

令和元年6月25日現在

機関番号：14301

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2014～2018

課題番号：26112003

研究課題名（和文）神経回路活動を計測する非侵襲的イメージング技術

研究課題名（英文）Noninvasive imaging technique for measuring neural circuit activity

研究代表者

尾上 浩隆（ono, hirotaka）

京都大学・医学研究科・特定准教授

研究者番号：80214196

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 56,500,000円

研究成果の概要（和文）：霊長類動物や遺伝子改変マウスなどの病態モデル動物から非侵襲的に脳の機能構造を同定するために、MRIにおける動物専用のコイルの開発やPETにおける新しい分子プローブの開発等を行い、他のイメージング技術との融合により機能的ネットワークの動的変化とその因果性を描出するための方法を確立した。本技術を用いて遺伝子改変モデルマウスや非ヒト霊長類であるマカサルにおける機能的神経回路網の解析し、病態のみならず、学習や発達の段階で遷移する神経回路や脳・脊髄損傷後の機能代償に関わる回路を特定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子改変モデルマウスから非ヒト霊長類であるマカサルにおける機能的神経回路網の解析のためのイメージング基盤技術を開発したことで、ヒトの病態のみならず、学習や発達の段階で遷移する神経回路や脳・脊髄損傷後の機能代償に関わる回路を特定することが可能となった。したがって、ヒトにおける脳損傷後のリハビリテーションや発達障害等の病態を、脳構造・機能的ネットワークの神経回路動態変化に基づいて理解することで、効率的で有用な治療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：In order to identify the functional structure of the brain from pathological animal models such as non-human primates and genetically modified mice, we developed dedicated coils for animals MRI imaging and also developed new molecular probes in PET. In combination with other technologies, we established a method for delineating the dynamic changes in functional network and its causality. Using this non-invasive imaging methods, we analyzed functional neural networks in genetically modified model mice and non-human primates such as macaques, and not only pathologies, but also neural circuits under the transition in the learning and development stages and functional recovery after the brain and spinal cord injury.

研究分野：脳機能・分子イメージング

キーワード：MRI PET 遺伝子改変マウス 非ヒト霊長類 脳機能イメージング リハビリテーション 精神神経疾患 自閉症

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

行動適応を担う神経回路の機能シフト機構を理解するためには、非侵襲的手法による時系列観察や膨大かつ複合的なデータ収集と推定精度・感度の高い多次元解析によって、機能的ネットワークの動的変化の因果性を明らかにすることが重要である。これまでに研究申請者らは、脳の機能構造、機能的ネットワークの動的変化を非侵襲的に測る技術的側面で本研究課題に関する重要な成果を得るとともに、また、覚醒下の動物を用いた陽電子断層撮影法 (PET) による研究環境、3 テスラ磁気共鳴画像 (MRI) 装置を用いた脳構造画像法や拡散強調画像法、高磁場 MRI と超高感度コイルシステムを導入したマウスの脳における測定環境を整備してきた。これらの画像・複合技術を更に高精度化し応用性を発展させることで、脳内分子発現と脳構造、脳機能とを統合し、脳内大規模ネットワークの動的変化を調べるツールとして有用な測定法となる。この技術を、領域内外の他の技術、ウィルスベクターによる特定神経回路の選択的遮断や ECoG による皮質の大量データの同時解析と融合することにより、脳機能構造の大規模な神経回路動態を一層正確に理解することが可能になり、運動機能、学習機能、高次認知機能の可塑性に関わる脳構造・機能的ネットワークの時空間的変遷を紐解く、全く独自の動物画像研究環境の実現が可能である。

2. 研究の目的

本研究では、非ヒト霊長類であるマカクザルや遺伝子改変マウスなどの病態モデル動物から非侵襲的に脳の機能構造を同定するために、MRI における動物専用のコイルの開発や PET における新しい分子プローブの開発等を行い、他の技術との融合イメージングにより機能的ネットワークの動的変化とその因果性を描出する観察法の確立を目指す。研究期間内に、MRI ではマカクザル、マウス専用の動物用送受信装置をさらに改良するとともに、微細構造の撮影を行うための拡散テンソル画像法のシーケンス開発、共振性を調べるための fMRI 画像の高時間分解能シーケンスを開発することで、脳の創発性を支える脳構造と機能的神経ネットワークの動的変遷を測定する動物撮像環境を構築する。これらの技術を用いて、神経科学の重要な課題について、応用研究を推進してきた研究者と連携し、本技術を効率よく有機的に有効活用し、遺伝子改変モデルマウスやマカクザルにおける機能的神経回路網の解析のためのイメージング基盤技術を開発し、病態のみならず、学習や発達の段階で遷移する神経回路や脳・脊髄損傷後の機能代償に関わる回路を特定する。本研究成果によって、ヒトにおける脳損傷後のリハビリテーションや発達障害等の病態を、脳構造・機能的ネットワークの神経回路動態変化に基づいて理解することが可能となり、効率的で有用な治療法の開発につながることを期待される。

3. 研究の方法

遺伝子導入マウスを対象として脳微細構造の研究を進めるために、超高感度コイルシステムを導入し、マウス近郊系のテンプレートを作製する。また、11.7T の高磁場の MRI を用いたマウスの測定法を確立し、病態モデル動物へ応用する。マカクザルを対象とした MRI による非侵襲イメージング法のための専用高感度コイルシステムを開発するとともに、長時間安定した撮影実験を行うための麻酔・呼吸管理法、生理モニタリングシステムを確立する。また、神経突起 (軸索および樹状突起) の微細構造の評価を行うための高空間分解能の拡散強調画像法や、安静時大規模脳ネットワークを評価するための高時間分解能の機能的 MRI 法の撮像シーケンスを開発・最適化を進める。応用研究として、マカクザルの脊髄損傷、一次視覚野損傷モデルを用いて PET による機能的神経ネットワークの時空間的変化の解析を行い、リハビリによる回復過程における運動機能可塑性と脳機能的ネットワークの経時的な変化を明らかにする。また、小林班と共同し、ラットにおける学習の獲得・実行の過程や障害、および回復過程での機能的神経回路シフトの動態を解析するために、無麻酔下での脳活動 ($[^{18}\text{F}]$ FDG-PET) イメージング測定技術の開発を進める。さらに、fMRI と PET による神経機能的結合と脳代謝測定との融合解析技術を確立し、病態における機能的ネットワーク異常のメカニズムを明らかにする。

4. 研究成果

遺伝子導入マウスを対象として脳微細構造の研究を進めるために、7 テスラの高磁場 MRI と超高感度コイルシステムを導入し、 $80\ \mu\text{m}$ の等方性分解能を有した Microscopic MRI を可能とし、高分解能の標準脳テンプレートを作成・Web 上に公開し、マウスの画素毎形態評価法 (VBM) を確立した。この方法により、近交系マウスの系統間の脳形態差を VBM によって明らかにした (図 1)。超高テスラ (11.7T) の高磁場の MRI を用いて、マウスの拡散テンソル解析を展開し、ボクセル内における複数の交差性神経線維を解析することで、従来法の神経追跡に対し 4 倍程度まで検出能を高めた。マカクザルを対象として専用高感度コイルシステムを開発するとともに、長時間安定した撮影実験を行うための麻酔・呼吸管理法、生理モニタリングシステムを確立した。また、神経突起 (軸索および樹状突起) の微細構造の評価を行うための高空間分解能の拡散強調画像法や、安静時大規模脳ネットワークを評価するための高時間分解能の fMRI 法の撮像シーケンスを開発・最適化した。さらに、マカクザルの高解像度拡散強調画像と T1 強調画像を用いて拡散テンソルを最適化することで、

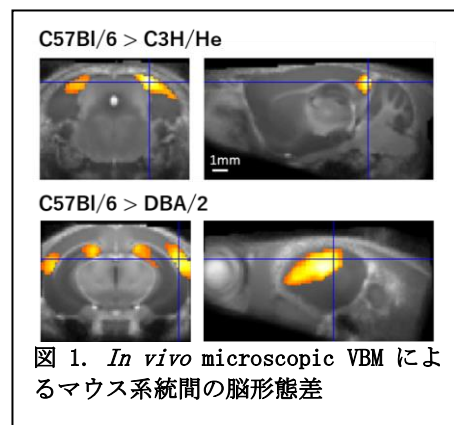


図 1. *In vivo* microscopic VBM によるマウス系統間の脳形態差

神経突起の微細構造情報に基づいた高分解能でマルチモーダルな標準脳テンプレートを作成し、3次元画像統計や表面解析・表示のパイプラインを構築した。マカクサル標準脳アトラスについてはワシントン大学・ロンドン大学との共同作業により、マルチモーダル皮質表面マッチングと拡散テンソル画像を用いた位置合わせ・変形処理による脳形状標準化の技術を融合して高解像度3次元脳画像および皮質表面アトラスを構築した。

無麻酔、覚醒状態下の機能的MRI (fMRI) イメージング法を確立し、発達障害モデルマウスの神経ネットワーク異常の有無について解析を行った。Poly (I : C) を用いた偽ウイルス感染による母体免疫活性化 (MIA) による自閉症モデルを妊娠 12.5 日目のマウスに poly (I : C) (20mg / kg) を腹腔内注射することによって作成した。社会的接近テストにおいて有意な行動異常を示したマウスについてのみ、安静期 fMRI における機能的ネットワークの解析を行った。その結果、多くの皮質間結合に正常な対照群に比較して機能的結合性の増加が認められた。しかし、同じ個体群について行った¹⁸F]FDG-PET による脳代謝活動の解析では、対照群よりも脳代謝が増加している部位はなく、機能的結合と脳代謝の間にはアンカップリングが認められた。安静期 fMRI のデータをグラフ理論に基づいたスモールワールド性について解析を行ったところ、ヒトの自閉症患者において報告される結果と同様に、パス長の減少とクラスタリングの増加が認められた。

計画班の小林班と共同し、ラットにおける学習の獲得・実行の過程や障害、および回復過程での機能的神経回路シフトの動態を解析するために、無麻酔下、自由行動下での脳活動 (¹⁸F]FDG-PET) イメージングの測定方法を確立し、同一個体による学習過程の繰り返し測定に成功した。その結果、学習過程において神経活動が線条体前部から後部へとシフトする、これまで知られていなかった機能変化が起こることを見出した。

アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いて、遺伝子発現を抑制する shRNA を霊長類であるマモセットの線条体尾状核に導入し、脳内の線条体尾状核の D1R および D2R の発現の抑制に成功した。この個体に視覚認知学習課題を行わせたところ、D2R を発現抑制した個体は成績が悪化し、D1R を抑制した個体には変化がみられず、線条体尾状核の D2R が認知学習へ関わることが明らかになった (図 2)。

大脳皮質一次運動野損傷モデルサルを用いて PET、MRI による機能的神経ネットワークの時空間的变化の解析を行った。運動野損傷モデルの作成は、皮質内微小電極刺激 (ICMS) 法により「指」領域を同定し、その部位に神経毒イボテン酸溶液を注入することで機能選択的・限局性皮質病変を作製し、その後、運動課題を繰り返し練習することで運動機能回復を促進させる。回復過程における ¹⁵O] H₂O-PET による局所脳血流画像撮影を繰り返し行い、得られた膨大な画像の運動障害の回復との関連性について多次元データ解析を行い、リハビリによる回復過程における運動機能可塑性と脳機能的ネットワークの経時的な変化を明らかにした (図 3)。

計画班の伊佐班と共同し、一次視覚野損傷モデルサルの機能回復過程について時空間的变化の解析を行い、視覚機能ネットワークの経時的な変化を明らかにした。さらに、得られた結果に基づいて、訓練により盲視野内の指標への眼球サックード運動が回復したサルに対し、ウィルスベクター二重感染法を用いて上丘一視床枕経路のシナプス伝達の選択的操作を行い、盲視における視野へのサックード運動に上丘一視床枕経路が関与することを証明した。

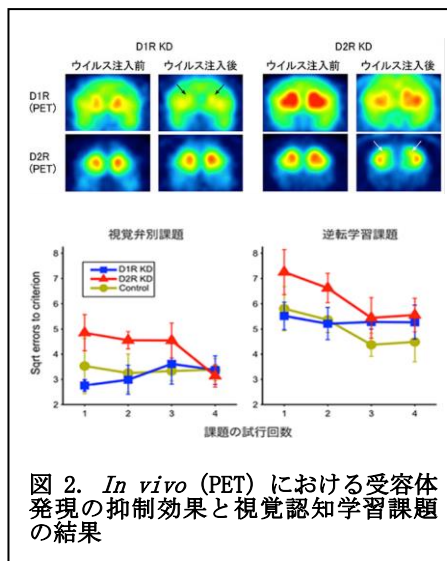


図 2. *In vivo* (PET) における受容体発現の抑制効果と視覚認知学習課題の結果

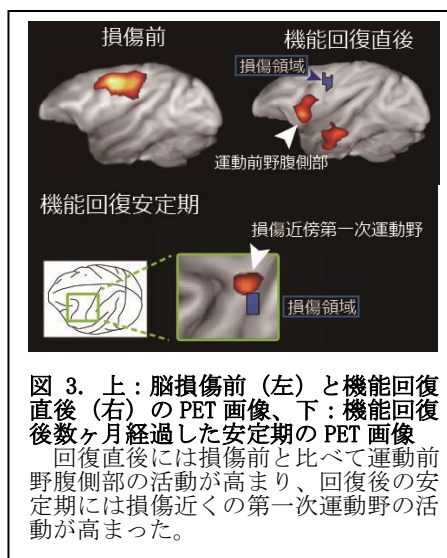


図 3. 上: 脳損傷前 (左) と機能回復直後 (右) の PET 画像、下: 機能回復後数ヶ月経過した安定期の PET 画像
回復直後には損傷前と比べて運動前野腹側部の活動が高まり、回復後の安定期には損傷近くの第一次運動野の活動が高まった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 18 件)

- ① Cui YL, Toyoda H, Sako T, Onoe K, Hayashinaka E, Wada Y, Yokoyama C, Onoe H, Kataoka Y, Watanabe Y. A voxel-based analysis of brain activity in high-order trigeminal pathway in the rat induced by cortical spreading depression. *NeuroImage* 108 17-22 (2015). doi: 10.1016/j.neuroimage.2014.12.047.
- ② Takata N, Yoshida K, Komaki Y, Xu M, Sakai Y, Hikishima K, Mimura M, Okano H, *Tanaka KF. Optogenetic Activation of CA1 Pyramidal Neurons at the Dorsal and Ventral Hippocampus Evokes Distinct Brain-Wide Responses Revealed by Mouse fMRI. *PLoS One* 10(3) e0121417 (2015). doi: 10.1371/journal.pone.0121417.
- ③ Hikishima K, Ando K, Yano R, Kawai K, Komaki Y, Inoue T, Itoh T, Yamada M, Momoshima S, Okano HJ, *Okano H. Parkinson Disease: Diffusion MR Imaging to Detect Nigrostriatal Pathway Loss in a Marmoset Model Treated with 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Radiology* 275(2) 430-7 (2015). doi: 10.1148/radiol.14140601.
- ④ Murata Y, Higo N, Hayashi T, Nishimura Y, Sugiyama Y, Oishi T, Tsukada H, Isa T, Onoe H. Temporal Plasticity Involved in Recovery from Manual Dexterity Deficit after Motor Cortex Lesion in Macaque Monkeys. *J Neurosci* 35(1) 84-95 (2015). doi:10.1523/JNEUROSCI.1737-14.2015.
- ⑤ Hikishima K, Ando K, Komaki Y, Kawai K, Yano R, Inoue T, Itoh T, Yamada M, Momoshima S, Okano HJ, Okano H. Voxel-based morphometry of the marmoset brain: In vivo detection of volume loss in the substantia nigra of the MPTP-treated Parkinson's disease model. *Neuroscience* 300 585-92 (2015). doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.05.041.
- ⑥ Sawada M, Kato K, Kunieda T, Mikuni N, Miyamoto S, Onoe H, Isa T, Nishimura Y. Function of the nucleus accumbens in motor control during recovery after spinal cord injury. *Science* 350 (6256) 98-101 (2015). doi: 10.1126/science.aab3825.
- ⑦ Fujiyoshi K, Hikishima K, Nakahara J, Tsuji O, Hata J, Konomi T, Nagai T, Shibata S, Kaneko S, Iwanami A, Momoshima S, Takahashi S, Jinzaki M, Suzuki N, Toyama Y, Nakamura M, Okano H. Application of q-Space Diffusion MRI for the Visualization of White Matter. *J Neurosci* 36(9) 2796-808 (2016). doi: 10.1523/JNEUROSCI.1770-15.2016.
- ⑧ Fujita S., Mizoguchi N., Aoki R., Cui, Y.L., Koshikawa N., and Kobayashi M. Cytoarchitecture-dependent decrease in propagation velocity of cortical spreading depression in the rat insular cortex revealed by optical imaging. *Cerebral Cortex* 26(4), 1580-9, 2016. doi: 10.1093/cercor/bhu336.
- ⑨ Komaki Y, Hikishima K, Shibata S, Konomi T, Seki F, Yamada M, Miyasaka N, Fujiyoshi K, Okano HJ, Nakamura M, Okano H. Functional brain mapping using specific sensory-circuit stimulation and a theoretical graph network analysis in mice with neuropathic allodynia. *Sci Rep.*6(37802), (2016). doi:10.1038/srep37802.
- ⑩ Yamazaki Y, Hikishima K, Saiki M, Inada M, Sasaki E, Lemon RN, Price CJ, Okano H, Iriki A. Neural changes in the primate brain correlated with the evolution of complex motor skills. *Sci Rep* 6:31084 (2016). doi: 10.1038/srep31084.
- ⑪ Takaji M, Takemoto A, Yokoyama C, Watakabe A, Mizukami H, Ozawa K, Onoe H, Nakamura K, Yamamori T. Distinct roles for primate caudate dopamine D1 and D2 receptors in visual discrimination learning revealed using shRNA knockdown. *Sci Rep.* 6:35809, 2016. doi: 10.1038/srep35809.
- ⑫ Hikishima K, Komaki Y, Seki F, Ohnishi Y, Okano HJ, Okano H. In vivo microscopic voxel-based morphometry with a brain template to characterize strain-specific structures in the mouse brain. *Sci Rep.* 7(1)85(2017). doi: 10.1038/s41598-017-00148-1.
- ⑬ Hara Y, Motoi Y, Hikishima K, Mizuma H, Onoe H, Matsumoto SE, Elahi M, Okano H, Aoki S, Hattori N. Involvement of the Septo-Hippocampal Cholinergic Pathway in Association with Septal Acetylcholinesterase Upregulation in a Mouse Model of Tauopathy. *Curr Alzheimer Res* 14(1) 94-103 (2017). doi: 10.2174/1567205013666160602235800.
- ⑭ Nakai N, Nagano M, Saitow F, Watanabe Y, Kawamura Y, Kawamoto A, Tamada K, Mizuma H, Onoe H, Watanabe Y, Monai H, Hirase H, Nakatani J, Inagaki H, Kawada T, Miyazaki T, Watanabe M, Sato Y, Okabe S, Kitamura K, Kano M, Hashimoto K, Suzuki H, Takumi T. Serotonin rebalances cortical tuning and behavior linked to autism symptoms in 15q11-13 CNV mice. *Sci Adv.* 3(6): e1603001, 2017.
- ⑮ Zeng Y, Hu D, Yang W, Hayashinaka E, Wada Y, Watanabe Y, Zeng Q. Cui YL. A

- voxel-based analysis of neurobiological mechanisms in placebo analgesia in rats. *NeuroImage* 178, 602-612, 2018. Doi: 10.1016/j.neuroimage.2018.06.009.
- ⑬ Higo N, Sato A, Yamamoto T, Oishi T, Nishimura Y, Murata Y, Onoe H, Isa T, Kojima T: Comprehensive analysis of area-specific and time-dependent changes in gene expression in the motor cortex of macaque monkeys during recovery from spinal cord injury. *J Comp Neurol*. 526(7):1110-1130, 2018. doi: 10.1002/cne.24396.
 - ⑭ Kato M, Yokoyama C, Kawasaki A, Takeda C, Koike T, Onoe H, Iriki A. Individual identity and affective valence in marmoset calls: in vivo brain imaging with vocal sound playback. *Anim Cogn*. 21(3):331-343, 2018. doi: 10.1007/s10071-018-1169-z.
 - ⑮ Kinoshita M, Kato R, Isa K, Kobayashi K, Kobayashi K, Onoe H, Isa T. Dissecting the circuit for blindsight to reveal the critical role of pulvinar and superior colliculus. *Nat Commun*. 10(1):135, 2019. doi: 10.1038/s41467-018-08058-0.

〔学会発表〕（計 21 件）

〔図書〕（計 10 件）

- ① 林 拓也, Clinical Neuroscience, 神経束空間統計 Tract-Based Spatial Statistics (TBSS), 2014, 32(5) 585–87.
- ② 林 拓也, Clinical Neuroscience, 脳のおシレーション、循環代謝と自発的神経活動 Cerebral Oscillation, Blood Flow-Metabolism and Spontaneous Neural Activity, 2014, 32(7) 762–67.
- ③ 水間 広 他, JSMI report, PET と MRI によるタウオパチーモデルマウスにおける障害部位の可視化, 2016, 10(1):57-60.
- ④ 尾上 浩隆 他, 脊髄外科, 脊髄損傷からの回復期における側坐核の役割. 2016, Vol.28 No.1:77-79. 4.
- ⑤ 尾上 浩隆 他, 月刊「BIO INDUSTRY」, PET による神経変性疾患における神経炎症のライブイメージング, 特集 認知症診断・根治に向けたイメージング利用, 2016, 2 月号.
- ⑥ 尾上 浩隆, JSMI Report, 分子イメージングの明日に向けて, 2016, 9, 巻頭言.
- ⑦ 尾上 浩隆 他, BRAIN and NERVE—神経研究の進歩, ミクログリアと認知症 PET イメージングによる診断の可能性、特集 ミクログリアと精神・神経疾患, 2017, 69 (9) .
- ⑧ 疋島 啓吾, 中外医学社, Annual Review 神経 2019 (分担執筆:「MRI によるミエリンイメージング」), 2019, 56-63.
- ⑨ 水間 広 他, Clinical Neuroscience, 機能画像 タウ蛋白編, 2019, 37(1): 78-80.
- ⑩ Hikishima Keigo et al, Springer , The 3-Dimensional Atlas of the Marmoset Brain. 2019.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

- ① 脳損傷によって失われた運動機能を肩代わりする脳の変化を解明—脳から学んだりハビリの開発につながる発見—, 産業総合研究所 WEB, http://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2015/pr20150107/pr20150107.html, 2015/01/07

- ② "やる気や頑張り"がリハビリテーションによる運動機能回復に 大切であることを脳科学的に証明、生理学研究所 WEB、http://www.nips.ac.jp/release/2015/10/post_306.html、2015/10/2
- ③ 片頭痛の痛みを可視化する脳機能画像解析法、理化学研究所ライフサイエンス技術基盤研究センター WEB、<http://www.clst.riken.jp/ja/topics/research/0422cui/> 2015/04/22、
- ④ ドーパミン受容体の機能に新視点—ドーパミン受容体D1R・D2R発現抑制の視認知学習機能への影響 2016, 理化学研究所 WEB、http://www.riken.jp/pr/press/2016/20161108_1/ 2016/11/8、国内
- ⑤ 「期待感」は痛みを和らげる—プラセボ効果の神経生物学的な基盤の解明— 理化学研究所 WEB http://www.riken.jp/pr/press/2018/20181105_2/、2018/11/5、国内

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：疋島啓吾

ローマ字氏名：Hikishima Keigo

所属研究機関名：沖縄科学技術大学院大学

部局名：実験動物セクション・

職名：スペシャリスト

研究者番号（8桁）：30420219

研究分担者氏名：林 拓也

ローマ字氏名：Hayashi Takuya

所属研究機関名：国立研究開発法人理化学研究所

部局名：生命機能科学研究センター

職名：チームリーダー

研究者番号（8桁）：50420219

研究分担者氏名：崔 翼龍

ローマ字氏名：Cui Yilong

所属研究機関名：国立研究開発法人理化学研究所

部局名：生命機能科学研究センター

職名：ユニットリーダー

研究者番号（8桁）：60312229

研究分担者氏名：水間 広

ローマ字氏名：Mizuma Hiroshi

所属研究機関名：国立研究開発法人理化学研究所

部局名：生命機能科学研究センター

職名：研究員

研究者番号（8桁）：00382200

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：小牧裕司

ローマ字氏名：Komaki Yuji