

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：72611

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16031

研究課題名（和文）発達期マーマセットにおけるニコチン摂取を制御する神経回路の脆弱性解明

研究課題名（英文）Unveiling vulnerability of the neural connectivity controlling nicotine intake in marmoset brain development

研究代表者

関 布美子（Seki, Fumiko）

公益財団法人実験動物中央研究所・ライブイメージングセンター・主任

研究者番号：40771407

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではニコチン摂取様の機能動態が予想できる手綱核-脚間核回路の神経活動を、薬理遺伝技術を用いて選択的に抑制させ、その結果生じる認知行動の変化と回路と連結する広域の脳活動の動態を認知行動評価とMRIから解明することを目的に、整備を行った。手綱核-脚間核回路の可視化に必要な高コントラスト、高解像度の画像を取得した。またマーマセットで全脳活動をMRIで評価するために、脳活動MRIの最適化を行った。加えて経時的な脳発達の評価を行い、脳体積の変化は想定していた24ヶ月より更に長期にわたって続くことが明らかにした。これらより脳発達に伴い変化する脳活動及び領域間結合性を評価可能となる基盤を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非ヒト霊長類である実験動物のマーマセットは、他霊長類と比べ発達期間が短くヒトの脳発達を理解する上で適したモデルの一つである。マーマセットとヒトと共通したMRIをモダリティとして使用出来ればスムーズな比較研究が可能となる。本研究ではマーマセットの脳発達を多面的に評価するための基盤を確立した。マーマセットの発達に伴う脳形態の変化はヒトと同様に成熟に達する年齢より長く変化することを見出した。また覚醒下における全脳活動を評価する方法を確立した。これらから子どもがより脆弱とされているニコチン依存について、脳発達の度合いがもたらす影響について評価するデータを整えた。

研究成果の概要（英文）：The project aimed to establish the method for evaluating brain activity associated with habenular nucleus - interpeduncular nucleus connection using MRI and cognitive assessment. If neural activity of habenular - interpeduncular nucleus connectivity is restrained by use of chemogenetic technology, its activity would be similar to the neural activity when we take nicotine.

The high resolution and high contrast MRI were acquired to visualize the connectivity between habenular nucleus and interpeduncular nucleus. Also, functional MRI was optimized to evaluate the activation at the whole brain level. In addition, longitudinal MRI was conducted to identify when the volume change due to development lasted. It was found that the volume decrease was continued after the age of 24 months, the timepoint of adulthood. Such base data would contribute to evaluate the brain activity changed associated with brain development or intervention.

研究分野：実験動物学

キーワード：マーマセット MRI 脳活動 発達 手綱核

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

子どもの喫煙は心身の健やかな発育を妨げ将来に強く影響する。実際に、子どものニコチン依存に対する脆弱性は顕著である。成年では依存まで喫煙後 5~10 年かかるのに対し、子どもは数週間~数か月でニコチン依存を形成することがある。子どもがニコチンに脆弱である神経基盤を解明することで、最適な喫煙防止策やニコチン依存治療につなげる研究ができ得る。子どもが急速にニコチン依存になり得る背景は大きく分けて 2 つある。1. 子どもはニコチンが刺激する報酬回路による快感を味わい易い、2. 高用量のニコチンに耐性がある、という点である。最近の研究からニコチンを摂取するとニコチン性アセチルコリン受容体を介して手綱核-脚間核回路を活性化させて嫌悪症状を生じさせ、ニコチン摂取量を制限させていることがわかっている (Fower et al., 2011, Nature)。一方でニコチンの神経毒性にも選択的に脆弱であり、この回路の活動が低下した際はニコチン摂取の抑制機能も低下する可能性がある (Lee et al., 2015, Physiology & Behavior, 138)。

子どもに顕著に認められる上記の症状は、神経変性等の理由から抑制機能が弱まった際に見られるニコチン消費量の増加、高用量への耐性といった症状と類似している。つまり子どもの脳は大人と比べ手綱核-脚間核回路機能の効果が低い可能性がある。子どもの脳は発達中のため、領域によって発達速度や変化パターンが異なり成熟・未成熟の領域が共存する。このアンバランスな状態でニコチンを摂取すると、この回路と連結するネットワークと脳領域の発達がまだ不十分であることから、神経毒による変性等から手綱核-脚間核回路の活動が抑制された際、脳全体が大人と異なる神経活動となる可能性を考えた。

### 2. 研究の目的

手綱核-脚間核回路の活動を抑制させた結果によって生じるニコチン様の症状と全脳活動の動態は脳発達度合いで差が認められるかを明らかにする。そのため、発達期から成体期へ変化した時、手綱核-脚間核、またこの回路に関する脳領域には、脳構造・脳活動には脳発達に依る変化があるかどうかを明らかにすることを目的に、小型の非ヒト霊長類であるコモンマーモセット (マーモセット) で経時的な MRI を実施・評価するための基盤整備を行った。脳の領域によって成熟度合いがどの程度違うのか、それはいつ安定するのか評価するため、経時的な MRI による脳領域の体積計測によって明らかにすることとした。また脳活動を評価するためには覚醒時撮影する必要がある。そのための固定具の開発、及び解析の確立を行った。

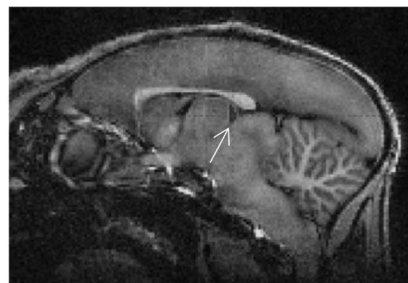
### 3. 研究の方法

脳成熟のニコチン作用影響を調べるため、本研究では脳内投与の検討をマウスで行い、また脳発達パターンと認知機能がよりヒトと類似しているマーモセットを適用した。マーモセットは他の霊長類と比べて発達期間が 2 年と早く、個体差の違いを排除した同一個体の発達前後で変化があるか評価できるのではないかと考えた。

定位座標で頭部のプレグマの位置と脳領域を同一画像で同定するため、MRI-CT の融合画像を構築するための撮像の最適化を行った。実験には実験動物中央研究所の MRI 装置 (Bruker 社、Biospec 70/16 scanner system)、及び CT 装置 (リガク社、Cosmo Scan Fx) を使用した。また、手綱核領域を MRI 画像から同定するため、生体のマーモセットを対象に経時的に撮影した T1 強調画像と MRI 用標準脳テンプレートにレジストレーションを行った。そこで取得したパラメータを元に MRI 標準脳アトラスに適用し手綱核を同定した。同様の処置を同一個体で経時的に 6 か月、12 か月、18 か月を対象に行った。

一方脳全体の脳活動を捉えるために、マーモセットにおける脳機能 MRI の最適化を行った。マーモセットの覚醒下における脳機能 MRI は確立されているが (Liu et al., 2011, Neuroimage)、実験動物中央研究所で使用している MRI への適用は仕様の違い等の理由から困難であった。そのため MRI の仕様左右されない脳機能 MRI が実施可能となり得る固定具の開発を行った。固定具はレジン製でマーモセットが入る 72mm 以下となるサイズを条件に作成された。固定具の開発に伴い既存の研究で報告されている動物の馴化トレーニング (Silva et al., 2011, Methods Mol. Biol.) の最適化を行った上で、実際に脳機能 MRI の撮影を行った。

また、マーモセットの脳発達評価も合わせて行った。これまでに、2.5 歳まで経時的な MRI を実施してきたが、領域によっては脳体積の変化が減少に転じた後体積の減少が続いていた。引き続き体積が減少するのか、一定の年齢で体積の減少が落ち着くのか調べるため、経時的な MRI を継続した。



T1強調画像における手綱核の同定

また脳内投与の検討においては、特定の脳領域において一定の確率で投与可能とするために、定位座標における脳領域への注入の検討をマウスにて行った。

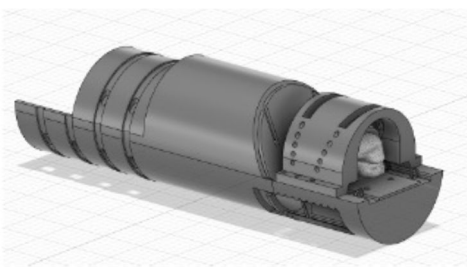
#### 4. 研究成果

生体マーモセットから所得した T1 強調画像からラベリング解析を行い手綱核の同定を行った。組織学的アトラスと解析した画像を矢状断で照らし合わせ、脳梁膨大部の下に手綱核をラベリングできていることを確認した。8 頭を対象に同様の処置を行ったが個体差が認められないことを確認した。また、6,12,18 か月齢を対象に同一個体を経時的に撮影した画像から手綱核の体積を抽出したところ、手綱核においては脳成熟にともなう顕著な体積変化は認められなかった。また、マウスを用いた検討では、特定領域に投与をする手技の確立のため、投与前後に MRI を撮影し、刺入部ができていることを確認した。

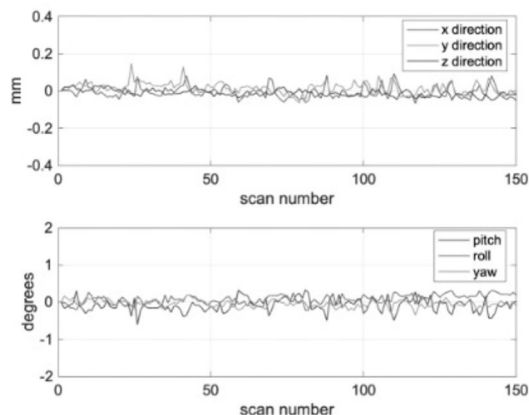
一方、覚醒下における脳機能 MRI 用のマーモセット固定具を開発し (図上)、全脳を対象とした脳活動を覚醒下で MRI 撮影することに成功した。頭部を撮影するには動物の動きを最小限にする必要がある (図中)。

動きを制限する固定具の構成を必要最低限に収めることによって、狭いボア内においても脳活動 MRI の実施が可能となった。この新規に開発した脳活動 MRI 固定具については特許申請を行った。解析に十分な信号雑音比を有した脳活動を取得するため、新たに脳活動 MRI 用の頭部固定具と受信コイルが統合された頭部ヘルメットを開発した。その受信コイルを適用し複数個体で安静時における脳活動 MRI を実施した。独立成分分析を行い安静時における脳活動のネットワークが評価できることを確認した。同一個体で麻酔下、覚醒下双方の脳活動 MRI を実施し、麻酔下と比較して強度な信号が認められるのを確認した (図下)。

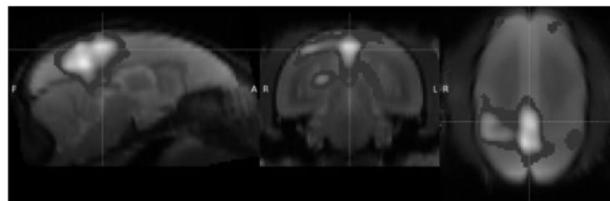
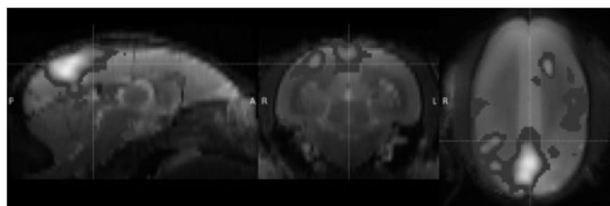
脳構造の MRI と同様に、脳活動 MRI においても経時的な撮影を 18 か月、24 か月齢を対象に行い、解析結果に再現性が認められることを確認した。脳体積を指標とした発達・加齢に伴う経時的な脳形態評価を 7 歳齢まで行った。手綱核と同様に大脳皮質の体積変化を調べた。脳発達による前頭前野や第一次視覚野の変化は 3 歳齢まで認められることが明らかになった。マーモセットの性成熟は 2 歳までには完了しているとされているが (Abbott & Barnett, 2003)、ヒトと同様に (Bethlehem et al., 2022)、脳形態の変化は成体になっても続いている可能性がある。このことから、ヒトの先行研究を元にマーモセットの脳発達による変化を推測する際は、24 か月齢よりも長期に評価する必要性が示唆された。脳形態、脳構造、脳活動 MRI から多面的にヒトの年齢に対応するマーモセットの月齢を対応させる必要がある。以上より本研究では手綱核-脚間核回路の変化がもたらす脳活動を経時的に評価するための基盤を整備できた。



マーモセット脳機能MRI固定具



マーモセット脳機能MRI固定具を用いた頭部の動き



脳活動MRIによる全脳ネットワークの可視化

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 INOUE Takashi, YURIMOTO Terumi, SEKI Fumiko, SATO Kenya, SASAKI Erika	4. 巻 72
2. 論文標題 The common marmoset in biomedical research: experimental disease models and veterinary management	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 140 ~ 150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1538/expanim.22-0107	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yoshimatsu Sho, Seki Fumiko, Okahara Junko, Watanabe Hirotaka, Sasaguri Hiroki, Haga Yawara, Hata Jun-ichi et al.	4. 巻 185
2. 論文標題 Multimodal analyses of a non-human primate model harboring mutant amyloid precursor protein transgenes driven by the human EF1 promoter.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 49 ~ 61
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2022.08.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Muta Kanako, Hata Junichi, Kawaguchi Naoki, Haga Yawara, Yoshimaru Daisuke, Hagiya Kei, Kaneko Takaaki, Miyabe-Nishiwaki Takako, Komaki Yuji, Seki Fumiko, Okano Hirotaka James, Okano Hideyuki	4. 巻 33
2. 論文標題 Effect of sedatives or anesthetics on the measurement of resting brain function in common marmosets	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cerebral Cortex	6. 最初と最後の頁 5148 ~ 5162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/cercor/bhac406	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Rikitake Mitsuki, Notake Sachiko, Kurokawa Karen, Hata Junichi, Seki Fumiko, Komaki Yuji, Oshiro Hinako, Kawaguchi Naoki, Haga Yawara, Yoshimaru Daisuke, Ito Ken, Okano Hirotaka James	4. 巻 8
2. 論文標題 Effects of chronic caffeine intake and withdrawal on neural activity assessed via resting-state functional magnetic resonance imaging in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e11714 ~ e11714
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2022.e11714	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Abe Yoshifumi, Kwon Soojin, Oishi Mitsuhiro, Unekawa Miyuki, Takata Norio, Seki Fumiko, Koyama Ryuta, Abe Manabu, Sakimura Kenji, Masamoto Kazuto, Tomita Yutaka, Okano Hideyuki, Mushiake Hajime, Tanaka Kenji F.	4. 巻 36
2. 論文標題 Optical manipulation of local cerebral blood flow in the deep brain of freely moving mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 109427 ~ 109427
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.109427	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Akaba Yuichi, Shiohama Tadashi, Komaki Yuji, Seki Fumiko, Ortug Alpen, Sawada Daisuke, Uchida Wataru, Kamagata Koji, Shimoji Keigo, Aoki Shigeki, Takahashi Satoru, Suzuki Takeshi, Natsume Jun, Takahashi Emi, Tsujimura Keita	4. 巻 16
2. 論文標題 Comprehensive Volumetric Analysis of Mecp2-Null Mouse Model for Rett Syndrome by T2-Weighted 3D Magnetic Resonance Imaging	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2022.885335	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kawamura Atsuki, Abe Yoshifumi, Seki Fumiko, Katayama Yuta, Nishiyama Masaaki, Takata Norio, Tanaka Kenji F., Okano Hideyuki, Nakayama Keiichi I.	4. 巻 13
2. 論文標題 Chd8 mutation in oligodendrocytes alters microstructure and functional connectivity in the mouse brain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-020-00699-x	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Yawara Haga, Junichi Hata, Akiko Uematsu, Fumiko Seki, Yuji Komaki, Mai Mizumura, Marin Nishio, Takaaki Kaneko, Noriyuki Kishi, Hideyuki Okano, Akira Furukawa	4. 巻 18
2. 論文標題 MR Imaging Properties of ex vivo Common Marmoset Brain after Formaldehyde Fixation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Magnetic Resonance in Medical Sciences	6. 最初と最後の頁 253-259
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2463/mrms.mp.2018-0086	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 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 1. 関 布美子、富樫 充良、村岡 俊典、石淵 智子、黒滝 陽子、井上 貴史、塚本 晃海、向笠 圭亮、小牧 裕司、山田 知歩子、力武 聖月、伊東 莉那、佐々木 えりか
2. 発表標題 環境エンリッチメントが脳発達に与える影響
3. 学会等名 日本神経科学学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 2. 関 布美子、富樫 充良、村岡 俊典、黒滝 陽子、井上 貴史、塚本 晃海、向笠 圭亮、小牧 裕司、山田 知歩子、佐々木 えりか
2. 発表標題 豊かな環境で育ったマーモセットの脳発達解析
3. 学会等名 マーモセット研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 F. Seki, T. Yurimoto, T. Inoue, E. Sasaki.
2. 発表標題 Functional MRI in awake marmosets for longitudinal studies.
3. 学会等名 Neuroscience 2021 Annual meeting of Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 1. 関布美子、山田知歩子、小牧裕司、富樫充良、村岡俊典、石淵智子、黒滝陽子、井上貴史、塚本晃海、向笠圭亮、力武聖月、伊東莉那、佐々木えりか
2. 発表標題 環境エンリッチメントが脳発達に与える影響
3. 学会等名 第11回マーモセット研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Fumiko Seki Seiji Shiozawa Sho Yoshimatsu Yuji Komaki Marin Nishio Erika Sasaki Hideyuki Okano
2. 発表標題 Longitudinal voxel-based analysis in Alzheimer's disease transgenic marmosets
3. 学会等名 International Society for Magnetic Resonance in Medicine (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fumiko Seki
2. 発表標題 MR Neuroimaging of disease models in the common marmoset
3. 学会等名 2019 International Symposium of Korean Association for Laboratory Animal Sciences (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fumiko Seki
2. 発表標題 Multiparametric analysis of life-span brain maturation and degeneration in common marmosets brain
3. 学会等名 日本神経科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fumiko Seki
2. 発表標題 Evaluation of cortical microstructure in marmoset life-span development
3. 学会等名 日本マーモセット研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 機能的MRI用ベッド及びこれを備えた 機能的MRI用ベッドシステム	発明者 2021	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-110184	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------