

# 研究報告書

## 「局所コネクティクス: 抑制性局所神経回路発達の細胞種特異的解析」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年10月～平成27年3月

研究者: 谷口 弘樹

### 1. 研究のねらい

脳の高次機能を担う大脳皮質を構成する神経細胞には、大きく分けて、興奮性、抑制性の二種類の細胞が存在する。興奮性錐体細胞は、異なる大脳皮質層、大脳領野、脳領域間の信号伝達を担うのに対し、抑制性神経細胞は局所回路を形成し、細胞レベル、回路レベルで神経活動の時空間パターンを制御している。脳内で情報は神経活動の時空間パターンとして表現されると考えられている。従って、抑制性神経細胞の機能、解剖、回路発達を明らかにすることは、大脳の機能、構築原理を理解するうえで極めて重要である。

興味深いことに、抑制性神経細胞には多様なサブタイプが存在し、それぞれのサブタイプは異なる解剖学的、電気生理学的特性を持っている。この多様性が、異なる抑制様式を与え、多様な神経活動パターンの生成に貢献し、神経回路が行う複雑な演算を可能にしていると考えられている。しかしながら、これまで、抑制性神経細胞サブタイプの機能、特にその基盤となる解剖学的特性に関する知見は、技術的困難から限られたものしかなかった。

大脳皮質錐体細胞は、各細胞区画(樹状突起、細胞体、軸索起始部)に決まった抑制性神経細胞サブタイプから局所入力を受けることが知られている。しかしながら、錐体細胞に入力する抑制性神経細胞サブタイプの層分布、カラム分布といった解剖学的詳細は全く明らかになっていない。また、抑制性神経細胞サブタイプの細胞区画特異的神経支配に至る発達過程もほとんど不明である。このような抑制性神経細胞サブタイプの解剖学的詳細、発達を明らかにすることは、その機能を解明するためにも必須の課題である。

本研究では、大脳皮質錐体細胞に入力する抑制性神経細胞をサブタイプ特異的に標識する遺伝学的技術を開発し、抑制性局所神経回路の結合様式、発達様式を体系的に明らかにするための基盤を確立する。本研究により、これまで全く未知であった、単位回路における抑制性神経細胞サブタイプの空間編成、さらに細胞区画特異的神経支配の発達過程が明らかになっていくことが期待される。さらに、ここで開発された方法を精神疾患モデルマウスに適用することにより、これまで知られていなかった、抑制神経系における病理、病態が明らかになり、新たな治療法の開発につながる可能性が考えられる。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

大脳皮質抑制性神経細胞には、固有の解剖学的、電気生理学的特性を持つ極めて多様なサブタイプが存在する。異なるサブタイプは結合相手に対して異なる型の抑制効果を及ぼし、多様な神経活動パターン生成に寄与していると考えられている。しかしながら、これまで、単位回路内における興奮性錐体細胞と抑制性神経細胞サブタイプの結合性に関する詳細は

技術的制約からほとんど不明であった。そこで本研究では、まず、組み替え酵素 Cre をサブタイプ特異的に発現するマウスと狂犬病ウイルスを用いた逆行性経1シナプス標識法を組み合わせることにより、第 II/III 層錐体細胞に入力する抑制性神経細胞をサブタイプ特異的に標識する方法を開発した。さらに、この方法を用いることにより、第 II/III 層錐体細胞は、第 II/III 層のみならず、第 IV 層、第 V 層に位置する Parvalbumin (PV)陽性抑制性神経細胞から入力を受けていることを見出した。本研究で確立された方法を、他のサブタイプ、他の層に位置する錐体細胞、他の脳領域に適用することにより、大脳における抑制性神経回路の解剖学的詳細が体系的に明らかになることが期待される。

## (2) 詳細

本研究では、興奮性錐体細胞に入力する抑制性神経細胞をサブタイプ特異的に標識する技術の開発を目標に研究を行った。その結果、以下に記述する成果を得ることができた。1) 本手技の基盤となる遺伝学的材料の作出と基本的特徴づけ。2) 本手技を用いた、大脳体性感覚野第 II/III 層錐体細胞に入力する抑制性神経細胞サブタイプの可視化。3) 大脳体性感覚野第 II/III 層錐体細胞に入力する深層 PV 陽性抑制性神経細胞の発見。4) 単一錐体細胞へ入力する PV 陽性抑制性神経細胞の可視化。

### 1) 遺伝学的材料の作出と基本的特徴づけ

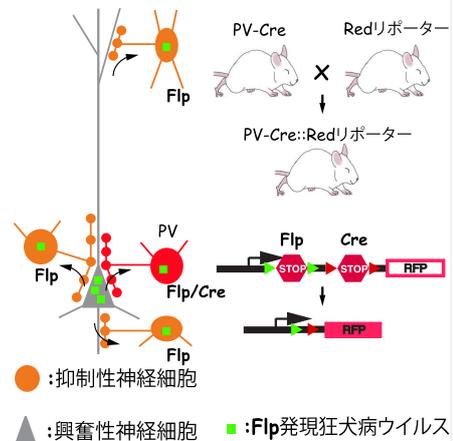
#### (狂犬病ウイルス)

RFP/Flp を発現する EnvA 偽型化狂犬病ウイルス (EnvA-RFP/Flp) と CFP/Flp を発現する EnvA 偽型化狂犬病ウイルス (EnvA-CFP/Flp) を作製した。EnvA-RFP/Flp は、既存の RFP/Flp-野生型ウイルスを偽型化後、増幅することによって得られた。EnvA-CFP/Flp は、DNA プラスミドの構築、CFP/Flp 野生型ウイルスの産生、偽型化、増幅を経て得られた。

なお、CFP/Flp 野生型ウイルスの産生は、Osakada 博士(元 Callaway 研究室ポスドク/ソーク研究所、現准教授/名古屋大学)との共同研究として行われた。TVA を恒性的に発現する培養細胞を用いた、感染実験の結果、両ウイルスとも良好なタイターを持つことが示された。

#### (リポーターマウス)

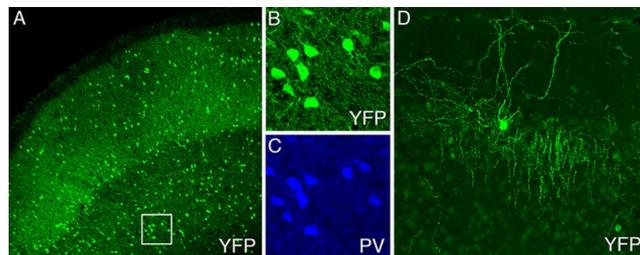
本研究では、Flp/Cre 依存性マウスを利用する (図1)。手技の確立には、既存の Dual-RFP リポーター (Zeng 博士/アレン神経科学研究所からの分与)、Dual-GFP リポーターを用いたが、Dual-RFP リポーターは蛍光退縮、利用可能抗体の制限(ウサギ由来抗体のみ利用可能)の問題があり、Dual-GFP リポーターは発現量の問題があることから、より明るく、抗体染色の選択性を豊富にする Dual-YFP リポーターの作出を試みた。Rosa26 座へのターゲティングコンストラクトのバックボーンは Dual-RFP リポーターと同様のものを用いた。このコン



(図1)興奮性神経細胞に入力する抑制性神経細胞サブタイプを標識する遺伝学的手法: この図では PV 陽性抑制性神経細胞が特異的に RFP を発現する。

ストラクトに4つの YFP を2A ペプチドで隔てて直列につないだものを組み込んだ。常法どおり、ES 細胞にこのコンストラクトをトランスフェクション後、Rosa26 座に正しくノックインされたクローンを PCR で同定し、陽性クローンをブラストシストに注入後、ノックインマウスを得た。次に、Dual-YFP リポーターの特徴づけを発現特異性、発現レベルの観点から行った。Dlx5/6-Flp (Flp を全抑制性神経細胞で発現)、PV-Cre、Dual-YFP を持つマウス大脳皮質を抗 PV 抗体で染色し、共発現を検討したところ、91%の YFP 陽性細胞が PV を発現していることがわかり、高い特異性が明らかになった (図2)。また、Dlx5/6-Flp、Nkx2.1-CreER (シャンデリア細胞の幹細胞で CreER を発現)、Dual-YFP を持つマウス大脳皮質でシャンデリア細胞を YFP 標識、抗 GFP 抗体で染色後、細胞の形態を観察したところ、シャンデリア細胞の特徴的な軸索形態まで高解像度で可視化されていることが明らかになった (図2)。これは現存する最も明るい緑色系リポーターである Cre 依存性 GFP リポーター (Ai47) と明るさにおいてほぼ同等であることを示唆する。

さらに、錐体細胞への抑制性入力をサブタイプ特異的にシナプスレベルで可視化することを目的として、Dual-Synaptophysin-YFP (SynYFP) リポーターを作製した。今後、このラインを特徴づけした後、狂犬病ウイルスと組み合わせ、抑制性神経細胞サブタイプの細胞区画特異的シナプス形成に関する詳細な解析を行う予定である。



( 図 2 ) Dual-YFP リポーター : (A-C) PV-Cre::Dlx5/6-Flp::Dual-YFP マウス脳内における YFP (A、B) と PV (C) の共発現。B、C は A の四角内の拡大。(D) Nkx2.1-CreER::Dlx5/6-Flp::Dual-YFP マウス脳内で標識されたシャンデリア細胞。

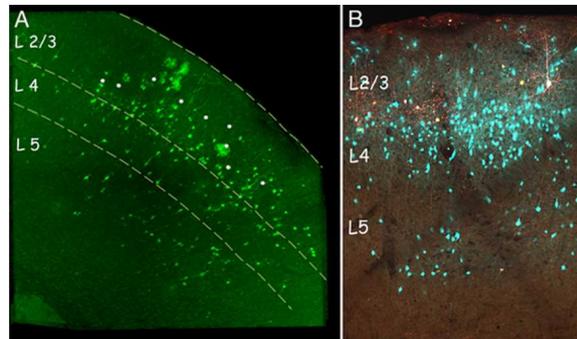
## 2) 大脳体性感覚野 II/III 層錐体細胞に入力する抑制性神経細胞サブタイプの可視化

サブタイプ特異的 Cre ライン (PV-Cre、SOM-Cre、VIP-Cre) と Dual リポーター (Dual-RFP、Dual-GFP) を交配し、胎生 15 日にエレクトロポレーションで錐体細胞に H2BYFP-TVA-RG を導入後、EnvA 偽型化狂犬病ウイルス (EnvA-RFP/Flp、EnvA-CFP/Flp) を生後 14 日マウスの大脳体性感覚野に注入した (図1)。ウイルス注入後、7 日目 (生後 21 日) に観察したところ、注入箇所を中心にして広範なウイルス感染を確認することができた (ウイルス由来の蛍光タンパク発現に基づく) (図3)。また、期待どおり、ウイルス感染細胞の一部で Dual リポーター由来の蛍光タンパク発現が見られた (図3)。PV-Cre を用いた実験で、抗 PV 抗体で染色し、特異性を調べた結果、リポーター由来蛍光タンパク陽性細胞のうち約 60% が PV を発現していることがわかった。また、同様に、抗 GAD67 抗体で染色した結果、リポーター由来蛍光タンパク陽性細胞のうち約 55% が GAD67 を発現していることがわかった。一次感染錐体細胞以外のリポーター由来蛍光タンパク陽性細胞の形態で、錐体細胞様のは皆無であること、ある種の神経ペプチドは狂犬病ウイルスの感染により発現抑制を受けること (共同研究者の Callaway 博士の観察) などから、PV、GAD67 の部分的共発現は、リポーター由来蛍光タンパクの非特異的発現というよりむしろウイルス感染細胞におけるこれらの分子の発現抑制によるものであると考えた。この可能性を支持するように、ウイルス注入後、4 日目に観察した場合、90% のリポーター由来蛍光タンパク陽性細胞が PV を発現していた。また、VIP 陽性細胞

は、錐体細胞ではなく、主に他の抑制性神経細胞に入力を送るという知見と一致して、VIP-Cre を用いた場合、一次感染錐体細胞以外でリポーター由来蛍光タンパクの発現は見られなかった（図3）。これらの結果は、本遺伝学的手法の高い特異性を示唆するものである。

### 3) 大脳体性感覚野第 II/III 層錐体細胞に入力する深層 PV 陽性抑制性神経細胞の発見

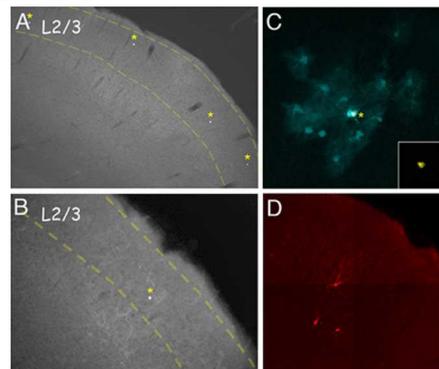
大脳体性感覚野第 II/III 層錐体細胞に入力する PV 陽性抑制性神経細胞の層分布を調べるため、本遺伝学的手法を PV-Cre マウスに適用し、解析を行った。その結果、第 II/III 層錐体細胞に入力する PV 陽性細胞は、同じ II/III 層のみならず、深層の IV 層、V 層にも存在することが明らかになった（図3）。これら深層の PV 陽性細胞から第 II/III 層錐体細胞への入力は、層をまたいだフィードフォワード抑制、もしくはフィードバック抑制に関与している可能性が考えられる。現在、一次感染第 II/III 層錐体細胞と深層 PV 陽性細胞の電気生理学的結合を検出する試みを行っている。また、第 II/III 層錐体細胞に入力する単一の深層 PV 陽性細胞にビオチンを注入後、染色することにより、これらの細胞の形態的特徴を解析していく予定である。



(図3)第 II/III 層錐体細胞に入力する PV 陽性抑制性神経細胞: (A)PV-Cre と Dual-GFP リポーターによる標識。一次感染 II/III 層錐体細胞 (白)と Dual-GFP リポーターで標識された PV 陽性抑制性神経細胞。II/III 層のみならず IV、V 層でも GFP 細胞が見られる。(B)VIP-Cre と Dual-RFP リポーターによる標識。一次感染 II/III 層錐体細胞 (黄色)、ウイルス感染した入力細胞 (水色)。一次感染錐体細胞のみで RFP 発現があり、VIP 陽性抑制性神経細胞で RFP の発現は見られない。

### 4) 単一錐体細胞へ入力する PV 陽性抑制性神経細胞の可視化

錐体細胞に入力する抑制性神経細胞サブタイプの空間編成をより詳細に理解するため、単一の錐体細胞に入力する抑制性神経細胞サブタイプを標識することを試みた。このために、まず、CreER の弱い活性を利用して、H2BYFP-TVA-RG を疎に広く発現する条件を検討した。その結果、直径300  $\mu\text{m}$  以内に1-3個の H2BYFP-TVA-RG 発現錐体細胞が得られる条件を同定することができた(図4)。さらに、この H2BYFP-TVA-RG を疎に発現する PV-Cre マウスに EnvA-GFP/Flp を注入したところ、一個の一次感染錐体細胞と複数の RFP 陽性細胞(RFP はリポーター由来)が得られた (図4)。今後、3次元再構成法を用い、第 II 層錐体細胞に入力する PV または SOM 陽性細胞の空間配置の解剖学的詳細を解析してい



(図4)単一錐体細胞へ入力する PV 陽性抑制性神経細胞: (A、B) 疎に H2BYFP-TVA-RG を発現するための条件検討。0.01  $\mu\text{g}$  の CreER (A)、0.002  $\mu\text{g}$  の CreER (B)。(C)単一の一次感染錐体細胞。(D)RFP 標識された PV 陽性細胞。

く予定である。

### 3. 今後の展開

本研究で開発された遺伝学的手法により、興奮性錐体細胞に入力する抑制性神経細胞をサブタイプ特異的に標識することが可能になった。本方法を応用し、今後、以下の重要な課題に挑戦していく予定である。1)本研究では、体性感覚野に焦点を絞り解析を行ったが、今後、視覚野、前頭前野など他の領野でも同様の解析を行う。また、第Ⅴ層錐体細胞に入力する抑制性神経細胞サブタイプにも解析を広げていく。これらの解析を通じ、領野ごとにどの程度共通の抑制性回路が存在するのか、もしくは、どのような特異的抑制性回路が存在するのかを明らかにしていく。本研究で見出した、深層 PV 陽性抑制性細胞から第Ⅱ/Ⅲ層錐体細胞への入力のような新たな抑制性回路の発見も期待できる。2)本研究では、単一錐体細胞に入力する抑制性神経サブタイプの可視化にも効率は低い成功している。今後、錐体細胞を機能によって分類し(例えば体性感覚野バレル構造の内に位置するか外に位置するかで分類する)、それぞれのクラスにおいて、抑制性入力細胞の特異的空間配置が見られるかどうか検討する。このような解析によって、抑制性神経細胞サブタイプの回路レベルでの機能に対する洞察が得られることが期待できる。3)本研究では、抑制性入力細胞全体を標識するためのリポーターマウスのみならず、抑制性入力細胞の前シナプス末端のみを標識するリポーターマウスも作製した。今後は、このシナプス特異的リポーターマウスを用い、第Ⅱ/Ⅲ層錐体細胞に入力する抑制性神経細胞サブタイプのシナプス末端を標識し、錐体細胞上の細胞区画特異的シナプス編成を高解像度で解析する。また、細胞区画特異的シナプス編成の発達過程も明らかにしていく。これらの研究により、これまで未解明であった抑制性神経細胞サブタイプによって形成される細胞区画特異的シナプスの発達過程が明らかになることが期待される。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

本研究を通じて、錐体細胞に入力する抑制性神経細胞サブタイプを特異的に標識することが可能になった。また、単一錐体細胞に入力する抑制性神経細胞サブタイプを標識することにも成功した。この遺伝学的手法を用いて、第Ⅱ/Ⅲ層錐体細胞に入力する PV 陽性抑制性細胞は同じⅡ/Ⅲ層のみならず、第Ⅳ層、第Ⅴ層にも存在することが明らかになった。この結果は、本手法が、これまで未知であった抑制性回路の結合性を明らかにするうえで非常に強力なものであることを示唆している。また、本手法の原理は、シナプスを特異的に標識するリポーターマウスと組み合わせることにより、錐体細胞に入力する抑制性神経細胞サブタイプのシナプス週末を可視化することにも利用可能である。我々はすでにこのシナプスを特異的に標識するリポーターマウスも作製済みで、今後、このマウスの特徴づけを行った後、細胞区画特異的シナプスの発達過程を調べるのに利用する予定である。以上、述べたとおり、本研究期間中に抑制性神経細胞サブタイプの結合特異性を調べるための手技的基盤を確立することができた。本手法は、これまで解析不能であった、抑制性神経細胞サブタイプの結合特異性に関わる多くの疑問に答えるためのブレークスルーになることが期待される。

昨今の遺伝学的技術、顕微鏡技術の発展を基礎にして、脳の解剖学的詳細を体系的に明らかにするコネクトミクスプロジェクトが世界的に流行している。これらの試みは、特に、脳の領域間の結合性など、比較的マクロなレベルの結合性に関して一定の成果をあげてきた。しかしながら、大脳抑制性神経細胞に見られる多種多様なサブタイプの結合性に関して未だ多くの情報は得られていない。本研究で開発された遺伝学的手法を体系的に適用することにより、大脳皮質神経回路の細胞種特異的神経結合が細胞レベル、シナプスレベルで明らかになることが期待できる。

JST 職員をはじめとする関係者の方々のご協力により、海外での実施という難条件にも関わらず予算を適切に迅速に執行することができた。また、2012年8月の現所属独立ポジションへの移動に際しても多大なご協力を頂き、研究費の移行、それに引き続く執行をスムーズに行うことができた。移動から研究室の立ち上げに至る過程で若干の停滞があり、また、本研究の実験補助者が経験の浅い技術員のみであったこともあり、当初予定した全ての課題を遂行するには至らなかったが、核となる遺伝学的技術の確立と大脳皮質内の新たな抑制回路の発見を遂げることができたのは大きな進歩であると考え。今後、このプロジェクトに対して、ポスドク研究員を当て、さらなるテコ入れを行い、できる限り早い時期に論文発表ができるよう努力する所存である。

本研究成果により、大脳機能に必須の役割を果たす抑制性神経細胞の解剖学的詳細をサブタイプ特異的に可視化できるようになった。脳の構造と機能は密接な相関があるため、抑制性神経細胞の詳細な結合性を知ることにより、脳の機能の理解が一層進むことが期待できる。また、本研究で開発された技術を、精神疾患モデルマウスに適用することにより、抑制性神経回路における病態の発見に役立てることができる。このようなアプローチを糸口にして、治療の標的とすべき細胞種が明らかとなり、新たな薬や治療戦略の開発が促進されることが期待できる。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

大脳皮質の抑制性神経細胞には解剖学的、神経化学的および電気生理学的特性により区別される多様なサブタイプが存在すること、また興奮性の錐体細胞は各細胞区画(樹状突起、細胞体、軸索起始部)において特定の抑制性神経細胞サブタイプから局所入力を受けることが長く知られているが、それらの解剖学的細胞学的詳細や神経結合の発達などに関しては解析の困難から不明な部分が多く残されている。本研究は、これらのサブタイプを特異的に標識する遺伝学的技術を開発し、抑制性局所神経回路の結合様式と発達様式を体系的に明らかにしようとするものである。このために組み替え酵素 Cre をサブタイプ特異的に発現するマウスと狂犬病ウイルスを用いた逆行性経 1 シナプス標識法を組み合わせることにより抑制性神経細胞サブタイプ特異的な標識に成功し、たとえば第 II/III 層錐体細胞への各層の Parvalbumin 陽性抑制性神経細胞から入力の様相などを明らかにすることに成功し、また形態的サブタイプの一つシャンデリア細胞の全貌を詳細に可視化することにも成功した。これらの成果は大脳皮質の局所回路の解明の強力な基盤を開くものであり、その意義は大きい。今後他のサブタイプについても解析が進み、大脳皮質の神経回路の理解が大きく進展することが期待できる。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1)論文(原著論文)発表

該当なし。

### (2)特許出願

該当なし。

### (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)

#### 招待講演

2012 Taniguchi, H.”Origin and Organization of Chandelier Cells in the Mouse Neocortex”, MPFI/IBRO Neural Circuits Symposium, USA

2013 Taniguchi, H.”Genetic dissection of GABA neuronal subtypes”, NEURO2013 Satellite Symposium, Japan

2014 Taniguchi, H.”Genetic dissection of Inhibitory Circuits in Neocortex”, Florida Brain Project Symposium, USA

#### 受賞

2013 Honorable mention recipient of the 2013 Daniel X. Freedman Award

#### 著作物

##### Invited Review

##### Taniguchi, H. (2014)

“Genetic dissection of GABAergic neural circuits in mouse neocortex”

Front. Cell. Neurosci. 8:8. doi: 10.3389/fncel.2014.00008