

[課程一 2]

審査の結果の要旨

氏名 大橋 陽平

本研究は、マカクサル等のような発生工学的手法が適用できない動物種において、神経回路の遺伝学的追跡を行なうことを目的として、経シナプス性トレーサーである小麦胚芽レクチン(WGA)のトランスジーンを搭載したレンチウイルスベクターの開発及び適用を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. ピコルナウイルス由来 2A 配列を介した AcGFP1 と WGA の共発現を目的とするレンチウイルスベクターを開発した。HEK293T 細胞にこのウイルスベクターを感染多重度(multiplicity of infection: MOI)10 にて感染させ、4 日後、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(27 kDa)、WGA(18 kDa)共に発現が確認でき、AcGFP1 と WGA の融合蛋白(推定 45 kDa)は確認できなかった。免疫細胞化学染色においては、同一細胞内で AcGFP1 と WGA の発現が確認でき、またそれらの局在は異なっていた。以上より、本ベクターは *in vitro* において、AcGFP1 と WGA の共発現が可能であることが実証された。
2. 上記 1. 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が、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、ラットの小脳第 6 小葉に接種した。接種後 7 日以上飼育し、組織学的検討を行なった結果、主に小脳第 6 小葉のプルキンエ細胞において、AcGFP1 と WGA の共発現が見られ、その投射先である小脳核・前庭神経核の神経細胞においては WGA の取り込みが認められた。これにより、本ベクターは *in vivo* において、感染した神経細胞（一次ニューロン）で AcGFP1 と WGA の共発現が可能であること、WGA はシナプスを越えて投射先の神経細胞（二次ニューロン）に運ばれること、AcGFP1 は一次ニューロン内に留まることが示された。
3. 本ベクターを用いて二次ニューロン以降の可視化が可能であるかを検討するため、ラットの小脳左係蹄小葉第一脚(Crus I)にベクターを接種し、100 日目に組織学的解析を行なった。WGA は、小脳左外側核内の二次ニューロンでの取り込みが認められ、さらにその投射先である右視床外側腹側核に分布が認められた。これにより三次神経核の可視化が可能であることが示された。
4. 本ベクターを用いて大脳皮質一次体性感覚野(SI)から始まる皮質視床路及び皮質間

連絡の可視化を試みた。接種後 28 日目において、投射先である同側の視床、同側の二次体性感覚野、対側の一次体性感覚野において WGA の取り込みが観察された。以上により、本ベクターは、皮質視床路及び皮質間連絡の可視化を目的として使用可能であることが実証された。

5. 上記 1-4. で使用された MSCV プロモーターの代わりに CMV プロモーターを搭載した WGA/GFP 共発現レンチウイルスベクターを開発した。これを用いて、上記 4. で可視化した回路を同様に可視化することができた。以上より、本ベクターは、実験者が実験系に応じて任意のプロモーターを搭載できることが示唆された。
6. 最後に本 WGA/GFP 共発現レンチウイルスベクターがマカクサルに適用可能であるかを検討した。二頭のマカクサルにおいて、小脳第 8 小葉にベクターを接種し、14 日後及び 28 日後に組織学的検討を行なった。二頭のサルにおいて、AcGFP1 と WGA の小脳第 8 小葉での共発現が認められ、WGA のみシナプスを越えて、投射先である小脳核の神経細胞に取り込まれている様子が観察できた。これにより、本ベクターはラットだけではなくマカクサルにおいても適用が可能であることが示された。

以上、本論文はマカクサルのような発生工学的手法が適用できない動物種においても有効な神経回路トレーサーとして、WGA/GFP 共発現レンチウイルスベクターを開発し、その有用性を実証した。本研究はこれまで未知に等しかったマカクサルの認知機能の基盤となる神経回路及び情報処理機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。