

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 理学 )	氏名	田 辺 創 思
論文題目	Developing novel techniques for primate neural network analyses by retrograde gene transfer with viral vectors (ウイルスベクターによる逆行性遺伝子導入を利用した霊長類の神経ネットワーク解析のための新規技術開発)		
(論文内容の要旨)			
<p>ヒトの高次脳機能のメカニズムを解明するためには、サルを用いて神経ネットワークの構造と機能を理解する必要がある。ウイルスベクターを利用することによって、特定の神経路の選択的活動操作や共通の機能を有する複数の神経路の構築様式を解析することが可能になり、これらの技術を霊長類に適用することが本質的である。そこで本研究では、ウイルスベクターによる逆行性遺伝子導入を利用した霊長類の神経ネットワーク解析のための新規技術の開発に関する研究を行った。</p> <p>第2章で取り上げる逆行性感染型レンチウイルスベクターは注入部位に投射する神経細胞に外来遺伝子を導入できるため、神経路選択的な活動操作に有効なツールである。近年、神経細胞に特異的に感染する NeuRet タイプのベクターのうち、新型の E 型と呼ばれるベクターが従来型の C 型に比べてより優れた逆行性遺伝子導入効率をマウスの脳で示すことが報告された。しかしながら、同様な特性が霊長類でも認められるか、また、同じく高い逆行性遺伝子導入効率を有する HiRet ベクター (B2 型) との感染特性の差異については不明である。そこで、霊長類 (マカクザル、マーモセット) および齧歯類 (ラット) の線条体に E 型または C 型、B2 型のベクターを注入し、線条体入力系におけるこれらの逆行性遺伝子導入効率および毒性を比較した。その結果、E 型は C 型や B2 型より高い逆行性遺伝子導入効率を有し、かつ毒性も低いことを明らかにした。以上のことから、E 型のベクターが霊長類や齧歯類の線条体入力系の神経回路操作に適していることが示唆された。</p> <p>第3章では、異なる蛍光タンパク質遺伝子を搭載した狂犬病ウイルスベクターを利用して大脳皮質—大脳基底核ループ回路の構築様式を解析した。大脳皮質—大脳基底核ループにおける情報処理様式については、機能的に異なる皮質領野からの情報が基底核内で並列的に処理されるモデルと、基底核内で統合されるモデルが古くから示唆されているが、基底核の各部位でどのように情報が処理されるかについては、未だ不明な点が多い。そこで、基底核から異なる2つの運動関連領野への情報出力様式を調べるために、GFP と RFP を発現する狂犬病ウイルスベクターをそれぞれ運動前野の背側部と腹側部に注入し、逆行性越シナプスの二重トレーシングを実施した。基底核における細胞ラベルの分布様式を解析した結果、線条体あるいは視床下核・淡蒼球外節を介して淡蒼球内節から2つの皮質領野に出力する細胞の分布様式に違いがあることが明らかになった。</p> <p>本研究の成果から、第2章で論じたE型のベクターを使用することにより、霊長類脳における神経路選択的活動操作を効果的かつ効率的に遂行することが期待できる。また、第3章で論じた逆行性越シナプスの二重トレーシングを大脳皮質—小脳ループといった他の神経回路に適応することによってより広範な神経ネットワークの構築様式の解明に繋がることが考えられる。</p>			

(続紙 2 )

(論文審査の結果の要旨)

ヒトの脳は膨大な数の神経細胞が複雑に絡み合った神経ネットワークを形成し、さまざまな高度な機能を生み出している。このような高次脳機能のメカニズムを解明するためには、ヒトに類似の脳構造と脳機能を有する霊長類動物において、神経ネットワークの構築様式と機能的役割を明らかにすることが必要である。近年、逆行性感染型ウイルスベクターによる遺伝子導入技術を利用することにより、特定の神経回路の可視化や神経活動操作をおこなう手法がげっ歯類で開発されてきた。高次脳機能のメカニズム解明には、これらの手法を霊長類動物を用いた神経ネットワーク解析に適用することが本質的である。本研究では、神経路選択的活動操作に有用な逆行性感染型レンチウイルス (LV) ベクターの性状解析、および狂犬病ウイルス (RV) ベクターを使用した逆行性越シナプスの二重トレーシング技術の開発を行った。

第2章は、複数の逆行性感染型LVベクターのうち、どのタイプのベクターが霊長類動物を用いた脳科学研究に適しているかを明らかにすることを目的としている。まず、優れた神経細胞特異性を持つNeuRetベクターのうち、新型のEタイプベクターが従来型のCタイプベクターより高い逆行性遺伝子導入効率を示すことをマカクザルにおいて明らかにした。続いて、このEタイプベクターのマカクザル、マーモセット、およびラット脳における性状を、同じく逆行性感染型LVベクターであるHiRetベクター (B2タイプ) と比較した。その結果、EタイプベクターはB2タイプベクターに比べて逆行性遺伝子導入効率が高いだけでなく、脳組織に対する毒性も低いことを明らかにした。以上の結果は、Eタイプベクターが霊長類とげっ歯類の両者において神経細胞への逆行性遺伝子導入に適していることを示唆している。今後、Eタイプベクターによる効率的かつ安定的な逆行性遺伝子導入により、霊長類脳での神経路選択的活動操作を利用した研究が推進されることが期待できる。

第3章は、RVベクターを使用した逆行性越シナプスの二重トレーシング法により、霊長類の大脳皮質—大脳基底核ループ回路の構築様式を解明することを目的としている。マカクザルを用いて運動前野の背側部 (PMd) および腹側部 (PMv) にGFPまたはRFPを発現するRVベクターを注入し、大脳基底核における細胞ラベルの分布を調べた。その結果、GFPとRFPにより二重ラベルされる細胞を同定し、PMdとPMvの両方に多シナプス性の出力を送る単一神経細胞が存在することを明らかにした。更に、視床下核 (STN) と淡蒼球外節 (GPe) における二重ラベル細胞の比率が線条体と淡蒼球内節 (GPi) に比べて顕著に高いという結果から、線条体—GPi経路とSTN/GPe—GPi経路が異なるタイプの情報処理を担っていることを見出した。これらの知見は、大脳皮質—大脳基底核ループ回路の情報処理様式を探究するうえで重要な形態学的基盤を構築している。また、本研究で開発した逆行性越シナプスの多重トレーシング技術は他の神経ネットワーク解析にも応用できることから、本研究は今後の神経解剖学研究に大きく寄与するものであると評価できる。

よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として価値あるものと認める。また、令和2年1月17日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公表可能日： \_\_\_\_\_ 年 月 日以降