

研究終了報告書

「新規ウイルスによる光神経回路解析法を用いた摂食神経回路の解明」

研究期間：2017年10月～2021年3月

研究者：近藤 邦生

1. 研究のねらい

脳内の神経回路は体内と体外の様々な情報を統合して判断を下し、状況に応じた行動と体内の生理的反応を引き起こす。例えば摂食行動は動物の生存に必須の行動だが、脳は外界から食物の情報などを得て、同時に体内のエネルギー状態などの生理的状态を感知し、摂食行動を制御する。脳において摂食に関わる神経細胞群が同定されている。しかし、体内外の情報を取り入れてそれらの神経細胞を制御する神経回路網はあまりよく分かっていない。

摂食行動を制御する神経回路が未解明なのは、特定の神経細胞を制御する上流の神経細胞の機能解析が未だに難しいことが理由の一つである。近年の光を用いた技術の進歩により、自由行動下マウスの特定の神経細胞群について、神経の活動状態をリアルタイムで観察する技術、あるいは人為的に神経活動を活性化・不活性化する技術が実用化され、特定の神経細胞の機能に対する理解が進んでいる。並行して、シナプス結合を介して輸送される経シナプス性ウイルストレーサーを用いて上流の接続する神経細胞を同定する技術が実用化され、神経回路の構成に対する理解も飛躍的に進んでいる。しかしながら、経シナプス性ウイルストレーサーと光を用いた神経細胞の解析法を組み合わせることはウイルス感染が毒性を持つために難しく、そのため特定の神経細胞を制御する上流の神経細胞を、光によって解析・制御する研究はまだあまり行われていない。

本研究では、これまで経シナプス性ウイルストレーサーとして用いられてきた仮性狂犬病ウイルスおよび狂犬病ウイルスを改変し、光による神経細胞の解析法と組み合わせることができる新たなウイルストレーサーを開発する。そして、そのウイルストレーサーと光による神経細胞の解析技術を組み合わせることにより、摂食に関わる神経回路の制御機構を明らかにする。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、まず細胞毒性の無い単シナプス性経シナプス性ウイルストレーサーの作成を行った。そのために、PRVの超初期遺伝子であるIE180を欠損した新しいPRVベクターを作成する実験系を構築し、様々な外来遺伝子を組み込んだPRVを作成した。これらウイルスは培養細胞への感染実験において、IE180依存的に増殖し、ウイルスを産生した。このウイルスベクターを脳の神経細胞に感染させたところ、4週間以上感染細胞数が変化せず、安定的に外来遺伝子を発現できた。また、外来遺伝子の発現が、遺伝子発現カセットの挿入位置に影響されることを見出し、長期的に外来遺伝子を発現できる挿入位置を同定した。次に、Creリコンビナーゼ依存的にIE180を発現するアデノ随伴ウイルス(AAV)を作成し、Cre発現神経細胞にIE180欠損PRVと共感染させたところ、Cre発現神経細胞に投射する上流の神経細胞へのPRV感染が確認された。この感染はPRV接種後5週間以上維持されたことから、細胞毒性の低い単シナプス性トレーサーの作成に成功したことが示唆される。本研究では、さらに2

シナプス性神経シナプス性トレーサーの開発を行い、このトレーサーの開発に繋がる重要な知見を得た。安定的に任意の遺伝子を発現できる経シナプス性トレーサーは、世界で初めて開発に成功したものであり、このトレーサーを改良して摂食神経回路など様々な神経回路の解明につながる事が期待できる。

(2) 詳細

研究テーマ A. 細胞毒性の無い単シナプス性ウイルストレーサーの開発

本研究テーマでは、図1で示す単シナプス性ウイルストレーサーの作成を行った。IE180 は PRV の感染超初期に発現する遺伝子であり、IE180 を欠損したウイルスは感染細胞に毒性を示さない。Cre 依存的に IE180 を発現するヘルパーウイルスと IE180 欠損 PRV を Cre 発現細胞に共感染させると、ヘルパーウイルス由来の IE180 を用いて新たな PRV が産生され、PRV (IE180 を欠損している) は上流の神経細胞へ感染する。しかし、上流の神経細胞には IE180 が発現しないため、感染した PRV は新たなウイルスを産生できず、さらに上流の神経細胞へのウイルス感染は起こらない。したがって、IE180 欠損 PRV は Cre 発現細胞に直接投射する神経細胞に安定的に目的遺伝子を発現する単シナプス性トレーサーとして機能する。

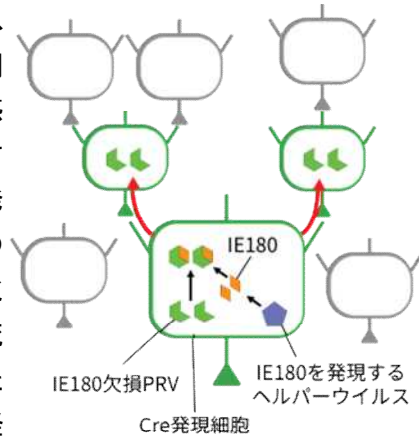


図1 PRVを用いた細胞毒性の無い単シナプス性トレーサーの概略図

A-1. 安定的に外来遺伝子を発現できる IE180 欠損 PRV の開発

まず IE180 欠損 PRV を作成するための細胞株を樹立した。次に IE180 を欠損した PRV ゲノムを持つ BAC コンストラクトをプリンストン大学の Esteban Engel 博士より供与いただき、tdTomato を発現する遺伝子発現カセットをウイルスゲノム中に組み込んだ。PRV は 140 kb のゲノムを持ち、ウイルスゲノム上のどの位置に外来遺伝子を組み込むのが重要である。そこで gG と LLT という二つの領域に遺伝子発現カセットを組み込んだウイルスを作成した。これらのウイルスを培養細胞に感染させたところ、IE180 を発現しない細胞においてはウイルス感染細胞が死滅せず、一方で IE180 を発現する細胞においては細胞が死滅し、培養上清中にウイルス粒子が放出されることを確認した(図2)。この結果から、培養細胞レベルにおいて、IE180 を用いたウイルスの増殖と感染毒性の制御が可能であることが明らかになった。

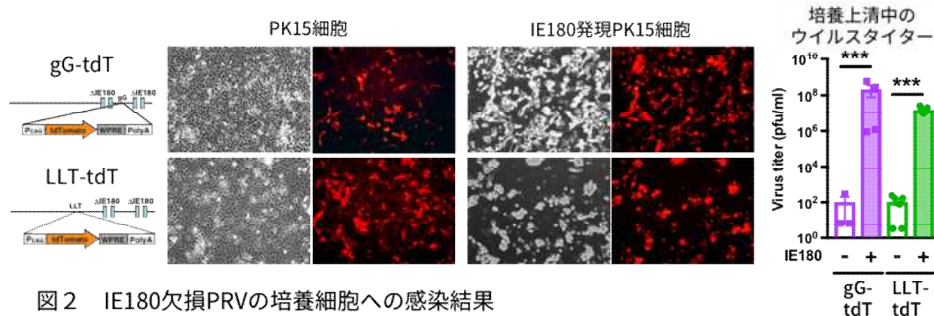


図2 IE180欠損PRVの培養細胞への感染結果

これらのウイルスを脳へ接種し、tdTomato の発現を解析した。その結果、ウイルス接種 28

日後において多くの神経細胞にtdTomatoが発現していることが観察された。また、作成した2種類のウイルスを比較したところ、LLTに遺伝子を組み込んだウイルスの方がtdTomato発現細胞の数が多かったことから、今後はLLTに様々な外来遺伝子を組み込むことにした。次にCreリコンビナーゼ依存的にtdTomatoを発現するIE180欠損PRVを作製した。このウイルスの感染細胞への影響を調べるため、視床下部腹内側核(VMH)に特異的にCreリコンビナーゼを発現するSF1-CreマウスのVMHへウイルスを接種し、感染細胞数の変化を解析した。その結果、IE180欠損PRV感染細胞の数が、ウイルス感染4週間後においても全く変化しないことが観察された(図3)。また、蛍光タンパク質の発現は8週間以上観察された。一方で、比較対象として狂犬病ウイルス(RV)を接種した場合は、感染2週間後にウイルス感染細胞数の著しい減少が見られた。また、これまでの研究から、野生型PRVに感染した神経細胞の生存期間は4-5日であることが分かっている。したがって、この結果はIE180欠損PRVの感染毒性が従来の経シナプス性ウイルスに対して著しく低いことを示している。先行研究では、IE180欠損PRVが細胞毒性を減少させることは観察していたが、ウイルス感染細胞への蛍光タンパク質の発現には成功しておらず(Oyibo et al. 2014, Front. Neuroanat.)、この結果は世界初の成果である。この結果を元に、Cre依存的にChR2やGCaMP6を発現するPRVを作製し、これらのウイルスも目的の遺伝子を安定的に発現することを確認した。

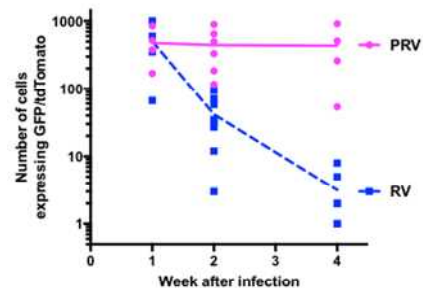


図3 IE180欠損PRVとRVG欠損RVのウイルス接種後の感染細胞数の変化

A-2. IE180を発現するヘルパーウイルスの作成

IE180は全長4.3 kbの長い遺伝子であることから、アデノ随伴ウイルス(AAV)に組み込むことは困難だと予想された(一般的にAAVへ組み込むことができるDNAの長さ(プロモーターなどを含む)は最大5 kb程度だと考えられている)。そこでIE180を発現するレンチウイルスの作成を試みたが*in vivo*で効率よくIE180を発現するウイルスを作製できなかった。一方、同じ領域のさきがけ研究者でAAVの専門家である本領域1期生の井上謙一研究者が、5 kbを超える外来遺伝子をAAVに組み込むことに成功していたため、井上研究者との共同研究でIE180発現AAVの作成を試みたところ、IE180を発現するAAVの作成に成功した。さらに、Creリコンビナーゼ依存的に比較的高効率でIE180を発現するAAVの作成にも成功した。

A-3. 安定的単シナプス性トレーサーの構築

上記のIE180欠損PRVおよびIE180発現AAVを細胞に共感染することで、安定的単シナプス性トレーサーとして機能するか検討を行った。脳

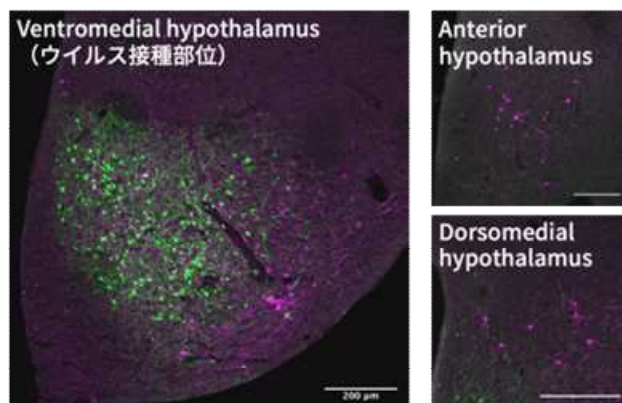


図4 IE180発現AAV(緑)とIE180欠損PRV(赤)を神経細胞に共感染させた後のウイルス感染細胞の様子(PRV接種5週間後)

領域特異的に Cre リコンビナーゼを発現するマウスに AAV と PRV を共感染させると、AAV 依存性、つまり IE180 の発現依存的にウイルス感染の広がりが観察された(図4)。また、PRV の感染 5 週間後においてもこのような輸送された PRV に感染した細胞が観察されたことから、PRV が目的の細胞に投射する神経細胞に安定的に蛍光タンパク質を発現できていることが示唆され、安定的単シナプス性トレーサーの構築に成功したと考えられた。

研究テーマ B. 2 シナプス性ウイルストレーサーの開発

従来用いられている狂犬病ウイルスを用いて、PRV IE180 を Cre 発現細胞とその 1 次上流ニューロンに発現させ、さらに非増殖型 PRV を共感染させることにより、Cre 発現細胞の 2 次上流ニューロンまで感染する、2 シナプス性ウイルストレーサーを開発することを目的とした。そのため、IE180 を発現する狂犬病ウイルスの作成に取り組んだが、IE180 を発現するウイルスを作出することができなかった。外来遺伝子を発現する新しい狂犬病ウイルスの作出には成功したことから、ウイルス作出の実験系に問題はなく、IE180 という遺伝子自体に問題がある可能性がある。実際 IE180 の全長(4.3 kb)は、これまでに報告された狂犬病ウイルスに組み込まれた遺伝子よりも長く、また、異なるウイルス由来の遺伝子のため、狂犬病ウイルスの作成を阻害した可能性も考えられる。

研究テーマ C. 摂食に関わる神経回路の光を用いた解析

摂食行動は視床下部弓状核に存在する AgRP 発現神経細胞(AgRP ニューロン)が重要な役割を果たすことが分かっている。AgRP ニューロンを光遺伝学を用いて活性化すると摂食量が増加する。また、空腹時に AgRP ニューロンの神経活動が上昇し、摂食によりその上昇が抑制されることが報告されている。PRV と光を用いて、AgRP ニューロンを制御する神経回路を解析するため、オプトジェネティクスとカルシウムイメージング(ファイバーフォトメリー)の実験系を立ち上げた。AAV を用いた解析の結果、上記に示した AgRP ニューロンの活性化による摂食亢進と、摂食による AgRP ニューロンの活性変化を確認することができた。

3. 今後の展開

本研究により、IE180 欠損 PRV を元にした細胞毒性の少ない単シナプス性ウイルスペクターが原理的には開発可能であるということが示された。今後は、以下の 2 点の研究を進めることにより、このウイルスペクターの性質を確認する。まず、このウイルスペクターが本当に細胞毒性を持たないのかどうかを確かめるために、ウイルス感染細胞の生理学的解析を行う。さらに、チャンネルロドプシンやカルシウムセンサーを発現するウイルスペクターを用いて上流の神経細胞にこれらのタンパク質を発現させ、ウイルス感染細胞の光操作が可能であることを確認する。これらの解析で問題がなければ、世界初の細胞毒性のない単シナプス性ウイルスペクターの開発に成功したといえる。

今後はウイルスペクターを用いて、研究者の専門分野である摂食・代謝を司る神経回路の解明を進めていく。また、このウイルスペクターをできるだけ多くの研究者に広めるため、精製プロトコルの最適化や簡易化、ウイルスの配布方法の確立などを行い、神経科学研究全体の発展に貢献したい。

4. 自己評価

研究期間内の論文発表には至らなかったものの、毒性のない安定的単シナプストレーサーの作成にはほぼ成功しており、最低限の目標は達成できたと考えている。経シナプス性トレーサーを使用するための書類手続きとIE180を発現するヘルパーウイルスを作成することに予定より時間がかかってしまったが、当初の計画から大幅に変更することなく研究を遂行でき、予定通りに研究費を執行できた。研究実施体制としては、優秀な研究補助者を雇用することができ、効率的に研究を遂行できた。本研究で開発した安定的単シナプストレーサーは、国際的にみても前例のない革新的なウイルスベクターであり、世界の神経回路研究者の研究に貢献することが期待できる。また、本研究を通じて、新しい PRV の効率的な作成法、高濃度ウイルスの精製法など PRV を用いた神経回路研究に必要な基礎技術を確立することができた。今後はこれらの独自技術をもとに、PRV を用いた神経回路解析をさらに進めることができる。似た技術をもつ研究者は世界的にも少ないため、「日本発」の技術で世界の神経回路解析をリードしていきたい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:0件

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0件(特許公開前のものも含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

受賞

平成 31 年度科学技術分野の文部科学大臣表彰・若手科学者賞、「ストレス応答を担う中枢神経回路の研究」、2019 年 4 月

英文総説

Li J, Liu T, Dong Y, Kondoh K#, Lu Z#. “Trans-synaptic Neural Circuit-Tracing with Neurotropic Viruses.” (2019) *Neurosci. Bull.* 35:909–920. (#共同責任著者) [査読有]

日本語総説

近藤邦生、「越シナプス性ウイルストレーサーにより明らかになった生理的応答を制御する神経回路」(2020) *YAKUGAKU ZASSHI* 140:985–992. [査読有]