

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430048

研究課題名(和文) 霊長類の大脳皮質間回路操作技術の開発とその応用

研究課題名(英文) Investigation of functional interaction between multiple brain sites to regulate a higher brain function in macaque monkeys by using a gene-manipulation technique

研究代表者

肥後 剛康 (Higo, Takayasu)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：10396757

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトを含む霊長類の高次脳機能は、高度に発達した大脳皮質の領野間の相互作用によって制御されると考えられています。しかし、検証技術である神経回路操作技術が未開発なため、研究は国際的に停滞しています。本研究では、霊長類で発達した高次脳機能である「注意」に着目し、その制御メカニズム解明を目指しました。現在、申請者は、サル背外側前頭前野と図形情報の記憶保持に特化した側頭葉下側間の神経回路において、回路選択的に遺伝子発現を操作する技術の開発に成功しており、今後は、この技術を注意評価課題を訓練したサルへ導入し、電気生理学的、行動学的解析を駆逐することで、作業記憶制御の神経回路と神経活動の同定を行います。

研究成果の概要(英文)：It has been suggested that the higher brain functions in primates including human are regulated by highly developed cerebral cortex. A large number of researches using primates have actively investigated to clarify the functions of anatomical connections between areas. However, the underlying circuit mechanisms of the higher functions remain elusive, because of the difficulties to generate a method of selectively manipulating the interaction between brain sites. In this research project, we mainly focused on a functional interaction between prefrontal cortex and inferior temporal cortex to regulate attention, and in order to identify circuits and neural activities, we were able to develop a technique to projection-specifically manipulate a gene between two areas, and will apply this to trained monkeys to projection-specifically block a brain function, attention, and then analyze them by behavior and electrophysiological studies.

研究分野：認知神経科学、分子生物学

キーワード：霊長類 高次脳機能

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含む霊長類は、高度な「思考」や「注意」といった高次脳機能を有することで、複雑な環境や社会への対応や生存が可能となる。高次脳機能は、広範な脳領域の中でも特に**前頭前野**によって制御されるが、過去の研究より、**前頭前野単独では無く他の脳部位との間に形成する神経結合(神経回路)が重要**であり、前頭前野(トップ)が他の脳領域(側頭葉や後頭葉など(ボトム))の神経活動を制御するトップダウン制御が提唱されている(図1)(Higo et al., PNAS, 2011, Corbetta and Shulman, Nature Rev. Neurosci. 2002, 他多数)。例えば、「**注意**」は、前頭前野が視覚情報を記憶保持する側頭葉を活性化することで、適切な視覚情報のみを選択想起し、適切な状況判断や行動に結びつける。しかしながら、**前頭前野は複数の下流脳領域へ複雑な神経投射を伸ばしているため、特定の神経投射の意味を検証することが極めて困難**であり、どのような経路(神経回路)によってトップダウン制御が実現されているか未だ明らかとなっていない。

この問題の解決には、**特定の神経回路の遮断法の確立が有効**と考えられる。申請者はこの試みをサルにおいて行う。その理由として、サルは、ヒトと同じ霊長目に属し、ヒト脳との機能的相関性が高く、大脳に対する前頭前野の比率も高いこと(ヒト30%、サル15%、イヌ7%、ネコ3%)、更にヒトに比べ、侵襲実験が容易である点が挙げられる。最近、マカクザル脊髄ニューロンにおいて、ウイルスベクターを用いた神経回路遮断法が報告されているが(Kinoshita et al., Nature, 2012)、長距離である大脳皮質間の神経回路操作技術の成功例は未だ報告が無い。申請者は、この実現には、(1)**神経結合の阻害**を(2)**投射特異的**かつ(3)**可逆的**かつ(4)**長期的**に行う必要があると考えており、各要素実現のための条件検討を進めており、以下の結果を得ている。

(1, 阻害) 神経回路は複数の神経細胞が結合したものであり、その結合の場であるシナプスでの情報伝達を阻害することが有効と考えられる。プレシナプスでの情報伝達物質放出に必須な SNARE タンパク質 VAMP-2 と syntaxin-1A を切断・不活性化する TeNT (テタヌトキシン) と BoNT (ボツリヌストキシン) を候補タンパク質として

生化学実験により選定している。

(2, 投射特異的) 最上流である前頭前野のシナプス連絡を阻害した場合、複数の経路を通じて複数の下流脳領域を不活性化してしまうため、一旦下流から上流へ上らせた後、来た経路を特異的に不活性化させる戦略を採用する。**逆行性神経トレーサーとして神経科学研究において長年使用されるコレラトキシンBサブユニット(CTB、分子量約10kDa)が高効率で当該領域間を逆行的輸送されることを解剖学的解析によって確認した。**

(3, 可逆的) サルは、使用頭数が限られており、遺伝的背景が全てことなるため、同一個体内での比較検討が望まれる。Dox 投与/非投与によって遺伝子発現を on/off する **Tet-on システム** が再現良くワークすることを免疫組織化学実験で確認している。(4, 長期) 長期に渡って安定した行動・電気生理実験を行うため、最低でも数週間は Tet-On システムをワークさせる必要がある。様々なウイルスベクターを検討した結果、**アデノ随伴ウイルスベクター(AAV)タイプ1型、5型、6型および1型から9型の混合型が神経細胞へ高い感染・遺伝子発現効率を長期(2~3ヶ月)に渡って示すことを蛍光タンパク質 GFP を用いた実験で確認した。**また神経細胞への毒性の点という点からも AAV は他のウイルスベクターに比べ、優れていることを確認している。

本研究では、上記の4要素を有機的に組み合わせた神経回路阻害法をサルにおいて確立し、霊長類に特徴的な「注意」を制御する神経回路の同定を試みる

2. 研究の目的

霊長類に特徴的な高度な思考や行動は、前頭前野が神経回路を介して他の脳領域を活性/不活性化することで制御されると考えられている。しかしながら、霊長類における神経回路の複雑さ故、その理解は進んでおらず、神経回路を特異的に阻害するシステムの開発が待たれている。本研究では、**サルの大脳皮質間神経回路をターゲットとし、投射特異的、可逆的、長期的に阻害する技術を開発、運用することで、霊長類高次脳機能を制御する神経回路を明らかにする。**

3. 研究の方法

マカクザルの高次脳機能を制御する前頭前野を起点とした神経回路の同定を行うため、神経回路操作技術の開発を行う。

まずは、(1)**神経結合の阻害**(2)**投射特異的**(3)**可逆的**(4)**長期**、の各条件を統合し、その有効性をマカクザル脳で検証する。

申請者は、以下の通り各条件を実現する材料の絞り込みをほぼ終了している。

- (1) TeNT または BoNT
- (2) CTB
- (3) Tet-on システム
- (4) AAV 1 型と 5 型

前頭前野と側頭葉 TE 野にインジェクションする AAV には、TRE3G (TeT3G 応答配列)-eTeNT、CTB-TeT3G(テトラサイクリン制御性トランス活性化因子の最新改良型)をそれぞれをコードした発現ベクターを搭載する。原理としては、AAV 感染した側頭葉 TE 野において CTB-TeT3G タンパク質が合成され、逆行輸送先 (前頭前野)において TRE3G に結合、Dox 存在下において、TRE3G の下流遺伝子 TeNT の発現を誘導する。TeNT(または BoNT)は軸索終末まで運ばれ、VAMP-2 (または syntaxin-1A)を切断するため、シナプス情報伝達物質放出が阻害され、CTB-TeT3G タンパク質が逆行輸送した回路が特異的に不活性化される。Dox 経口投与 7 日～10 日後にマカクザルをかん流固定し、免疫組織化学解析によって逆行性輸送された CTB-T3G と Tet-On によって誘導された eTeNT の発現を調べる。どちらかまたは両方の発現が低い場合、AAV の血型の組み合わせを変える、または搭載ベクターのプロモーターやリンカー等 (核移行シグナルを含む)を変え、最適な組み合わせを見出す。現在 200 種以上の発現ベクターを作製しており臨機応変に対応可能な体制が整っている。

行動課題の開発、サルの訓練

免疫組織化学解析によって Tet-On システム構築が確認された後、マカクザルの行動課題の訓練を開始する。行動課題は、サルに複数の刺激の中から標的刺激の発見を要求する探索課題を用いる。視覚刺激は、人工的なフラクタル図形を用いる。訓練期間は、6 ヶ月から 1 年を想定している。現在、2 頭のマカクザルを用いて探索課題の開発をほぼ終了している。

行動記録

新たなサル

電気生理学的解析

行動解析終了後、サル

と)において、多点電極を用いて多くの層からの局所場電位(LFP)や単一細胞同時記録を行い、単シナプスのな投射への影響を調べる。LFP に関しては、周波数帯域の同期性にも着目し解析を行い、神経細胞の時空間的ダイナミクスと行動の連関を検証し、高次脳機能の時空間的制御のモデルを考案する。

免疫組織化学解析

行動解析、電気生理学解析終了後、再度 Dox を経口投与し、固定したサル

4 . 研究成果

一般に、げっ歯類やマカクザル脊髄(Kinoshita et al., Nature, 2012)における、回路遮断の技術開発は、神経回路上位に逆行性アデノ随伴ウイルスベクター、下位に逆行性レンチウイルスベクターを注入し、2重感染した上位においてシナプス伝達阻害タンパク質テタヌストキシンを誘導する戦略を用いる。しかし、レンチウイルスベクターは霊長類大脳皮質では低い逆行性輸送と高い細胞毒性のため、効果的に機能しないことが知られている。申請者は、その代替として、高い逆行性輸送能を有する神経トレーサー、**コレラトキシン B サブユニット (CTB)に着目し**、CTB と融合した rtTA を低毒性の AAV によって大量に発現誘導させ、高効率で逆行輸送させる Tet-On システムの開発に成功した。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
肥後 剛康 (HIGO Takayasu)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合
研究センター・研究員

研究者番号：10396757

(2)研究分担者
なし
()

研究者番号：

(3)連携研究者
なし
()

研究者番号：

(4)研究協力者
なし
()