

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07859

研究課題名(和文) 化学遺伝学的手法を用いたサル小脳投射経路の経路特異的機能の解明

研究課題名(英文) Chemogenetic manipulation reveals pathway-specific functions of the cerebellar efferent of macaque monkeys

研究代表者

石田 裕昭 (ISHIDA, Hiroaki)

公益財団法人東京都医学総合研究所・精神行動医学研究分野・主任研究員

研究者番号：70728162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はサル小脳の投射経路を標的に、化学遺伝学手法(DREADD法)を用いて、小脳の投射経路の活動を人工的に操作し、投射経路の機能的役割を明らかにしようとした。サルの小脳歯状核へDREADDを発現させるウイルスベクターを注入し、発現量をポジトロン断層法を用いて評価した。サル小脳に十分な発現が確認されたのち、投射経路の遮断を試みた上で、サルの運動や筋活動、各脳部位の神経活動の変化を記録した。しかし、解析の結果、DREADDによる操作の効果は認められなかった。片側の小脳投射経路を一時的に抑制しても小脳の優れた学習・適応力により変化は起こらない可能性が考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

霊長類の脳を用いた遺伝子導入技術の確立を目指した。サルを用いて小脳投射経路の操作が実現することによって因果関係に基づいた神経経路機能が明らかになり、ヒト運動失調の病態理解や新しいリハビリテーション法の開発が促進される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to use chemogenetic methods to manipulate projection pathways in the cerebellum of monkeys to clarify the functional role of the pathways. AAV vectors expressing DREADD were injected into the dentate nucleus of the monkey cerebellum and expression levels were evaluated using positron emission tomography. After sufficient expression was confirmed in the monkey cerebellum, the projection pathway was reversibly blocked and changes in monkey reaching movements, muscle activity, and neural activity in each brain region were recorded. The analysis did not show an effect of the manipulation by DREADD. It is possible that temporary inhibition of unilateral cerebellar projection pathways does not cause changes due to the learning and adaptive ability of the cerebellum.

研究分野：システム神経生理学

キーワード：化学遺伝学 小脳遠心路 PETイメージング マカクザル 運動障害 遺伝子導入 アデノ随伴ウイルス ムシモル

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

代表者らは霊長類脳の神経回路網を明らかにするためにモデルとしてマカクザルを用い、狂犬病ウイルスによる逆行性・越シナプス性トレーシング法を駆使して、大脳基底核、小脳から大脳皮質運動野へ投射する多シナプス性神経回路を明らかにしてきた(Eur J Neuro, 2015; Clinical Neuro, 2017)。神経回路の機能的役割を因果性を持って明らかにするには、標的神経経路を選択的に操作する技術が必要と考えた。そこで霊長類に導入され始めた DREADD 人工受容体の遺伝子導入法に注目した。

2. 研究の目的

この手法は、人工リガンド(薬剤)にのみ応答する人工受容体を脳の特定領域にのみ発現させ、特定の神経核や領域の神経回路の活動を選択的に操作できる。しかし、従来の DREADD 法は、人工リガンドを全身投与するため(システミック投与)脳領野自体と投射経路がすべて同時に抑制され、神経経路選択的な操作ができなかった。そこで本研究提案では人工リガンドを標的領域に微量局所注入することにより、DREADD による神経経路選択的な遮断法を確立することを目的とした。この手法を用いて、小脳の投射経路を選択的に操作し、その経路が担う機能的役割を解明しようとした。

3. 研究の方法

二ホンザル 4 頭を用いて以下の実験を実施した。

実験 1: PET スキャンによる小脳核、視床、赤核内での DREADD 発現の証明

本研究提案は、マカクザルの小脳核に DREADD を発現させ、神経経路選択的な遮断を実現する。小脳核と投射先に十分に DREADD が発現していることが本研究提案の成功の鍵となるため、ポジトロン核種(11C)で標識した人工リガンド(11C-クロザピン)を実験動物に静注し、PET スキャンを用いて脳内に発現した DREADD を可視化する。これにより実験動物を生かしたまま、DREADD が小脳核および投射先に発現しているか、またその発現量が十分か確認できる。DREADD 発現が不十分な場合は、DREADD の追加注入することができ効率的に実験できる。本研究提案で使用した AAV ベクターは、京都大学霊長類研究所・高田昌彦教授および井上謙一助教、生理学研究所・小林憲太准教授から提供を受けた。また、PET スキャンによる DREADD 発現の可視化は、量子科学技術研究開発機能・南本敬史チームリーダー・永井裕司研究員の協力を得て実施した。

実験 2: 到達把持運動に対する小脳視床路、小脳赤核路の機能的役割の証明

到達把持運動をサルに遂行させ、行動および上肢遠位・近位部の筋活動を正常時と経路選択的な遮断時、全経路遮断時において対比した。これにより上肢運動の制御に対する経路特異的な機能を課題の成功率と筋活動の違いから明らかにする。

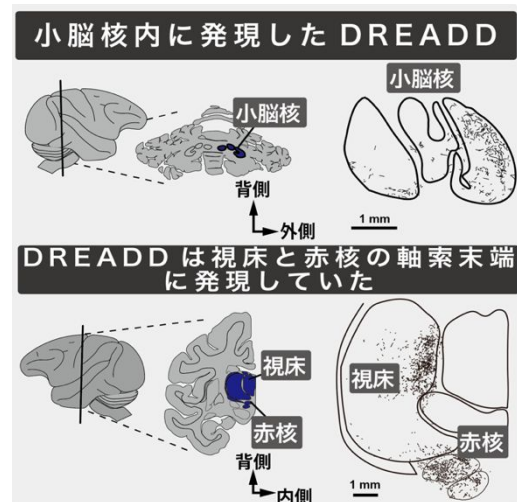
4. 研究成果

令和元年度は、2 頭のサルを用いて小脳核にウイルスベクター(AAV2-hM4Di)の注入を試みたが、小脳核に正確に注入できなかった。そこで新たに 2 頭のサルを用い、(1)頭部 CT/MRI 画像に基づいて小脳核に対する注入座標を精密に同定し、(2)ウイルスベクターは、前回のベクターよりも遺伝子発現力が強く神経毒性は低い AAV2.1-hM4Di を導入し、小脳核に注入した。その後 PET イメージング法を用い、これら 2 頭のサル共に小脳核とその神経投射先である視床に

において、DREADD が発現したことを確認した。令和 2 年度は、これらのモデル動物に対し、上肢運動を遂行している際の上肢近遠位筋群の活動を記録するために筋電ワイヤ埋め込み(慢性留置)手術を実施した。さらに DREADD を作動させるための人工リガンドは、令和元年に用いた CNO に代わり、Nagai and Miyakawa et al., (2020)が開発した、デスクロクロザピン (DCZ) を使用した。CNO に比べて即効性があり、低用量かつ低副作用と利点が多い。モデル動物に対して、DCZ を全身投与(筋肉注射)した後、到達把持運動(餌取り課題)を遂行させ、行動および上肢遠位・近位部の筋活動の変化を記録したが、DREADD 作動時において、サルの餌取りの成功率および上肢筋群の活動に顕著な変化は認められなかった。そこで 2 頭のうち 1 頭のサルに対して、DREADD を注入した小脳核内の同一座標に GABAA 受容体アゴニストであるムシモルを注入し上肢運動の変化を観察したところ、このサルの運動は顕著に障害された。従って、抑制性 DREADD はムシモルと比較すると運動障害に至るほど強く作用しない可能性があるかもしれないと考えた。

令和元年度の操作実験はうまく行かなかったため、令和 2 年度に本実験系の抜本的な技術的修正を行った。令和 3 年は令和 2 年度に確立した新しい手法を用い、DCZ を全身投与(筋注)した後、到達把持運動(餌取り課題)を遂行させ、行動および上肢遠位・近位部の筋活動の変化を記録した。しかし、実験を繰り返しても DREADD 作動時において、サルの餌取りの成功率および上肢筋群の活動に顕著な変化は認められなかった。DREADD を注入した座標に対して、ムシモルを微量注入しサルの手指運動の変容を観察した結果、ムシモル

注入の場合はサルの行動は注入なしの時よりも拙劣になった。以上の結果から、DREADD の発現量が行動の変化を起こすほど十分ではない可能性があると考え、R3 年度は、(1)サルに対して、DREADD の追加注入を実施し、(2) PET 撮像により DREADD 結合能が注入前よりも上昇したことを確認した。サルに DCZ を全身投与(筋注)した後、PET で応答があった小脳核あるいはその投射先の視床運動核がある座標に対して微小電極を刺入し神経活動を記録しながら、手指・上肢運動の行動および筋活動変化を記録した。サルの行動および筋活動は、DCZ の投与前後で変化なく、神経活動においてもマルチユニットおよびシングルユニットレベルの活動に変化は認められなかった。ヒストロジー解析の結果は、小脳核、視床および赤核に確かに DREADD は発現していた。今後は共同研究者らと情報を共有し、本実験系が働かなかった原因を明らかにする。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 Sano Nobuya, Nakayama Yoshihisa, Ishida Hiroaki, Chiken Satomi, Hoshi Eiji, Nambu Atsushi, Nishimura Yukio | 4. 巻 164 |
| 2. 論文標題 Cerebellar outputs contribute to spontaneous and movement-related activity in the motor cortex of monkeys | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Neuroscience Research | 6. 最初と最後の頁 10~21 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2020.03.010 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 石田裕昭 |
| 2. 発表標題 統合失調症患者における小脳ネットワークの糖化ストレス病理 |
| 3. 学会等名 第16回日本統合失調症学会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 石田裕昭 |
| 2. 発表標題 霊長類における自己と他者の神経表象に関わる多シナプス性神経ネットワーク |
| 3. 学会等名 令和3年京都大学霊長類研究所共同利用共同研究 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|------------------------------|
| 1. 発表者名 石田裕昭 |
| 2. 発表標題 小脳ネットワークの糖化ストレス病態 |
| 3. 学会等名 東京都立松沢病院神経科研修医研修 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Hiroaki Ishida |
| 2. 発表標題 Neural circuits of metacognition and pathology of schizophrenia |
| 3. 学会等名 The 44 th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 石田裕昭 |
| 2. 発表標題 内側前頭極は記憶と社会的な視覚・聴覚情報を統合する |
| 3. 学会等名 第85回日本心理学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--------------------------------|
| 1. 発表者名 石田裕昭 |
| 2. 発表標題 カルボニルストレス性統合失調症の脳病態 |
| 3. 学会等名 東京都立松沢病院神経科研修医研修 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 石田裕昭 |
| 2. 発表標題 統合失調症の基礎医学研究『医療と福祉をつなぐ展望について』 |
| 3. 学会等名 臨床ソーシャル研究会(招待講演) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|-----------------------------|
| 1. 発表者名 石田裕昭 |
| 2. 発表標題 自己－他者－社会の意思決定 |
| 3. 学会等名 第84回日本心理学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2020年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|