

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 脳機能ネットワークの全容解明プロジェクト
(英語) Brain Mapping by Integrated Neurotechnologies for Disease Studies
(Brain/MINDS)

研究開発課題名： (日本語) マーモセット脳機能研究に最適化した経路選択的操作とその基盤となる回路構造解析技術の開発
(英語) Development of technologies for pathway-specific manipulation and structural analysis of neural circuits aiming at functional brain research of common marmosets

研究開発担当者 (日本語) 医学部 教授 小林和人
所属 役職 氏名： (英語) Fukushima Medical University School of Medicine, Professor,
Kazuto Kobayashi

実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究 (日本語) 経路選択的な神経回路解析基盤技術の開発とマーモセット脳解析への最適化
開発課題名： (英語) Development and optimization of anatomical tools for pathway-specific circuit analysis in marmoset brains

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人 北海道大学 大学院医学研究科 准教授 山崎美和子
所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Medicine, Hokkaido University, Associate Professor,
Miwako Yamasaki

II. 成果の概要 (総括研究報告)

和文

研究開発代表者のグループは、マーモセット脳内の各種神経路への HiRet/NeuRet ベクター導入効率を検討した。FuG-B2 あるいは FuG-E を用いてシュードタイプ化したウィルスベクターを作製し、両者のゲノム力価をそろえてマーモセット脳内へ注入し、免疫染色により脳領域への導入効率を解析した。脳内注入は、京都大学霊長類研究所の中村・高田グループとの共同研究として行った。免疫組織解析の結果、黒質緻密部(SNc)、視床 (CM-Pf)、大脳皮質(area6D)のいずれの領域においても FuG-E ベクターが FuG-B2 ベクターに比較して、1.4-2.3 倍の高い効率で遺伝子導入されることが明らかとなった。また、

ゲノム力価自身も、FuG-E ベクターが FuG-B2 ベクターに比較して顕著に高いことが示され (GFP 搭載の場合、7.2 倍、RFP 搭載の場合、5.0 倍)、ベクター生産効率、導入効率ともに、FuG-E ベクターがマーモセット脳内への遺伝子導入には最適であると結論付けた。

黒質線条体路の経路除去と伝達遮断の技術を用いてパーキンソン病モデルの開発に取り組んだ。経路除去技術では、NeuRet-IL2R α /EGFP ベクターを線条体に注入し、組み換え体イムノトキシンを黒質に注入することによって、黒質線条体経路を除去する。伝達遮断技術では、NeuRet-TRE-TeNT/EGFP ベクターを線条体に注入し、rtTA 因子を発現する AAV ベクターを黒質に注入することによって、破傷風菌毒素を Dox 処理に依存して黒質線条体路に発現させる。NeuRet-IL2R α /EGFP、NeuRet-TRE-TeNT/EGFP、AAV-rtTA ベクターを調製し、注入の準備を整えた。京都大学霊長類研究所との連携により、これらのベクターをマーモセット線条体に注入する予定であったが、MRI の修繕のため注入を延期した。今後できるだけ早い段階で、黒質線条体路の除去や伝達遮断を誘導し、本経路の機能不全に基づく行動障害について評価する計画である。光遺伝学の応用について、理化学研究所・山森グループとの連携により、大脳皮質(area 9)から尾状核に投射する神経路の解析を行った。NeuRet-Cre ベクターを線条体に注入し、Cre-loxP 組み換えを介して ChR2-EGFP を発現する AAV ベクターを大脳皮質に注入した。TissueCyte を用いて ChR2-EGFP の発現を解析し、皮質 9 野から線条体に入力する経路の投射マップを明らかにした。化学遺伝学への応用について、FuG-E を用いた NeuRet-Cre ベクターをマウス線条体に注入し、Cre-loxP 組み換えを介して hMD1-EGFP を発現する AAV ベクターを大脳皮質 (運動野) に注入し、皮質線条体路において、hMD1-EGFP 遺伝子の発現の誘導されることを確認した。

遺伝子発現解析・遺伝子発現技術班の班長として、革新脳推進会議やプロジェクト推進委員会に出席し、プロジェクト全体の進捗状況を把握するとともに、プログラムディレクター、プログラムオフィサー、プロジェクトリーダーと密な連携をとった。遺伝子発現解析・遺伝子発現技術班では、スカイプ会議あるいはメール会議により、年度初めの研究打ち合わせと全体の報告会前に進捗報告を行い、班内での連携を深めた。

分担機関である国立大学法人北海道大学では、霊長類 (マーモセット) の脳構造・機能マップの作成または解析技術の開発を補完・加速するための個別技術課題として、経路選択的な神経回路解析基盤技術の開発とマーモセット脳解析への最適化を目的とした技術開発を行った。平成 28 年度は、平成 26 年度より開始した以下の研究項目①を完成させ、既に完了した研究項目② (マーモセット神経回路の入出力特性を特定するための多重標識法の開発) の成果をマーモセット脳に応用して研究項目③を推進した。

研究項目①マーモセット脳における神経化学マップ作製のための技術開発

平成 28 年度は、マーモセット脳の神経化学特性を可視化するための 5 種類のマーカー抗体 (小胞膜グルタミン酸トランスポーター-VGluT3, セロトニントランスポーター-HTT, グリシントランスポーター-GlyT2, ドーパミン合成酵素 DBH, ドーパミントランスポーター-DAT) に対する特異抗体開発を行った。このうち VGluT3, HTT, GlyT2, DBH の 4 種については特異抗体の作成に成功した。ドーパミン作動性線維を可視化するための DAT については特異的抗体を得ることができなかったが、その代替策としてチロシン水酸化酵素 (TH) 抗体を使った可視化で代用可能であることが分かった。従って 3 年間で 9 種類の抗体とリポプローブの開発を完了し、マーモセット脳での代表的な神経伝達物質経路のニューロンを可視化するためのツール開発を全て完成させることができた。

研究項目③マーモセット神経回路の形態学的可視のための技術開発

項目①で開発したプローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーション法により、マーモセット成体脳における VGluT1, VGluT2, VGluT3, GAD67, CHT, HTT, DBH, DAT の 8 種類の分子の mRNA 発現細胞

マップ構築を完了した。また項目①で開発したマーカー抗体を用いた免疫組織化学法により、マーモセット成体脳におけるタンパク質レベルでの神経化学データを収集した。マーモセット脳は、京都大学霊長研の中村・高田グループより供与を受け、理研下郡・郷グループと連携し mRNA 発現データマップ公開に取り組んだ。現在までに VGluT1-3, GAD67, CHT, DBH, DAT VGluT3, HTT の 8 種類の mRNA 発現細胞マップが公開されている (<https://gene-atlas.bminds.brain.riken.jp/>)。当初予定していた GlyT2 mRNA については発現分布の信頼性が疑わしかったため、マップ作成を目指しプローブの再作成中である。また当初の計画では、小林グループが開発したウイルスベクターにより回路選択的標識されたマーモセット脳サンプルに対し、開発した抗体やリボプローブを適用して神経化学特性や入出力解析を行う予定であったが、京大・霊長研の MRI の修繕によるベクター注入延期のため、脳サンプルが入手できなかった。今後ベクター注入マーモセット脳サンプルが得られ次第、検討を行う予定である。

英文

Kobayashi's group investigated the efficiency of retrograde gene transfer of HiRet/NeuRet vectors in marmoset brains. Pseudotyped lentiviral vectors with FuG-B2 and FuG-E were prepared and injected with equivalent genome titers into the striatum of the marmosets to evaluate the gene transfer efficiency by using immunohistochemistry. Intracranial injection of the vectors was performed as a collaboration with Nakamura's and Takada's groups in the Primate Research Institute of Kyoto University. Immunohistochemical analysis indicated that FuG-E vector, as compared with FuG-B2 vector, shows 1.4-2.3-fold higher efficiency of gene transfer into various brain regions, such as the substantia nigra pars compacta (SNc), intralaminar thalamic nucleus (CM-Pf), and cerebral cortex (area 6D). The genome titer was also greater in FuG-E vector than FuG-B2 vector (7.2 fold for GFP transgene and 5.0 fold for RFP transgene). Therefore, we concluded that FuG-E-pseudotyped vector exhibits the higher efficiency of retrograde gene delivery in the marmoset brains.

We tried to develop animal models for Parkinson disease by using pathway targeting and transmission silencing of the nigrostriatal system. In the pathway targeting strategy, the NeuRet-IL2R α /EGFP vector is injected into the striatum and the recombinant immunotoxin is injected into the substantia nigra, resulting in the deletion of nigrostriatal pathway. In the transmission silencing strategy, the NeuRet-TRE-TeNT/EGFP vector is injected into the striatum and AAV vector encoding rtTA transgene is injected into the substantia nigra, leading to the expression of tetanus neurotoxin in the nigrostriatal system dependent on Dox treatment. The NeuRet-IL2R α /EGFP, NeuRet-TRE-TeNT/EGFP, and AAV-rtTA vectors were prepared. Although we planned to inject these vectors into the marmoset striatum as a collaboration with the Primate Research Institute of Kyoto University, the experiments were postponed due to the repair of the MRI. We will perform the experiments for pathway targeting and transmission silencing to evaluate the behavioral changes based on functional impairments of the nigrostriatal pathway. We collaborated with Yamamori's group of RIKEN to apply optogenetic approach to analyze the projection map of corticostriatal pathway from the area 9. The NeuRet-Cre vector was injected into the striatum and AAV vector that expresses ChR2-EGFP based on Cre-loxP recombination was injected into the area 9. TissueCyte analysis showed the expression pattern of ChR2-EGFP, indicating the projection map of the area 9-derived corticostriatal pathway. In addition, we tried to apply chemogenetic approach for functional analysis of corticostriatal pathway. The NeuRet-Cre vector with FuG-E was injected into the mouse striatum and AAV vector encoding hMD11-EGFP under the control of Cre-loxP recombination was injected into the motor cortex (M1), resulting in the expression of hMD11-EGFP in the M1-derived corticostriatal pathway.

Kobayashi worked as a leader of the gene expression analysis and technology group and

attended the project meeting to understand the progress of the whole project and to communicate closely the project director, program officer, and project leaders. In the gene expression analysis and technology group, we had the skype or e-mail meeting at the beginning of each year and prior to the progress meeting to build up a close connection with each other.

Yamasaki's group aimed to develop the appropriate technology for pathway-specific manipulation of neural function and detailed analysis of structure and neural circuit in the marmoset brain. In the fiscal year 2016, we produced specific antibodies against four marker molecules: type 3 vesicular glutamate transporter (VGluT3), serotonin transporter (HTT), glycine transporter 2 (GlyT2), and dopamine beta-hydroxylase (DBH). Although a specific antibody against dopamine transporter (DAT) was not obtained, we were able to visualize dopaminergic neurons in the marmoset brain samples by using an anti-TH antibody. Therefore, we have set up nine riboprobes and antibodies that can be used for detailed analysis of major neurotransmitter systems in the marmoset brain.

By *in situ* hybridization using specific riboprobes for neurotransmitter transporters and synthetic enzymes, we also developed a detailed map of major neurotransmitter systems in the marmoset brain, including glutamate (VGluT1–3), GABA (GAD67), acetylcholine (CHT), dopamine (DAT), norepinephrine/epinephrine (DBH) and serotonin (HTT). Expression maps of eight mRNAs (VGluT1–3, GAD67, CHT, DBH, DAT, and HTT) are now available online (<https://gene-atlas.bminds.brain.riken.jp/>). Because we found that a riboprobe for GlyT2 did not work in marmoset samples, we will continue developing a specific riboprobe and complete mapping. We also applied specific antibodies to marmoset brain samples and obtained a detailed information about their distribution patterns. However, we were not able to extend above histological analysis to vector-injected marmoset samples, because of the unexpected repair of MRI in Primate Research Institute of Kyoto University and the resultant delay of injection experiment. Now we rescheduled the injection experiment and will perform experiments as soon as the brain samples are obtained. Nakamura's and Takada's groups in the Primate Research Institute of Kyoto University provided us with adult marmoset brain samples, and Shimogori's and Go's groups at RIKEN BSI helped us to produce a high-resolution atlas.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 5 件)

1. Kobayashi K, Kato S, Inoue K, Takada M, Kobayashi K. Altering entry site preference of lentiviral vectors into neuronal cells by pseudotyping with envelope glycoproteins. *Methods Mol. Biol.* 1382 : 175-186 (2016).
2. Ichikawa R, Sakimura K, Watanabe M: GluD2 endows parallel fiber–Purkinje cell synapses with a high regenerative capacity. *J Neurosci*, 36:4846-4858 (2016).
3. Yamasaki M, Fukaya M, Yamazaki M, Azechi H, Natsume R, Abe M, Sakimura K, Watanabe M: TARP γ -2 and γ -8 differentially control biased AMPAR density across Schaffer collateral/commissural synapses in the hippocampal CA1. *J Neurosci*, 36:4296-4312 (2016).
4. Ichikawa R, Hashimoto K, Miyazaki T, Uchigashima M, Yamasaki M, Aiba A, Kano M, Watanabe M: Territories of heterologous inputs onto Purkinje cell dendrites are segregated by mGluR1-dependent parallel fiber synapse elimination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 113:2282-2287 (2016).
5. Kobayashi, K., Kato, S., and Kobayashi, K. (2017) Genetic manipulation of specific neural circuits by use

of a viral vector system. J. Neural Transm. (in press)

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Use of an optimized chimeric envelope glycoprotein for enhancement of the efficiency of retrograde gene transfer of a pseudotyped lentiviral vector in the primate brain. (ポスター発表) Inoue K, Tanabe S, Tsuge H, Ueno T, Nagaya K, Fujiwara M, Sugawara M, Kato S, Kobayashi K, Takada M. The 39th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 20-22 July 2016, Yokohama (国内)
2. Comparison of the efficiency of retrograde gene transfer between lentiviral vectors pseudotyped with FuG-E and FuG-B2 glycoprotein in primate brains: Striatal input system. (ポスター発表) Tanabe S, Uezono S, Tsuge H, Fujiwara M, Nagaya K, Sugawara M, Miwa M, Konoike N, Kato S, Nakamura K, Kobayashi K, Inoue K, Takada M. The 39th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 20-22 July 2016, Yokohama (国内)
3. Comparison of the efficiency of retrograde gene transfer between lentiviral vectors pseudotyped with FuG-E and FuG-B2 glycoprotein in primate brains: Cortical input system. (ポスター発表) Tsuge H, Uezono S, Tanabe S, Fujiwara M, Nagaya K, Sugawara M, Miwa M, Konoike N, Kato S, Nakamura K, Kobayashi K, Inoue K, Takada M. The 39th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 20-22 July 2016, Yokohama (国内)
4. The lentiviral vector pseudotyped with FuG-E glycoprotein is more suitable, compared with FuG-B2, for retrograde gene transfer in the cortical input system of primate brains. (ポスター発表) Tsuge H, Uezono S, Tanabe S, Fujiwara M, Sugawara M, Miwa M, Konoike N, Kato S, Nakamura K, Kobayashi K, Inoue K, Takada M. The 6th Annual Meeting of Japan Society for Marmoset Research. 12-14 December 2016, Bunkyo-ku, Tokyo (国内).
5. Difference in efficiency of retrograde gene transfer and cytotoxicity between lentiviral vectors pseudotyped with FuG-E and FuG-B2 glycoproteins in primate brains. (ポスター発表) Sugawara M, Tanabe S, Uezono S, Tsuge H, Fujiwara M, Miwa M, Konoike N, Kato S, Nakamura K, Inoue K, Takada M, Kobayashi K. The 6th Annual Meeting of Japan Society for Marmoset Research. 12-14 December 2016, Bunkyo-ku, Tokyo (国内).
6. マウス線条体シナプスの AMPA 受容体密度は細胞種や出入力経路によらず一様である, (口頭発表), 山崎美和子、宋曉紅、渡辺雅彦, 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2017/3/28 長崎県長崎市 (国内)

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし。

(4) 特許出願

該当なし。