

7.2 研究成果

7.2.1 計画研究

2020-A-1 オルガノイド培養系を用いた霊長類消化器の機能解析

岩槻健（東京農大・応生・食安健）、有永理峰（東京農大・院・農）、坂口恒介（東京農大・院・農）、小松さゆり（北海道大学・院・理）所内対応者：今井啓雄

前年度に続いて、サル（*Macaca mulatta*）の消化管上皮細胞の三次元培養系（オルガノイド培養系）を使い、研究計画で課題として掲げた、1）消化管上皮細胞の至適分化条件の探索および、2）機能評価系の構築を行った。

まず、消化管オルガノイドの培養を安定化させるために近年報告された IGF-1 と FGF-2 を培地に添加し、代わりに p38 阻害剤である SB202190 を除いて培養した。その結果、オルガノイドを形成率が向上したばかりでなく、分化細胞数も増えたため、以後 IGF-1 と FGF-2 を添加した培地を用いることにした。次に、この新しい培地組成を分化誘導培地に替え、II 型免疫系を惹起する IL-4 を加えることで Tuft 細胞への分化誘導を試みた。その結果、Tuft 細胞選択的に発現する遺伝子である POU2F3、DCLK1、TRPM5 などの発現上昇が観察された。また、免疫染色により DCLK1 タンパク質の発現も増加することが確認された。特筆すべきことは、この IGF-1 および FGF-2 を用いることで、これまでの不安定な培養系が改善されたことである。

現在、霊長類の Tuft 細胞のナチュラルリガンドが何かについてはまだ明らかではない。マウスの研究により寄生虫感染がトリガーとなり、Tuft 細胞が活性化し一連の II 型免疫反応を引き起こされるが、今回 IL-4 による Tuft 細胞の分化誘導もその一部を再現したものである。今後は、本系を用いて II 型免疫反応を増強する食品因子や化学物質の探索を目指したい。これを見ているときのチンパンジーの視線と瞳孔径を測定した。現在データの分析を進めている。

2020-A-2 霊長類の生理機能季節変化の分子基盤の解明

吉村崇（名大・院・生命農学）、中根右介、中山友哉、Ying-Jey Guh、Junfeng Chen、沖村光祐（名大・院・生命農学）所内対応者：今井啓雄

環境の季節変化に応じて、代謝、免疫機能、気分など、ヒトの様々な生理機能は季節変化を示す。また、心疾患、肺がん、精神疾患などの発症率にも季節の変化が存在するが、それらの季節変化をもたらしている分子基盤は明らかになっていない。次世代シーケンサーの進歩により、様々な組織の時系列試料において全転写産物の振る舞いをゲノムワイドに明らかにできる環境が整った。サルは進化的にヒトに近く、これまでヒトの生理機能や病態の理解に必須の役割を果たしてきた。特に、ヒトの様々な生理機能や病態の季節変化の分子基盤を明らかにするためには、繁殖などにおいて、明瞭な季節応答を示すアカゲザルを用いる以外に研究手段がない。そこで本研究では、屋外の自然条件下で飼育されているアカゲザルにおいて、全身の様々な組織における全転写産物の季節性時空間動態を RNA-seq 解析によって明らかにすることを目的として実験を行ったところ、季節変動する遺伝子を抽出することに成功した（図）。また、血液におけるメタボローム解析を行うことで、季節変動する代謝物を見出すことに成功した。

2020-A-3 複数骨格筋への単シナプス性発散投射構造の解剖学的同定

関和彦、大屋知徹、窪田慎治、工藤もゑこ、種田久美子（国立精神・神経医療研究センター）、梅田達也（京大） 所内対応者：高田昌彦

現在までに、最も効率的に脊髄運動ニューロンに遺伝子を導入する方法を確立しつつある。つまり、マカクサルの第一背側骨間筋の神経終板帯を電気生理学的に同定し、当該部位にウイルスベクター(AAV9)によって、脊髄運動ニューロンへの GFP の導入を試みた。結果として、定性的評価では 100 個以上の運動ニューロンがラベルされた。ヒトでは当該筋を支配する α 運動ニューロンの数は 120 程度と言われるので、効率は高いといつてよい。G 遺伝子の欠損により感染伝播能を欠失させた高発現狂犬病ウイルスベクターの開発も進捗しており、次年度は最低 2 回の実験を計画している。

2020-A-4 サル内側前頭葉を起点とする領域間回路の解析とうつ病モデルの創出

筒井健一郎、中村晋也、大原慎也、吉野倫太郎（東北大・生命） 所内対応者：高田昌彦

我々は、内側前頭葉、特に前部帯状皮質と扁桃体や側坐核を結ぶ繊維連絡の構成を明らかにするために、ウイラーストレーザーを用いた解剖学的解析を行っている。本年度は、これまでに行った逆行性ウイルスベクターを用いた実験結果の解析を進めた。さらに、マカクザルの前部帯状皮質の複数領域（背側部、膝前部、膝下部）にそれぞれ異なる蛍光タンパク質を発現する順行性ウイルスベクターを注入する実験を行った。その結果、いずれの注入部位についても扁桃体や側坐核において標識された軸索が認められたが、その分布パターンには違いが認められた。今後は、さらに解析と実験を進め、これらの解剖学的結果について論文投稿の準備を行うとともに、化学遺伝学的手法による機能阻害実験によりこれらの神経経路の機能

を調べていく。本研究の一部について、第43回日本神経科学大会（ポスター）および第61回日本神経学会学術大会（招待講演）において発表を行った。

2020-A-5 Phylogenetic genomics and adaptive evolution of the genus *Trachypithecus*

Zhijin Liu(Institute of Zoology, Chinese Academic of Sciences) 所内対応者：今井啓雄

The divergence between limestone and forest langurs was estimated to have occurred at ~ 2.90 Mya (95% HPD 2.23-3.56). Phenotypically, the limestone langurs exhibit generally black fur coloration, while the forest langurs are predominantly gray pelage coloration. As melanocortin 1 receptor (MC1R) is a critical regulator of melanin pigment formation during pelage development, we first examined the MC1R gene in both limestone and forest langurs. We found one amino acid substitution (E94D) of the MC1R in all limestone langurs, but not in any forest langurs.

To further explore the effects of the substitution E94D of MC1R on melanin synthesis in limestone langurs, we evaluated MC1R activity by in vitro cyclic adenosine monophosphate (cAMP) assays of MC1R-94E and MC1R-94D. We measured the production of intracellular cAMP in response to different concentrations of α -MSH with MC1Rs from four primate species (*Homo sapiens*, *Macaca mulatta*, *T. francoisi* and *T. phayrei*), respectively (Fig 4). All MC1Rs showed a dose response to increasing concentrations of α -MSH. With increasing concentrations of α -MSH, the cells showed an increasing production of cAMP. MC1R of limestone langurs (*T. francoisi*) exhibited significant higher level of basal cAMP production compared to forest langurs (*T. phayrei*) and other primates (*H. sapiens* and *M. mulatta*) (P value < 0.01).

2020-A-6 脳活動制御とイメージングの融合技術開発

南本敬史、永井裕司、小山佳、堀由紀子（量子科学技術研究開発機構）所内対応者：高田昌彦

本研究課題において、独自の技術である DREADD 受容体の生体 PET イメージング法と所内対応者である高田らが有する霊長類のウイルスベクター開発技術を組み合わせることで、マカクサルの特定期間回路をターゲットとした化学遺伝学的操作の実現可能性を飛躍的に高めること目指した。R2 年度は脳移行性が高くかつ DREADD に親和性の高い化合物として独自に見出した DCZ の有効性についてさらなる検証を進め、抑制性 DREADD(hM4Di)を両側 DLPFC に発現させたサルに微量の DCZ を投与することで、空間作業記憶の障害を引き起こすことを示すなど、サル DREADD 操作性の高精度化・安全性・利便性を高めることに成功し、論文として報告した (Nagai ら *Nat Neurosci*,2020)。さらに DCZ を放射性ラベルした[11C]DCZ は DREADD の脳内発現を画像化する PET リガンドとしても有用で、高感度に hM4Di/hM3Dq の発現を定量するとともに、陽性神経細胞の軸索終末に発現した DREADDs も鋭敏に捉えることに成功。サル尾状核に発現させた hM4Di を DCZ で賦活化することにより、一過性に抑制することでこの部位が遅延報酬割引価値に基づいた意欲行動を制御することに必須であることを示した (Hori ら *bioRxiv*2020)。加えて、PET で可視化した DREADD 陽性細胞の軸索終末部に DCZ を局所注入することで経路選択的な抑制制御ができることを明らかにする(Oyama ら *bioRxiv*2021)など、複数の論文としてまとめ投稿中である。これらの成果はマカクサルの特定期間回路をターゲットとした DREADD による神経活動操作がよいよ実用段階になったことを示す。成果論文を preprint で共有するとともに、研究会を定期的に開催し（例えば霊長類脳の遺伝子導入による脳回路操作とイメージング研究会 2021.2.27 online）、DREADD によるサル脳回路操作の技術普及を図る。

2020-A-7 ウイルスベクターを利用した経路選択的操作技術による霊長類皮質—基底核—視床連関回路の機能解明

小林和人、管原正晃、加藤成樹（福島県立医科大）、渡辺雅彦、内ヶ島基政、今野幸太郎（北海道大学）所内対応者：高田昌彦

マーモセット東傍核—尾状核経路の認知機能における役割を評価するために、視覚弁別学習課題を用いて、行動学的な解析を行った。イムノトキシン細胞標的のための遺伝子として、インターロイキン-2 受容体 α サブユニット(IL-2R α)と GFP 変異体 mVenus の融合遺伝子をコードし、融合糖タンパク質 E 型(FuG-E)を用いてシュードタイプ化した NeuRet ベクターを作成し、これをマーモセットの線条体内に注入した。その後、東傍核にイムノトキシンあるいはコントロールとして PBS を注入することにより、視床線条体路の除去を誘導した。視床線条体路を欠損する動物の行動学的評価として、中村教授・高田教授の開発した、視覚弁別課題を用いて認知機能の解析を行った。視覚弁別課題では、第一に、1つの単純な画像の提示を用いて画像に触れること、およびそれにより報酬を得られることを学習させた。次に、報酬が得られる正画像と得られない誤画像の2種類の弁別用画像を同時に提示して、正画像を選択した正答率や一定の正答率に達する所要期間を評価した。一定の正答率に達した後、画像の正誤を逆転させて同様に正答率と一定の正答率に達する所要期間等を評価した。コントロール群に比較して除去群は視覚弁別学習の獲得に変化はなかったが、逆転学習の実行が低下する傾向を示した(t 検定、P = 0.063)。本実験は、

コントロール群m実験群のそれぞれを2頭の動物を用いて行ったため、動物数を追加して確認する必要がある。行動テストの後、視床線条体路を構成する細胞数の減少を抗 GFP 抗体を用いて免疫組織学的に検出した。コントロール群に比較して、実験群の束傍核細胞数は40%程度に減少することから経路の除去を確認した。

2020-A-8 マカクザル前頭極の多シナプス性ネットワークの解明

石田裕昭、西村幸男（都医学研）所内対応者：高田昌彦

前頭極は、霊長類に特有の前頭前野領域であり、ヒト・マカクザルでは「認識していることを認識する」メタ認知に関与すると言われている。前頭極に関して統合失調症患者の脳形態学的研究では、前頭極の体積減少が示され、これが患者の病識欠如や社会生活を送る上での困難さ（目的指向的な行動制御の困難さ）に関わる可能性が示唆されている。

ヒト脳 fMRI を用いて前頭極の機能的ネットワークが調べられてきた一方で、細胞レベルでの神経ネットワークは未解明の部分が多い。そこで、本研究課題では、前頭極を有するマカクザルをモデルに、狂犬病ウイルスを用いた逆行性越シナプストレーシング法を用いて、前頭極の多シナプス性神経ネットワークの解析を行った。

これまでに、一次シナプスまでの神経ネットワーク (N=2)、二次までの多シナプス性ネットワーク (N=2) について解析を完了した。これらのデータに基づき、マカクザル前頭極の皮質間ネットワークについてまとめ、論文の執筆を進めている。

2020年度は、三次までの多シナプス性ネットワークを明らかにするために、サル2頭を用いて注入実験を実施した。その結果、2頭のうち1頭については期待した線条体への感染が認められなかったことから、三次までの越シナプス感染に至らなかったと解釈した。ウイルスベクターの生存時間の再検討が必要と考えられる。来年度は、三次シナプスまでの感染させた個体を追加し、前頭極-大脳基底核ネットワークの実態を明らかにする。

2020-A-9 霊長類脳的全細胞イメージングと神経回路の全脳解析

橋本均、笠井淳司、勢力薫（大阪大・薬）所内対応者：高田昌彦

学会発表

丹生光咲、笠井淳司、勢力薫、橋本均.(2021年3月8日)「全脳レベルの活動・回路マッピングから解き明かすストレス脳」第64回日本薬理学会（札幌コンベンションセンター）

笠井淳司、勢力薫、橋本均.(2021年3月9日)「全脳活動地図と経時的活動が示す不安様行動の制御機構」第64回日本薬理学会（札幌コンベンションセンター）

本年度は高田研で作成された全脳感染性蛍光標識アデノ随伴ウイルスベクターを用いて脳全体の神経細胞を蛍光標識した霊長類脳を得た。また、高田研で作成された刺激依存的な蛍光標識アデノ随伴ウイルスベクターを用いて、微小脳領域内の刺激依存的な全脳投射パターンをFASTを用いてシングル細胞レベルで観察した。

2020-A-10 視覚の充填知覚を司る情報処理機構の探索

小松英彦、斉藤治美（玉川大・脳科学研）所内対応者：高田昌彦

2頭のサルに注視課題を訓練し、第一次視覚野 (V1) の視野地図で盲点に対応する視野を表現している領域（盲点領域）からニューロン活動の記録を行った。片目を遮蔽して単眼視の条件で、盲点を覆うような刺激を提示し、盲点で充填知覚が起きる条件で、V1の各層にどのような活動が生じるかを多チャンネル電極を用いて調べた。その結果、V1盲点領域の深層と浅層の両方で視覚応答が見られた。次に、充填知覚に伴い盲点領域およびその周辺領域で同期活動が生じるかを調べるために、2本の多チャンネル電極を同時に刺入して記録を行った。この結果については現在解析中である。V1と外側膝状体を結ぶ双方向の回路の働きにより、充填知覚時の活動が生じるかをオプトジェネティクスの方法により調べる計画であったが、実験が予定より遅れたために共同利用で予定していたオプトジェネティクスの研究については行うことができなかった。

2020-A-11 α シヌクレイン過剰発現モデルサルを用いたパーキンソン病の病態生理の解析

南部篤、畑中伸彦、知見聡美、佐野裕美、長谷川拓、瀬瀬大輔、Woranan Wongmassang（自然科学研究機構・生理学研究所・生体システム）所内対応者：高田昌彦

パーキンソン病 (PD) の病態を調べるため、ドーパミン選択的神経毒 MPTP を投与したニホンザル PD モデルを作製し、大脳基底核の中継核である淡蒼球外節 (GPe) の神経活動を記録した。大脳皮質運動野の電気刺激に対する応答を調べてみると、正常サルでは早い興奮-抑制-遅い興奮という3相性の応答が観察

できるが、PD サルでは遅い興奮が著しく増大していた。GPe における皮質由来の遅い興奮は、大脳皮質—線条体—GPe—視床下核—GPe 路を介して伝達されることから、PD では線条体から GPe への情報伝達が増強されていることが示唆された。同様の応答様式がドーパミン D2 受容体のノックアウトマウスでも観察されることから、線条体—GPe における情報伝達の増強は、主に D2 受容体を介する情報伝達の消失によると考えられる。

また、a シヌクレイン過剰発現 PD サルを作製するため、a シヌクレイン遺伝子を搭載した逆行性感染型アデノ随伴ウイルスベクター (AAV2-retro) をニホンザルの線条体に注入投与した。約 2 か月で黒質緻密部のドーパミン神経の細胞死が起こる考えられたが、行動や大脳基底核の神経活動の明らかな変化は観察されなかった。黒質緻密部を組織学的に調べたところ、逆行性に感染した細胞は多くなく、細胞の脱落も観察できなかった。現在、新たに開発した逆行性感染型 AAV ベクターを用い、遺伝子の発現効率を調べる実験を進めている。

2020-A-12 Analysis of microRNA derived from long interspersed nuclear element (LINE) in primates

Heui-Soo Kim, Woo Ryung Kim (Pusan National University) 所内対応者：今井啓雄

Transposable element (TE), which jumps around another region of genome, can be alternative enhancer, promoter and generate some microRNAs (miRNAs). MicroRNA is short single strand RNA (ssRNA) that is about 22 nucleotides in length. The miRNA binds to 3' untranslated and regulates the expression of target messenger RNA (mRNA). The miRNA also plays a crucial role in several biological processes at the post transcriptional level. MicroRNA-588, miR-887-3p, miR-582-5p and miR-1825 are derived from long interspersed element (LINE), which is group of non-long terminal repeat retrotransposons and account for approximately 21% of human genome. The expression patterns of miRNAs were analyzed in various tissue samples of chimpanzee (*Pan troglodytes*) that has considerable genetic similarities with human. MicroRNA-887-3p and miR-582-5p were highly expressed in spleen and the highest expression of miR-588 was identified in kidney of chimpanzee. Especially, miR-1825 which regulates progression of several cancers and other diseases is highly expressed in colon. Bioinformatic analyses about miR-1825 were also conducted by using several bioinformatic tools. Common target genes of miR-1825 were chosen by four databases of target gene prediction, including TargetScan, miRDB, miRWalk, miRPathDB. For the additional study, target gene of miR-1825 will be selected and its expression patterns in chimpanzee will be analyzed.

2020-A-13 ギエノン類の混群形成メカニズム解明のための遺伝マーカーの検討

北山遼、早川卓志 (北大・院・地球環境科学) 所内対応者：今井啓雄

ウガンダ共和国のカリンズ森林に生息するアカオザルとブルーモンキーは混群を形成する。混群の成立要因はいまだよくわかっていない。そこで本研究は、従来の仮説に分子の視点を取り入れ、品質の良い飼育ギエノン類の遺伝試料を用いて、カリンズのギエノン類の混群研究に有用な遺伝子マーカーの選抜をおこなうことを目的とした。2020 年 10 月に霊長類研究所を訪問し、ギエノン類 11 種の遺伝試料を譲り受けた (霊長類研究所訪問はコロナウイルスの感染拡大防止に最大限配慮しておこなった)。そのうち、アカオザルとブルーモンキーに近縁な 4 種について、全ゲノムショットガン法による全ゲノムの塩基配列決定をおこなった。組織からの DNA 抽出までを代表者が実施し、シークエンス解析は解析業者に外注した。現在は得られた全ゲノムデータの解析中である。今後はこの全ゲノムデータを活用し、有用な遺伝子マーカーの選抜をおこなう。遺伝子マーカーの選抜にあたり、今年度に全ゲノム解析を行わなかった種や個体も解析、比較に用いることで、より正確に各マーカーの有効性を評価したい。最終的にこれらのマーカーを用いて、カリンズのギエノン類の集団解析を実施する。

2020-A-14 行動制御における皮質下領域の機能解析

田中真樹、竹谷隆司、亀田将史、澤頭亮 (北大・医・神経生理) 所内対応者：高田昌彦

感覚性視床は皮質下の情報を大脳の一次感覚野に中継するが、これは大脳皮質深層から視床へのフィードバック経路によって調節を受けることが知られている。運動性視床についても脳幹、小脳、大脳基底核の情報を運動性皮質にただ中継するだけではなく、視床のレベルで何らかの情報修飾が行われていると考えられる。これを明らかにするため、ニホンザルの大脳視床路を光遺伝学的に抑制し、視床のニューロン活動に及ぼす影響を調べた。京大から抑制性オプシンであるハロロドプシンを発現するウイルスベクターを提供していただき、北大で補足視野に遺伝子導入を行った。眼球運動課題を行っているサルの視床ニューロンの記録中に、同部の光刺激によって皮質視床路を終末で抑制した。多くのニューロンが課題特異的な活動変化を示したが、課題非特異的なベースライン活動の変化も約半数で認められた。この課題非特異的な変化はオプシンを発現していない個体でも観察され、その潜時と活動変化の方向から局所の熱産生による影響が疑われた。京大で免疫組織学的検討を行っていただいたところ、大脳・視床とも良好に遺伝子

発現がみられた。以上の結果は eNeuro 誌 (8 (2) ENEURO.0511-20.2021) に発表した。引き続き、分子ツールを用いた本共同研究課題「行動制御における皮質下領域の機能解析」をさらに発展させるための準備を進めている。

2020-A-15 マカクザル外側手綱核の神経連絡

松本正幸、國松淳 (筑波大学医学医療系) 所内対応者：高田昌彦

外側手綱核から投射を受け、抑制的な活動制御を受ける中脳ドーパミンニューロンが形成する神経回路の解剖学的な探索を目的として、特に、これまで不明であったドーパミンニューロン—小脳間の神経連絡に着目した。先行研究により、ドーパミン神経系の異常との関係が指摘されている発達障害者において、小脳の異常が報告されており、ドーパミンニューロン—小脳間の相互作用が推測される。令和2年度はコロナ禍のために霊長研で実験を実施することができなかったが、共同研究者でもある所内対応者と議論を深め、どの脳領域にどのような種類のトレーサーを注入すればドーパミンニューロン—小脳間の神経連絡を同定できるのか (たとえば黒質緻密部のドーパミンニューロンが小脳のどの部位に投射を送っているのか等)、実験計画を洗練することができた。令和3年度にこの実験を実施予定である。

2020-A-16 霊長類の皮質—基底核—視床ループの形態学的解析

藤山文乃、苅部冬紀 (北海道大学)、平井康治 (同志社大) 所内対応者：高田昌彦

本研究では、齧歯類の脳の尾側線条体に、ドーパミン受容体およびドーパミンのマーカである tyrosine hydroxylase (TH) の発現が非常に少ない領域があることを報告した。その後、本共同利用研究によって所内対応者の高田昌彦教授、井上謙一助教の協力で得たマモセット脳で確認したところ、同様の領域が確認され、これは種を超えた所見であることが判明し、本教室の大学院生が本年度学位論文として報告した。次年度は、この領域の機能に迫るために、D1R / D2R poor zone の投射ニューロンが他の線条体領域の投射ニューロンと異なる性質を持つかどうかという(1)投射ニューロンの特性、D1R / D2R poor zone にどのタイプのニューロンが存在するのかという(2)細胞構築と、どこの領域から入力を受けてどこに出力するのかという(3)入出力構造をその他の線条体領域と比較することで、機能が異なるかどうかを解明し、さらにこの領域が(4)霊長類にも存在するかどうかの検証を行う。

2020-A-17 代謝プロファイルテストを用いた野外飼育ニホンザルの飼養管理評価

高須正規 (岐阜大・応生物・共同獣医) 所内対応者：岡本宗裕

令和2年度、新型コロナウイルスの影響により、霊長類研究所への訪問が叶わず、実験を速やかに進めることが困難であった。感染拡大を防止しつつも、研究を進めるために、オンラインでのミーティングを持ち、コロナ禍における申請研究の方向を明確にした。

まず、投稿中の論文採択のための議論を持った。さらに、投稿論文におけるレビューアからのコメントを基に、今後、進めるべき内容を議論した。加えて、行動自粛下で採取できるデータに関して議論した。

令和3年には、投稿論文の採択を得ることに加え、ここで議論した内容を進める。これにより、臨床獣医学で用いられている代謝プロファイルテストの野外飼育ニホンザルへの応用を実現し、その QOL の向上へ寄与したいと考えている。

2020-A-18 神経路選択的トレーシング法による社会脳ネットワークの解析

二宮太平、則武厚、磯田昌岐 (生理研・認知行動) 所内対応者：高田正彦

本共同研究は、社会的認知機能に重要とされる、いわゆる社会脳ネットワークの詳細を解剖学的アプローチにより明らかにすることを目的とする。具体的には、マカクザルの内側前頭皮質 (MFC) と腹側運動前野 (PMv) を対象とした、越シナプス能をもたない G 遺伝子欠損型狂犬病ウイルスベクターおよびテトラサイクリン遺伝子発現調節システム (Tet-on システム) を利用した、神経路特異的トレーシング実験をおこなう。本年度はマーカ遺伝子として GFP 遺伝子を挿入した G 遺伝子欠損型 RV ベクターの回収に成功し、当該ベクターの大量調製法と濃縮・精製法を確立した。また、げっ歯類への注入実験により、高い逆行性感染能と外来遺伝子発現能を有していることも確認した。注入実験の対象となる MFC および PMv の同定に必要な、細胞外電位記録法および皮質内微小電気刺激法についても実験をおこなえることを確認している。今後は、霊長類におけるベクターの有効性を確認し、必要があれば更なるベクターの調整をおこなった後、当初計画していた MFC と PMv への注入実験および神経ラベルの解析を進めていく予定である。

2020-A-19 霊長類におけるほ乳類キチナーゼの遺伝子発現とその酵素機能の解析

小山文隆、田畑絵理 (工学院大学先進工学部生命化学科) 所内対応者：今井啓雄

キチンは N-アセチル-D-グルコサミンが β -1,4 結合した多糖で、エビ、カニ、昆虫など多くの生物に存在している。ほ乳類はキチンを合成していないが、その分解酵素であるキチナーゼを発現している。北

米での先行研究で、ほ乳類の祖先は昆虫を主食にしており、酸性キチナーゼ (Acidic Chitinase, Chia) 遺伝子がほ乳類の進化と密接に関わっていることが示された。霊長類の CHIA には二つのパラログが存在している(ここではそれぞれ CHIA1, CHIA2 とよぶ)。しかし、それぞれのパラログの遺伝子発現、機能については大部分が未解明である。我々は、ヒトで、CHIA1 は高いレベルで発現しているが、non-coding RNA であることを見出している (Tabata et al., 未発表データ)。2020 年度の研究で、Great Apes のチンパンジーで、CHIA1 が、肺で高い発現をしていることを見出した。ヒトの CHIA1 との類似性から推定すると、この遺伝子の転写物は stop codon が出る long noncoding RNA になっていると思われた。他方、ゴリラ、オランウータンでは CHIA1 の発現は認められなかった。Lesser Apes のテナガザルでは、CHIA2 が、胃で高いレベルで発現していた。CHIA2 は、マウスやブタなどのほ乳類の胃で高い発現をする分子であり、旧世界ザルのカニクイザル、新世界ザルのマーモセットでは偽遺伝子化していた (Tabata et al., Sci Rep, 9, 159, 2019)。以上のことから、進化の過程で、CHIA1 の偽遺伝子化、CHIA2 の発現調節の変化があったものと推定された。

2020-A-20 意欲が運動を制御する神経基盤の解明

西村幸男、鈴木迪諒 (東京都医学総合研・脳機能再建プロジェクト)

意欲を司る腹側中脳領域 (腹側被蓋野、黒質緻密部、赤核後部) が皮質脊髓路ニューロンの活動を促通する神経回路の存在を明らかにする目的で、逆行性越シナプス神経トレーサーである狂犬病ウイルスを、2 頭のサルの頸膨大へ注入し、一定期間の生存期間を経て、灌流固定を行い組織実験を行なった。2 頭のサル共に腹側中脳領域に脊髄へ越シナプスで投射するニューロンの存在を確認できた。さらに標識されたニューロンの一部はドパミンニューロンであった。一方で、腹側中脳で標識されたニューロンが脊髄へ直接投射するニューロンである可能性を排除するために逆行性のコンベンショナルトレーサーを 1 頭のサルの頸膨大へ注入し、組織実験を追加した。その結果、腹側被蓋野・黒質緻密部・赤核後部の領域から脊髄へ直接投射するニューロンの存在しないことを確認した。上記のすべての結果により、腹側中脳から脊髄へ 2 シナプス性に投射する神経路が存在することを明らかにした。現在これらの成果を含めて論文化を進めており、投稿予定である。

2020-A-21 判断を可能にする神経ネットワークの解明

宇賀貴紀、三枝岳志、熊野弘紀、須田悠紀 (山梨大・医) 所内対応者: 高田昌彦

運動方向を判断する際、大脳皮質中側頭 (MT) 野が動きの知覚に必要な感覚情報を提供していることは明らかであるが、MT 野の情報がどこに伝達され、判断が作られているのかは未解明である。本研究では、化学遺伝学的手法を用い、MT 野からのどの出力経路が判断に必須であるかを調べることにより、判断を可能にする神経ネットワークを明らかにすることを旨とする。昨年度に引き続き、サル 1 頭の MT 野に hM4Di 遺伝子を搭載したウイルスベクターを打ち、マルチユニットと局所電場電位 (LFP) の反応変化を解析した。

2020-A-22 アイ・トラッキングによるチンパンジーの社会認知研究

佐藤侑太郎 (京大・野生動物)、狩野文浩 (京大・高等研究院) 所内対応者: 足立幾磨

当該年度は、前年度に実施した以下の実験にかかる、データ分析や論文執筆に取り組んだ。チンパンジーが他個体の音声 (警戒声・採餌声) を聞いたときに、関連のある事物 (果物・ヘビ) の画像と結びつけることができるかを、視線計測装置を使った実験によって調べた。実験の結果、チンパンジーが警戒声を聞いたときにヘビの画像をより長く見ることが示唆され、警戒声とヘビとを結びつけることができる可能性が示唆された。この成果は、チンパンジーの音声コミュニケーションに関わる認知メカニズムを理解するうえで重要である。

また、類人猿が他者の身体の構造をどの程度理解しているかを、視線計測装置を使った実験によって調べた。実験の結果、類人猿も身体運動が関節によって制限されていることをある程度は理解している可能性が示唆されたものの、全体的な結果は曖昧であり、明確な結論を導くことはできなかった。瞳孔径を活用した情動反応評価についても、信頼できる結果は得られなかった。しかしながら、これらの成果は、今後の研究に方法論的観点から示唆を与えることが期待される。現在、これらの成果をまとめた論文を、国際学術誌に投稿中である。

2020-A-23 霊長類島皮質の神経ネットワークに関する解剖学的研究

上園志織 (東京医療学院大・保健医療・リハ) 所内対応者: 高田昌彦

当該研究は、小型霊長類であるマーモセットを実験動物とし、神経トレーサー (狂犬病、レンチ、アデノ随伴ウイルスベクターなど) の注入により霊長類の島皮質の入力および出力系の連絡を明らかにすることで、島皮質の詳細な機能マップを作成し、島皮質が果たす機能の全容解明の基盤となる神経ネットワークを細胞レベルで包括的に示すことを目的としている。

当該研究の対象である島皮質は他の大脳皮質に比べ深部にあり、細胞構築の違いから大きく3つの亜領野（無顆粒性島皮質、不全顆粒性島皮質、顆粒性島皮質）に分類される。これまでの注入実験により、島皮質の亜領野への限局的な注入を成功させるためには、注入実験の方法をより高い精度でおこなう必要があることが分かった。そこで、2020年度はMRIの脳画像とトレーサー注入部位の同期をより精密にするために、研究協力者とMRIの際に使用する脳定位装置およびマーカーパーツの改良をおこなった。新規のマーカーパーツを実際に使用し、MRIでのテスト撮像を進めた。2021年度は見直しをおこなったシステムでのトレーサー注入実験を行う予定である。

2020-A-24 ヒトとチンパンジーにおける質感知覚に関する比較認知研究

伊村知子（日本女子大・人間社会・心理）所内対応者：足立幾磨

チンパンジー7個体（オス3個体、メス4個体）を対象に、メスの性皮の腫脹に関連する色や光沢の手がかりが性皮画像に対する選好注視に及ぼす影響について検討した。昨年度までの成果から、①最大腫脹時の性皮画像を最小腫脹時の性皮画像よりも長く注視すること、②性皮の大きさや形を揃えて光沢の強度のみを操作すると、より強い光沢を持つ性皮画像を長く注視することが示された。本年度は、光沢への選好注視が性皮に特有のものかを確認するため、①色相を反転させた青色の性皮画像と、②光沢に関する輝度分布の情報は保持しつつ性皮の形が知覚できないようピクセル毎に並び替えたシャッフル画像を作成し、より強い光沢、あるいはより強い光沢と同じ輝度分布を持つ画像への選好注視が生じるかについて調べた。実験では、光沢情報の異なる2枚の画像を左右に並べて画面に4秒間提示し、注視時間をアイトラッカーにて測定した。1日につき12試行を1セッションとし、色相反転画像、シャッフル画像について2セッションずつ実施した。その結果、青色の性皮や性皮の形が知覚されない画像では、強い光沢、あるいはそれと同じ輝度分布を持つ画像への注視時間の増加は見られなかった。したがって、チンパンジーは少なくとも性皮の腫脹という文脈において、光沢への選好注視を示すことが示唆された。

2020-A-25 霊長類におけるヒトの皮膚の表現型の特性について

荒川那海、颯田葉子、寺井洋平（総研大・先導研）所内対応者：今井啓雄

ヒトの皮膚は他の霊長類に比べ多くの形態的特徴があるが、それらがどのように進化してきたのか、その遺伝的基盤はあまり明らかになっていない。本研究ではこれまでに、発現量解析で検出された皮膚でのヒト特異的遺伝子発現を生み出すヒト系統での塩基置換を推定した。今年度の研究では、それらの置換が実際にヒト特異的遺伝子発現を生み出しているのかを、皮膚培養細胞を用いたプロモーターアッセイとゲノム編集により解明することを目的とした。始めにプロモーターアッセイに必要な各種ベクターの作成を行った。これらのベクターを皮膚培養細胞に導入する際にはエンドトキシンなどの細胞毒性を示す物質を取り除いておく必要がある。そこでベクターのクローニング後はエンドトキシンを取り除く工程を取り入れたプラスミドDNA精製を行った。また、予備実験としてゲノム編集を行った細胞株を作成中であり、プロモーターアッセイで絞り込んだ候補置換について培養細胞での発現比較を行う準備を進めた。今後、作成したベクター等を皮膚培養細胞に導入し、推定した置換サイトをヒト型と類人猿型の塩基にしたプロモーターアッセイとゲノム編集を行うことで、着目する遺伝子のヒト特異的発現を生み出す塩基置換を特定していく。

2020-A-26 スラウエシマカクにおける自然選択圧の検出

寺井洋平（総研大・先導研）所内対応者：今井啓雄

インドネシア、スラウエシ島には7種のマカクが異なる地域に分布しており、分布の境界で交雑帯を形成している。しかし交雑帯が広がることはなく、地域への適応など何らかの要因がそれぞれの種を分けていると予想されている。これまでの研究で体毛色に関連した遺伝子(MC1R)が種間で配列が異なり、自然選択を受けて進化してきたと予想していた。自然選択は、MC1Rとその周辺ゲノム領域間での多型/種特異的変異の比率の比較により検出できる。しかし本研究ではこれまでエキソーム解析を行ってきたため、MC1Rの周辺領域の配列情報はなかった。今年度は、MC1Rとその周辺領域を含むニホンザルのBACクローンを選択し、それらBACクローンのDNA抽出、断片化、ビオチン化によりプローブを作成した。このプローブを用いて、スラウエシマカクのBAC領域をキャプチャし次世代シーケンシングにより配列を決定した。その結果、BACクローンの領域の配列はキャプチャされていたが、キャプチャが不完全でカバー率が低く、配列の信頼性の高い領域が少なかった。これはBAC DNAのビオチンラベルの効率が低かったためだと考えられ、現在、再度BAC DNA抽出とビオチンラベルを進めている。

2020-A-27 霊長類保存ゲノム試料の全ゲノム解析活用

河村正二（東京大・院新領域）早川卓志（北海道大・院地球環境科学）、MELIN, Amanda (Univ. Calgary・Dept. Anthropol. Archaeol./Dept. Med. Genet.)、MARQUES, Tomas (Pompeu Fabra Univ.・Dept. Experimental Health Sci.) 所内対応者：今井啓雄

スペイン・Pompeu Fabra University のトーマス・マルケス博士とのゲノム解析の共同研究として、2019-2021年の3年間に600以上の霊長類ゲノムの決定を目指す同研究機関での“Primate Genome Sequencing in Search for Insights on Classifying Disease Variants”プロジェクトに参加している。2020年度は、全ゲノムシーケンス用のライブラリー作製の条件検討の試行として8種（ボルネオオランウータン、スマトラオランウータン、ゴールデンマンガベイ、アジルマンガベイ、アボリアリスザル、シロガオマーモセット、アザラヨザル、ボリビアハイイロティティ）について、ライブラリーを作成し、そのうち6種についてマルケス研究室に送付した。シーケンス結果を待ち、本格実施を進めていく。一方、感覚系遺伝子にフォーカスした適応進化解析に向け、1) 別プロジェクトで決定したノジロオマキザルの全ゲノムシーケンスデータから色覚オプシン、嗅覚受容体 (OR)、鋤鼻受容体 (VR)、味覚受容体 (TASR) 遺伝子の配列解析を行って論文発表し (PNAS 118(7): e2010632118)、2) target capture と次世代シーケンスによるオナガザル科と広鼻猿類の OR と TASR 遺伝子の解析について学会・研究会で発表した。

2020-A-28 アイ・トラッキングを用いたチンパンジーの社会認知の比較研究

狩野文浩 (京大・野生動物)、山本真也 (京大・高等研究院)、James Brooks (京大・野生動物研究センター)
所内対応者：足立幾磨

オキシトシン (とプラシーボの生食) を噴霧投与することで、アイ・トラッキングで画像の見方を記録したとき、オキシトシンが及ぼす効果を検討した。熊本サンクチュアリのボノボとチンパンジーを対象にした実験では、オキシトシンがボノボに対しては、顔画像の目に対する注視を促進し、チンパンジーでは逆に抑制することを見出した。オキシトシンが近縁種の行動の違いの進化に影響する可能性を示した。霊長類研究所においては、既知個体と未知個体を対提示し、その選好注視においてオキシトシンが及ぼす影響を検討した。全体としてオキシトシンの影響は確認できなかったが、一部のオス個体においてはオキシトシン条件において未知個体をより強く選好注視するなど、部分的には効果が認められた。今後、条件を限定するなどして、さらに調査を進める。
添付の画像は、霊長研のチンパンジーにネブライザーでオキシトシン溶液を噴霧しているところ。チンパンジーはその間ジュースを飲んでいる。霧を嫌がることはなかった。

Brooks, J., Kano, F., Sato, Y., Yeow, H., Morimura, N., Nagasawa, M., . . . Yamamoto, S. (2021). Divergent effects of oxytocin on eye contact in bonobos and chimpanzees. *Psychoneuroendocrinology*, 125, 105119.

2020-A-29 霊長類の循環器系加齢誘引疾患に関する研究

鯉江洋 (日本大・獣医生理学/病態生理)、揚山直英 (医薬基盤・健康・栄養研究所 霊長類医科学研究センター)、中山駿矢、白仲玉 (日本大・獣医生理学/病態生理) 所内対応者：宮部貴子

申請者はこれまでにカニクイザルとニホンザルなどサル類の循環器疾患を研究した。人と解剖学的構造及び生理学的機能が近いこと、人医学への貢献が考えられる。今年度は従来の研究を継続し、「各種霊長類の発達と加齢に関する総合的研究」分野に申請を行った。また今回の研究も昨年と同様に、獣医臨床学的手法を用い心臓の評価を行い、人医学で心筋損傷評価に用いたマーカーの有用性を検証をはじめた。本研究結果は人とサル類を含めた霊長類全般に有意義な結果をもたらすと考える。

新型コロナウイルスの影響により、今年度申請者らは過去に得られたデータをさらに解析し、第163回日本獣医学会で発表した (オンライン)。その予演会などの打ち合わせを ZOOM 会議で行った。内容については、臨床で貴重な心筋症疾患個体であり、その病態を中心に発表した。本研究で得られた基礎及び臨床データは、獣医循環器分野や霊長類研究のみならず、人医学においても、大変貴重だと思われる。次年度は引き続き、これらの症例の継続研究を行いたいと考えている。

2020-A-30 チンパンジー多能性幹細胞の性状解析および異種間キメラ動物の作製

正木英樹 (東京大・医科学研究所)、水谷英二 (筑波大・医学研究科) 所内対応者：今井啓雄

本年度は以前に提供頂いたチンパンジー細胞から樹立した細胞株を用いて、マウス胚との異種間キメラ作製実験を実施した。以前の研究課題 (2019-B-87) で樹立されたナイーブ型株をマウス着床前胚に移植し子宮内で発生させたところ、将来的にマウス個体を形成する領域であるエピブラストへの寄与が認められていたが、実験条件の改善によって、現在ではより多くの細胞をエピブラストに寄与させられるようになった。また、当該胚は最長で E8.5 までキメラ状態を維持できることを確認している。今後はより高度なキメラ形成を目指して、チンパンジー細胞との異種間キメラ形成により適した動物種との間でキメラ形成実験を実施する予定である。

今年度はコロナ禍の影響を考慮し、学会発表は行わなかった。

これまでの成果をまとめた論文を近日中に投稿予定である。

2020-A-31 口腔粘膜におけるメカノセンサー発現の解明

城戸瑞穂、吉本怜子、西山めぐみ(佐賀大学) 所内対応者: 今井啓雄

口腔粘膜は鋭敏な器官である。その繊細かつ鋭敏な感覚の機構については、未だ不明なことが多い。適切な口腔感覚は哺乳・摂食・情報交換など多様な行動の基盤であり、その異常は摂食行動の阻害や発話などを阻み、生活の質の低下、引いては生命維持の繫がる。近年、メカノセンサー分子の実体が特定され、機能解明も発展している。そこで、力学的に多様な環境として口腔に着目し、受容との関係にも着目されている。口腔は力学的に咀嚼など多様な刺激に常に曝されるユニークな器官であるが、その力学的な受容の機構についての理解はまだ限られたものである。そこで、私たちは、口腔内の力学センサーがどのような部位に存在をするのかを明らかにすることを目的として、固定された組織において、メカノセンサーイオンチャンネルが口腔の上皮および結合組織に発現していることを明らかにした。特に、咀嚼により大きな力が加わる歯肉では、部分的に強い発現を示し、細胞内の骨格を担う分子と関連を示すことを見いだした。今後、異なる構造を示す消化管等と比較しながら細胞生物学的な詳細な解析を進める予定である。

2020-A-32 動物園のチンパンジーにおける口腔内状態の調査

生江信孝(日立市かみね動物園)、桃井保子、齋藤渉(鶴見大学・歯学部) 木村加奈子、大栗靖代、正藤陽久、飯田伸弥(日立市かみね動物園)、齋藤高(たかいそ海岸歯科) 所内対応者: 宮部貴子

かみね動物園で飼育しているチンパンジーの雌(愛称ヨウ、推定 50 歳) 個体において上顎に内歯瘻がみられた。2020 年 4 月に麻酔下で検診したところ破折していたため、抜歯処置をほどこした。また、チンパンジーの雄(愛称ゴヒチ、推定 43 歳) 個体において、2020 年 5 月に闘争によって左下の犬歯が折れてしまったため切断し縫合処置をほどこした。

この 2 例の処置で得られた歯を鶴見大学にサンプルとして送付した。

昨年度歯科治療をほどこしたチンパンジーの雌(愛称マツコ、推定 43 歳) の治療経過を直接確認してもらいたかったが新型コロナウイルス感染拡大により叶わなかった。メールのやり取りにて報告を行った。

2020-A-33 チンパンジーの口腔内状態の調査と歯科治療法の検討

齋藤渉(鶴見大・歯・保存修復)、桃井保子(鶴見大・名誉教授)、花田信弘、今井奨、岡本公彰、宮之原真由(鶴見大・歯・探索歯学) 所内対応者: 宮部貴子

新型コロナウイルスの影響により霊長類研究所内への入場がかなわず、研究を進めることができませんでした。

2020-A-34 触覚情報を用いたチンパンジーの個体識別および課題反応との関係分析

田中由浩(名古屋工業大学・工) 所内対応者: 足立幾磨

個体識別や感情推定について、顔画像、音声、歩容など、生体情報を活用する方法が様々提案されているが、カメラやマイクを用いた視聴覚情報を用いた研究開発が多く、運動に伴う触覚情報(力や振動)について検討が十分進んでいない。触覚情報は外から見えにくい性質も持ち、個体識別や感情推定に活用できれば、工学的応用だけでなく基礎科学にも活用でき、人を含む動物研究にも新しい分析を提供できる。本研究では、チンパンジーのタップ動作を対象に、個体識別や提示課題における各種反応との関係を分析することを目的としている。本年度は、新たに実験データを追加するのではなく、これまでに 5 個体に対して行われたタッチパネルを用いた顔に見える画像選択課題の実験データについて分析を深めた。実験は 6 ヶ月間で、データは 1 個体あたり約 90 日、約 3000 タップある。0.04s のタップ振動の強度および反応時間による 2 次元分布を作成し、特に簡単と難しい課題の総数は約半々であるが、この割合を分けて分布図を作成し、難易度の割合に応じた応答を模擬した。その結果、個体差はあるものの、簡単な課題が多い場合に、反応時間が短く、振動強度が大きいタップの割合が増える傾向が見られた。個々の試行に対する応答からの難易度の推定は困難であるが、複数試行における結果から難易度の推定の可能性が考えられる。今後は難易度の割合を分けた実験を実際に行い、検証を行いたい。

2020-A-35 脳性麻痺チンパンジーへの発達支援と養育環境整備

竹下秀子(追手門学院大・心理)、山田信宏(高知県立のいち動物公園)、高塩純一(びわこ学園医療福祉センター草津)、櫻庭陽子(京都市動物園 生き物・学び・研究センター) 所内対応者: 足立幾磨

本研究は、2013 年 7 月 14 日に出生、母親の難産、育児困難により人工保育となったが、脳性まひによる右半身の強いまひが残ったミルクィ(女性、高知県立のいち動物公園) の参加を得て、飼育個体に障害のある場合への発達支援と動物福祉環境改善の指針を得るために実施した。3 歳 6 カ月から 7 歳 5 カ月までの月 1 回の療育活動前 1~2 時間のビデオ記録から、10 秒ごとのタイムサンプリング法により、行動と障害部位の状態の指標として、座位における右足首の背屈(正常な状態)割合を算出した。計 67.2 時間(41 日)分のデータから、観察年月日を独立変数として回帰分析した結果、右足首の背屈割合は、全体では有効な正の回帰線が得られたが、療育活動の一部縮小及び屋外リハビリ運動場の工事期間中には負の回帰線が

得られた。工事が終わり新しい屋外リハビリ運動場の使用が始まると、右足首の背屈割合は高い水準になった。他方、2020年10月から顕著に活動量が落ち、常同行動が出現し、療育者・観察者に対する反応も変化してきた。これまでの取り組みにより、行動発達や生活環境の充実に一定の成果が得られたが、思春期を迎えるにあたり、今後は「人による感覚刺激中心の療育」から、他個体との同居を含む「チンパンジーによる社会的リハビリテーション」への転換を急ぎ図っていく必要がある。

2020-A-36 The Bossou Archive Project

Daniel Schofield (University of Oxford) 所内対応者: 足立幾磨

The Bossou Archive Project aims to digitise and catalogue video footage of wild chimpanzees from Bossou, Guinea, from over 30 years of fieldwork, and implement a framework for researchers to access and analyse this data. Recently, a key result of the Bossou Archive project was the development of the artificial intelligence (AI) to automatically track and identify chimpanzees using deep neural networks (CNNs) (Schofield et al. 2019 <https://advances.sciencemag.org/content/5/9/eaaw0736>). Using the output of this system, a new publication is in prep for analysing the Bossou chimpanzees social networks over 17 years of the archive (Schofield et al, in prep). In addition to this work, collaboration with Oxford University engineering (VGG) we have developed full body and behaviour recognition (Bain et al., in review, Science Advances). The cooperative research project has supported Amazon Web Services storage costs for the archive – additional funding is being sought for development a web-framework to allow for easier access for researchers, enable remote collaboration and annotation of the Bossou archive, and promote the next phase of development for new automated methods.