

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02454

研究課題名(和文) 先端的神経ネットワーク解析による霊長類大脳眼球運動制御システムの構造と機能の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the structure and function of the primate cerebral oculomotor control system by means of cutting-edge neural network analyses

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) 33,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、行動の発現と制御における大脳皮質-大脳基底核連関の基本的フレームワークを解明するため、狂犬病ウイルスベクターを用いた入出力解析、多領域多点同時記録によるネットワークダイナミクス解析、多様なウイルスベクターシステムによる神経路選択的活動操作などの先端的神経ネットワーク解析技術を駆使し、霊長類において眼球運動制御を実現する大脳ネットワークの構築と情報処理機構に関する包括的研究を遂行した。その結果、マカクザルを用いて、眼球運動関連皮質領野への多シナプス性入力様式および眼球運動関連ネットワークダイナミクスを解析するとともに、神経路選択的な光遺伝学的・化学遺伝学的活動操作手法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、狂犬病ウイルスベクターを利用した入出力トレーシング、神経ネットワークを構成する異なる部位からの多領域多点同時記録、神経路選択的活動操作を組み合わせ、複雑なネットワークをコンポーネント毎に分離、解析するとともに、ネットワーク全体の機能的意義を検証できるという点で極めて画期的かつ重要である。また、眼球運動は学習・認知機能などヒトを含む霊長類で特に発達した高次機能が関与し、多くの精神疾患においてその障害が特徴的に認められるため、関係する神経ネットワークの動作原理を解明する意義は極めて大きい。

研究成果の概要(英文)：The present research project aims at elucidating the fundamental framework of the cortico-basal ganglia link that is involved in the execution and control of behavioral actions. To this end, we employed a wide variety of cutting-edge techniques, including input-output analyses with rabies viral vectors, network dynamics analyses through multiple (multi-area and multi-site) simultaneous activity recordings, and pathway-selective activity manipulation by means of diverse viral vector systems, and then performed comprehensive research plans for investigating the architecture and information processing mechanism of neural networks achieving oculomotor control in primates. Consequently, we not only have analyzed the distribution patterns of multisynaptic inputs to the oculomotor-related cortical areas in macaque monkeys and the dynamics of the oculomotor-related neural networks, but also have established optogenetic/chemogenetic methods for pathway-selective activity manipulation.

研究分野：神経科学

キーワード：大脳皮質 前頭葉 大脳基底核 線条体 黒質 眼球運動制御 ウイルスベクター 霊長類

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

複雑かつ精緻なネットワークからなる脳は、外界からの感覚情報を取得するとともに記憶、感情などの内的状態を参照し、さまざまな状況に応じて適切な行動を選択、生成する。大脳基底核は大脳皮質と協調して働き、行動の発現と制御に重要な役割を果たすことが示唆されているが、この大脳皮質-大脳基底核連関は、筋骨格系の制御に関与するだけでなく、認知、情動などの高次機能にも関連が深いことが明らかになっており、近年ではうつ病、統合失調症など多くの精神疾患との関係が注目されている。これら多様な機能とその破綻(病態)をもたらすメカニズムを理解するためには、ヒトに近縁のサルにおいて、大脳皮質と大脳基底核を巡る神経ネットワークの構築様式、およびその活動ダイナミクスと機能的役割を明らかにする統合的な解析が必須である。例えば、代表的な眼球運動であるサッカードでは、関与する皮質領野である前頭眼野、補足眼野、外側頭頂間野は、それぞれ大脳基底核と線条体(特に尾状核)に inputs、黒質網様部から出力し、視床を介して皮質領野に戻るループ回路を形成することにより、状況に応じた運動パターンがプログラムされ、最終的に中脳の上丘から脳幹のサッカードジェネレータに inputs する信号に基づいて運動が実行される。上記の眼球運動関連皮質領野が上丘に連絡する際、直接 inputs する神経路と大脳基底核(線条体から黒質網様部)を経由して inputs する神経路の独立したネットワーク構造を呈することが知られている。上丘に連絡するこれら2つの神経路はそれぞれ異なる機能に関係すると考えられてきたが、眼球運動関連皮質領野や黒質網様部は広範な脳部位と結合し多様な機能を有するため、実際に上丘にどのような信号が伝達され、どのような役割を担っているかについて未だ不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

本研究では、サルの眼球運動を制御する大脳皮質-大脳基底核連関の基本的フレームワークを、独自に開発した狂犬病ウイルスベクターを用いた入出力解析や、近年導入した多領域多点同時記録法を用いた動態解析により解明することを目的とする。さらに、研究代表者らが世界に先駆けて霊長類で成功した、ウイルスベクターを用いた遺伝子操作による神経路選択的機能介入などの先端的研究手法を組み合わせることにより、個別のネットワークのダイナミクスとそれに基づく行動発現における役割を検証する。

具体的には、まず、独自に開発する超高発現型の順行性トレーサーベクターと逆行性越シナプスのトレーサーベクターを併用し、眼球運動関連皮質領野からの inputs を受ける線条体や上丘の部位とこれらの皮質領野に多シナプス性に inputs する視床、黒質網様部、線条体の部位を同時に可視化し、各ループ回路間における相違(トポグラフィ)と重複(オーバーラップ)のパターンを明らかにする。また、研究代表者らが近年開発した逆行性感染型レンチウイルスベクターと、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター+G 遺伝子欠損型(感染伝播能欠失型)狂犬病ウイルスベクターを組み合わせた特定の神経路からの単シナプス性トレーシングにより、上丘に inputs する眼球運動関連皮質領野や黒質網様部のニューロン群の入出力を同時に可視化し、特に他の皮質領野や線条体に着目してこれらのニューロン群に inputs する起始ニューロンの分布を詳細に解析する。このような先端的トレーシング手法により、大脳皮質、大脳基底核、上丘を繋ぐ眼球運動関連ネットワークの構築様式を細胞・回路レベルで明らかにする。

次に、外因性や内因性に注意を誘発する眼球運動課題をサルに訓練し、眼球運動関連皮質領野、大脳基底核(線条体、黒質網様部)、上丘、視床から課題遂行中の神経活動を同時に記録する。現在、技術的には8つの脳領域からの同時記録が可能であり、また、多点電極を用いることにより、層構造を持つ皮質領野や上丘では全層からの同時記録が可能になる。このような多領域多点同時記録により、眼球運動関連皮質領野間の機能的差異を明確にするとともに、層特異性を含めた広範な神経ネットワークのダイナミクスを詳細に解析し、眼球運動関連ネットワークの情報処理機構を明らかにする。

最後に、研究代表者らが最近、世界に先駆けて霊長類で確立した神経路選択的な活動操作法を応用し、個別の皮質領野や黒質網様部から上丘への神経路、個別の皮質領野から線条体への神経路などの機能に介入する。すなわち、上述した研究計画から得られた結果に基づいて、眼球運動関連ネットワークのダイナミクスにおけるこれらの神経路の位置付けや行動発現における役割を解明する。このような神経路選択的機能介入により、眼球運動関連ネットワーク上の各神経路の機能的意義を因果的に検証し、ネットワーク全体の動作原理の理解を目指す。

### 3. 研究の方法

本研究では、以下の解剖・生理・介入からなる神経ネットワーク解析手法を駆使し、マカクザル(ニホンザルやアカゲザル)の眼球運動関連ネットワークの構築様式、情報処理機構、および動作原理の解明を目指す。

具体的には、研究代表者らがすでに開発済みである高発現型狂犬病ウイルスベクターを用いた逆行性越シナプスのトレーシングと超高発現型ウイルスベクターを用いた順行性単シナプスのトレーシングを同一個体に適用し、大脳皮質-大脳基底核ループ回路の構造を解析する、

研究代表者らが近年確立した逆行性感染型レンチウイルスベクターと AAV ベクターの共感染系およびテトラサイクリン誘導性発現制御系を組み合わせた神経路選択的な遺伝子発現制御による特定ニューロンの軸索投射解析と、感染伝播能欠失型狂犬病ウイルスベクターの単シナプス的感染伝播を利用した特定ニューロンへの入力解析を同一個体で実現し、特定の神経路を構成するニューロン群の入出力様式を探究する、という2つの機能解剖学的手法に加えて、研究代表者らがすでに導入済みである多領域多点同時記録法を用いて、眼球運動課題遂行中のマカザルの眼球運動関連皮質領野(前頭眼野、補足眼野、外側頭頂間野)、大脳基底核(線条体、黒質網様部)、上丘、視床から同時記録をおこない、眼球運動関連ネットワークのダイナミクスを解析するとともに、研究代表者らが最近確立した霊長類における神経路選択的な活動操作法を用いて、個別の皮質領野や黒質網様部から上丘への神経路、個別の皮質領野から線条体への神経路などに対する機能介入をおこない、行動学および電気生理学的変化を解析する。

平成 28 年度から平成 30 年度の3 年において、以下の3つの研究計画を遂行した:(1) 狂犬病ウイルスベクターを用いた眼球運動関連皮質領野の投射様式と多シナプス性入力様式の解析;(2) 多領域多点同時記録による眼球運動関連ネットワークダイナミクスの解析;(3) 神経路選択的な光遺伝学的抑制法や化学遺伝学的抑制法の確立。

#### 4. 研究成果

(1) 狂犬病ウイルスベクターを用いた眼球運動関連皮質領野の投射様式と多シナプス性入力様式の解析については、高発現型 multi-color 狂犬病ウイルスベクターによる逆行性越シナプス的多重トレーシングに関する最初の原著論文である「大脳基底核から運動前野背側部および腹側部への多シナプス性入力様式」の投稿準備を進めるとともに、前頭眼野、補足眼野、頭頂間溝外側部を対象にした実験計画を遂行する準備を進めている。

(2) 多領域多点同時記録による眼球運動関連ネットワークダイナミクスの解析については、眼球運動課題を遂行中のサルにおいて、前頭眼野、大脳基底核、上丘から神経活動の同時記録をおこない、現在、得られた実験データの解析を進めている。また、本研究計画に関連して、新規ウイルスベクター(以下の研究計画3を参照)を開発した。

(3) 神経路選択的な光遺伝学的抑制法や化学遺伝学的抑制法の確立については、高発現型の新規アデノ随伴ウイルスベクターを開発し、それを基盤にして光遺伝学的あるいは化学遺伝学的な活動操作を実現する研究手法の確立を目指した開発研究を進めている。具体的には、当該ベクターにオプシン遺伝子や DREADD レセプター分子を挿入した新規ウイルスベクターシステムを用いて、神経線維の光・薬剤刺激による神経路選択的な活動制御をおこなった。また、ニューロン種特異的のプロモータやゲノム編集技術を利用して、ターゲットニューロン種に選択的な遺伝子操作手法の確立を進めている。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 15 件)

Kawai T, Yamada H, Sato N, Takada M, Matsumoto M (2019) Preferential representation of past outcome information and future choice behavior by putative inhibitory interneurons rather than putative pyramidal neurons in the primate dorsal anterior cingulate cortex. *Cereb Cortex*, in press. 査読有

DOI: 10.1093/cercor/bhy103

Tanabe S, Uezono S, Tsuge H, Fujiwara M, Miwa M, Kato S, Nakamura K, Kobayashi K, Inoue K, Takada M (2019) A note on retrograde gene transfer efficiency and inflammatory response of lentiviral vectors pseudotyped with FuG-E vs. FuG-B2 glycoproteins. *Sci Rep* 9:3567. 査読有

DOI: 10.1038/s41598-019-39535-1

Inoue K, Miyachi S, Nishi K, Okado H, Nagai Y, Minamimoto T, Nambu A, Takada M (2019) Recruitment of calbindin into nigral dopamine neurons protects against MPTP-induced parkinsonism. *Movement Disorders* 34:200-209. 査読有

DOI: 10.1002/mds.107

Nakagawa H, Ninomiya T, Yamashita T, Takada M (2019) Treatment with the neutralizing

antibody against repulsive guidance molecule-a promotes recovery from impaired manual dexterity in a primate model of spinal cord injury. *Cereb Cortex* 29:561-572.

査読有

DOI: 10.1093/cercor/bhx338

Kato S, Sugawara M, Kobayashi K, Kimura K, Inoue K, Takada M, Kobayashi K (2019) Enhancement of the transduction efficiency of a lentiviral vector for neuron-specific retrograde gene delivery through the point mutation of fusion glycoprotein type E. *J Neurosci Methods* 311:147-155. 査読有

DOI: 10.1016/j.jneumeth.2018.10.023

Ogasawara T, Nejime M, Takada M, Matsumoto M (2018) Primate nigrostriatal dopamine system regulates saccadic response inhibition. *Neuron* 100:1513-1526. 査読有

DOI: 10.1016/j.neuron.2018.10.025

Ishida H, Inoue K, Takada M (2018) Multisynaptic projections from the amygdala to the ventral premotor cortex in macaque monkeys: Anatomical substrate for feeding behaviour. *Front Neuroanat* 12:3. 査読有

DOI: 10.3389/fnana.2018.00003

Ichinose H, Inoue K, Arakawa S, Watanabe Y, Kurosaki H, Koshiba S, Hustad E, Takada M, Aasly JO (2017) Alterations in the reduced pteridine contents in the cerebrospinal fluids of LRRK2 mutation carriers and patients with Parkinson's disease. *J Neural Transm* 125:45-52. 査読有

DOI: 10.1007/s00702-017-1784-x

Oh Y-M, Karube F, Takahashi S, Kobayashi K, Takada M, Uchigashima M, Watanabe M, Nishizawa K, Kobayashi K, Fujiyama F (2017) Using a novel PV-Cre rat model to characterize pallidonigral cells and their terminations. *Brain Struct Funct* 222:2359-2378. 査読有

DOI: 10.1007/s00429-016-1346-2

Seiriki K, Kasai A, Hashimoto T, Schulze W, Niu M, Yamaguchi S, Nakazawa T, Inoue K, Uezono S, Takada M, Naka Y, Igarashi H, Tanuma M, Wascheck JA, Ago Y, Tanaka KF, Hayata-Takano A, Nagayasu K, Shintani N, Hashimoto R, Kunii Y, Hino M, Matsumoto J, Yabe H, Nagai T, Fujita K, Matsuda T, Takuma K, Baba A, Hashimoto H (2017) High-speed and scalable whole-brain imaging in rodents and primates. *Neuron* 94:1085-1100. 査読有

DOI: 10.1016/j.neuron.2017.05.017

Tanabe S, Inoue K, Tsuge H, Uezono S, Nagaya K, Fujiwara M, Kato S, Kobayashi K, Takada M (2017) The use of an optimized chimeric envelope glycoprotein enhances the efficiency of retrograde gene transfer of a pseudotyped lentiviral vector in the primate brain. *Neurosci Res* 120:45-52. 査読有

DOI: 10.1016/j.neures.2017.02.007

Saga Y, Nakayama Y, Inoue K, Yamagata T, Hashimoto M, Tremblay L, Takada M, Hoshi E (2017) Visuomotor signals for reaching movements in the rostro-dorsal sector of the monkey thalamic reticular nucleus. *Eur J Neurosci* 45:1186-1199. 査読有

DOI: 10.1111/ejn.13421

Nagai Y, Kikuchi E, Lerchner W, Inoue K, Ji B, Eldridge MAG, Kaneko H, Kimura Y, Oh-Nishi A, Hori Y, Kato Y, Hirabayashi T, Fujimoto A, Kumata K, Zhang M-R, Aoki I, Sahara T, Higuchi M, Takada M, Richmond BJ, Minamimoto T (2016) PET imaging-guided chemogenetic silencing reveals a critical role of primate rostromedial caudate in reward evaluation. *Nat Commun* 7:13605. 査読有

DOI: 10.1038/ncomms13605

Kimura K, Inoue K, Kuroiwa Y, Tanaka F, Takada M (2016) Propagated but topologically distributed forebrain neurons expressing alpha-synuclein in aged macaques. *PLoS ONE* 11:e0166861. 査読有

DOI: 10.1371/journal.pone.0166861

Ishida H, Inoue K, Takada M, Hoshi E (2016) Origins of multisynaptic projections from the basal ganglia to the forelimb region of the ventral premotor cortex in macaque monkeys. *Eur J Neurosci* 43:258-269. 査読有

DOI: 10.1111/ejn.13127

〔学会発表〕(計 83 件)

Kimura K, Tanabe S, Fujiwara M, Nakano M, Nagai Y, Minamimoto T, Inoue K, Takada M (2018) Neuron-specific efficient gene transduction in the primate brain with modified AAV vectors. 第 41 回日本神経科学大会

Inoue K, Fujiwara M, Uezono S, Tanabe S, Ishida H, Hoshi E, Takada M (2017) Arrangement of multisynaptic inputs from the basal ganglia to the dorsal and ventral premotor cortical areas in macaques: retrograde transneuronal double labeling with fluorescent rabies viral vectors. *Neuroscience* 2017

〔図書〕(計 10 件)

高田昌彦 (2019) パーキンソン病の発症・進行を抑える新たな治療法の開発. 歯界月報「生涯研修コード」, 810, 兵庫県歯科医師会

高田昌彦 (2018) 抗体治療による脊髄損傷からの機能回復. バイオインダストリー「BIO REVIEW」, 35:13-18, シーエムシー出版

Matsumoto M, Inoue K, Takada M (2018) Causal role of neural signals transmitted from the frontal eye field to the superior colliculus in saccade generation. *Front Neural Circuits* 12:69

Nakagawa H, Takada M (2018) Promoting functional recovery by inhibition of repulsive guidance molecule-a after spinal cord injury. *Neural Regen Res* 13:981-982

高田昌彦、井上謙一、松本正幸 (2018) 霊長類眼球運動制御. *Clinical Neuroscience* 「メインテーマ 光が拓く神経科学の未来 オプトジェネティクスと光イメージング」, 36:914-915, 中外医学社

Kobayashi K, Inoue K, Tanabe S, Kato S, Takada M, Kobayashi K (2017) Pseudotyped lentiviral vectors for retrograde gene delivery into target brain regions. *Front Neuroanat* 11:65

高田昌彦、永井裕司、井上謙一、南本敬史 (2017) 脳内のやる気スイッチを操作: 霊長類の生体脳における人工受容体の画像化. 医学のあゆみ「TOPICS」, 263:866-868, 医歯薬出版

高田昌彦、井上謙一、松本正幸（2017）光による霊長類脳機能制御：神経路選択的光操作技術「生体の科学」増大特集 細胞多様性解明に資する光技術 見て動かす」68:488-489, 医学書院

Kobayashi K, Kato S, Inoue K, Takada M, Kobayashi K (2016) Altering entry site preference of lentiviral vectors into neuronal cells by pseudotyping with envelope glycoproteins. In: Gene Therapy for Neurological Disorders: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol 1382 (Manfredsson FP, ed), pp 175-186. Springer: New York

高田昌彦、井上謙一、松本正幸（2016）霊長類の脳神経回路を光で操作．自動車技術「超の世界」, 70:106-107, (公社)自動車技術会

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕

京都大学霊長類研究所 統合脳システム分野 ホームページ

[http://www.pri.kyoto-u.ac.jp/sections/systems\\_neuroscience/index.html](http://www.pri.kyoto-u.ac.jp/sections/systems_neuroscience/index.html)

## 6．研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：松本 正幸

ローマ字氏名：( MATSUMOTO, masayuki )

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、研究者個人に帰属されます。