

121. 大脳皮質領野間フィードバック結合の層特異的な役割

小坂田 文隆

名古屋大学 大学院創薬科学研究科 細胞薬効解析学分野

Key words : 大脳皮質, フィードバック, ウイルス遺伝子工学, 神経回路, 光遺伝学

緒言

視覚情報は、網膜で受容され、外側膝状体 (LGN) を経て、大脳皮質1次視覚野 (V1) へと伝えられる。その後、V2、V3、V4、V5などの高次視覚野へと伝達される (図1A)。これらの視覚野は並列階層的に構成されており、異なる種類の視覚情報は異なる経路で処理される^{1,2)}。サルの視覚系において、V1に到達した視覚情報は背側視覚路と腹側視覚路と呼ばれる2種類の主要な視覚経路に分かれる。背側視覚路は対象の位置や動きの把握と関係しており、where 経路とも言われる。V1から始まり、V2やV3を経て、middle temporal (MT) 野、medial superior temporal (MST) 野に至る。一方、腹側視覚路は視覚対象の認識、色や形の表象と関係しており、what 経路とも呼ばれる。V1から始まり、V2やV3を経て、V4、inferior temporal (IT、TEO、TE) 野へ伝達される。

視覚研究は、歴史的にサルおよびネコ、フェレットを中心に発展してきた。しかし、近年マウスがヒトやサルの視覚野の基本的な性質を有していることが明らかになってきた。マウス V1 にも、サルやネコの V1 に特徴的な方位選択性応答を示す細胞が存在し^{3,4)}、さらにマウス lateral medial (LM) や anterior lateral (AL)、posterior medial (PM) などが解剖学的にも、生理学的にもサル高次視覚野に相当する事が報告された⁵⁻⁷⁾。マウス視覚野においても各領野間で双方向性の結合が存在し、フィードフォワード入力およびフィードバック入力が認められる (図1B)。

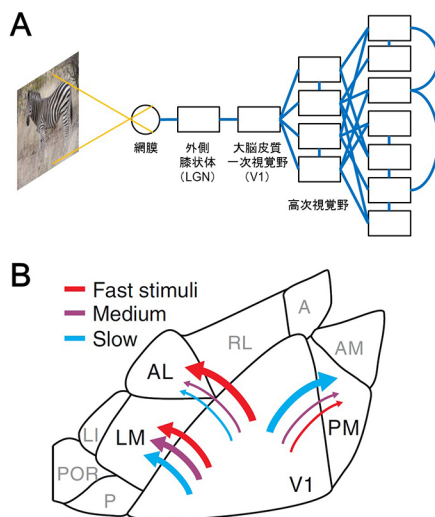


図1. 視覚の情報伝達

(A) 視覚伝達のフィードフォワードモデル。(B) マウス大脳皮質1次視覚野から高次視覚野 (LM、AL、PM) への主なフィードフォワード出力。

大脳皮質の階層性は主に解剖学的な結合パターンにより規定される。低次な領野から高次な領野へのフィードフォワード結合では起始細胞の細胞体が2/3層あるいは5層に存在し、軸策終末が他の領野の4層に終わるのに対して、高次な領野から低次な領野へのフィードバック結合では2/3層および5層に起始細胞の細胞体を持ち、他の領野の4層を避けて1層または5-6層に軸策終末が入力する。ところが、大脳皮質の領野間におけるフィードバック結合の機能的な役割は未だに不明な点が多い。そこで本研究では、層特異的にCreを発現するマウスおよびFLPを発現する逆行性ウイルスベクターを用いて、2/3層に起因するフィードバック結合と5層に起因するフィードバック結合の機能的役割の違いを明らかにする。

方法

野生型およびCre発現マウスは、自由に飲食および飲水可能な環境下で12時間毎の明暗サイクルにて飼育・維持を行った。ジェノタイピングは、マウスの尾からゲノムを抽出し、特異的なプライマーを用いてPCR反応を行うことにより判定を行った。クローニングは常法に従い制限酵素処理、PCR反応、電気泳動、大腸菌培養、プラスミド精製を行い、In-fusion反応によりゲノムベクターを得た。Adeno-associated virus (AAV)はHEK293t細胞をトランスフェクションすることにより作製し、opti-prepを用いた密度勾配遠心法により精製した。Human immunodeficiency virus (HIV)はHEK293t細胞をトランスフェクションすることにより作製し、超遠心により濃縮を行った。ウイルスは、craniotomy後に、脳の標的領域にpicospritzerを用いて50 nl/minの流速で微量注入した。動物は4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定した後、脳を単離し、50 μm厚の切片を作製した。免疫組織化学には、標的タンパク質に特異的な1次抗体を用い、Alexa488などの蛍光標識された2次抗体により可視化した。染色画像は共焦点蛍光顕微鏡により取得した。

結果

本研究では大脳皮質の特定の領野における特定の層に由来するフィードバック結合を特異的に標識する方法の開発を行った。

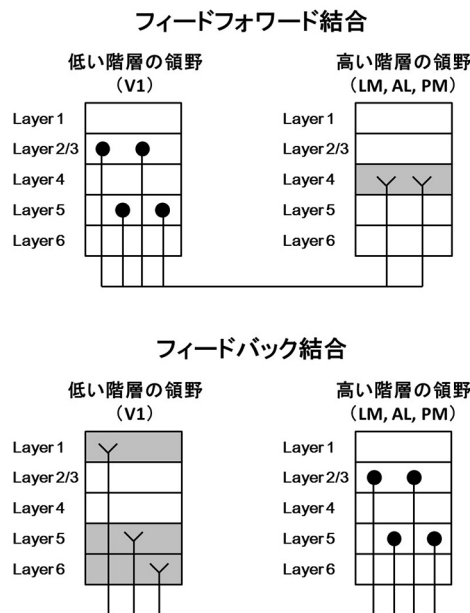


図2. 大脳皮質領野間結合の層特異性

低次な領野から高次な領野へのフィードフォワード結合では起始細胞の細胞体が2/3層あるいは5層に存在し、軸策終末が他の領野の4層に終わるのに対して、高次な領野から低次な領野へのフィードバック結合では2/3層および5層に起始細胞の細胞体を持ち、他の領野の4層を避けて1層または5-6層に軸策終末が入力する。

まず2/3層の細胞あるいは5層の中で皮質間結合を持つ細胞にのみ Cre を発現するマウスを探索した (図2)。その結果、皮質下に投射する細胞に Cre を発現する L5SC-Cre マウス、および大脳皮質の領野間を結合する細胞に Cre を発現する L5CC-Cre マウスを同定した。2/3層の細胞については、論文報告に基づいて L2/3-Cre マウスを検討し、あるいはマウス胎仔に *in utero* electroporation を用いて2/3層細胞に特異的に Cre を導入した。

改変型狂犬病糖タンパク質で pseudotype した HIV ベクター (RG-HIV-FLP) を用いて逆行性に FLP を導入し、フィードバック結合の標識を試みた。Cre マウスの V1 へ RG-HIV-FLP を注入し、各領野から V1 へのフィードバック結合を標識した。2/3層あるいは5層由来の V1 へのフィードバック入力に Cre および FLP を発現することから、Cre 依存的、FLP 依存的に遺伝子導入できるシステム pAAV-Con-Fon を検討した⁸⁾。高次視覚野に Cre 依存的かつ FLP 依存的に Channelrhodopsin-2 を発現する AAV ベクター (AAV-Con-Fon-ChR2-GFP) を注入し、特定の視覚野の特定の層由来の V1 へのフィードバック入力に ChR2 を導入した。しかし、標識効率は高くなく、さらなる方法の改良を試みた。

そこで次に逆行性感染することが報告されているイヌアデノウイルス CAV-2 に着目した⁹⁾。CAV2 を用いて逆行性に導入することで、効率が改善することが分かった。具体的には Cre 依存的に FLP を発現する CAV2-FLEX-FLP を Cre マウスの V1 に注入して、特定の層由来のフィードバック結合に FLP を導入した。そこで、FLP 依存的に遺伝子導入できるシステムを検討した。まずは FLP 依存的な発現ベクターを構築し、HEK293t 細胞を用いて *in vitro* で検討した。AAV-fDIO-tdTomato は FLP 存在下でのみ tdTomato を発現し、FLP 非存在下では tdTomato の発現は認められなかった (図3)。そこで、FLP 依存的に ChR2 を発現する AAV-fDIO-ChR2 を特定の領野に微量注入した。その結果、特定の領野の特定の層由来のフィードバック結合にのみ ChR2 を導入することに成功した。

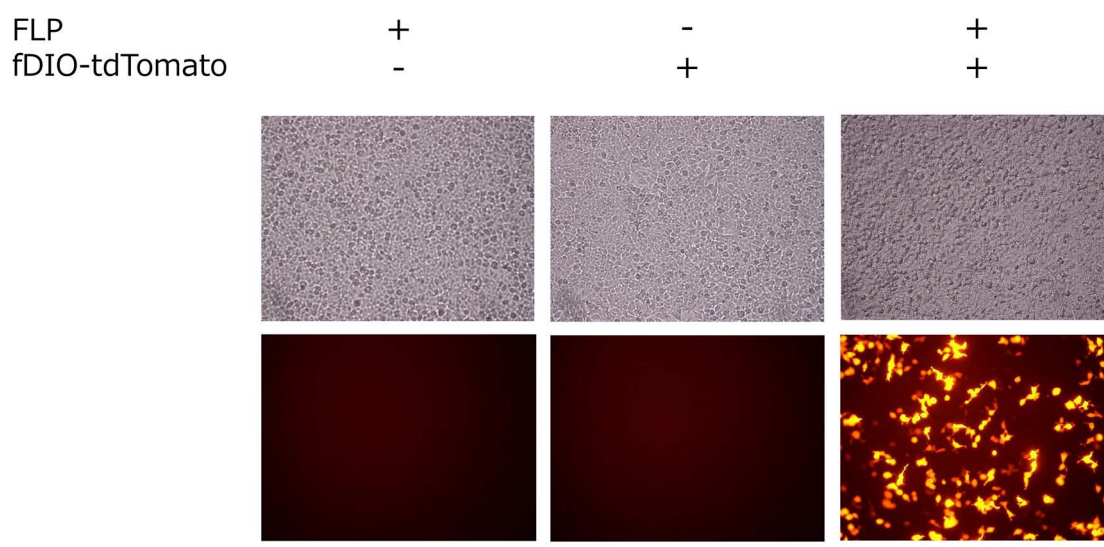


図3. FLP 依存的な遺伝子発現

AAV-fDIO-tdTomato は、FLP 非存在下では tdTomato を発現しないが、FLP 存在下では組み換えが起こり tdTomato を発現する。Scale bar = 100 μ m

考 察

大脳皮質の最大の特徴は、解剖学および機能的な階層性にある。しかし、フィードフォワード結合に比べフィードバック結合の機能的役割は未だに分かっていない。その理由には、これまで特定のフィードバック結合を選択的に loss-of-function あるいは gain-of-function することができなかつたことが挙げられる。本研究では、マウス遺伝学とウイルスベクターを駆使し、Cre/lox および FLP/frt の2つの組み換えシステムを使用することにより、層特異的にフィードバック結合に光遺伝学ツールあるいは薬理遺伝学ツールを導入することに成功した。

層特異的 Cre 発現マウスおよび逆行性 FLP 発現ウイルス、Cre 依存的かつ FLP 依存的な遺伝子発現系を組み合わせた本研究戦略は極めて先駆的であり、他の神経科学研究への波及効果は極めて大きい。

共同研究者

本研究の実施にあたり、名古屋大学大学院創薬科学研究科の赤池昭紀博士、ソーク研究所の Ed Callaway 博士、福島県立医科大学学生体情報伝達研究所の小林和人博士、名古屋大学環境医学研究所の山中章弘博士に御支援を賜り、深く感謝申し上げます。本稿を終えるにあたり、本研究に御支援を賜りました上原記念生命科学財団に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) Felleman DJ, Van Essen DC. Distributed hierarchical processing in the primate cerebral cortex. *Cereb Cortex*. 1991 Jan-Feb;1(1):1-47. Review. PubMed PMID: 1822724.
- 2) Nassi JJ, Callaway EM. Parallel processing strategies of the primate visual system. *Nat Rev Neurosci*. 2009 May;10(5):360-72. doi:10.1038/nrn2619. Epub 2009 Apr 8. Review. PubMed PMID: 19352403; PubMed Central PMCID: PMC2771435.
- 3) Niell CM, Stryker MP. Highly selective receptive fields in mouse visual cortex. *J Neurosci*. 2008 Jul 23;28(30):7520-36. doi:10.1523/JNEUROSCI.0623-08.2008. PubMed PMID: 18650330; PubMed Central PMCID: PMC3040721.
- 4) Niell CM, Stryker MP. Modulation of visual responses by behavioral state in mouse visual cortex. *Neuron*. 2010 Feb 25;65(4):472-9. doi:10.1016/j.neuron.2010.01.033. PubMed PMID: 20188652; PubMed Central PMCID: PMC3184003.
- 5) Wang Q, Burkhalter A. Area map of mouse visual cortex. *J Comp Neurol*. 2007 May 20;502(3):339-57. PubMed PMID: 17366604.
- 6) Marshel JH, Garrett ME, Nauhaus I, Callaway EM. Functional specialization of seven mouse visual cortical areas. *Neuron*. 2011 Dec 22;72(6):1040-54. doi:10.1016/j.neuron.2011.12.004. PubMed PMID: 22196338; PubMed Central PMCID: PMC3248795.
- 7) Andermann ML, Kerlin AM, Roumis DK, Glickfeld LL, Reid RC. Functional specialization of mouse higher visual cortical areas. *Neuron*. 2011 Dec 22;72(6):1025-39. doi: 10.1016/j.neuron.2011.11.013. PubMed PMID: 22196337; PubMed Central PMCID: PMC3876958.
- 8) Fenno LE et al. Targeting cells with single vectors using multiple-feature Boolean logic. *Nat Methods*. 2014 Jul;11(7):763-72. doi:10.1038/nmeth.2996. Epub 2014 Jun 8. PubMed PMID: 24908100; PubMed Central PMCID: PMC4085277.
- 9) Junyent F, Kremer EJ. CAV-2—why a canine virus is a neurobiologist's best friend. *Curr Opin Pharmacol*. 2015 Oct;24:86-93. doi:10.1016/j.coph.2015.08.004. Epub 2015 Aug 25. Review. PubMed PMID: 26298516.