

## 学会発表

- 1) Konoike N, Nakamura K, Neuronal responses to faces in the anterior cingulate cortex of monkeys. 43th Annual meeting, Society for Neuroscience, (Nov 9-13, 2013, San Diego, CA, USA)
- 2) 堀田英莉, 関 義正, 岡ノ谷一夫, 齋藤慈子, 中村克樹「コモンマーモセットは乳児の鳴き声に対して発声頻度を上げる」第28回日本霊長類学会(2013年9月6-9日, 岡山市) P148.
- 3) 脇田 真清, コモンマーモセット(*Callithrix jacchus*)の音列知覚, 日本動物心理学会第73回大会(2013年9月13-16日, つくば市) 発表要旨集 p30. 動物心理学研究 63: 161.
- 4) 三輪美樹, 中村克樹「マーモセットの麻酔方法の実例紹介」第3回日本マーモセット研究会大会(2013年12月11-12日, 福岡市)
- 5) 中村克樹, 竹本篤史, 木場礼子, 三輪美樹, 山口智恵子「マーモセットの視覚認知地図」第3回日本マーモセット研究会大会(2013年12月11-12日, 福岡市)

## 講演

- 1) 中村克樹: 「コモンマーモセットの行動特性とモデル動物としての可能性」 第60回日本実験動物学会総会 シンポジウム III 「先端の実験動物としての霊長類モデルの開発: 基礎から再生医療まで」 (2013年5月15-17日のうち16日に講演、つくば市)
- 2) 中村克樹: 「マーモセットの認知機能の研究」 都医学研セミナー(東京都医学総合研究所), (2013年5月27日, 東京都)
- 3) 中村克樹: 「前頭葉と親子の絆づくり」 新幼児教育研究会(2013年7月29日, 大阪市)
- 4) 中村克樹: 「Discrimination of faces in common marmosets」. 6th IGAKUKEN International Symposium on “Marmoset Neuroscience -Anatomy Development Function-” (第6回 都医学研国際シンポジウム 「マーモセットの神経科学」, 招待講演) (東京都医学総合研究所), (2013年10月3~4日, 東京都)
- 5) 中村克樹: 「幼児の脳とこころを育む」 日本公文教育研究会(2014年1月15日, 函館市)
- 6) 中村克樹: 「動作の理解とコミュニケーション」新学術領域研究「ヘテロ複雑システムによるコミュニケーション制御のための神経機構の解明」公開シンポジウム「コミュニケーションする脳!!」(2014年3月21日, 東京都)

## 分子生理研究部門

### 統合脳システム分野

#### <研究概要>

#### A) ウイルスベクターシステムを駆使した線条体入力系の構造—機能連関の解明

高田昌彦, 井上謙一

本研究課題では、さまざまなウイルスベクターを利用した先端的神経ネットワーク解析システムを確立し、それらを駆使して、霊長類の大脳基底核を巡る神経ネットワークの構造と機能を明らかにすることを目的としている。平成25年度は、外来遺伝子の高発現化など、独自に開発、改良をおこなった狂犬病ウイルス固定株をベースとするウイルスベクターに、4種類の蛍光タンパク質遺伝子を組み込んで多重逆行性越シナプスのための狂犬病ウイルスベクターを作製し、前頭前野の4領野への注入実験を実施した。その結果、このベクターは親株である CVS26 株と同等の逆行性感染伝播効率を保持しており、1シナプスにつきおよそ24時間で移動し、注入後72時間ではベクターが注入部位からシナプスを3つ介する3次ニューロン(大脳皮質—大脳基底核ループ回路では線条体の投射細胞)まで到達していることが確認され、かつ大脳基底核のさまざまな領域において蛍光タンパク質による多重ラベルが発見された。また、線条体の特定の部位に入力するニューロン群の軸索投射を解析するためのシステムとして、研究代表者らが近年開発に成功した逆行性レンチウイルスベクターとアデノ随伴ウイルスベクター、および Tet-On 発現誘導系を利用した経路選択的細胞可視化法に改良を加え、発現量の増加とリーク発現の低下に成功した。さらに、線条体の特定の部位に入力するニューロン群の入出力解析法の開発としては、同法に必須なベクターである感染伝播能欠損型(G 遺伝子欠損型)狂犬病ウイルスベクターにゲノム配列の改変をおこない、従来型と比べて外来遺伝子発現能を向上させ、かつ細胞毒性を低減した改良型ベクターを開発することに成功した。

#### B) 霊長類脳において導入遺伝子発現をモニターするための生体イメージング法の開発

高田昌彦, 井上謙一

本研究課題では、生体イメージング法におけるマーカー遺伝子を利用し、ウイルスベクターによって導入した外来遺伝子の発現状態をモニターする手法を霊長類脳神経系で確立するとともに、同手法を特定の神経路を形成するニューロン群にのみ外来遺伝子を導入する神経路選択的遺伝子導入法に適用し、ターゲット神経路の活動を操作する機能介入解析をおこなう際に、遺伝子発現状態をモニターすることを可能にすることを目的としている。平成25年度は、陽電子放射断層撮影(PET)のマーカー遺伝子を導入したアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを作製し、同ベクターをマカクザルの線条体に注入し、その発現状態をPETで検出できることを検証する実験をおこなった。その結果、PET撮像により線条体におけるマーカー遺伝子の発現がシグナルとして検出できることを確認し、組織学的解析をとおしてマーカー遺伝子の発現範囲とPETシグナル範囲が一致していることを確認した。また、タグ配列の導入によるPETシグナルへの影響について解析をおこなった。また、この手法を特定の神経回路に対する機能介入解析に応用するため、逆行性レンチウイルスベクターとAAVベクター、およびTet-On発現誘導系を利用した神経路選択的な遺伝子発現法に改良を加え、発現量の増加

とリーク発現の低下を実現し、かつ PET マーカー遺伝子、組織学的マーカー遺伝子、神経活動制御プローブ遺伝子など複数の遺伝子を発現できるシステムを開発した。また、ベクターシステムに RNAi による発現抑制系を開発するためのベクター配列の改変をおこなった。

### 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。脊髄損傷モデルザ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。このようなモデルザルで皮質脊髄路の順行性神経路トレーシングを行い、損傷した脊髄の支配側と反対側の脳半球において、一次運動野から脊髄 motor neurons に向かって神経軸索が新たに伸長していることを見出した。また、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限局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。さらに、反発性軸索誘導因子である ephrin B3 が脊髄正中付近に強く発現していることを霊長類で初めて明らかにした。

### 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

狂犬病ウイルスを用いた解析: 狂犬病ウイルスの逆行性越シナプスのトレーシング法を用いて、側頭葉皮質から前頭前野背側部への特異的な入力様式を同定することに成功した (Hirata et al., Cereb Cortex, 2013)。具体的には、上前頭回(9野)、主溝背側壁(46d野)もしくは腹側壁(46v野)、前頭眼窩野外側部(12野)にウイルス注入をおこない、これらの領域への多シナプス性入力様式を解析した。側頭葉皮質において越シナプスの的に標識されたニューロンの分布を検討した結果、46d野に注入した例では標識されたニューロンが内側側頭皮質の嗅内皮質や傍海馬皮質に分布しているのに対して、46v野に注入した例では下側頭皮質のTE野に分布していることが明らかになった。このことは、46d野と46v野はそれぞれ側頭葉皮質の記憶関連領域あるいは視覚関連領域から特異的に多シナプス性入力を受けることを示唆している。

また、狂犬病ウイルス CVS 株をベースとする狂犬病ウイルスベクターを作製することに成功した。培養細胞を用いた検証実験の結果、CVS26株は遺伝子発現量が低いことが明らかになったため、外来遺伝子を高発現させる仕組みとして、遺伝子順序の改変をおこなった。この改良型ベクターに、外来遺伝子として GFP を導入してその発現効率を検討した。サルの運動前野にベクターを注入し、72時間後に灌流固定をおこない、抗狂犬病ウイルス Nタンパク質抗体を用いた免疫染色をおこなった結果、ベクターは注入部位からシナプスを3つ介する3次ニューロンに相当する線条体の投射ニューロンまで到達しており、およそ1シナプス24時間で移動すると考えられた。GFP抗体を用いた免疫染色をおこなったところ、同様の結果が得られており、検出感度としてはゲノムの先端にあるNタンパク質とほぼ同等であることが示された。未染色標本で GFP 蛍光を調べたところ、初期感染から約24時間が経過していると推定される三次ニューロン(淡蒼球外節)では蛍光は検出限界程度であったが、初期感染から約48時間が経過した二次ニューロン(淡蒼球内節)では検出に十分な蛍光が観察された。また、初期感染から約48時間が経過した視床のニューロンでは極めて明るい蛍光が観察された。さらに、このベクターに4種類の異なるカラー(緑、赤、青、赤外)の蛍光蛋白を搭載したウイルスベクターを開発し、逆行性越シナプスの多重トレーシング法を開発することに成功した。

### 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

1. 片側の線条体(被殻および尾状核)に Cre リコンビナーゼを発現する逆行性 LV ベクター(LV-Cre)を、両側の黒質(外側部および内側部)にドーパミンニューロン変性を誘導する  $\alpha$ -synuclein 遺伝子(A53T 変異)を組み込んだ loxP 配列搭載 AAV ベクター(AAV-LSL/FLEX- $\alpha$ -syn)を注入し、パーキンソン病モデルザル( $\alpha$ -synuclein モデル)を開発した。このような  $\alpha$ -synuclein モデルでは、LV-Cre 注入側に対応する上下肢にパーキンソン病様の行動障害が誘発され、手の使用頻度の低下などが観察された。また、ドーパミン合成に関わるチロシン水酸化酵素(TH)の免疫染色をおこなった結果、LV-Cre を注入した半球の線条体および黒質において TH レベルの減弱が確認されるとともに、残存している線条体の TH 陽性線維の中にリン酸化  $\alpha$ -synuclein の凝集体が検出された。本研究の結果は  $\alpha$ -synuclein の過剰発現によるドーパミンニューロンの変性・脱落をサーキット選択的に誘導できることを示している。

2. 逆行性感染型レンチウイルスベクターとテトラサイクリン誘導性転写制御システムを組み合わせて、神経路選択的にドーパミン神経伝達を抑制したモデルザルの作製に成功した。本実験系では、導入遺伝子としてテトラサイクリン応答プロモータの下流にテタヌトキシン軽鎖遺伝子を挿入した逆行性感染型レンチウイルスベクターを線条体に、テトラサイクリン応答因子を発現するアデノ随伴ウイルスベクターを黒質に注入した。このようなサルにおける行動変化を採餌タスクなどの行動学的指標を用いて解析した結果、ドキシサイクリン誘導的かつ可逆的にパーキンソン病様の運動障害が誘発されることを確認した。このような運動障害は緩徐に進行し、また、ドキシサイクリンの投与期間中に機能回復は観察されなかった。

### 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領野、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。転写因子の遺伝子461個の内、脳部位で変動していた遺伝子は20%以下であった。大脳新皮質7領野の内、一次視覚野と連合野は発現プロファイルが最も異なり、感覚運動野はその中間に位置した。転写因子遺伝子の内、発達期において発現が変動するものは約半数であった。

### G) 実行機能の脳内メカニズムの研究

大石高生、宮地重弘（高次脳機能）、泉明宏（高次脳機能）

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シナプス伝達を抑制するためのベクター注入を行った。特定の課題の学習成績は、非投与時に比べて投与時に低下する傾向があった。

### <研究業績>

#### 原著論文

- 1) Hirata Y, Miyachi S, Inoue K, Ninomiya T, Takahara D, Hoshi E, Takada M (2013) Dorsal area 46 is a major target of disynaptic projections from the medial temporal lobe. *Cereb Cortex* 23:2965-75.
- 2) Yoshida T, Suzuki S, Iwasaki Y, Kaneko A, Saito A, Enomoto Y, Higashino A, Watanabe A, Suzuki J, Inoue K, Kuroda T, Takada M, Ito R, Ito M, Akari H (2013) Efficient in vivo depletion of CD8+ T lymphocytes in common marmosets by novel CD8 monoclonal antibody administration. *Immunol Lett* 154:12-17.
- 3) Hayashizaki S, Hirai S, Ito Y, Honda Y, Arime Y, Sora I, Okado H, Kodama T, Takada M (2013) Methamphetamine increases locomotion and dopamine transporter activity in dopamine D5 receptor-deficient mice. *PLoS ONE* 8:e75975.
- 4) Matsumoto M, Takada M (2013) Distinct representations of cognitive and motivational signals in midbrain dopamine neurons. *Neuron* 79:1011-1024.
- 5) Isomura Y, Takekawa T, Harukuni R, Handa T, Aizawa H, Takada M, Fukui T (2013) Reward-modulated motor information in identified striatum neurons. *J Neurosci* 33:10209-10220.
- 6) Hayakawa H, Nagai M, Kawanami A, Nakata Y, Nihira T, Ogino M, Takada M, Saïdo T, Takano J, Saegusa M, Mikami T, Hamada J, Nishiyama K, Mochizuki H, Mizuno Y (2013) Loss of DARPP-32 and calbindin in multiple system atrophy. *J Neural Transm* 120:1689-1698.
- 7) Hoshina N, Tanimura A, Yamasaki M, Inoue T, Fukabori R, Kuroda T, Yokoyama K, Tezuka T, Sagara H, Hirano S, Kiyonari H, Takada M, Kobayashi K, Watanabe M, Kano M, Nakazawa T, Yamamoto T (2013) Protocadherin 17 regulates presynaptic assembly in topographic cortico-basal ganglia circuits. *Neuron* 78:839-854.
- 8) Miyachi S, Hirata Y, Inoue K, Lu X, Nambu A, Takada M (2013) Multisynaptic projections from the ventrolateral prefrontal cortex to hand and mouth representations of the monkey primary motor cortex. *Neurosci Res* 76:141-149.
- 9) Hiraoka M, Kuroda T, Inoue K, Senoo H, Takada M (2013) Developmental anatomy in the zonular connection with lens capsule in macaque eye. *Anat Rec* 296:726-735.
- 10) Sugiyama Y, Higo N, Yoshino-Saito K, Murata Y, Nishimura Y, Oishi T, Isa T (2013) Effects of early versus late rehabilitative training on manual dexterity after corticospinal tract lesion in macaque monkeys. *J Neurophysiol*, 109(12):2853-2865
- 11) Yamamoto T, Oishi T, Higo N, Murayama S, Sato A, Takashima I, Sugiyama Y, Nishimura Y, Murata Y, Yoshino-Saito K, Isa T, Kojima T (2013) Differential Expression of Secreted Phosphoprotein 1 in the Motor Cortex among Primate Species and during Postnatal Development and Functional Recovery. *PLoS One*, 8(5): 1-13, e65701

#### 総説

- 1) Takada M, Inoue K, Koketsu D, Kato S, Kobayashi K and Nambu A (2013) Elucidating information processing in primate basal ganglia circuitry: a novel technique for pathway-selective ablation mediated by immunotoxin. *Front Neural Circuits*. 7:140.
- 2) 高田昌彦 (2013) ウイルスベクターを用いた遺伝子導入による特定神経回路の除去—イムノトキシン神経路標的法による霊長類の大脳基底核機能解析. *Brain and Nerve* 「特集 見せる・仕分ける—脳機能解析の新技术」. 65:635-642.
- 3) 高田昌彦 (2013) 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. 日本生物学的精神医学会誌「特集2 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」. 24:57-61.

#### 学会発表

- 1) Takao Oishi, Sayuri Higaki, Akira Sato, Shinji Kondo, Toshio Kojima (2014) Gene expression of the transcription factors in the monkey cerebral cortex during postnatal development. 第91回日本生理学会大会 (2014/3/28, 鹿児島)
- 2) Takada M, Inoue K (2014) Novel primate models for Parkinson's disease due to nigrostriatal pathway-selective gene manipulation. *New Frontier of Molecular Neuropathology 2014* (2014/3/17, 東京)
- 3) Kimura K, Inoue K, Tanaka F, Takada M (2013) Age-dependent alterations in the distribution of neurons expressing alpha-synuclein in macaque monkeys. *Neuroscience 2013* (2013/11/9-13, San Diego, USA)
- 4) Kawai T, Sato N, Takada M, Matsumoto M (2013) Negative feedback monitoring by lateral habenula and anterior cingulate cortex in monkey during a reversal learning task. *Neuroscience 2013* (2013/11/9-13, San Diego, USA)
- 5) Hatanaka N, Miyachi S, Nambu A, Takada M (2013) Neuronal networks innervating the jaw-opening and jaw-closing muscles: A retrograde transneuronal tracing study with rabies virus in the rat. *Neuroscience 2013* (2013/11/9-13, San Diego, USA)

- 6) 川合隆嗣, 佐藤暢哉, 高田昌彦, 松本正幸 (2013) 逆転学習課題におけるマカクザル前部帯状皮質と外側手綱核の機能的役割. 日本動物心理学会第 73 回大会 (2013/9/15, つくば)
- 7) 川合隆嗣, 佐藤暢哉, 高田昌彦, 松本正幸 (2013) 前部帯状皮質と外側手綱核の負の報酬シグナルが学習に果たす役割. 2013 年度包括脳ネットワーク夏のワークショップ (2013/8/31, 名古屋)
- 8) 木村 活生, 井上 謙一, 田中 章景, 高田 昌彦 (2013) マカクザルにおけるアルファシヌクレイン発現ニューロンの加齢による分布様式 の変化. 第 28 回日本大脳基底核研究会 (2013/07/21, 静岡)
- 9) 中川浩, 二宮太平, 高田昌彦, 山下俊英 (2013) マカクザル脊髄損傷後の損傷周囲部には RGMa が過剰発現される. 第 36 回日本神経科学大会 (2013/6/20-23, 京都)
- 10) 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 (2013) 脊髄路損傷モデルザルにおける大脳皮質運動野から脊髄への越シナプス的入力様式. 第 36 回日本神経科学大会 (2013/6/20-23, 京都)
- 11) 木村活生, 井上謙一, 黒田呈子, 田中章景, 高田昌彦 (2013) マカクザルにおけるアルファシヌクレイン発現ニューロンの加齢による分布変化. 第 36 回日本神経科学大会 (2013/6/20-23, 京都)
- 12) 川合隆嗣, 佐藤暢哉, 高田昌彦, 松本正幸 (2013) 外側手綱核と前部帯状皮質における学習シグナルの表現. 第 36 回日本神経科学大会 (2013/6/20-23, 京都)
- 13) 井上謙一, 藤原真紀, 奥田泰宏, 高田昌彦 (2013) 神経回路解析に適した新規狂犬病ウイルスベクターの開発. 第 36 回日本神経科学大会 (2013/6/20-23, 京都)

## 講演

- 1) 高田昌彦 (2014) サル片側脊髄損傷モデルにおける皮質脊髄路の可塑性変化の解析とリハビリテーション効果の検討. CREST 「脳神経回路」研究領域 運動系関連研究チーム合同ワークショップ (2014/2/11, 岡崎)
- 2) 高田昌彦 (2014) システム脳科学の趨勢を読む. 生理研シンポジウム・グローバルネットワークによる脳情報処理 (2014/1/11, 岡崎)
- 3) 井上謙一 (2014) 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. 生理研シンポジウム・グローバルネットワークによる脳情報処理 (2014/1/11, 岡崎)
- 4) 高田昌彦, Kevin McCairn (2014) Decoding tourettism and its response to deep brain stimulation. 京都大学 - ブリストル大学シンポジウム (2014/1/9, 岡崎)
- 5) 高田昌彦 (2013) ニホンザルモデルが拓く新しい医療-脳科学の種が実るまで. ナショナルバイオリソースプロジェクト「ニホンザル」第 10 回公開シンポジウム (2013/11/22, 東京)
- 6) 高田昌彦 (2013) 遺伝子改変サルモデルを用いてパーキンソン病を克服する. ナショナルバイオリソースプロジェクト「ニホンザル」第 10 回公開シンポジウム (2013/11/22, 東京)
- 7) 高田昌彦 (2013) 精神疾患サルモデルの作出に向けた新規ウイルスベクターとその導入手法の開発. 第 4 回脳表現型の分子メカニズム研究会 (2013/11/16-17, 福岡)
- 8) 大石高生, 今井啓雄, 平井啓久, 高田昌彦 (2013) Sporadic premature aging in a Japanese monkey. 第 3 回生理研-チュービンゲン大学合同シンポジウム (2013/10/11, 岡崎)
- 9) 井上謙一 (2013) 霊長類脳研究に資する遺伝子導入技術の開発. 「霊長類認知ゲノミクス」キックオフワークショップ (2013/10/1, 岡崎)
- 10) 大石高生 (2013) サルを用いた脳脊髄損傷からの運動機能回復の研究: 訓練の効果と脳活動の操作, 青丹学園関西学研医療福祉学院 (2013/7/16, 奈良)
- 11) 井上謙一 (2013) Manipulation of primate neuronal circuits by the use of modified lentiviral vector with enhanced retrograde transport. 生理研ミニ国際シンポジウム Frontiers in Neural Control of Actions (2013/6/17, 岡崎)
- 12) 高田昌彦 (2013) ウイルスベクターを用いた神経路選択的除去技術により大脳基底核の機能と病態を解明する. 第 60 回日本実験動物学会 (2013/5/16, つくば)

## 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 (ゲノム多様性分野), スダラス・バイチャロエン (タイ動物園協会), ビジット・アライサムクル (タイ動物園協会), 宮部貴子 (人類センター)

テナガザルのアルファサテライト DNA はセントロメアだけでなくテロメアや染色体腕内に介在することを発見した。その特性を利用し属間雑種個体のゲノムを見分けるマーカーとして有用であることを明らかにし、種および雑種特性とともに論文にまとめた。また、テナガザルのヘテロクロマチンとアルファサテライト DNA の特性について本のチャプターとしてまとめた。

#### 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 (ゲノム多様性分野), 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), スダラス・バイチャロエン (タイ動物園協会), Hsiu-hui Su (台湾国立屏東科技大学)

タイ国立動物園協会の動物園においてスローロリスの血液を収集し、宿主の進化的解析を進めるとともに病原体の検出解析を開始した。台湾国立屏東科技大学からタイワンザルの台湾国内の北部、中部、南部、東部の個体群の糞サンプルを