

## 論文の内容の要旨

### 論文題目 : **Genetic transsynaptic tracing of neural pathways using 2A-based bicistronic lentiviral vectors in rats and monkeys**

(2 シストロン性レンチウイルスベクターを用いたラット及びサルにおける神経回路の遺伝学的経シナプス追跡法の開発)

氏名 : 大橋陽平

複雑な神経細胞間の結合様式の解明を目指した研究は、古くから神経解剖学分野の中心の一つとされてきた。90年代以降、遺伝子工学技術の爆発的な進歩により、特定の神経回路を対象とした様々な遺伝学的介入が可能となってきた(Luo et al., 2008)。一方で、小麦胚芽レクチン (Wheat germ agglutinin; WGA) 蛋白は、経シナプス性神経回路トレーサーとして、これまでに多くの研究で使用されてきており、効率良くシナプスを越えて神経細胞間を運搬されることが示されている(Fabian and Coulter, 1985)。これを発生工学的手法と組み合わせることで、特定の神経回路の選択的可視化が可能となっている(Yoshihara et al., 1999)。例えば、特定のタイプの神経細胞のみにおいて働く遺伝子プロモーターの制御下で WGA トランスジーンを発現させることで、それら神経細胞群及びそれらと投射関係にある神経細胞群を選択的に WGA でラベルすることができる。しかしながら、発生工学的手法を適用できる動物種は限られており、認知機能の研究対象として用いられてきたマカクサル等 (Miyashita, 2004) には適用できない。そこで、本研究においては、WGA トランスジーンの *in vivo* への遺伝子導入のツールとして、レンチウイルスベクターの使用を検討した。レンチウイルスベクターは、神経細胞のような非分裂細胞に対しても感染が可能であり、少なくとも 9kb までの長いインサートを搭載でき、標的細胞のゲノムに目的の配列が組み込まれることで目的遺伝子等の長期発現が可能であるという神経科学研究に適した特性を有している(Bjorklund et al., 2000)。また、そのエンベロープを水疱性口内炎ウイルス G 糖蛋白 (vesicular stomatitis virus G protein; VSV-G) に置換 (pseudotyping) することで、大きな炎症反応または免疫応答を引き起こすことなく、神経細胞指向性の遺伝子導入が可能である(Trono, 2000; Duale et al., 2005)。さらに本研究においては、WGA トランスジーン搭載レンチウイルスベクターの開発にあたり、ピコルナウイルス由来の 2A 配列(De Felipe et al., 2006)を用いて、WGA と GFP の共発現が可能なシステムを構築した。これにより対象となる神

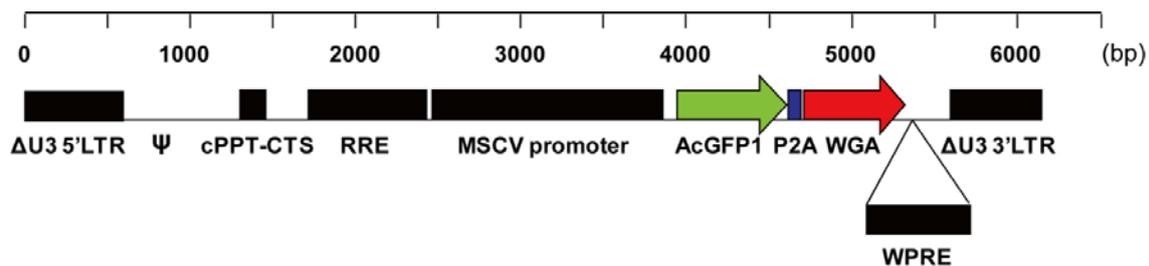


図1 本研究で用いられた HIV-1 由来レンチウイルスベクターの配列模式図

レンチウイルスベクターのバックボーンは、St. Jude Children's Research Hospital(Dr. Arthur W. Nienhuis)から供与を受けた。3' long terminal repeat (3'LTR)の U3 region を除去することにより、LTR のプロモーター活性を損なわせている (self-inactivating vector: SIN vector)(第三世代 HIV-1 ベクター)。マウス幹細胞ウイルス(murine stem cell virus: MSCV)プロモーターの下流に、AcGFP1 トランスジーンと truncated WGA トランスジーン(Yoshihara et al., 1999)を in-frame でピコルナウイルス由来 2A 配列を介して挿入している。

経回路を、シナプスを越えて神経細胞間を「動く」WGA と、感染神経細胞内に「静止する」GFP で、切り分けることを試みた。

本研究において開発した WGA/GFP 共発現レンチウイルスベクターシステムの配列模式図を示す (図1)。このトランスファーベクター及びパッケージングプラスミドを HEK293T 細胞にリン酸カルシウム法を用いてトランスフェクションすることで、ウイルス含有上清を得、さらに超遠心濃縮・精製を経て、高力価レンチウイルスベクター(GFP titer:  $>1.0 \times 10^9$  transducing units (TU)/ml)を得た。続いて、このレンチウイルスベクターにより、AcGFP1 と WGA の共発現が可能であることを実証するため、HEK293T 細胞に感染多重度(multiplicity of infection: MOI)10 にて感染させ、ウェスタンブロット法及び免疫細胞化学染色にて各蛋白質の発現を解析した。ウェスタンブロットでは、AcGFP1(27kDa)、WGA(18kDa)共に発現が確認できた。本レンチウイルスベクターでは、AcGFP1 と WGA は単一の open reading frame (ORF)内に位置し、1本の mRNA として転写され、翻訳の際に 2A 配列の自己プロセッシングを受け、1:1 の比率で別々の蛋白質として合成される。今回のウェスタンブロットでは、AcGFP1 と WGA の融合蛋白(推定分子量 45kDa)は観察されなかったことから、P2A 配列を介したペプチド切断の効率が非常に高いことが示された。一方で、免疫細胞化学染色においても、AcGFP1 と WGA の発現は確認できた。確認した全ての HEK293T 細胞において(310/310 cells)、AcGFP1 と WGA の共発現が認められた。また、同一の細胞内において、AcGFP1 は核と細胞質に一樣に分布しているのに対し、WGA は細胞質に凝集塊を形成していることから、AcGFP1 と WGA が別々の蛋白質として存在していることが示唆された。これらの結果から、本レンチウイルスベクターが、WGA/GFP 共発現レンチウイルスベクターとして、*in vitro* で機能しうることが明らかとなった。

次に、本 WGA/GFP 共発現レンチウイルスベクターが、実際に動物個体の脳内において、神経回路追跡ツールとして機能することを確認するため、まずはラットの小脳出力経路を対象としたウイルス接種実験を行なった。10 週令の Wistar rat の小脳第 6 小葉に対し、8  $\mu$ l の高力価(GFP titer:  $>1.0 \times 10^9$  TU/ml)ウイルス液を 200 nl/min にて注入し、7 日以上飼育した後、経心的灌流固定を行ない、摘出脳を免疫組織化学的解析の対象とした。摘出脳を蛍光実体顕微鏡で観察したところ、小脳第 6 小葉に沿って、強い GFP の蛍光が観察された (図 2)。傍矢状断切片の観察では、小脳第 5-6 小葉のプルキンエ細胞層及び分子層で、GFP の強い蛍光が認められ、その領域のプルキンエ細胞から小脳核へと投射する軸索の可視化も可能であった (図 2)。

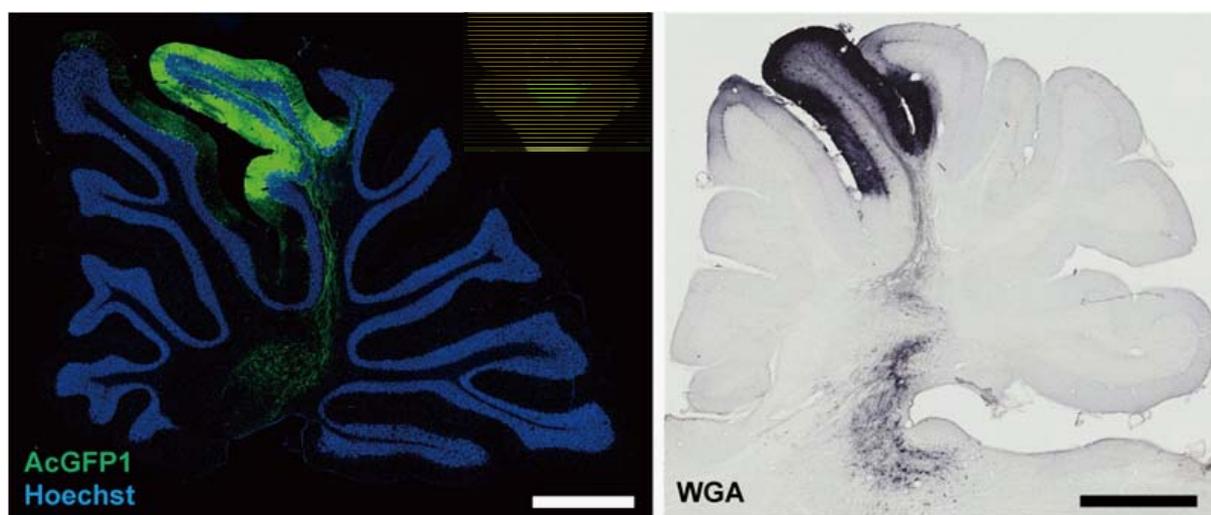


図 2 WGA/GFP 共発現レンチウイルスベクター接種後の小脳傍矢状断切片の免疫組織化学解析

(左) 小脳傍矢状断切片における AcGFP1 の発現。第 5-6 小葉のプルキンエ細胞層及び分子層に沿って、強い AcGFP1 の蛍光が観察できる。同領域のプルキンエ細胞から小脳核へ AcGFP1 陽性の軸索が観察できる。Inset: 灌流固定後の蛍光実体顕微鏡写真。第 6 小葉に沿って、約 5 mm 幅の AcGFP1 の強い蛍光帯が認められる。(右) 小脳傍矢状断切片における WGA の分布。AcGFP1 と同様に第 5-6 小葉に強い発現が認められ、また小脳核神経細胞の細胞体においても WGA の強い染色性が認められた。小脳プルキンエ細胞で産生された WGA が、シナプスを越えて、投射先である小脳核神経細胞の細胞体へ取り込まれたと考えられる。スケールバーはいずれも 1 mm。

一方で、抗 WGA 抗体を用いた免疫組織化学においても、同小葉において WGA の強い染色性が認められ、さらにはそのプルキンエ細胞の投射先である小脳核の神経細胞の細胞体においても、WGA の強い染色性が認められた (図 2)。これはプルキンエ細胞で産生された WGA が、軸索に沿って順行性に輸送され、シナプスを越えて、投射先である小脳核神経細胞の細胞体へと取り込まれたと考えられる。

続いて、GFP と WGA の二重染色を行なったところ、レンチウイルスベクターを接種した小脳皮質において、GFP と WGA の共発現が認められた。一方でその投射先である小脳核神経細胞においては、その細胞体内で WGA の分布が認められるものの、GFP は同細胞体を囲む軸索においてのみ認め

られた (図 3)。これにより、WGA/GFP 共発現レンチウイルスベクターは、*in vivo* においても共発現可能であり、WGA による経シナプス神経回路追跡、GFP による感染神経細胞 (一次ニューロン) とそこから投射を受けるニューロン (二次ニューロン) の区別が可能であることが示された。さらには、WGA/GFP 共発現レンチウイルスベクターにより、小脳係蹄小葉第 I 脚—小脳核外側核—視床外側腹側核の経路を、三次神経核まで追跡可能であること、大脳皮質第一体性感覚野から、同側視床後外側腹側核・同側第二体性感覚野・対側第一体性感覚野への追跡が可能であることを実証した。

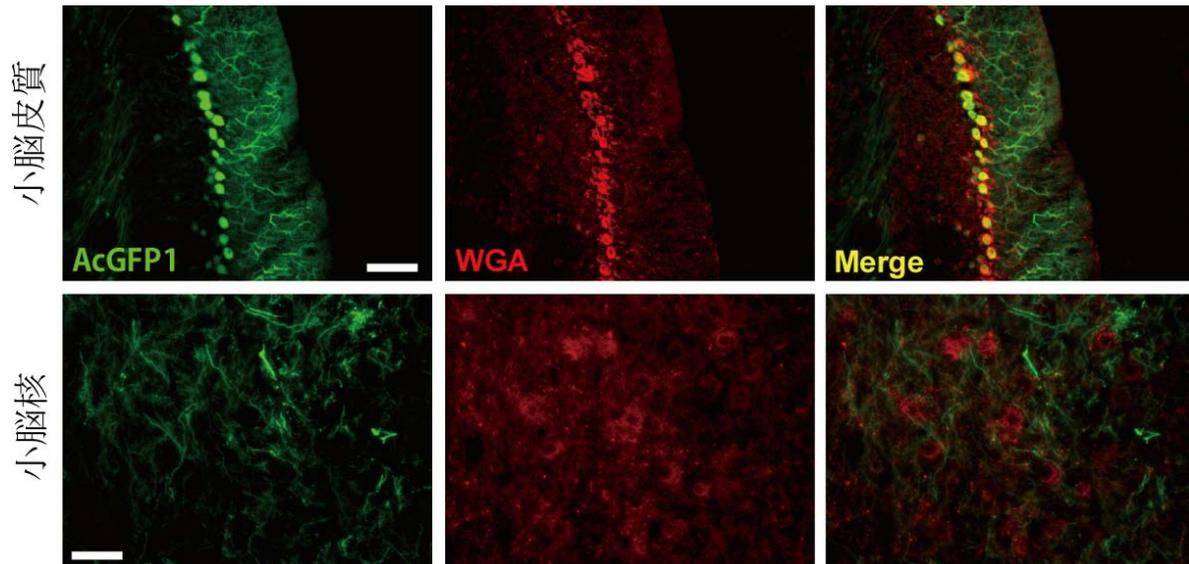


図 3 WGA/GFP 共発現レンチウイルスベクター接種後の小脳傍矢状断切片の蛍光二重染色

(上段) 小脳皮質における AcGFP1 と WGA の共発現。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。(下段) 小脳核における AcGFP1 と WGA の分布の乖離。WGA は神経細胞細胞体内に分布しているのに対し、AcGFP1 はそれを囲む軸索内のみ存在している。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$ 。

最後に、本システムが種を越えて、他の動物種でも適用可能であるかを検証するため、認知機能等の研究対象であるマカクサルでの神経回路追跡を試みた。ラットと同様小脳皮質へウイルスを接種したところ、14 日後に小脳核神経細胞において経シナプス性の WGA の取り込みが認められた。これにより、本 WGA/GFP 共発現レンチウイルスベクターシステムは、発生工学的手法が適用できないマカクサル等においても使用可能であるといえる。

本研究においては、2 シストロン性レンチウイルスベクターを用いて WGA と GFP を共発現させることで、種を越えて、任意の局所を起点とする神経回路の遺伝学的可視化を実現した。今後は、このシステムを用いて、マカクサル等、トランスジェニック動物の作出が困難とされる動物種において、脳高次機能の基本となる神経回路の構造が明らかにされることが期待される。