

## 分子生理研究部門

### 統合脳システム分野

#### <研究概要>

#### A) 神経路選択的な活動抑制とトレーシングによる大脳ネットワークの構築と機能の解明

高田昌彦, 井上謙一

神経路選択的な活動抑制法の確立と応用については、認知機能を含む眼球運動課題および上肢運動課題の2種類の行動課題を訓練したサルにおいて、テタヌストキシン軽鎖フラグメント等の細胞操作プローブの選択的導入が行動に及ぼす影響の解析を進めた。具体的には、眼球運動課題では前頭葉眼球運動関連領域(前頭眼野や補足眼野)からの出力系を構成するニューロンに、また、上肢運動課題では線条体および前頭前野領域(特に背外側部と背内側部)への入力系を構成するニューロンに細胞操作プローブを導入することによって、眼球運動あるいは上肢運動の異常を誘導することに成功し、その行動学および電気生理学的解析をおこなった。さらに、神経路選択的な逆行性越シナプスのトレーシングの実現と応用については、前年度から継続している前頭葉の眼球運動関連領域および前頭前野領域への多シナプス性入力様式を同定するトレーシング実験結果の解析を進めるとともに、各種のトレーシングシステムに使用する狂犬病ウイルスベクターの改良をおこなった。具体的には、蛍光タンパク質を用いた逆行性越シナプスの多重トレーシング法については、発現量の向上などのベクター改良を進めてより実用的な4重トレーシング法を開発することに成功し、前頭前野領域(特に背外側部と背内側部)への多シナプス性入力様式の解析に適用した。他方、特定の神経路を選択的にマスクするOFF制御型逆行性越シナプスのトレーシングシステムに関しては、マスク効率の向上のために新規の抗狂犬病ウイルス細胞内抗体のスクリーニングを進め、また特定の神経路を選択的にラベルするON制御型逆行性越シナプスのトレーシングシステムに関しては、越シナプス性感染伝播効率の向上を実現するベクター改良をおこなった。

#### B) 遺伝子改変霊長類モデルの開発と高次脳機能の解析

高田昌彦, 大石高生, 松本正幸, 井上謙一, 二宮太平, 宮地重弘(高次脳機能)

##### ① 神経路選択的な遺伝子操作法を用いた大脳基底核の情報処理機構と機能的役割の解析

- (1) イムノトキシン神経路標的法を用いて、ハイパー直接路を選択的に除去したモデルサルにおいて、運動野刺激に対する淡蒼球内節ニューロンの早い興奮性応答がハイパー直接路を経由することを明らかにした研究成果を原著論文としてPLoS ONE誌に発表した(Inoue and Koketsu et al., 2012)。
- (2) Cre-loxP 神経路選択的な遺伝子発現制御法を用いて、線条体に入力する黒質ドーパミンニューロンにその変性を誘導するアルファシヌクレインを発現させることによって、黒質線条体神経路を選択的に除去したパーキンソン病モデルサルを作製し、パーキンソン病様の運動障害および非運動障害の発現様式を行動学的に解析するとともに、ドーパミンニューロン変性の程度を組織学的に解析し、特に残存したドーパミンニューロンの神経線維にアルファシヌクレインの凝集がみとめられる等の新しい知見を得た。
- (3) イムノトキシン神経路標的法を用いて、眼球運動制御に関与する皮質上丘路を選択的に除去したモデルサルを作製し、上丘に入力する前頭眼野ニューロンの脱落の程度を電気生理学的に確認した。また、複数の眼球運動課題を用いて行動学的変化を解析した結果、皮質上丘路が内部情報に基づく attention よりも外部情報に基づく attention に強く関与することが明らかになった。

##### ② 逆行性感染型レンチウイルスベクターの改良

福島県立医科大学との共同研究により、サル脳において高い逆行性遺伝子導入効率とともに優れたニューロン特異性を有する逆行性感染型レンチウイルスベクターを NeuRet ベクターと命名し、これまでの成果に関する総説を発表した(Kato et al., 2013)。また、高精製度のベクターを安定的に回収する手法を改良し、上記①の業務に利用した。

##### ③ 実行機能の脳内メカニズムの研究(大石, 宮地(高次脳機能)、泉(高次脳機能))

背外側前頭前野が関与する実行機能に背外側前頭前野への複数の入力それぞれどのように寄与しているかを知るために、遺伝子導入法を用いて神経路選択的にシナプス伝達を抑制し、行動への影響を確認する研究を進めている。自己行動のモニター、物体認識、空間認識のそれぞれに関するワーキングメモリーが必要な3つの行動課題を全て訓練した個体4頭を作成し、その内の2頭にドキシサイクリン投与依存的に特定の神経路のシナプス伝達を抑制するためのベクター注入を行い、投与時と非投与時の学習成績を解析中である。

#### C) サルモデルによる皮質脊髄路の可塑性制御機構の検討

高田昌彦, 二宮太平, 大石高生

サルを用いて片側の外側皮質脊髄路(直接路)を損傷した脊髄損傷モデルを作製し、行動学および形態学的解析を実施した。脊髄損傷モデルサルに精密把持課題を遂行させた結果、損傷後数日で機能回復が始まり、1~3ヶ月後には損傷前とほぼ変わらない程度にまで回復することを確認した。このようなモデルサルにおいて、狂犬病ウイルスを用いた逆行性越シナプスの神経トレーシングにより、残存している皮質脊髄路、いわゆる間接路の構築を調べた。損傷直後に同側の脊髄に狂犬病ウイルスを注入した例では、反対側の一次運動野に局限して越シナプスのニューロンラベルが観察された。このことから、一次運動野だけでなく運動前野や補足運動野からの出力を中継する直接路とは異なり、間接路は一次運動野からの出力のみを中継することが明らかになった。また、機能回復した後

に損傷側と同側の脊髄に狂犬病ウイルスを注入した例では、両側の一次運動野に越シナプスのニューロンラベルが観察された。このことは、リハビリテーションによる機能回復に損傷側と同側の一次運動野が関与する神経回路の再編成が寄与することを示唆している。

#### D) 霊長類の脳—小脳—基底核ネットワークにおける運動情報処理の分散と統合

高田昌彦, 二宮太平, 井上謙一

順行性トレーシング法による構造解析

単一のサル(ニホンザルもしくはアカゲザル)の運動前野(PM; 特に背側部)と補足運動野(SMA)の上肢領域を、皮質内微小刺激法により電気生理学的に同定し、それぞれの領域に異なる順行性神経トレーサーである BDA と WGA-HRP を注入した。このようなサルにおいて、PM と SMA の上肢領域から一次運動野(MI)の上肢領域への入力分布の層特異性を比較検討した結果、PM からの入力が MI の浅層(特に2層)を中心に分布するのに対して、SMA からの入力は層横断的かつカラム状に分布することが明らかになった。

#### E) 運動障害と認知障害を切り分けるパーキンソン病のサーキットパズロジー

高田昌彦, 井上謙一

Cre リコンビナーゼを発現する逆行性感染型レンチウイルスベクターをサルの線条体全体に注入し、その数週間後に、変異型  $\alpha$ -synuclein を発現するアデノ随伴ウイルスベクター、AAV-floxed/stop- $\alpha$ -synuclein を黒質に注入したサルを作製した。これらのサルに前もってトレーニングしておいた採餌運動課題を実行させた結果、両ベクターの二重感染によりパーキンソン病様の運動障害および非運動障害を誘発できることを確認し、そのパターンや程度を行動学的に解析した。また、このようなパーキンソン病モデルザルの組織学的解析をおこなった結果、黒質ドーパミンニューロンの変性・脱落が確認されるとともに、線条体のドーパミン神経線維において  $\alpha$ -synuclein を包有する凝集体の存在を確認した。さらに、パーキンソン病に関連する運動機能や認知機能の異常を検出するための課題として採餌パターン切り替え課題をトレーニングしたサルを用いて、線条体の特定の部位に Cre リコンビナーゼを発現する逆行性感染型レンチウイルスベクターを注入することによって、運動機能もしくは認知機能に関与したドーパミン神経路に選択的に変異型  $\alpha$ -synuclein を発現させて、課題遂行時における行動異常を解析した。また、ギャンプル課題などより高度な認知課題を実行するサルにおいて同様の解析をおこなうため、オンケージ型のタッチパネル式行動課題を用いたトレーニングを進めるとともに、発現特異性や発現量を向上させるため、ベクターシステムの改良をおこなった。

#### F) 霊長類脳の転写因子遺伝子発現とその発達に関する研究

大石高生

マカク大脳新皮質の7領域、海馬、被殻および小脳の発達における転写因子遺伝子発現解析を行っている。調べた約2万の遺伝子の内、全ての脳部位で変動していた遺伝子、大脳新皮質7領域で変動し、他の3部位では変動しなかった遺伝子がともに約30個あった。新皮質内の機能遺伝子群の発現の差は発達期に小さく、成体で最大であった。

#### G) 意欲を生み出す神経メカニズムの解明：前頭前野への中脳ドーパミン入力への役割

松本正幸, 高田昌彦

目標を達成して報酬を得よう、あるいは罰を避けようという「意欲」は前頭前野の働きの一つである。最近の研究は、前頭前野に報酬や罰に対して応答する神経細胞(ニューロン)が存在し、これらのニューロン応答が意欲のコントロールに関与することを示唆している。しかし、意欲に関連した前頭前野の神経活動がどのようなメカニズムによって生じるのかという根源的な問題は未解明のままである。

本研究では、そのメカニズムを明らかにするため、中脳ドーパミンニューロンから前頭前野に伝達される神経シグナルに注目する。ドーパミンニューロンは報酬や罰に関連した情報をコードしており、そのシグナルを前頭前野に伝達することによって、意欲に関連した前頭前野の活動を形成する基盤となっている可能性がある。そこで本研究では、ドーパミンニューロンから前頭前野にどのようなシグナルが伝達されているのか調べることを目的とし、前頭前野が発達したマカク属のサルを実験動物として用いた電気生理実験を計画している。具体的には、認知課題をサルに行わせ、ドーパミンニューロンと前頭前野ニューロンの活動を記録する。認知課題では、課題の難易度や報酬量をパラメータとして操作し、サルの意欲をコントロールする。そして、ドーパミンニューロンと前頭前野の活動を比較することにより、意欲に関わる難易度や報酬量の信号がドーパミンニューロンから前頭前野に伝達されているのか検証する。

平成24年度は、行動実験・電気生理実験によって、報酬量や難易度など意欲に関わるパラメータが操作可能な行動課題をサルにおこなわせ、ドーパミンニューロンがどのような信号を伝達しているのかを明らかにした(論文投稿中)。

## <研究業績>

### 原著論文

- 1) Kojima T, Higo N, Sato A, Oishi T, Nishimura Y, Yamamoto T, Murata Y, Yoshino-Saito K, Onoe H, Isa T (2013) Functional annotation of genes differentially expressed between primary motor and prefrontal association cortices of macaque brain. *Neurochemical Research* 38(1):133-40.
- 2) McCairn KW, Iriki A, Isoda M (2013) Global dysrhythmia of cerebro-basal ganglia-cerebellar networks underlies motor tics following striatal disinhibition. *Journal of Neuroscience* Vol. 33(2), p697-708.
- 3) Ninomiya T, Sawamura H, Inoue K, Takada M (2012) Multisynaptic inputs from the medial temporal lobe to V4 in macaques. *PLoS ONE* 7(12):e52115.
- 4) Lu X, Miyachi S, Takada M (2012) Anatomical evidence for the involvement of medial cerebellar output from the interpositus nuclei in cognitive functions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109(46):18980-4.
- 5) Takahara D, Inoue K, Hirata Y, Miyachi S, Nambu A, Takada M, Hoshi E (2012) Multisynaptic projections from the ventrolateral prefrontal cortex to the dorsal premotor cortex in macaques - anatomical substrate for conditional visuomotor behavior. *Eur J Neurosci*, 36(10):3365-75.
- 6) Inoue K, Koketsu D, Kato S, Kobayashi K, Nambu A, Takada M (2012) Immunotoxin-mediated tract targeting in the primate brain: selective elimination of the cortico-subthalamic "hyperdirect" pathway. *PLoS ONE* 7(6):e39149.
- 7) Shimizu J, Fukuda T, Abe T, Ogihara M, Kubota J, Sasaki A, Azuma T, Sasaki K, Shimizu K, Oishi T, Umemura S, Furuhashi H (2012) Ultrasound safety with midfrequency transcranial sonothrombolysis: preliminary study on normal macaca monkey brain. *Ultrasound in Medicine & Biology* 38(6):1040-50.
- 8) Ninomiya T, Sawamura H, Inoue K, Takada M (2012) Segregated pathways carrying top-down signals from frontal cortex to visual areas MT and V4 in macaques. *J Neurosci* 16:32(20):6851-6858.
- 9) McCairn KW, Iriki A, Isoda M (2012) High-frequency pallidal stimulation eliminates tic-related neuronal activity in a nonhuman primate model of Tourette syndrome. *Neuroreport* Vol. 23(4), p206-210.

### 総説

- 1) 高田昌彦(2012)大脳皮質-線条体の神経回路. *Brain and Nerve* 「特集 線条体の基礎と臨床」, 64:871-879.
- 2) 木村活生(2012)【パーキンソン病医学・医療の最前線】(第3部)治療上の問題点 進行期パーキンソン病治療 脳深部刺激療法(DBS)の利点と欠点. *Progress in Medicine*, 32(6) : 1235-1240.
- 3) 木村活生, 山本 光利(2012)【Restless legs syndrome】 抗 Parkinson 病薬による restless legs syndrome の治療. *神経内科* 76(1) : 67-74.
- 4) 木村活生, 山本 光利(2012)【類似する神経症候・徴候を正しく理解する-神経診断のピットフォール】 Apathy と anhedonia. *Clinical Neuroscience* 30(5) : 584-586.

### 学会発表

- 1) Takada M, Kobayashi K, Nambu A (2013) Immunotoxin-mediated tract targeting in the primate brain:selective elimination of the cortico-subthalamic "hyperdirect" pathway. 11th Triennial meeting of the International Basal Ganglia Society (2013/03/03-07, Eilat, Israel).
- 2) 大石高生, 佐藤明, 檜垣小百合, 近藤伸二, 小島俊男(2012)マカク中枢神経系の遺伝子発現の発達変化の解析. 第59回中部日本生理学会(2012/11/16, 岡崎).
- 3) Sawamura H, Ninomiya T, Inoue K, Takada M(2012)Architecture of multisynaptic inputs from the medial temporal lobe to V4 in macaques. 42th Annual Meeting of Society for Neuroscience (2012/10/13-17, New Orleans, USA).
- 4) Ninomiya T, Nakagawa H, Ueno M, Nishimura Y, Oishi T, Ymashita T, Takada M(2012)Neural basis for functional compensation after spinal cord injury in macaques. 42th Annual Meeting of Society for Neuroscience (2012/10/13-17, New Orleans, USA).
- 5) T. Kojima, N. Higo, A. Sato, T. Oishi, Y. Nishimura, T. Yamamoto, Y. Murata, K. Yoshino-Saito, H. Onoe, T. Isa (2012) Gene network analysis of genes differentially expressed between primary motor and prefrontal association cortices of macaque brain, 42th Annual Meeting of Society for Neuroscience (2012/10/17, New Orleans, USA).
- 6) Y. Murata, N. Higo, T. Hayashi, Y. Nishimura, Y. Sugiyama, T. Oishi, H. Tsukada, T. Isa, H. Onoe (2012) The role of the ventral premotor area after primary motor cortex lesion in macaque monkeys: Involvement in functional compensation of grasping, 42th Annual Meeting of Society for Neuroscience (2012/10/14, New Orleans, USA).
- 7) Bromberg-Martin ES, Matsumoto M, Hikosaka O (2012) Lateral habenula neurons encode risky rewards with distinct tonic and phasic motivational signals. 42th Annual Meeting of Society for Neuroscience (2012/10/14, New Orleans, USA).
- 8) 木村活生, 井上謙一, 奥田泰弘, 加藤成樹, 黒田呈子, 藤原真紀, 小林和人, 高田昌彦(2012)霊長類における改変型逆行性感染型レンチウイルスベクター使用による黒質ドーパミンニューロンへの選択的遺伝子発現. 第35回日本神経科学大会(2012/09/20, 名古屋).
- 9) McCairn KW, Iriki A, Isoda M (2012) The cerebellum contributes to basal ganglia mediated motor tics. 第35回日本神経科学大会(2012/09/20, 名古屋).
- 10) 井上謙一, 額大輔, 加藤成樹, 小林和人, 南部 篤, 高田昌彦(2012)イムノトキシン神経路標的法を用いたサル皮質-視床下核路の選択的除去. 第35回日本神経科学大会(2012/09/19, 名古屋).

- 11) 二宮太平, 中川 浩, 上野将紀, 西村幸男, 大石高生, 山下俊英, 高田昌彦 (2012)マカクザルにおける脊髄損傷後の機能回復に関与する神経回路再編成と機能分子発現. 第 35 回日本神経科学大会 (2012/09/19, 名古屋).
- 12) 杉山容子, 大石高生, 山下 晶子, 村田弓, 山本竜也, 伊佐 正, 肥後範行(2012)健常及び運動皮質損傷マカクサルにおける SPP1 の局在の違い.第 35 回日本神経科学大会(2012/09/19, 名古屋).
- 13) 大石高生, 佐藤明, 檜垣小百合, 近藤伸二, 小島俊男(2012)サル中枢神経系の遺伝子発現の発達の部位間比較. 第 35 回日本神経科学大会(2012/09/20, 名古屋).
- 14) Matsumoto M (2012) Midbrain dopamine neurons are divided into different functional groups. 10th International Catecholamine Symposium. (2012/09/10, Pacific Grove, USA).
- 15) Kimura K, Koyano S, Baba Y, Takahashi T, Suzuki Y, Kuroiwa Y (2012) Evaluation of the cerebral blood flow by 99mTc-ECD SPECT using eZIS in hereditary spinocerebellar ataxias. 16th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders(2012/06/17-21 , Dublin, Ireland).

## 講演

- 1) 木村活生(2012/12/15) やさしい脳の話「パーキンソン病の外科療法」, 高松パーキンソン病市民公開講座, 高松神経内科クリニック, 高松市中央図書館会議室, 高松市.
- 2) 木村活生(2012/11/23)DBS どんな治療? パーキンソン病患者勉強会, 秋田県立脳血管研究センター神経内科, 秋田市 JA 会館, 秋田市.
- 3) 松本正幸(2012/11/20)Negative learning signals in the lateral habenula, Neurex Workshop “Habenula”, Strasbourg, France.
- 4) 井上謙一(2012/11/9)第 9 回ナショナルバイオリソースプログラム「ニホンザル」 公開シンポジウム, 神経路選択的な遺伝子導入による神経ネットワークの機能操作, 秋葉原 UDX, 東京.
- 5) 大石高生(2012/11/7) 変化する脳, くるる情報大学, 岐阜市.
- 6) 高田昌彦(2012/9/30)第 34 回日本生物学的精神医学会「遺伝子改変霊長類モデルを用いた精神神経疾患研究を目指して」, アルファシヌクレイン発現によるパーキンソン病サルモデルの開発, 神戸国際会議場, 神戸.
- 7) 高田昌彦(2012/09/19)第 35 回日本神経科学大会, ウイルスベクターを用いた遺伝子導入による神経回路の狙い撃ち作戦. 名古屋国際会議場, 名古屋.
- 8) 松本正幸, 高田昌彦(2012/9/18)中脳ドーパミンニューロンによる動機付け信号と認知信号の情報表現. 第 35 回日本神経科学大会, 名古屋.
- 9) 大石高生(2012/7/17)サルを用いた脳脊髄損傷からの運動機能回復の研究: 訓練開始遅延の影響, 青丹学園関西学研医療福祉学院, 奈良市.
- 10) 高田昌彦(2012/07/14)第 21 回サル疾病ワークショップ サル類の疾病と病理のための研究会, 共同利用施設でサル類を用いた医学研究を行う利用者の立場から, ユーザーにやさしい共同利用施設のあり方. 麻布大学, 相模原.

## 遺伝子情報分野

### <研究概要>

#### A) ゲノム不毛遅滞(RCRO)の進化と意義

平井啓久, 古賀章彦(ゲノム多様性)

チンパンジーの RCRO の生物学的意義に関わる論文を推敲した。テナガザルおよびヨザルの新しいアルファサテライトを発見し、染色体解析をおこなったうえで、その分化について推測し、論文をまとめた。

#### B) アジア霊長類と病原体の宿主寄生体関係史の探索

平井啓久, 古賀章彦(ゲノム多様性), 岡本宗裕(人類センター), 安波道郎(長崎大学熱帯医学研究所), 早川敏之(人類センター), 松井 淳(非常勤研究員)

タイ(国立動物園協会), マレーシア(野生動物保護局), 台湾(国立屏東科技大学野生動物保育所)を訪問し、調査研究内容のセミナーと共同研究に関わる話し合いをおこなった。インドネシアのカニクイザルとブタオザルの血液における SRV4 と SRV5 の検査をおこなった。またフィリピンから輸入されたカニクイザルを 50 頭検査した。

#### C) ニホンザル苦味受容体の多型解析

鈴木南美, 早川卓志, 伯川美穂, 松井淳(人類進化モデル研究センター), 郷康広, 平井啓久, 今井啓雄

各地のニホンザルについて苦味受容体 TAS2R の遺伝子多型解析を行った。特に、紀伊半島の群については TAS2R38 の開始コドンの変異に注目し、この変異が生じた年代推定を行っている。

#### D) チンパンジー苦味受容体の多型解析

早川卓志, 菅原 亨(現 成育医療センター), 鶴殿俊史, 森村成樹(以上, 熊本サンクチュアリ), 友永雅己(思考言語), 大東肇(福井県立大学), 郷康広, 平井啓久, 今井啓雄

チンパンジー東西亜種間で苦味受容体の遺伝子型に想像以上の差があることを発見し、論文にまとめた。