

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月11日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07036

研究課題名(和文) マーモセット前頭皮質におけるモジュール構造の研究

研究課題名(英文) Modular network of marmoset PFC connection

研究代表者

渡我部 昭哉 (Watakabe, Akiya)

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・研究員

研究者番号：40290910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：前頭前皮質は、霊長類においてよく発達した脳部位であり、その大幅な拡大と質的变化がヒトに特有の高度な認知機能を可能にした。今回の研究課題では、大脳皮質間のモジュラー結合が鍵だと考え、その実体を明らかにする研究を行った。研究方法としては、霊長類のモデル生物であるマーモセット脳にウイルストレーサーを注入し、連続2光子トモグラフィー法によって全脳イメージングを行い、さらに組織染色と組み合わせて複数部位の結合関係を調べた。その結果、8aD野では、対側からの投射と、同側帯状回からの投射が相補的であること、このようなモジュラー的な結合関係は、背側前頭前皮質の一般的な特徴であることが明らかになってきた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経科学の一大目標はヒトの脳とその疾患を理解することである。現在、神経科学研究はマウスを使った研究が圧倒的に進んでいるが、そこから得られた知見がどの程度ヒトにあてはまるのかは、実は未知数である。実際、マウスを使った創薬が失敗する例も多い。私の研究は、ある意味でマウスとヒトをつなぐことを目指している。ヒトの脳はもちろんサルとも違うが、マウスよりは明らかに共通性が多い。マウス-サル-ヒトと、進化的な考察を加えることで、共通のルールと種を分けた違いを明らかにすれば、ヒト脳に対する理解はより深まる。

研究成果の概要(英文)：Prefrontal cortex (PFC) is a brain region that developed well in primate lineages. Its expansion and qualitative changes enabled high cognitive functions of humans. The specific aim of this research is to clarify the modular connectivity of the corticocortical network, which I think is the key to understand PFC. Marmoset monkey was chosen as a model primate for neuroanatomical studies using viral tracers and serial two photon tomography, which achieved efficient whole brain imaging. Combined with histological techniques, the connective properties of remote areas are being explored. For example, area 8aD receives inputs from the contralateral PFC and ipsilateral cingulate area, but those inputs are separated as columnar modules. Such modular connectivity is considered to be a general property of PFC.

研究分野：分子神経解剖学

キーワード：トレーサー AAV マーモセット 大脳皮質 神経ネットワーク コネクトーム

1．研究開始当初の背景

一般的に霊長類は、他の種に比べよく発達した前頭皮質を有している。サルとヒトの前頭皮質を比べた場合、サイズについては大きな違いが存在するが、細胞の配置（細胞構築）や、マクロな結合関係、機能などの点で2者間の相同性は高い。一方、ネズミの「前頭皮質」は、霊長類の前頭皮質とは大きく違う。例えば、霊長類の前頭皮質には、顆粒層を持ったいわゆる背外側前頭前野 (dorsolateral prefrontal cortex) が存在するが、ネズミには存在しない。サルに見られる前頭皮質内外の、非常に複雑な相互結合もネズミには存在しない。霊長類は、皮質のサイズを拡大させただけでなく、独自の神経構築を進化させたのである。にもかかわらず、研究開始当初から現在に至るまで、アメリカにおける「Brain Initiative」に代表される大規模な脳研究プロジェクトは、さまざまなツールやインフラの整ったマウスやヒトの研究に大きく偏っており、間をつなぐような霊長類研究の必要性はますます増大している。

2．研究の目的

上述したとおり、前頭前皮質は、霊長類においてよく発達した脳部位である。その大幅な拡大と質的变化がヒトに特有の高度な認知機能を可能にしたと言っても過言ではなく、その実体を理解することで、ネズミからヒトまでの前頭前皮質の機能的な構造を包括的に理解するのが本研究の目的である。具体的には、最新のウイルストレーサー技術や、イメージング技術を駆使して、霊長類前頭前皮質が、他の大脳皮質や、皮質下構造との間に形成する複雑な結合ネットワークの詳細を調べ、その根底にあるネットワーク形成のルールを明らかにする。特に、今回の研究課題では、皮質間のモジュラー結合のメゾスコピックな解析を重点的に行う。

3．研究の方法

「霊長類前頭皮質」の原理を理解するためには、より単純でしわの少ない脳の方が有利だと考え、南米原産の小型(300～500g)のサルであるマーモセットを対象に前頭皮質の神経結合関係を調べる。アデノ随伴ウイルスベクター(AAV)トレーサーをマーモセットのさまざまな前頭皮質領野に注入し、その投射パターンを、連続2光子トモグラフィー(Ragan et al. 2012)という手法で精細に3Dイメージングする。同時に無蛍光のトレーサーであるBDAや、抗体染色可能なsmFPの発現ベクターを併用することで、隣接している局所構造の解析を行う。また、creやTETシステムを、2ないし3種類の逆行性ベクターと順行性ベクターに分割し、経路特異的に特定の投射ニューロン選択的に導入する2点感染系を確立し、投射元と投射パターンの関係を詳細に解析する。連続2光子トモグラフィーに加え、脳透明化技術も併用して、ニューロンレベル、アクソンレベルの解析も行う。

4．研究成果

本研究では、マーモセット前頭皮質のモジュール構造の解明を目的とする。手法としては、前頭皮質へのトレーサー注入と、網羅的画像解析をシステムティックに行うことで、違う個体のデータを統合的に理解する方法を目指すとともに、複数トレーサーを同一個体に注入する手法を組み合わせることを考えている。背外側前頭皮質である、46, 8aV, 8aD, 9, 8bなどの領野に加え、内側、眼窩前頭皮質に相当する、A32, A47などにもAAVトレーサーを注入し、2光子連続トモグラフィーによる網羅的画像取得を行った。同時に無蛍光のBDA (biotynilated dextran amine)を注入し、回収切片を組織染色することで、2重染色を行い、前頭皮質と、頭頂皮質、帯状回などとの相互結

合関係を詳しく調べた。興味深いことに、帯状回からの投射と、前頭皮質の対側投射は、同じ領域に投射しても、交差することなく、別々のカラムモジュールに入ることが確認できた。一方、同側の帯状回からの投射と、前頭皮質の同側投射は、同じカラムモジュールに入る場合があることも分かった。また、1層や、6層には、カラムモジュールを超えた拡散的な結合があることも分かった。つまり、皮質間の結合は、単純に領野間の結合として捉えるべきものではなく、カラム単位の集中的な結合に加え、領野を超えた拡散的な結合があり、その複合として捉えるべきである。この全貌を明らかにするには、さらに詳細な検討が必要である。また、最近開発された逆行性 AAV ベクターを使うことにより、経路特異的プロジェクションマッピングがマーマセットで可能になった。例えば、8aD 野において対側皮質投射ニューロン特異的なトレーサー導入を行なったところ、同側帯状皮質への投射が一部コラテラルとして存在すること、その場合、視床投射は見られないことなどを確認した。以上の成果の一部は、日本神経科学学会や、北米神経学会などで、口頭もしくはポスター発表した。今後、論文として取りまとめる予定である。

霊長類特異的な神経ネットワークを理解するためには、マウスにおけるネットワークの理解も重要であると考え、Allen Brain Institute の公開データベースを利用した研究も行なった。彼らのデータも我々と同様、2光子連続トモグラフィ法で取得されており、今後のデータ解析に有用である。この解析の結果、マウスにおいては、同側皮質間の結合は、白質ではなく、皮質を通過すること、大脳皮質間には、トポグラフィックな結合指向特性があること、階層的な結合があることなどを見出し、論文として発表した (Hirokawa and Watakabe 2018)。

前頭皮質ネットワークを理解する上で、前障(claustrum)と呼ばれる皮質下構造は重要な意味を持つと考えている。現時点では、本研究の主旨からは若干はずれるが、広義での前頭皮質研究の一端として、マーマセット Claustrum の分子発現解析を行い論文として発表した (Watakabe 2017)。さらに、Claustrum と Dorsal endopiriform nucleus について、Claustrum 研究学会のメンバーと協議を重ね、共同で解剖学的定義に関する提案を行い、論文として発表した (Smith et al. 2018)。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 3 件)

1: Smith JB, Alloway KD, Hof PR, Orman R, Reser DH, Watakabe A, Watson GDR. The relationship between the claustrum and endopiriform nucleus: A perspective towards consensus on cross-species homology. *J Comp Neurol*. 2018 Sep 17. doi: 10.1002/cne.24537. [Epub ahead of print] Review. PubMed PMID: 30225888; PubMed Central PMCID: PMC6421118. 査読あり 国際共著

2: Watakabe A, Hirokawa J. Cortical networks of the mouse brain elaborate within the gray matter. *Brain Struct Funct*. 2018 Nov;223(8):3633-3652. doi: 10.1007/s00429-018-1710-5. Epub 2018 Jul 9. PubMed PMID: 29987506. 査読あり

3: Watakabe A. In situ hybridization analyses of claustrum-enriched genes in marmosets. *J Comp Neurol*. 2017 Apr 15;525(6):1442-1458. doi: 10.1002/cne.24021. Epub 2016 May 6. PubMed PMID: 27098836. 査読あり

〔学会発表〕 (計 7 件)

Mapping prefrontal connectivity of the common marmosets

著者名/発表者名 Akiya Watakabe¹, Henrik Skibbe², Ken Nakae², Jian Wang¹, Masafumi Takaji¹, Alexander Woodward³, Junichi Hata^{4, 5}, Hideyuki Okano^{4, 5}, Yoko Yamaguchi³, Shin Ishii², Hiroaki Mizukami⁶, Tetsuo Yamamori¹

学会等名日本マーモセット学会

発表場所 東京 日本橋ライフサイエンスハブ

年月日 2019-2-6 ポスター発表

Prefrontal projection mapping of the marmoset

著者名/発表者名 Akiya Watakabe, Jian Wang, Masafumi Takaji, Hiroaki Mizukami, Alexander Woodward, Henrik Skibbe, Ken Nakae, Yoko Yamaguchi, Shin Ishii, Tetsuo Yamamori

学会等名日本神経科学大会

発表場所 神戸コンベンションセンタ

年月日 2018-7-25 ポスター発表

Prefrontal projection mapping of the marmoset

著者名/発表者名 Akiya Watakabe, Jian Wang, Masafumi Takaji, Hiroaki Mizukami, Alexander Woodward, Henrik Skibbe, Ken Nakae, Yoko Yamaguchi, Shin Ishii, Tetsuo Yamamori

学会等名北米神経学会

発表場所 San Diego (米国)

年月日 2018-11-5 口頭発表

Mapping connectivity of marmoset prefrontal cortex by serial two-photon tomography

著者名/発表者名 Akiya Watakabe¹, Jian Wang¹, Masafumi Takaji¹, Tetsuo Yamamori¹

学会等名日本マーモセット学会

発表場所 京都大学 芝蘭会館 稲盛ホール

年月日 2018-1-17 ポスター発表

著者名/発表者名 Akiya Watakabe, Jian Wang, Masafumi Takaji, Hiroaki Mizukami, Alexander Woodward, Takashi Kawase, Henrik Skibbe, Ken Nakae, Yoko Yamaguchi, Shin Ishii, Tetsuo Yamamori

学会等名北米神経学会

発表場所 Washington (米国)

年月日 2017-11-11 ポスター発表

Marmoset prefrontal projection mapping by serial two-photon tomography

著者名/発表者名 Akiya Watakabe, Jian Wang, Masafumi Takaji, Hiroaki Mizukami, Alexander Woodward, Takashi Kawase, Henrik Skibbe, Yoko Yamaguchi, Shin Ishii, Tetsuo Yamamori

学会等名日本マーモセット学会

発表場所 東京大学農学部弥生講堂 (東京都文京区)

年月日 2016-12-12 口頭発表

Mapping connectivity of marmoset prefrontal cortex by serial two-photon tomography

著者名/発表者名 Akiya Watanabe, Jian Wang, Masafumi Takaji, Hiroaki Mizukami, Alexander Woodward, Takashi Kawase, Henrik Skibbe, Ken Nakae, Yoko Yamaguchi, Shin Ishii, Tetsuo Yamamori

学会等名北米神経学会

発表場所 San Diego (米国)

年月日 2016-11-12 口頭発表

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者
研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

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。

