

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640011

研究課題名(和文) 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

研究課題名(英文) Development in an in vivo imaging technique for monitoring foreign gene expression in the primate brain

研究代表者

高田 昌彦 (Takada, Masahiko)

京都大学・霊長類研究所・教授

研究者番号：00236233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、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を開発するため、アデノ随伴ウイルスベクターや逆行性感染型レンチウイルスベクターを用いたウイルスベクターシステムとレポーターシステムにより、神経路選択的遺伝子発現ベクターシステムへのレポーター遺伝子の導入とその最適化を実施し、レポーター遺伝子による発現状態の確認と薬剤導入による特定の神経路への機能介入を同時に実現する実験系の構築に成功した。また、イメージング結果と行動学および組織学的解析結果との相関を調べることによって、本研究で確立した機能的生体イメージング手法の有用性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)： In order to develop an in vivo imaging technique for monitoring foreign gene expression in the primate brain, we first improved both the viral vector system and the reporter system using an adeno-associated viral vector and a lentiviral vector with highly efficient retrograde gene transfer. Employing these systems, we carried out the delivery of a reporter gene into the vector system for pathway-selective gene expression and its optimization, and then successfully achieved an experimental system that simultaneously allowed the verification of foreign gene expression with the reporter gene and the functional interference in a particular pathway with drug induction. Moreover, by examining a correlation between data obtained from the imaging and the behavioral/histological analysis we clarified the usefulness of the functional in vivo imaging technique that we established here.

研究分野：神経科学

キーワード：ウイルスベクター 遺伝子導入 神経路 イメージング 霊長類

1. 研究開始当初の背景

最近、サルにおいて特定の神経回路機能に介入し、行動学的・電気生理学的アプローチによる機能解析を実現するため、ウイルスベクターを用いた神経路選択的遺伝子導入法が開発された。本手法は、逆行性感染型のレンチウイルスベクター(HiRetベクター)と順行性感染型のアデノ随伴ウイルスベクター(AAVベクター)の多重感染によって、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の発現を誘導するものである。導入遺伝子としてテタヌストキシンやチャンネルロドプシンなどの機能プローブを使用することによりターゲット神経路に対する機能介入をおこない、行動学的・電気生理学的変化を解析することが可能になった。しかしながら、行動課題をトレーニングしたサルを用いた長期間にわたる慢性実験に神経路選択的遺伝子導入法を適用するためには、遺伝子導入の成否を事前に確認できることが必須要件である。そこで、陽電子放射断層撮影(PET)や核磁気共鳴画像法(MRI)などの生体イメージング法においてマーカーとなる遺伝子をウイルスベクターシステムに組み込むことにより、外来遺伝子の発現状態をモニターする手法を確立することを計画した。

2. 研究の目的

本研究では、PETやMRIなどの生体イメージング法においてマーカーとなる遺伝子を利用し、霊長類の脳にウイルスベクターを用い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確立することを第一の目的とする。また、この手法を、研究代表者らが最近開発した、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の際に、導入したプローブ遺伝子の発現状態をモニターすることによって、遺伝子導入の成否を事前に確認できる手段を提供することを第二の目的とする。さらに、これらの技術を発展させて、RNAi誘導による発現抑制系にも応用できるような汎用的システムの構築を目指す。

3. 研究の方法

(1) PET/MRIマーカー遺伝子と蛍光遺伝子を連結したレポーター遺伝子配列を構築し、それを組み込んだAAVベクターをサルの線条体に注入することにより、マーカー遺伝子の発現をシグナルとして検出できることを確認し、遺伝子構成や撮像条件の調整をおこなう。

(2) レポーター遺伝子を同時に発現するように神経路選択的遺伝子導入ベクターシステムを改良し、テタヌストキシン軽鎖によって黒質—線条体ドーパミン神経路の伝達阻害を引き起こす実験系において検証し、イメー

ジング結果と行動学的・組織学的解析結果との相関を調べる。最終的には、ベクターシステムを発現抑制系に改良し、RNAiによる受容体発現抑制効果とマーカー遺伝子のイメージング結果との相関を解析し、特定のニューロン群におけるRNAi効果を的確に推定できる手法を確立する。

4. 研究成果

(1) 本研究では、PETやMRIなどの生体イメージング法においてマーカーとなる遺伝子を利用し、霊長類の脳にウイルスベクターを用い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確立することを第一の目的とする。また、この手法を、研究代表者らが最近開発した、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操作法に適用し、当該神経路の活動を操作する機能介入の影響を解析する際に、導入したターゲット遺伝子の発現状態をモニターすることによって、遺伝子導入の成否を事前に確認できる手段を提供することを第二の目的とする。

(2) 第一の目的に関連し、PETのマーカー遺伝子を導入したAAVベクターを作製して、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。さらに、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、HiRet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、RNAi誘導による発現抑制系への応用を検討するため、ベクター配列の改良など、ベクターシステムの開発に着手した。

(3) 第二の目的に関連し、上記のように開発、改良したレポーターシステムおよびウイルスベクターシステムを利用して、神経路選択的遺伝子発現ベクターシステムへのレポーター遺伝子の導入とその最適化を実施し、レポーター遺伝子による発現状態の確認と薬剤導入による特定の神経路への機能介入を同時に実現する実験系の構築に成功した。さらに、イメージング結果と行動学的および組織学的解析結果との相関を調べることにより、本研究で確立した特定のニューロン群におけるターゲット遺伝子発現の機能的生体イメージング手法の有用性が明らかになった。

(4) 今後はこれらの技術を発展させて、RNAi誘導による発現抑制系にも応用できるような汎用的システムの構築を目指す。具体的には、神経伝達物質の受容体遺伝子をターゲットとして特定のニューロン群における RNAi誘導配列の転写状態を的確に推定できる手法を確立するため、ベクターシステムの開発と改良、およびベクター注入後のイメージング実験を進める。本研究の成果は、ターゲット遺伝子を発現する特定のニューロン群の効率的な生体イメージングを実現する手法として、広く遺伝子治療や再生医療の発展にも貢献できると考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 13 件)

1. Oishi T, Imai H, Go Y, Imamura M, Hirai H, Takada M (2014) Sporadic premature aging in a Japanese monkey: a primate model for progeria. PLoS ONE, 9:e111867.
2. Hiraoka M, Inoue K, Senoo H, Takada M (2014) Morphological study of the accommodative apparatus in the monkey eye. Anat Rec, 298:630-636.
3. 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.
4. 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 23:2965-2975.
5. 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.
6. Matsumoto M, Takada M (2013) Distinct representations of cognitive and motivational signals in midbrain dopamine neurons. Neuron 79:1011-1024.
7. Isomura Y, Takekawa T, Harukuni R, Handa T, Aizawa H, Takada M, Fukai T (2013) Reward-modulated motor information in identified striatum neurons. J Neurosci 33:10209-10220.
8. Hayakawa H, Nagai M, Kawanami A, Nakata Y, Nihira T, Ogino M, Takada M, Saido 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Ninomiya T, Sawamura H, Inoue K, Takada M (2012) Multisynaptic inputs from the medial temporal lobe to V4 in macaques. PLoS ONE 7:e52115.
13. Lu X, Miyachi S, Takada M (2012) Anatomical evidence for the involvement of medial cerebellar output from the interpositus nuclei in cognitive functions. Proc Natl Acad Sci USA 109:18980-18984.

[学会発表](計 43 件)

1. Nakagawa H, Ninomiya T, Yamashita T, Takada M : “Contribution of RGMa inhibition to recovery of motor functions after spinal cord injury in macaques.” 11th Goettingen Meeting of the German Neuroscience Society (2015.3.19) ドイツ, ゲッティンゲン
2. 高田昌彦 : “経路選択的な神経回路操作技術のマーモセット脳機能研究への応用” 第 4 回マーモセット研究会 (2015.1.22) 犬山国際観光センターフロイデ, 犬山
3. 高田昌彦 : “ウィルスベクターを用いた外来遺伝子導入による疾患モデル霊長類の開発” システム神経科学セミナー (2014.12.15) 国立精神・神経医療研究センター, 東京
4. Inoue K, Kimura K, Yasukouchi R, Sugawara N, Okuda Y, Fujiwara M, Takada M : “Systemic delivery of an AAV vector in neonatal macaques results in widespread gene transduction into neurons throughout the brain.” VMT2014“Vision, Memory, Thought: how cognition emerges from neural network”(2014.12.6-7) 伊藤国際学術研究センター, 伊藤謝恩ホール, 東京
5. Kawai T, Yamada H, Sato N, Takada M, Matsumoto M : “Past outcome monitoring

- and subsequent behavioral adjustment in the primate lateral habenula and anterior cingulate cortex during a reversal learning task.” VMT2014“Vision, Memory, Thought: how cognition emerges from neural network”(2014.12.6-7) 伊藤国際学術研究センター. 伊藤謝恩ホール, 東京
6. Nakagawa H, Ninomiya T, Yamashita T, Takada M : “Enhanced functional recovery after spinal cord injury by inhibition of repulsive guidance molecule in macaques.” VMT2014“Vision, Memory, Thought: how cognition emerges from neural network”(2014.12.6-7) 伊藤国際学術研究センター. 伊藤謝恩ホール, 東京
 7. Nakagawa H, Ninomiya T, Yamashita T, Takada M : “Effectiveness of inhibition of the repulsive guidance molecule, RGMa on the functional recovery following spinal cord injury in macaques.” Neuroscience 2014 (2014.11.19) Washington, D.C., USA
 8. Inoue K, Kimura K, Yasukochi R, Sugawara N, Okuda Y, Fujiwara M, Takada M : “Intravascular administration of an AAV vector to neonatal macaques results in widespread gene transduction into neurons throughout the primate brain.” Neuroscience 2014 (2014.11.18) Washington, D.C., USA
 9. Kang Y, Chung G, Saito M, Takada M, Bae Y, Kim J, Oh S : “Enhancement of INaP-mediated resonance by mGluR-I activation induces burst firing in mesencephalic trigeminal sensory neurons.” Neuroscience 2014 (2014.11.18) Washington, D.C., USA
 10. K. W. McCairn, Nagai Y, Hori Y, Iriki A, Takada M, Minamimoto T, Isoda M, Matsumoto M : “Distinct cortical and subcortical networks drive myoclonic and vocal tics in the nonhuman primate model of Tourette syndrome: A PET and electrophysiological study.” Neuroscience 2014 (2014.11.18) Washington, D.C., USA
 11. Nagai Y, Kikuchi E, W. Lerchner, Inoue K, Oh-nishi A, Kaneko H, Kato Y, Hori Y, B. Ji, Kumata K, M. Zhang , Aoki I, Suhara T, Takada M, Higuchi M, B. J. Richmond, Minamimoto T : “In vivo PET imaging of the behaviorally active designer receptor in macaque monkeys.” Neuroscience 2014 (2014.11.17) Washington, D.C., USA
 12. Oishi T, Imai H, Go Y, Hirai H, Takada M : “Brain shrinkage and reduced nerve conduction velocity in a progeroid-like macaque monkey.” Neuroscience 2014 (2014.11.17) Washington, D.C., USA
 13. 高田昌彦 : “狂犬病ウイルスを駆使した多シナプス性神経ネットワークの解析分子精神神経薬理学研究セミナー” (2014.11.7) 大阪大学, 大阪
 14. 永井裕司, 菊池瑛理佳, Walter Lerchner, 井上謙一, 大西新, 金子博之, 加藤陽子, 堀由紀子, 季斌, 熊田勝志, 張明栄, 青木伊知男, 須原哲也, 高田昌彦, 樋口真人, Barry J Richmond, 南本敬史 : “DREADD を用いたサル の行動制御と PET 生体内イメージング” 第 37 回日本神経科学大会(2014.9.13) パシフィコ横浜, 横浜
 15. 大石高生, 今井啓雄, 郷康広, 平井啓久, 高田昌彦 : “ニホンザルが示した神経系等の早老症的症状” 第 37 回日本神経科学大会(2014.9.13) パシフィコ横浜, 横浜
 16. 木村活生, 井上謙一, 田中章景, 高田昌彦 : “マカクザル脳における加齢に伴うアミロイドβ蛋白の蓄積変化” 第 37 回日本神経科学大会 (2014.9.13) パシフィコ横浜, 横浜
 17. 井上謙一, 木村 活生, 安河内 竜二, 菅原 直也, 小笠原 宇弥, 奥田 泰弘, 藤原 真紀, 高田昌彦 : “AAV ベクターによる霊長類新生児への全脳的遺伝子導入” 第 37 回日本神経科学大会 (2014.9.12) パシフィコ横浜, 横浜
 18. 澤田真寛, 吉野 - 斎藤 紀美香, 二宮太平, 大石高生, 山下俊英, 高田昌彦, 尾上浩隆, 西村幸男, 伊佐正 : “脊髄損傷からの回復過程における皮質脊髄路の再編” 第 37 回日本神経科学大会 (2014.9.12) パシフィコ横浜, 横浜
 19. 川合隆嗣, 山田洋, 佐藤暢哉, 高田昌彦, 松本正幸 : “報酬履歴と行動切替に関わる外側手綱核と前部帯状皮質の異なる神経表現” 第 37 回日本神経科学大会 (2014.9.11) パシフィコ横浜, 横浜
 20. 金子将也, 畑中伸彦, 高良沙幸, 高田昌彦, 南部篤 : “運動課題遂行中のサルにおける淡蒼球ニューロン活動のグルタミン酸および GABA 作動性調節” 第 37 回日本神経科学大会 (2014.9.11) パシフィコ横浜, 横浜
 21. 中川浩, 二宮太平, 高田昌彦, 山下俊英 : “サル脊髄損傷後の運動機能回復と神経再生における RGM の役割” 第 37 回日本神経科学大会 (2014.9.11) パシフィコ横浜, 横浜
 22. 高田昌彦 : “霊長類モデルを用いた今後の研究展開” ワークショップ「システム神経科学の将来展望」(2014.8.30) 館山寺温泉・ホテル鞠水亭, 浜松
 23. 高田昌彦 : “パーキンソン病モデルサルにおける大脳皮質 - 大脳基底核経路の情報伝達異常” 第 39 回日本大脳基底核研究会 (2014.8.23) 青森国際ホテル, 青森
 24. 高田昌彦 : “黒質ドーパミン神経細胞への外来遺伝子導入によるパーキンソン病の予防的治療戦略” 第 10 回横浜パーキンソン病治療研究会 (2014.7.16) 崎陽軒本店 5 階マンダリンイースト, 横浜

25. 中川浩, 二宮太平, 高田昌彦, 山下俊英 : “手指屈筋由来の運動ニューロン分布とサル脊髄損傷後の手指機能回復について” 第 49 回日本理学療法学会 (2014.5.30-6.1)パシフィコ横浜, 横浜
26. Takada M, Inoue K : “Novel primate models for Parkinson’s disease due to nigrostriatal pathway-selective gene manipulation.” New Frontier of Molecular Neuropathology 2014 (2014.3.17) 東京医科歯科大学, 東京
27. 高田昌彦 : “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) 自然科学研究機構, 岡崎
28. 高田昌彦 : “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) 自然科学研究機構, 岡崎
29. 高田昌彦, Kevin McCairn : “Decoding tourettism and its response to deep brain stimulation.” 京都大学 プリストル大学シンポジウム (2014.1.9) 京都大学医学部, 京都
30. 高田昌彦 : “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)フクラシア東京ステーション, 東京
31. 高田昌彦 : “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)フクラシア東京ステーション, 東京
32. 高田昌彦 : “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)リファレンス駅東ビル, 福岡
33. Kimura K, Inoue K, Tanaka F, Takada M : “Age-dependent alterations in the distribution of neurons expressing alpha-synuclein in macaque monkeys.” Neuroscience 2013 (2013.11.9-13) San Diego, USA
34. Kawai T, Sato N, Takada M, Matsumoto M : “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
35. Hatanaka N, Miyachi S, Nambu A, Takada M : “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
36. 大石高生, 今井啓雄, 平井啓久, 高田昌彦 : “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)自然科学研究機構, 岡崎
37. 中川浩, 二宮太平, 高田昌彦, 山下俊英 : “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)国立京都国際会館, 京都
38. 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 : “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入力様式” 第 36 回日本神経科学大会 (2013.6.20-23)国立京都国際会館, 京都
39. 木村活生, 井上謙一, 黒田呈子, 田中章景, 高田昌彦 : “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)国立京都国際会館, 京都
40. 川合隆嗣, 佐藤暢哉, 高田昌彦, 松本正幸 : “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)国立京都国際会館, 京都
41. 井上謙一, 藤原真紀, 奥田泰宏, 高田昌彦 : “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)国立京都国際会館, 京都
42. 高田昌彦 : “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)つくば国際会議場, 茨城

〔図書〕(計 7 件)

- 井上謙一, 高田昌彦(2014)ウイルスベクターを用いた神経回路への機能介入法. Clinical Neuroscience「メインテーマ 脳のゆらぎ・同期・オシレーション」, 中外医学社, 32:757-761.
- 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.
- 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」, 医学書院, 65:635-642.
- 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」, 日本生物学的精神医学会, 24:57-61.

5. 高田昌彦(2013) 14 視床, 16 大脳基底核. リッピンコット シリーズ イラストレイテッド 神経科学(白尾智明 監訳), 丸善出版.
6. Kato S, Kobayashi K, Inoue K, Takada M, Kobayashi K (2013) Vectors for highly efficient and neuron-specific retrograde gene transfer for gene therapy of neurological diseases. In: Gene Therapy – Tools and Potential Applications (Molina FM, ed), InTech: Rijeka (Croatia), pp 387-398.
7. 高田昌彦(2013)大脳基底核. Clinical Neuroscience 「メインテーマ 視床:単なる中継核ではない」, 中外医学社, 31:76-79.

〔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

http://www.pri.kyoto-u.ac.jp/sections/systems_neuroscience/index.html

6. 研究組織

○研究代表者

高田 昌彦 (TAKADA, Masahiko)

京都大学・霊長類研究所・教授

研究者番号: 00236233