

# 研 究 報 告 書

## 「相互結合かつ共通入力をもつサブネットワークの新規解析技術」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成26年10月～平成30年3月

研 究 者: 小坂田 文隆

### 1. 研究のねらい

ヒトの脳はおよそ 1,000 億個もの膨大な数のニューロンが神経回路を形成することにより情報を伝達・処理し、複雑な高次脳機能を発揮する。脳の情報処理は神経回路を基盤としているため、神経機能およびその異常は分子や細胞のみに起因するわけではなく、神経回路レベルの挙動として捉える必要がある。大脳皮質では、機能素子である神経細胞が微小な神経回路(サブネットワーク)を形成し、特異性の高い情報処理計算を実行する。これまでにラット由来の大脳皮質切片標本を用いた電気生理学的解析から、興奮性シナプスで結合している 2/3 層 2/3 層の錐体細胞ペアは、周辺細胞からの興奮性入力を高い割合で共有し、非常に微細なスケールのサブネットワークを形成していることが明らかになっている。本研究では、視覚系をモデルにして、相互結合かつ共通入力をもつサブネットワークの *in vivo* での役割を明らかにする目的で、経シナプス性ウイルスベクターを駆使した新規解析技術の開発を目指す。

本技術は、大脳皮質全体に一貫した基本動作原理の解明に留まらず、神経回路間の相互作用の解析にも適用可能であり、神経科学分野における必須な解析法の一つになると期待される。さらに、これまで視覚機能の再生は、幹細胞を用いた網膜再生に留まっているが、本解析技術を駆使することで、脳での視覚回路の再生・可塑性の制御による新規治療コンセプトも提案していきたい。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

視覚情報は網膜で受容され、大脳皮質一次視覚野へ伝えられる。大脳皮質では、機能素子である神経細胞が微小な神経回路(サブネットワーク)を形成し、特異性の高い情報処理計算を実行する。これまでにラット由来の大脳皮質切片標本を用いた電気生理学的解析から、興奮性シナプスで結合している 2/3 層 2/3 層の錐体細胞ペアは、周辺細胞からの興奮性入力を高い割合で共有し、非常に微細なスケールのサブネットワークを形成していることが明らかになっている。本研究では、視覚系をモデルにして、相互結合かつ共通入力をもつサブネットワークの *in vivo* での役割を明らかにする目的で、経シナプス性ウイルスベクターを駆使した新規解析技術の開発を目指す。

本研究課題は、以下の 3 つの個別課題により達成した。

1. 「狂犬病ウイルスベクターの改変」
2. 「直交型新規ウイルスベクターの開発」
3. 「2 光子顕微鏡技術の開発」

現在は開発した上記技術を全て総動員することで、マウスの視覚野をモデルとしてサブネ

ネットワークの解析を行っている。

本技術は、大脳皮質全体に一貫した基本動作原理の解明に留まらず、神経回路間の相互作用の解析にも適用可能であり、神経科学分野における必須な解析法の一つになると期待される。さらに、これまで視覚機能の再生は、幹細胞を用いた網膜再生に留まっているが、本解析技術を駆使することで、脳での視覚回路の再生・可塑性の制御による新規治療コンセプトも提案していきたい。

## (2) 詳細

本研究課題は、以下の 3 つの個別課題により達成される。

### 1. 「狂犬病ウイルスベクターの改変」

狂犬病ウイルスベクターは、経シナプス感染することから神経回路の解析に用いられており、私が開発したゲノムベクターおよびウイルス産生系が世界で最も広く使用されている。しかし、ウイルスベクター自体の毒性から解剖学的なツールとしては極めて有効であるが、イメージングや電気生理解析、さらには行動解析などの機能解析への使用は限られていた。そこで、本研究ではその点を改善するために、ウイルス構成タンパク質の M タンパク質に着目し、ウイルスベクターの低毒化を行った。M に変異を導入した 8 個の変異体からホストの遺伝子発現、代謝、抗ウイルス応答および in vivo での生存率を指標にスクリーニングを実施した。その結果、新たに M 変異 G 欠損型狂犬病ウイルスベクターの開発に成功した。

### 2. 「直交型新規ウイルスベクターの開発」

EnvA/TVA および EnvB/TVB システムを哺乳類に用いることで、2 つの異なるウイルスを異なる 2 つの細胞に特異的にウイルス感染を成立させた。G 欠損型狂犬病ウイルスベクターとは独立した新たなウイルスベクターを開発した。これにより独立した 2 つの神経回路を各々標識し、回路間の相互作用を詳細に解析が可能になった。

### 3. 「2 光子顕微鏡技術の開発」

2 光子顕微鏡下で単一細胞への遺伝子導入技術を開発した。ウイルス感染したマウス脳を CUBIC 法にて透明化し、2 光子顕微鏡で大脳皮質の全層の画像を取得できた。さらに緑色カルシウム感受性蛍光タンパク質の GCaMP6 および赤色カルシウム感受性蛍光タンパク質の jRGECO を用いて、成体マウスの脳からカルシウムイメージングを行った。マウスに様々な角度からなる白黒の縞模様を呈示し、その視覚応答を大脳皮質視覚野から計測した。視覚刺激に伴い GCaMP6 あるいは jRGECO シグナルの上昇が観察された。標識した神経細胞には興奮性細胞および抑制性細胞の両者が含まれ、興奮性細胞は特定の傾きに特異的に応答する方位選択性応答を示した。ネコやサルなどの高等な哺乳類では、方位選択性の似た神経細胞が集合する方位選択性コラムが認められるのに対して、マウスでは方位選択性を示す細胞はランダムに分布していた。さらに、イメージングチャンバーを改良することで、大脳皮質の全層に渡って同一個体から 1 ヶ月以上に渡って長期にイメージングが可能な系を構築した。

現在は開発した上記技術を全て総動員することで、マウスの視覚野をモデルとしてサブネ

ットワークの解析を行っている。具体的には、マウスの一次視覚野の 2 つの細胞の片方に TVA を、もう片方に TVB を導入する。その後、EnvA で pseudotyped したウイルスと EnvB で pseudotyped したウイルスを微量注入し、TVA 発現細胞および TVB 発現細胞の入力を同定する。これにより TVA 発現細胞、TVB 発現細胞のいずれか片方に入力する細胞、両者に入力する細胞を区別することができる。次いで、マウスに視覚刺激を呈示し、視覚応答を 2 光子顕微鏡下でカルシウムイメージングにより評価することで、神経回路の機能を解析する。神経の接続情報と機能とを対応付け、回路の演算様式を解析する。これによりサブネットワークを始めて可視化することができ、さらに脳内の神経情報処理におけるサブネットワークの役割を明らかにすることができる。

### 3. 今後の展開

ヒトを含む動物が外界を感知するための感覚機能として視覚、聴覚、触覚、味覚、嗅覚が挙げられる。ヒトは五感の中で視覚を最も発達させており、感覚情報の 8 割以上は視覚による。視覚異常は日常的生活機能を低下させ、生活の質(QOL)を大きく損なわせる。さらに、視覚障害は患者本人だけでなく、家族や社会にとっても大きな負担になっている。医療費などの直接的な負担に加え、生産性の低下、社会や家族のケアなどの間接的な経済コストなどを含めると、本邦における視覚障害による社会的損失は 1 年間で 8.8 兆円という試算がある。加えて、視覚障害は高齢者で有意に有病率が上がることから、超高齢化社会を迎える日本ではさらに視覚障害者数が増加し、2030 年には 200 万人に達すると推定され、2030 年における視覚障害による社会的損失は 11 兆円にも及ぶと予測されている。視覚障害の予防・治療法を開発し、視覚障害者を減らすことは、患者個人の QOL の改善だけではなく、視覚障害から生じる総合的なコストを減じ、日本経済の生産性にも大きく貢献すると考えられる。したがって、超高齢化が進む我が国において健康長寿社会の実現のためには、視覚障害は克服しなければならない課題である。

視覚情報は網膜で受容され、脳に伝達され、知覚・認知に至る。視覚障害はこの視覚情報処理のいずれかの段階が障害されることに起因する。したがって、脳・神経回路の情報処理機構および動作原理の解明、それらに基づいた眼疾患および神経・精神疾患の病態解析・病因解明、予防・治療法の開発は、極めて重要な研究課題と考える。

そこで私は今後、以下の研究を実施する。1. さらなる技術の開発および向上、2. 独自技術に基づいた、科学の謎を解くサイエンス、ユニークな基礎研究の実施、3. ヒトに類似性が高い高等動物サルへの展開、4. アンメットメディカルニーズの高い疾患の病態・病因の解析および新規治療法・創薬開発への展開、を考えている。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

研究目的であるサブネットワークを解析する技術の開発はおおむね完成に近づいているが、開発した技術を実際に使って、「科学的な問い」に対して仮説を検証して「答え」を出す必要

があると考えている。

研究の進め方については、技術開発を達成するために、3つのサブテーマに分けて、1. 狂犬病ウイルスの開発、2. 直行型新規ウイルスベクターの開発、3. 2光子顕微鏡システムの構築、という個別課題を設定し、各課題を達成してきた。現状は、個別課題を統合して、技術開発からサイエンスに挑戦する段階に移行しており、この成果を得られた時点で、論文発表を行う予定である。さきがけの「1細胞解析」領域が終了するまでには、論文発表を行う見込みである。

実施体制は、研究室の立ち上げの際に助成をして頂き、さきがけ期間中に研究室の引っ越しを2回経験したが、今は新しい研究棟が完成し、落ち着いて研究に取り組める環境を獲得した。さきがけ採択時は、大学院生の配属はなく、ラボワークの全てを1人で行っていたが、さきがけ期間中に大学院生の配属が増え、ラボの基本的なメンテナンスの協力体制を構築した。

研究費の執行状況は、研究室の立ち上げのタイミングでの採択であったので、大部分はセットアップに使用した。

他のさきがけ研究者と良好な関係を築き上げることができ、今後のキャリア形成にとって有意義な機会となった。「1細胞解析」領域では磯部博士(理化学研究所)、竹本博士(名古屋大学)、落合博士(広島大学)と共同研究を実施し、いずれも論文として成果報告が可能と期待できる。技術交流・情報交換の連携レベルではさらに多くのさきがけ研究者、例えば「1細胞解析」領域では今吉博士、遠藤博士、太田博士、樫田博士、宮成博士、谷内江博士、洲崎博士、加地博士、多喜博士と定期的な交流を持ち、研究を展開している。他領域とも共同・連携を行っており、李博士(論文投稿中)、谷口博士(論文投稿中)、小池博士(論文投稿中)、山中博士、山下博士、野間博士と協力体制を構築し、研究を展開している。萌芽的な研究を始めたり、学会でシンポジウムを開催したり、一部は共著の論文も執筆中である。

(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・1期生成果評価会での総括・AD間の議論を踏まえ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

相互結合かつ共通入力をもつ神経のサブネットワークを解析するために、経シナプス性ウイルスベクターを駆使して独立した2つの神経回路を各々標識し、回路間の相互作用を詳細に解析することが可能な新規解析技術の確立に取り組みました。まず、研究者が開発し世界的に使用されている経シナプス感染狂犬病ウイルスベクターを低毒性化し、イメージングや電気生理解析等の機能的な解析にも展開することを可能にしました。次に、狂犬病ウイルスベクターとは直交型の新規ウイルスベクターを開発しその機能を確認しました。これが完成すれば非常に有用なツールとなると期待されます。また2光子顕微鏡下での単一細胞への遺伝子導入技術を開発し、緑色カルシウム感受性蛍光タンパク質 GCaMP6 と赤色カルシウム感受性蛍光タンパク質 jRGECO を用いた生体マウスのカルシウムイメージングに成功しました。現在、これらの基盤技術を組み合わせて、マウスの視覚野のサブネットワークの解析に取り組んでおり、その成果が待たれるところです。また同じさきがけ領域1期生磯部研究員との分野をまたいだ共同研究も進んでいます。



本技術の有用性を対外的にも周知し広く認知を得るとともに、神経の接続情報と機能の対応づけを進め、脳内の神経情報処理におけるサブネットワークの役割を明らかにしてゆくことを期待します。

平成 28 年日本薬理学会学術奨励賞、日本薬学会奨励賞、平成 29 年文部科学大臣賞若手科学者賞を受賞している他、多数の講演に招待されており、この分野をリードする若手研究者として更なる活躍を期待します。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1)論文(原著論文)発表

1. Xu C, Krabbe S, Gründemann J, Botta P, Fadok JP, **Osakada F**, Saur D, Grewe BF, Schnitzer MJ, Callaway EM, Lüthi A. Distinct Hippocampal Pathways Mediate Dissociable Roles of Context in Memory Retrieval. *Cell*. 167, 961–972 (2016)
2. Tian J, Huang R, Cohen JY, **Osakada F**, Kobak D, Machens CK, Callaway EM, Uchida N, Watabe-Uchida M. Distributed and Mixed Information in Monosynaptic Inputs to Dopamine Neurons. *Neuron*. 91, 1374–1389 (2016)
3. Padmanabhan K, **Osakada F**, Tarabrina A, Kizer E, Callaway EM, Gage FH, Sejnowski TJ. Diverse Representations of Olfactory Information in Centrifugal Feedback Projections. *The Journal of Neuroscience*. 36, 7535–7345 (2016)
4. Faget L, **Osakada F**, Duan J, Ressler R, Johnson AB, Proudfoot JA, Yoo JH, Callaway EM, Hnasko TS. Afferent Inputs to Neurotransmitter-Defined Cell Types in the Ventral Tegmental Area. *Cell Reports*. 15, 2796–2808 (2016)
5. Tuncdemir SN, Wamsley B, Stam FJ, **Osakada F**, Goulding M, Callaway EM, Rudy B, Fishell G. Early Somatostatin Interneuron Connectivity Mediates the Maturation of Deep Layer Cortical Circuits. *Neuron*. 89, 521–535 (2016)

### (2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

### (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)

#### 主要な学会発表

#### 受賞

1. 小坂田 文隆 光科学技術研究振興財団 研究表彰  
“光の検出および情報伝達の再構築を目指した網膜再生研究” 2015 年 3 月 3 日
2. 小坂田 文隆 日本薬理学会 学術奨励賞 “新規狂犬病ウイルストレーシング法による神経回路の構造・機能・再生の解明” 2016 年 3 月 10 日
3. 小坂田 文隆 日本薬学会 奨励賞 “網膜再生治療に向けた新規幹細胞由来網膜細胞作成法の開発と創薬への応用” 2016 年 3 月 26 日
4. 小坂田文隆 文部科学大臣賞若手科学者賞

“視覚再生を目指した幹細胞制御と神経回路解析の研究”

2017 年 4 月 19 日

その他

1. 小坂田文隆 日経バイオテク 平成 27 年 7 月 13 日号「若手研究者の肖像」(第 4 回)  
iPS 細胞の臨床応用につながる成果、研究室を渡り歩いて実験系を開発
2. 小坂田文隆 リバネス研究応援 Vol.5 2017 年 3 月 2 日