

2. 研究成果

(1) 計画研究

A-1 霊長類脳内遺伝子導入に有益な新規ウイルスベクターの開発

小林和人, 小林憲太, 加藤成樹(福島医大・医) 所内対応者: 高田昌彦

我々は、これまでに、高田昌彦教授との共同研究により、狂犬病ウイルス糖タンパク質(RV-G)の細胞外・膜貫通ドメインと水泡性口内炎ウイルス(VSV-G)の細胞内ドメインから構成される融合糖タンパク質 B 型(FuG-B)を開発し、逆行性遺伝子導入の効率を向上させることに成功した。また、RV-G 細胞外ドメインN末端領域と VSV-G 細胞外ドメインC末端領域を含み、VSV-G 膜貫通・細胞内ドメインに連結した融合糖タンパク質 C 型(FuG-C)を作製し、本ベクターは高い頻度の逆行性遺伝子導入を可能にしたばかりでなく、FuG-B を用いたベクターに認められた注入部位でのグリア細胞への導入がほとんど認められず、神経細胞に特異的な遺伝子導入が可能なことを示した。この性質は、ベクター注入による組織損傷を防止するために有益であると考えられる。本研究では、FuG-C をさらに改善することにより、逆行性遺伝子導入の効率をより向上させる糖タンパク質の開発を試みた。FuG-C における RV-G と VSV-G の融合ジャンクションを至適化するため、ジャンクションを前後に移動させた融合糖タンパク質を作製し、ウイルスベクターの逆行性遺伝子導入効率を解析した。これまでに、VSV-G の C 末端領域が 14 アミノ酸から 18 アミノ酸の範囲で、高い導入効率を示すことが判明した。今後、この範囲の中で、ジャンクションがどの位置になる時に最も導入効率が高くなるかを検討する予定である。本ベクターの開発は、経路選択的に細胞あるいは遺伝子機能を操作し、行動特性を制御する遺伝子機能や高次脳機能を解析するための霊長類モデル開発に有益な技術を提供する。

A-2 ゲノムによる霊長類における脳機能の多様性の解明

橋本亮太(大阪大・院・連合小児発達学研究所), 安田由華, 山森英長(大阪大・院・医学研究)

所内対応者: 今井啓雄

統合失調症、双極性障害、うつ病などの精神疾患に関連することがすでに知られているリスク遺伝子である COMT、BDNF、DISC1 についての検討を行った。COMT(catechol-O-methyltransferase gene)は、ドーパミンの代謝酵素であり、COMT には機能的遺伝子多型(Val158Met)があることが知られている。Val 多型は Met 多型と比較してドーパミンを代謝する酵素活性が高いことから、ヒトの前頭葉において Val 多型では Met 多型よりドーパミンが多く代謝され、ドーパミン量が低下することが想定される。そこで、統合失調症において障害されていることが知られている前頭葉課題である WCST を行い、Val 多型を持つと Met 多型を持つものより WCST の成績が低いことを見出した。さらに、前頭葉機能効率を fMRI にて測定し、Val 多型を持つものではその効率が悪いことを示した。最後に、遺伝子関連解析により、Val 遺伝子多型は統合失調症のリスクとなることを報告している。すなわち COMT 遺伝子の Val 多型は Met 多型と比較して COMT 酵素活性が高く、その結果、前頭葉のドーパミン量が低下し、前頭葉機能効率が悪くなり、統合失調症のリスクとなるということである。

マカク類において、エクソンシーケンシングを行い、COMT のミスセンス変異を発見した。次に、大規模にこのミスセンス変異をタイピングする必要があるため、タックマン法を用いて、大量タイピング法を確立した。現在は、霊長研における多種・多数のサルゲノムサンプルの調整中であり、大規模なスクリーニングを行う予定である。

ヒトにおいても、脳表現型を測定し、ゲノム多型との関連の検討を行い、有望な遺伝子については、霊長類における検討を進めたいと考えている。

A-3 行動特性を支配するゲノム基盤と脳機能の解明に向けた神経解剖学的検索

南部篤, 畑中伸彦, 知見聡美, 額額大輔(生理研・生体システム) 所内対応者: 高田昌彦

逆行性のレンチウイルスベクターとイムノトキシンを用いることにより、特定の神経経路のみを選択的に除去する方法を開発し、サルの大脳基底核に応用することにより、ハイパー直接路(大脳皮質-視床下核路)のみを除去することに成功した。具体的には、ヒトインターロイキン 2 受容体と狂犬病糖タンパク質を発現するレンチウイルスベクター(NeuRet-IL-2R α -GFP ウイルスベクター)を開発し、ニホンザルの視床下核に注入した。狂犬病糖タンパク質の働きによって、逆行性に大脳皮質-視床下核投射ニューロンの細胞体に、ヒトインターロイキン 2 受容体が発現されると考えられる。発現を待って、大脳皮質のうち、補足運動野にイムノトキシンを注入した。

大脳皮質運動野を電気刺激して、大脳基底核の出力部である淡蒼球内節で神経活動を記録すると、早い興奮・抑制・遅い興奮の 3 相性の神経活動が記録できる。実際、イムノトキシン注入前は、補足運動野を刺激すると同様な 3 相性の活動が記録できた。しかし、イムノトキシン注入後は、多くの淡蒼球内節ニューロンにおいて、早い抑制は観察されず、抑制と遅い興奮の 2 相性の反応のみが観察された。これまでの研究によれば、早い興奮はハイパー直接路(大脳皮質-視床下核-淡蒼球内節路)、抑制は直接路(大脳皮質-線条体-淡蒼球内節路)、遅い興奮は間接路(大脳皮質-線条体-淡蒼球外節-視床下核-淡蒼球内節路)を介していることが明らかになっているので、本実験結果は、直接路・間接路に影響を与えることなくハイパー直接路のみが選択的に除去されたことを示すと同時に、早い興奮がハイパー直接路を介していることも示している。また、組織学的な検索により、補足運動野から視床下核に投射

するニューロンのみが脱落していることも確認された。

A-4 行動特性を支配する脳機能の解明に向けた神経ネットワークの解析

星英司, 橋本雅史(東京都医学総合研究所・前頭葉機能プロジェクト) 所内対応者: 高田昌彦

霊長類の高次運動野は補足運動野、運動前野背側部、運動前野腹側部の複数の領野から構成されており、各々が動作の企画や実行の過程で特異的な役割を果たすと考えられる。本研究はその特異性を支える構造的基盤を明らかにすることを目指して行われた。特に、運動前野腹側部が小脳と大脳基底核と形成する回路に注目した。この回路は視覚情報に基づいた動作において重要であると考えられているが、その構造的基盤は不明であった。小脳と大脳基底核は視床を介して大脳皮質に投射しているため、シナプスを越えて逆行性に伝播する性質がある狂犬病ウイルスをトレーサーとして用いた。運動前野腹側部にウイルスを注入後の生存期間を調節することによって、淡蒼球内節と小脳核における投射起源、ならびに、線条体と小脳皮質における投射起源を同定した。その結果、いずれの部位においても「運動領域」(一次運動野へ投射する領域)に運動前野腹側部へ越シナプス性に投射する細胞が集中していた。この結果は、運動前野腹側部は運動遂行に関する情報を大脳基底核と小脳から受け取っていることを示唆した。

A-5 霊長類における概日時計と脳高次機能との連関

清水貴美子, 深田吉孝(東大・院・理) 所内対応者: 今井啓雄

我々はこれまで、齧歯類を用いて海馬依存性の長期記憶形成効率の概日変動を見出し、SCOP/PHLPP という分子が概日時計と記憶を結びつける鍵因子である可能性を示す結果を得てきた。本研究では、ヒトにより近い脳構造・回路を持つサルを用いて、SCOP を中心に概日時計と記憶との関係を明らかにする。

アカゲザル 3 頭、ニホンザル 6 頭を用いて記憶測定法の検討を行った。苦い水が入ったボトルと普通の水が入ったボトルにそれぞれ異なる目印をつけ、水の味と目印との連合学習を行う。24 時間後のテストでは普通の水を入れた 2 つのボトルに学習時と同じ目印をつける。各ボトルからの飲水量と初めに選ぶボトルから、記憶の判断をした。また、記憶テストの前段階として、水の味と目印が連合する事をサルに覚えてもらうため、3 日間もしくは 3 日間 x 2 回の training(学習/テストに用いるものとは別の目印)を行った。これらの検討の結果、3 日間の training 後に学習とテストを 24 時間間隔で行い、計 5 日で記憶の測定が可能であると考えられた。また、海馬特異的な SCOP の発現抑制のため、SCOPshRNA 発現レンチウイルスの作成を行った。作成したレンチウイルスをミドリザル由来の培養細胞 COS7 に感染させ、内在性 SCOP の発現抑制効果を検討した結果、SCOP の発現が 50% 以下に減少することを確認した。25 年度は、確立した記憶測定方法を用いて記憶学習の時刻依存性の有無を確認し、SCOPshRNA 発現レンチウイルスの海馬投与により、記憶の時刻依存性に対する SCOP の影響を検討する。

A-6 チンパンジーの視覚・注意の発達変化に関する比較認知研究

牛谷智一(千葉大・文), 後藤和宏(相模女子大・人間社会) 所内対応者: 友永雅己

本研究では、視覚認知機能の進化的要因の解明を目的とし、チンパンジーの視覚処理・注意処理とヒトのそれらと比較し、両者の共通点と相違点の検討をおこなってきた。これまでの実験により、画面上の物体といった「まともまり」を単位に賦活するような視覚的注意過程(オブジェクトベースの注意)がチンパンジーにもあることが明らかになった。今年度は、物体の形状が注意の賦活にどう影響するかを検討した。実験条件では、複数のパーツが組み合わさったジグザグ形の図形を用意し、その内部の異なる場所に先行刺激(手がかり刺激)と標的刺激が出現した。統制条件では、長方形を用意し、先行刺激と標的刺激の出現位置は最短距離でつながっていた。先行刺激から標的刺激に注意を移動させるのに要する時間を測ったところ、同じ図形内部で注意を移動させる条件では異なる図形間で注意を移動させる条件よりも反応時間が短く、オブジェクトベースの注意が確認されたが、上記実験条件と統制条件との間に差はなかった。引き続き物体の形状を操作し、チンパンジーの視覚的注意の賦活様式がどのように変化するかを調べたうえで、今後はより複雑な日常の視覚風景上の刺激属性がどのようにチンパンジーの視覚的注意を捕捉するか解明していく予定である。

A-7 チンパンジーの口腔内状態の調査: う蝕・歯の摩耗・歯周炎・噛み合わせの評価を中心に

桃井保子, 花田信弘, 小川匠, 野村義明, 今井奨, 岡本公彰, 井川知子, 齋藤渉, 宮之原真由, 阿保備子, 山口貴央, 笠間慎太郎, 菅原豊太郎(鶴見大・歯) 所内対応者: 友永雅己

チンパンジー 11 個体 342 歯に対して歯科検診を実施した。その内う蝕歯は 16 歯、喪失歯は 3 歯であった。よって、う蝕経験歯を指す DMF 歯は 19 歯、DMF 指数は 1.45 であった。歯肉溝の深さは、342 歯中 317 歯が 4 mm 以下であった。歯周ポケット測定時に出血を認めなかったのは 6 個体、動揺歯を認めなかったのは 8 個体であった。著しいプラークの蓄積と歯石の沈着が 9 個体に認められた。また、年齢に応じて全顎的に顕著な咬耗を認めた。う蝕歯はそのほぼ全てに破折を認めた。そのうち前歯は 11 歯であり、破折・う蝕歯は前歯部に集中している。よって、う蝕の原因は外傷に起因すると考えられる。歯肉溝の深さが 4 mm 以下である歯は全体の 92.7% であり、そのほとんどが測定時の出血を認めなかった。深さ 4 mm の歯肉溝は健康な歯肉であると推察する。現在までに検診した個体のう蝕と歯周疾患から見る口腔健康状態は、口腔衛生に関する介入は皆無であり、プラークと歯石の多量の沈着を散見するにもかかわらず極めて良好といえる。この理由として、本研究所におけるチンパンジーが