

成果報告書

脳PRO 文部科学省
脳科学研究戦略推進プログラム

課題

2008-2012



はじめに

文部科学省「脳科学研究戦略推進プログラム」は、社会への応用を明確に見据えた脳科学研究を戦略的に推進し、その成果を社会に還元することを目的にスタートしました。課題Aから課題Gの研究組織を構成し、戦略的に研究を推進しております。このうち、課題C〈独創性の高いモデル動物の開発〉は、平成20年度より研究を実施していましたが、平成24年度で5年間の事業が終了しました。ここに本事業の成果をご報告させていただきます。

本プログラムの成果を更に発展させ、今後も社会に貢献する脳科学の実現を目指し一層努力してまいりたいと思います。

平成25年6月

脳科学研究戦略推進プログラム
課題Cプログラムディレクター

中西 重忠

目次

課題Cを進めるにあたって	1
脳科学研究戦略推進プログラム(脳プロ)	2
課題Cの概要	4
霊長類における神経経路選択的遮断法の開発 伊佐正	8
霊長類脳におけるRNA干渉による遺伝子発現操作と行動制御 山森哲雄	9
霊長類高次認知機能の発達基盤 大石高生	10
ウイルスベクターによる神経経路選択的除去技術の開発 高田昌彦	11
コモンマーモセットの行動を知る 中村克樹	12
ウイルスベクターによる神経機能操作技術の最先端 渡邊大	13
遺伝子改変コモンマーモセットによるヒト神経疾患モデルの開発 岡野栄之	14
脳科学研究に役立つアデノ随伴ウイルスベクターの開発 小澤敬也	15
トランスジェニックマーモセット作出法の開発 佐々木えりか	16
霊長類クローン技術の開発 外丸祐介	17
高頻度逆行性遺伝子導入ベクターの開発と応用 小林和人	18

課題Cを進めるにあたって

脳は、人間が人間らしく生きるための根幹をなす「心」の基盤であり、その研究は、人文系科学や社会科学と融合し、学際的に進められています。また、現在の脳科学研究は、脳の発生・発達・老化の制御とその異常や、精神疾患及び脳神経変性疾患の病因解明、予防・治療法の開発を可能とし、医療・福祉の向上に最も貢献できる研究分野の一つだと考えられます。更に、記憶・学習のメカニズムや脳の感受性期(臨界期)の解明等により、教育等における活用も期待されるなど社会的意義も大変高い分野でもあります。

このような状況を踏まえ、脳科学研究を戦略的に推進し、成果を社会に還元することを目指して、平成20年度より文部科学省の事業として、プログラムディレクターとプログラムオフィサーの統括の下、拠点化研究を推進する本プログラムが開始されました。取り組むべき研究開発事業の一つとして、ヒトの脳機能の理解に直結し、かつ、脳科学研究の共通的な基盤となる先進的なリソースの構築を進める「独創性の高いモデル動物の開発」を課題Cとして取り上げ、小型の霊長類であるマーモセットやニホンザルでの遺伝子操作を目指し、研究を進めてきました。

本課題において、霊長類として世界で最初の遺伝子導入マーモセットの作成の報告からその後の疾病モデルマーモセットの作成と着実な成果を遂げており、霊長類疾患モデル動物の研究分野では世界をリードするに至っています。一方、遺伝子の運び屋である新しいウイルスベクターを構築し、遺伝子操作ニホンザルの作成と脳機能解析に成功し、国際的にも高く評価される先端的な研究成果を挙げてきました。

動物実験について

動物の福祉に十分に配慮した研究を進めるために、本プログラムの開始と同時に、動物実験小委員会を設置しました。動物を用いた実験が必要なことを社会に説明するだけでなく、動物福祉の啓発、普及を目指し、特に霊長類を対象とする研究に関する適切な方針の提示を進めてきました。その一環として、平成24年2月には、マーモセット研究会を立ち上げ、国際シンポジウムを共催し、世界へ向けた情報発信を行いました。また、霊長類ウイルスベクターの分与体制を構築し、脳科学研究コミュニティへの貢献もなされています。

課題C プログラムディレクター
中西 重忠

課題C プログラムオフィサー
陣上 久人

課題C プログラムオフィサー
赤澤 智宏



脳科学の二つの意義

科学的意義

脳科学研究の成果は多くの自然科学に波及効果をもたらし、また人文・社会科学と融合した新しい人間の科学を創出するなど、これまでの科学の枠組みを変える可能性を秘めています。

社会的意義

現代社会は少子高齢化、生活様式の多様化・複雑化が進み、心身ともに様々な問題を抱える人が著しく増えてきています。一方、脳科学研究は近年めざましい発展を遂げており、医療・福祉の向上に最も貢献できる研究分野の一つです。将来的には教育等における活用も期待されています。

脳プロ発足の経緯

このような二つの意義を背景に、**脳科学委員会**における議論を踏まえ、文部科学省は平成20年度より「脳科学研究戦略推進プログラム(脳プロ)」を開始しました。

脳プロは、「社会に貢献する脳科学」の実現を目指して、特に重点的に推進すべき政策課題を選定し、その課題解決に

向けて、社会への応用を見据えた脳科学研究を戦略的に推進するプログラムです。

脳プロでは、それぞれの課題を担当するプログラムディレクター、プログラムオフィサーの指導・助言の下、研究を進めています。

脳科学委員会

平成19年10月、文部科学大臣が科学技術・学術審議会に対し、「長期的展望に立つ脳科学研究の基本的構想及び推進方策について」を諮問しました。

これを受け、同審議会の下に「脳科学委員会」が設置され、我が国における脳科学研究を戦略的に推進するため、その体制整備の在り方、人文・社会科学との融合、さらには大学等におけ

る研究体制等を議論し、平成21年6月に第1次答申「長期的展望に立つ脳科学研究の基本的構想及び推進方策について」を取りまとめました。

この答申では、**重点的に推進すべき研究領域等**が設定され、社会への明確な応用を見据えた対応が急務とされる課題について、戦略的に研究を推進することが提言されています。

重点的に推進すべき研究領域等

脳と社会・教育

(豊かな社会の実現に貢献する脳科学)
発達障害の予防と治療等への脳科学研究の確実な展開、脳科学と人文社会科学との融合により社会へ貢献

脳と心身の健康

(健やかな人生を支える脳科学)
睡眠障害の予防、ストレスの適切な処理、生活習慣病等及び精神・神経疾患の発症予防・早期診断などに資する研究

脳と情報・産業

(安全・安心・快適に役立つ脳科学)
脳型情報処理システムや脳型コンピュータの実現、脳内情報機序の解明を通じた技術開発により社会へ貢献

基盤技術開発

他の研究分野にも革新をもたらす基盤技術開発により、我が国における科学技術全体の共通財産を構築

脳プロの実施課題



課題D

社会的行動を支える脳基盤の計測・支援技術の開発



課題E

心身の健康を維持する脳の分子基盤と環境因子



課題F

精神・神経疾患の克服を目指す脳科学研究



課題A・B

ブレイン・マシン・インターフェース(BMI)の開発



課題C

独創性の高いモデル動物の開発



課題G

脳科学研究を支える集約的・体系的な情報基盤の構築

実施課題について

情報脳

ブレイン・マシン・インターフェース (BMI)の開発

脳内情報を解読・制御することにより、脳機能を理解するとともに脳機能や身体機能の回復・補完を可能とするための研究開発を実施

社会脳

社会的行動を支える脳基盤の計測・支援技術の開発

ヒトの社会性障害の理解・予防・治療や社会性の健全な発達促進に応用するための研究開発を実施

基盤技術開発

独創性の高いモデル動物の開発

脳科学研究の共通的な基盤となる先進的なリソースを創出するための研究開発を実施

脳基盤 (FS)

精神・神経疾患の克服のための研究基盤の整備に向けた課題の検討

代表機関: 国立精神・神経医療研究センター (平成24年9月終了)

精神・神経疾患の発症のメカニズムを解明するため、精神・神経疾患の死後脳を収集するとともに、精神・神経疾患の研究に携わる研究者へ死後脳を提供する基盤の整備に向けた課題の検討 (Feasibility Study: フィージビリティ・スタディ)を平成23年度より実施



生命倫理

生命倫理等に関する課題の解決に関する研究

代表機関: 東京大学

精神・神経疾患の発症のメカニズムを解明する研究を含む本事業全体の研究を促進するに当たり、倫理的・法的・社会的課題に対する注意深い検討が不可欠であり、新たな問題等を解決するための研究を平成23年度より実施

健康脳

精神・神経疾患の克服を目指す脳科学研究

精神・神経疾患(発達障害, うつ病等, 認知症)の発症のメカニズムを明らかにし, 早期診断, 治療, 予防法の開発につなげるための研究開発を実施

生涯健康脳

心身の健康を維持する脳の分子基盤と環境因子

心身の健康を支える脳の機能や健康の範囲を逸脱するメカニズム等を「分子基盤と環境因子の相互作用」という視点で解明するための研究開発を実施

神経情報基盤

脳科学研究を支える集約的・体系的な情報基盤の構築

複雑かつ多層層な脳機能を解明するため, 様々なモデル動物から発生する多種類, 多層層情報を集約化・体系化した情報基盤の構築を目指した研究を実施



脳プロの歩み



◎: 拠点長



モデル動物とは

「モデル動物」とは研究に有用な動物のことです。基本的な生命現象は様々な動物で共通しているため、ヒトでの実験ができない時にモデル動物が大きな役割を果たします。

例えば、遺伝子が欠損したり、遺伝子配列が変わったりしているために、特定の病気の発症率が高くなり、場合によってはほぼ確実に発症してしまうことがあります。その時、ヒトの体の中で何が起きているのかを知ることは容易ではありません。

そこで、私たちは、モデル動物の遺伝子を人工的に操作し、その影響を調べることによって、遺伝子本来の働きや病気の解明、さらには治療法の開発を進めようとしています。

モデル動物として線虫、キロショウジョウバエ、ゼブラフィッシュなどの様々な動物が用いられ、特にマウスやラッ

トといったげっ歯類はヒトと同じ哺乳類であり、脳科学の発展に大いに役立ってきました。

しかし、同じ哺乳類とは言っても限界があり、ヒトの脳の働きやその障害による神経疾患などを解明するためには、よりヒトに近い種でなければ調べようがないことがあるのです。

サルなどの霊長類は、これまでも脳研究に大きな貢献をしてきましたが、遺伝子改変技術が大変進んでいるマウスなどに比べると、可能な実験は限られたものでした。

課題Cが目指すのは、最先端の技術を駆使してこの限界を乗り越えることです。世界に先駆けた霊長類モデル動物の開発は、脳研究を大きく発展させ、さらにはヒト神経疾患の研究にも貢献すると期待されています。



線虫



キロショウジョウバエ



ゼブラフィッシュ



マウス



サル

霊長類モデル動物の特徴

同じ哺乳動物でも、霊長類であるマカクザルやマーモセットと、げっ歯類であるマウスとでは特徴が異なります。脳科学のさらなる発展のためには、それぞれのモデル動物の長所・

短所を理解した上で研究を進めることが重要です。課題Cでは、ヒトと同じ霊長類であるマカクザル、マーモセットをモデル動物として確立する取組を行ってきました。

マカクザル



長所

- 脳の構造がヒトに近い。(特に、前頭葉・運動系・視覚系)
- 身体の構造がヒトに近い。(特に、手・眼)
- 脳が大きい。

短所

- 遺伝子改変が困難。
- 性成熟に時間がかかる。
- 身体が大きい(高コスト)。

マーモセット



長所

- 霊長類としての基本的な構造を備えている。
- 遺伝子改変が可能になってきた。
- 性成熟までの時間が比較的短い。
- 身体がほほほに小さい。

短所

- 高次脳機能の研究にどこまで有用か不明確。
- 基礎的なデータが少ない。

マウス



長所

- 遺伝子改変が比較的容易。
- 性成熟までの時間が短い。
- 身体が小さい(低コスト)。

短所

- 脳(前頭葉・運動系・視覚系)・身体(手・眼)の構造がヒトと異なる部分が多い。
- 脳が小さい。

課題Cでの取組

- 霊長類で遺伝子導入・改変技術を確立。
- マーモセットを脳機能研究のためのモデル動物として確立する。

二つの大きな成果

霊長類モデル動物において、神経機能やその機能に関わる遺伝子を操作することが可能となれば、ヒトの脳機能の解明に大きく貢献することができます。

課題Cではウイルスベクター(遺伝子の運び屋)による遺伝子

導入と小型霊長類であるマーマセットにおけるトランスジェニック*動物の作成の二つの技術開発を進めました。

*受精卵の核に外来遺伝子を注入して、ゲノム配列上に導入する遺伝子組換え法

霊長類モデル動物におけるウイルスベクター技術の確立

- 遺伝子導入効率の向上
 - 高頻度逆行性レンチなど
- 経路選択的遺伝子発現制御
 - ウイルス二重感染 (破傷風毒素)
 - 神経終末部での伝達阻害 (光遺伝学)
- 遺伝子機能ノックダウン(shRNA)
 - AAVベクターによる効果的なRNA干渉
- 疾患モデルの作成
 - 経路選択的なパーキンソン病原因タンパク質の過剰発現

トランスジェニックマーマセット作成

- トランスジェニック作成技術の改良
 - 蛍光タンパクマーカース改良
 - 顕微受精による、より長い配列の発現制御
- 神経科学に有用なモデル
 - Tet-off, Tet-on
- 疾患モデル
 - パーキンソン病モデル
- 解析ツール開発
 - 認知行動バッテリー (図形弁別, 作業記憶, 逆転学習)
 - イメージングツール (神経路の可視化) (各領野の体積を計測) (脳活動の可視化)
 - 解剖・生理データの蓄積 (大脳皮質の領野識別) (大脳皮質からの下行路)

ヒト脳機能解明と疾患の克服を目指す新しい研究に向けて

課題Cの成果を改良・応用していくことによって、他のモデル動物に比べてよりヒトに近い疾患モデルの作出が期待できます。疾患モデル研究を加速することにより、精神・神経疾患の早期発見や新薬開発などに貢献できます。

また、疾患の原因となっている神経回路を操作し、元の機能に回復させる「経路標的治療法」の開発も重要な研究テーマです。

霊長類モデル研究



ヒト特有の脳機能
(意思決定・思考)の解明

精神・神経疾患の
早期発見・新薬開発

経路標的治療の開発

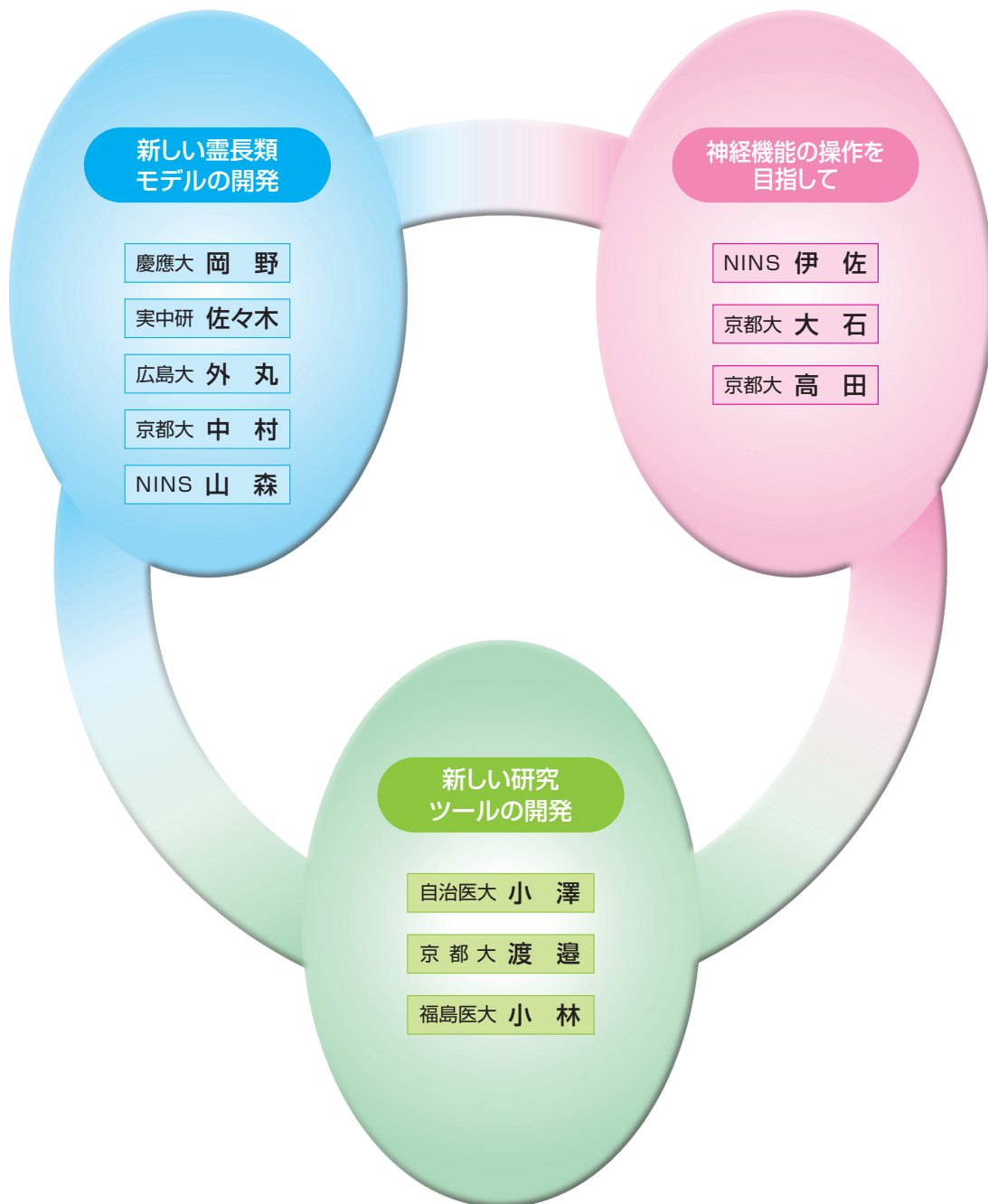
●代表機関

自然科学研究機構(NINS) 生理学研究所 認知行動発達機構研究部門 教授	伊佐 正 (拠点長)	先端的遺伝子導入・改変技術による脳科学研究のための 独自の霊長類モデルの開発と応用
自然科学研究機構(NINS) 基礎生物学研究所 脳生物学研究部門 教授	山森 哲雄	

●参画機関

京都大学 霊長類研究所 分子生理研究部門 統合脳システム分野 准教授	大石 高生	遺伝子改変霊長類モデルの開発と高次脳機能の解析
京都大学 霊長類研究所 分子生理研究部門 統合脳システム分野 教授	高田 昌彦	
京都大学 霊長類研究所 行動神経研究部門 高次脳機能分野 教授	中村 克樹	
京都大学大学院 生命科学研究科・医学研究科 教授	渡邊 大	
慶應義塾大学 医学部 生理学教室 教授	岡野 栄之	遺伝子改変コモンマーマウスによるヒト神経疾患モデルの 開発
自治医科大学 分子病態治療研究センター 遺伝子治療研究部 教授	小澤 敬也	アデノ随伴ウイルスベクターを用いた脳機能の制御技術の 開発
実験動物中央研究所 応用発生学研究部 部長	佐々木 えりか	コモンマーマウスの遺伝子改変技術の基盤整備
広島大学 自然科学研究支援開発センター 生命科学実験部門 動物実験部(震動物実験施設) 教授	外丸 祐介	コモンマーマウスの遺伝子改変技術の基盤整備 (ES/体細胞クローン技術の応用)
福島県立医科大学 医学部 附属生体情報伝達研究所 生体機能研究部門 教授	小林 和人	新規レンチウイルスベクターの開発と細胞標的への応用

課題Cは、中核となる代表機関である自然科学研究機構と、六つの参画機関で構成された研究開発拠点です。それぞれの機関が有機的に連携し、霊長類モデル動物開発を推進しています。



霊長類における神経経路選択的遮断法の開発

自然科学研究機構 生理学研究所
認知行動発達機構研究部門 教授

伊佐 正

ISA, Tadashi

目的

- ウイルスベクターを用いた中枢神経系の特定の細胞種、経路の機能を修飾による、高次脳機能の神経回路基盤の解明

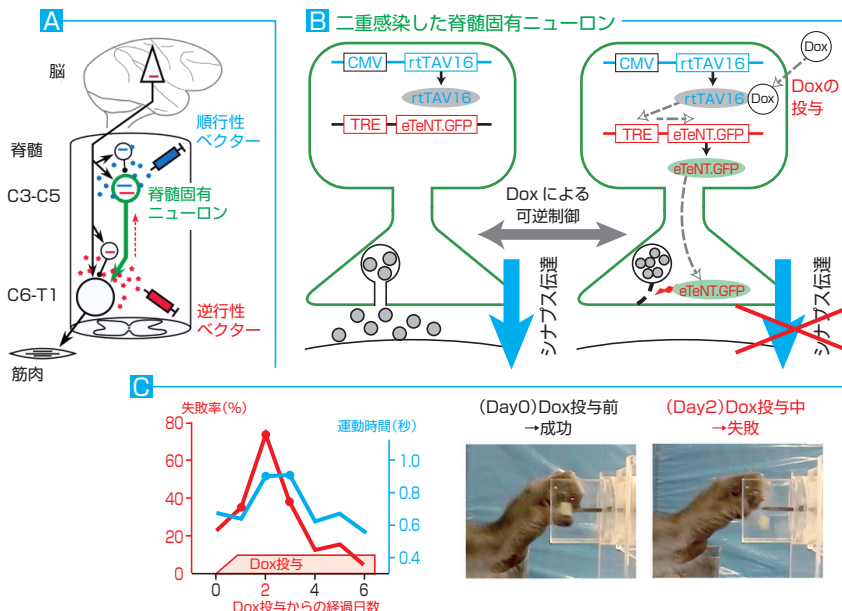
成果

- ウイルスベクターの二重感染によって特定の経路を選択的かつ可逆的に遮断する手法の開発に成功し、霊長類(マカクザル)の巧緻な手指の運動の制御における脊髄の特定の介在ニューロン群の機能を明らかにした。

個々の指を独立に動かして器用に物をつかむような巧緻な運動は、ヒトを含む霊長類で最も発達した行動です。しかし、実は、このような最も基本的な運動を制御する脳からの出力経路ですら、必ずしも明確に分かっているわけではありませんでした。ヒトやマカクザルのような霊長類では、大脳皮質から脊髄運動ニューロンへの直接の結合が存在します(直接経路)が、それに加えて、ネコなど、手の巧緻性が発達していない動物種で主要な働きをしている脊髄固有ニューロン(PN)とよばれる介在ニューロンを介する間接的な経路も存在するのです。しかしこの進化的に古くから存在する間接経路が霊長類においてもやはり機能を果たしているのか、それともはや使われなくなったのか、という問題については長年論争が続いていました。このような問題に対する最も直接的な回答はPNを選択的に遮断して運動に対する効果を調べることによって得られるはずですが、それはこれまで不可能でした。しかし、私たちは今回、課題Cにおける共同研究で、ウイルスベクターを用いて、世界で初めてサルのような遺伝子改変が困難な大動物において経路選択的・可逆的に遺伝子発現を制御する新しい方法を開発し、サルのPNを選択的に遮断することに成功しました。具体的には、まず高頻度逆行性レンチウイルスベクター(HiRet)を、PNの軸索が投射する領域(頸髄第6髄節(C6)から胸髄第1髄節(T1)の前肢の筋肉を支配する脊髄

運動ニューロンが存在する前角という部位)に注入します。そして次に順行性ベクターとしてアデノ随伴ウイルス(AAV)を、PNの細胞体が存在する領域(頸髄第3-第5髄節(C3-C5)の中間帯)に注入しました。すると二重感染は細胞体がC3-C5に存在し、軸索をC6-T1に投射しているPNでのみ起こります(図A)。そしてサルにテトラサイクリンという抗生物質の誘導体であるドキシサイクリン(Dox)を飲ませると、二重感染したPNでのみ破傷風毒素が発現し、その作用によりPNの伝達物質放出が阻害され、シナプス伝達が遮断されるような工夫をしました(図B)。実験では4頭のマカクザルでベクターの注入を行い、Doxの経口投与を開始したところ、4頭のいずれにおいても投与開始から2-5日後に前肢の巧緻な到達把持運動の失敗率が上昇し、同時に運動が遅くなりました(図C、2日目)。このようにPNのシナプス伝達遮断により運動の障害が観察されたことから、PNを介する間接経路がマカクザルの巧緻な到達把持運動の制御に重要な働きをしていることが明らかになりました。

本研究によって、長く議論の対象となっていた、進化的に古い経路と考えられてきたマカクザルのPNを介した間接経路の前肢巧緻運動の制御における役割を初めて明確に示すことができました。また、本研究で開発した手法によって、今後、脊髄に限らず脳の特定期間経路の操作的な研究を行う新たな可能性を切り開いたと言えます。



研究成果のご紹介

- ・ M. Kinoshita et al. "Genetic dissection of the circuit for hand dexterity in primates." *Nature*, 487: 235-238, 2012.
- ・ B. Alstermark et al. "Circuits for skilled reaching and grasping." *Annual Review of Neuroscience*, 35: 559-578, 2012.
- ・ K. Kaneda et al. "Selective optical control of synaptic transmission in the subcortical visual pathway by activation of viral vector-expressed halorhodopsin." *PLoS ONE*, 6: e18452, 2011.

霊長類脳におけるRNA干渉による 遺伝子発現操作と行動制御

自然科学研究機構 基礎生物学研究所
脳生物学研究部門 教授

山森 哲雄
YAMAMORI, Tetsuo

目的

- ウイルスベクター法を駆使した霊長類脳における遺伝子発現操作法の開発
- RNA干渉法を用いた霊長類脳における遺伝子発現制御法の確立

成果

- ウイルスベクターを用い霊長類脳の特定の回路の可視化に成功した。
- RNA干渉法を用いて、特定の脳部位の機能をノックダウンすることができるようになった。

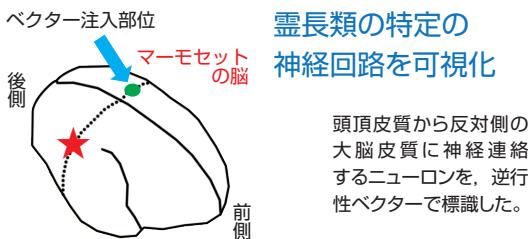
近年、マウスを用いた遺伝子操作技術が急速に進歩し、様々な遺伝子を導入したトランスジェニックマウスや遺伝子機能を失わせたノックアウトマウスの技術も長足の進歩をとげました。また、各種の無毒化したウイルスに遺伝子を導入し、特定の神経細胞で発現させてその機能をみる技術の開発も急速に進み、従来の生理学や解剖学では証明できなかった回路や神経細胞の機能が直接的に証明できるようになってきました。一方、ヒトの精神疾患等の病因を神経回路レベルから本当に理解するためには、ヒトにより近い霊長類を対象に研究を行う必要もあります。そのため、神経科学では、長らく、霊長類(マカクザルとよばれるニホンザルを含めた仲間)を題材とした研究が行われ、我が国でも優れた研究が行われてきました。

霊長類でも遺伝子操作法が可能になれば、こうした優れた生理学的技術や解剖学的知見を生かして、げっ歯類では得られないヒトの認知や行動についての理解が深まると考えられます。例えば、私たちの研究室では、眼から大脳皮質への最初の投射先であるマカクザル一次視覚野で最も強く発現する遺伝子の中に、うつ病と関係が深いと考えられているセロトニン(5HT)の受容体(13種類存在)の2種類5HT1Bと5HT2Aがあることを見いだしました。この機能を明らかにするために、大阪大学の佐藤宏道教授とともに、それぞれの受容体に特異的に作用して活性を促進するアゴニストや活動を抑えるアンタゴニストを用いて、前者は視覚

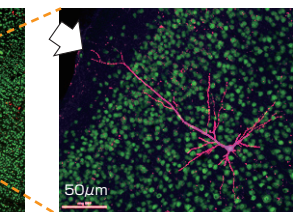
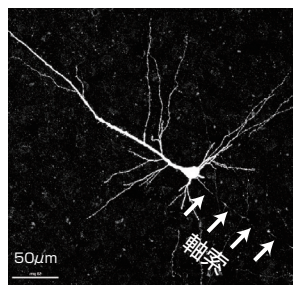
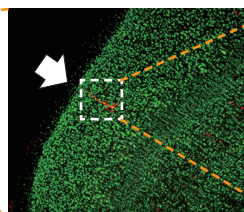
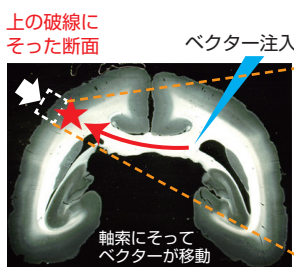
入力ノイズに対する信号(シグナル)の割合を上げ、後者はその補正をしていることを示しました。しかし、全ての遺伝子産物に対してその効果の特異的に促進したり、抑制したりする化合物が存在するわけではありませんので、全遺伝子に対して使えるより汎用的方法を開発する必要があります。

そこで私たちは、脳プロにおいて、まず、霊長類の特定の神経回路を可視化する方法を開発しました(図を参照)。さらに、ノーベル賞を受賞したファイアーとメローが1998年に発見したRNA干渉法を発展させた、Paddison(2002年)によるshort hairpin RNAs (shRNAs)法を用いて霊長類の標的遺伝子を特定の脳部位でノックダウンすることによって、霊長類の脳科学研究の方法論を進展させました。この方法は、RNA干渉法として遺伝子治療法の開発にも試みられていますが、なお汎用的方法が確立しているとは言えません。この問題を克服するために、私たちは、新世界ザルであるマーモセットを用いて、パーキンソン病、薬物依存、統合失調症等に深い関連があることが知られているドーパミン受容体遺伝子をshRNA法でノックダウンする方法を確立しました。すでに、遺伝子ノックダウンの効果を、生体での遺伝子発現レベル、電気生理学的解析、行動学的解析で調べて有効性を確認しており、特許申請、学会発表等を行い、現在論文作成を準備しています。

霊長類の特定の神経回路を可視化



頭頂皮質から反対側の大脳皮質に神経連絡するニューロンを、逆行性ベクターで標識した。



研究成果のご紹介

- A. Watakabe et al. "Visualization of cortical projection neurons with retrograde TET-off lentiviral vector." PLoS One, 7: e46157, 2012.
- M. Kinoshita et al. "Genetic dissection of the circuit for hand dexterity in primates." Nature, 487:235-238, 2012.
- T. Takahata et al. "Differential expression patterns of striate cortex-enriched genes among Old World, New World, and prosimian primates." Cerebral Cortex, 22: 2313-2321, 2012.
- T. Yamamori. "Selective gene expression in regions of primate neocortex: implications for cortical specialization." Progress in Neurobiology, 94: 201-222, 2011.
- M. Takaji et al. "Paraneoplastic antigen-like 5 gene (PNMA5) is preferentially expressed in the association areas in a primate specific manner." Cerebral Cortex, 19: 2865-2879, 2009.

霊長類高次認知機能の 発達基盤

京都大学 霊長類研究所 分子生理研究部門
統合脳システム分野 准教授

大石 高生
OISHI, Takao

目的

- 高次認知機能を担う前頭前野のネットワーク形成時期の決定
- 前頭前野ネットワーク内の個々の神経路が高次認知機能に果たす役割の解明

脳の中では、膨大な数のニューロンが複雑なネットワークを作っています。このネットワークが働くことによって、脳は様々な機能を果たすことができます。私たちは高次認知機能の神経基盤に注目し、重要な役割を果たす前頭前野がどう関わっているかを、サルを用いて調べました。

高次認知機能は、生後にゆっくりと発達することが知られています。私たちの研究によって、前頭前野に入力する神経路も生後に発達することが分かりました。前頭前野の異なる部位は、それぞれが複数の脳領域(例えば側頭連合野や後部帯状回皮質)からの入力を受けています(多対多の神経路)。それぞれの神経路ごとに、完成するタイミングが異なっていました。神経路は、それぞれが異なった情報を伝えており、その情報を必要とする高次認知機能は、異なった発達段階で徐々に形作られていくと予想できます。

前頭前野はいろいろな高次認知機能に関わっています。その中で私たちが注目したのは、「自分の行動をモニターして憶えておく」機能です。背外側前頭前野とよばれる部位が働かなくなると、自分がさっき見たものはきちんと思い出せるのに、自分がさっき選んだものは思い出せなくなります。また、自分がさっき左右どちらの位置を選んだかということも思い出せなくなります。背外側前頭前野は、ものであれ、位置であれ、自分が選んだ方を思い出すときに重要な役割を果たしているのです。しかし、どのようにして「自分の行動をモニターして憶えておく」機能が実現しているかは、まだ分かっていません。

成果

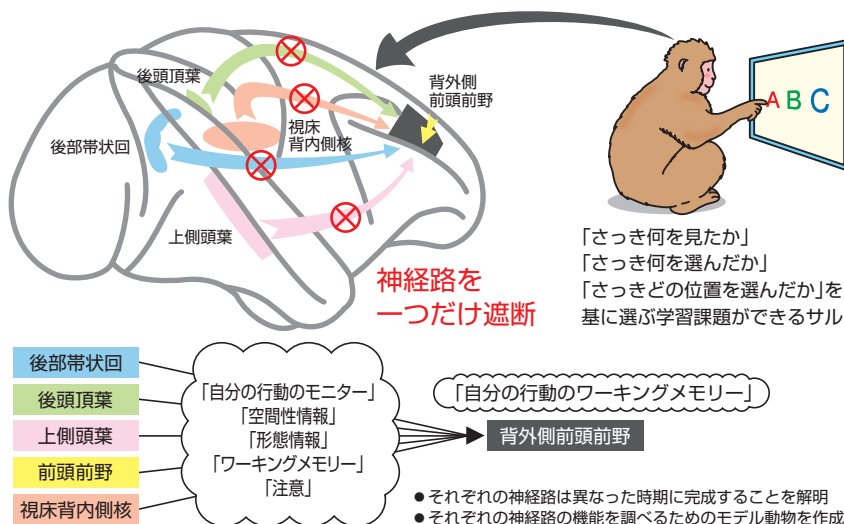
- 前頭前野への複数の入力神経路が異なる時期に形成されることを発見した。
- 神経路が高次認知機能に果たす役割を調べるためのモデル動物を作成した。

背外側前頭前野は、視床背内側核、側頭連合野、後部帯状回などの部位から入力を受けています。これらの入力神経路が、それぞれ異なった情報を背外側前頭前野に伝え、それらが組み合わさることによって「自分がしたことをモニターして憶えておく」機能が実現していると私たちは考えました。特定の神経路の情報伝達だけを好きなタイミングで遮断する手法を使えば、そのときにサルの記憶が受ける影響を調べることによって、その神経路の役割が分かるはずです。

サルにとっては難しいことなのですが、

- ・自分がさっき見たものを思い出して、それと違うものを選ぶ課題
- ・自分がさっき選んだものを思い出して、それと違うものを選ぶ課題
- ・自分がさっき選んだ位置を思い出して、それと違う位置を選ぶ課題

の三つの学習課題ができるように訓練しました。そのサルの背外側前頭前野と、それへの入力を送る部位に遺伝子を導入することにより、特定の条件下で、特定の神経路の伝達が遮断されるモデル動物を作成することに成功しました。異なる入力神経路を伝達遮断できるモデル動物で、伝達遮断が学習課題の成績にどのように影響するかを比較検討することによって、それぞれの神経路の役割を確認することができます。



研究成果のご紹介

- ・ S. Higaki et al. "Response of ER beta and aromatase expression in the monkey hippocampal formation to ovariectomy and menopause." *Neuroscience Research*, 72; 148-154, 2012.
- ・ S. Miyachi et al. "Corticocortical projections to the lateral prefrontal cortex of infant monkeys." *Neuroscience Research*, 71S; E388-E389, 2011.
- ・ T. Oishi et al. "Regional characteristics of gene expression in the brain of the rhesus monkey." *Neuroscience Research*, 68; E351-E352, 2010.
- ・ S. Higaki et al. "Microarray profiling of gene expression in the aging monkey brain." *Neuroscience Research*, 68; E305, 2010.

ウイルスベクターによる 神経路選択的除去技術の開発

京都大学 霊長類研究所 分子生理研究部門
統合脳システム分野 教授

高田 昌彦
TAKADA, Masahiko

目的

- 細胞死を誘導する物質であるイムノキシンの受容体を発現する特殊なウイルスベクターの開発
- 特定の神経回路を標的にしてイムノキシン受容体の遺伝子を導入し、その回路を除去する手法の開発

成果

- サルで特定の神経回路を選択的に除去し、その回路の機能を解析できる手法の開発に世界で初めて成功した。
- 様々な精神・神経疾患モデルの開発や疾患を克服するための遺伝子治療研究に応用できる。

ヒトやサルの脳は、1,000億を超える神経細胞が複雑に絡み合った神経回路をつくり、高次脳機能を生みだしています。例えば、パーキンソン病などの神経疾患の病態を解明し治療法を開発するためには、こうした複雑な神経回路の中から特定の働きをしている神経回路を見つけ出し、それを標的にする必要がありますが、特定の神経回路だけを標的にして遺伝子を導入することはこれまで困難でした。今回、私たちは、特定の神経回路だけを除去して、その神経回路の機能を解析できる手法の開発に世界で初めて成功しました。このような手法によって神経回路の機能を解明していくことが、パーキンソン病など神経回路の異常で起こる神経疾患の治療につながります。

手法の原理は、図(左)にあるように、まず、①シナプスとよばれる神経細胞どうしのつなぎ目の部分に、細胞死を誘導する物質として知られるイムノキシンの受容体(ヒトインターロイキンタイプ2受容体アルファ:IL-2R α)を発現する特殊なウイルスベクターを注入します。そうすると、②ウイルスベクターが神経線維の末端から感染して神経線維を神経の伝達方向と逆向きに輸送され、③領域A・B・Cの神経細胞で、イムノキシンの受容体が発現します。このとき、④領域Cにだけイムノキシンを作用させると、⑤領域Cの神経細胞のみを死滅させることができます。

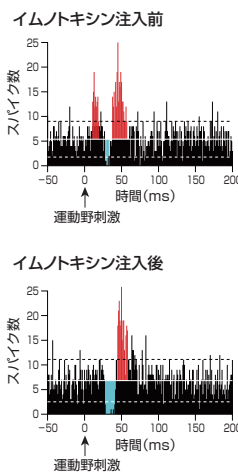
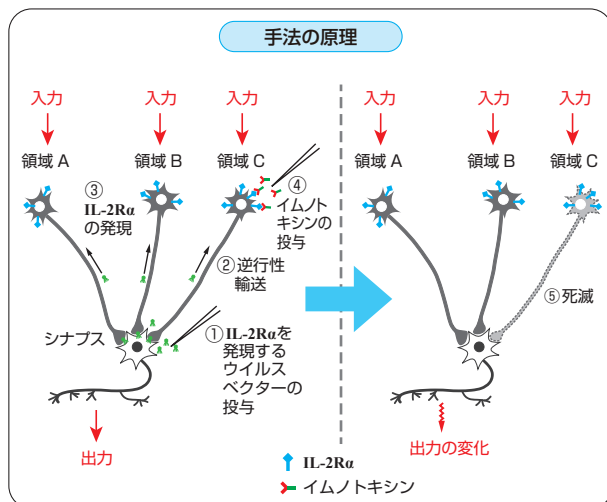
このようなベクターを大脳基底核(視床下核)に、イムノ

キシンを大脳皮質(運動野)に注入して、運動野から視床下核に至る神経回路(ハイパー直接路)だけを除去した際、大脳基底核の神経回路の働きがどう変化したかを、神経細胞の反応を記録して確かめます。

私たちは、イムノキシンの受容体を発現する特殊なウイルスベクターを大脳基底核の一部である視床下核に注入しました。次に、運動野(運動を制御する大脳皮質の領域)にイムノキシンを注入することによって、運動野から大脳基底核に至る神経回路のうち「ハイパー直接路」とよばれる神経回路だけを選択的に除去することに成功しました。その結果、図(右)にあるように、大脳皮質から大脳基底核に運動情報が入る際に、淡層球内節の神経細胞で見られる運動野刺激に対する早いタイミングの興奮活動がなくなりました。

パーキンソン病などの運動疾患に関わる、大脳皮質から大脳基底核に至る神経回路のうち「ハイパー直接路」とよばれる神経回路だけを選択的に除去すると、大脳基底核における早いタイミングの興奮活動だけが見られなくなったことから、この神経回路が早い興奮を引き起こす働きをしていることを明らかにしました。今回開発された方法は、高次脳機能の解明、さらには様々な精神・神経疾患モデルの開発やこれらの疾患を克服するための遺伝子治療研究などに大変役立つ手法となると期待できます。

特定の神経回路だけを“除去”して、その神経回路の機能を解析できる手法の開発に成功



研究成果のご紹介

- S. Kato et al. "Vectors for highly efficient and neuron-specific retrograde gene transfer for gene therapy of neurological diseases." In: Gene Therapy-Tools and Potential Applications; 387-398, InTech, 2013.
- K. Inoue et al. "Immunotoxin-mediated tract targeting in the primate brain: selective elimination of the cortico-subthalamic "hyperdirect" pathway." PLoS ONE, 7; e39149, 2012.
- S. Kato et al. "Neuron-specific gene transfer through retrograde transport of lentiviral vector pseudotyped with a novel type of fusion envelope glycoprotein." Human Gene Therapy, 22; 1511-1523, 2011.
- S. Kato et al. "A lentiviral strategy for highly efficient retrograde gene transfer by pseudotyping with fusion envelope glycoprotein." Human Gene Therapy, 22; 197-206, 2011.
- S. Kato et al. "Efficient gene transfer via retrograde transport in rodent and primate brains by an HIV-1-based vector pseudotyped with rabies virus glycoprotein." Human Gene Therapy, 18; 1141-1151, 2007.

コモンマーモセットの行動を知る

京都大学 霊長類研究所 行動神経研究部門
高次脳機能分野 教授

中村 克樹
NAKAMURA, Katsuki

目的

- 社会性に富み家族で暮らすコモンマーモセットの行動評価法の開発

コモンマーモセットでの遺伝子改変技術が進歩してきている今、何が脳研究や精神疾患研究に必要でしょう。例えば精神疾患を考えると、認知機能の変化だけではなく、社会行動の変化も診断基準に含まれ、なかなか動物で評価できません。他人に興味を示さない・コミュニケーションがうまくとれない・喜びを感じないなどが精神疾患の症状として挙げられます。もちろん、ヒトほど高度に複雑に精神機能が発達した動物はいません。しかし、コモンマーモセットもげっ歯類とは異なるレベルで発達した精神機能をもっています。それをうまく引き出し評価することが非常に重要です。コモンマーモセットは400グラム程度の小さなサルですが、複雑な行動レパートリーを有しています。昼行性で、視覚が発達しています。そのため、動作や表情など視覚情報を用いたコミュニケーションを頻繁にとります。また、鳴き交わり行動など、聴覚情報を用いたコミュニケーションも頻繁に観察されます。家族全員で子育てを分担したり、親から子へ食物を渡したりもします。こうした社会性に富んだコモンマーモセットの能力を評価することが重要です。

私たちは、コモンマーモセットの様々な行動を評価する方法を開発してきました。

1) 認知機能の評価

専用の認知機能実験装置を開発しました。タッチセンサー付きモニターを有する小型PCを中心とした装置で、簡単に飼育ケージの扉に装着できます。この装置で、図形を

成果

- 汎用性の高い小型認知実験装置を開発した。
- 社会的認知機能測定・筋力・前肢到達運動・活動量・脳波計測等を可能にした。

見分けたり、特定の図形を覚えたり、複数の刺激の順序を覚えたりする能力を調べました。

2) 親行動の評価

コモンマーモセットは離乳したばかりの幼い子に対して親が寛容で、自らの食物を渡す分配行動が見られます。この食物分配行動を実験室の環境で再現することに成功しました。また、親が離れたところにいる子を回収するテストも考案しました。

3) 鳴き交わり行動の評価

コモンマーモセットは音声レパートリーも豊富で、例えば他個体と出会ったときのTrillという鳴き声や、仲間と離れたときのPheeという鳴き声などがあります。こうした鳴き交わりを実験室の環境で再現することに成功しました。

4) その他の評価

前肢の筋力を測定する装置・前肢を伸ばし食物を取る検査装置・活動量を記録する方法・長時間にわたり脳波を計測する方法等の開発に成功しました。

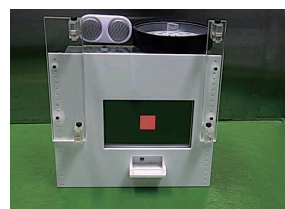
認知機能の評価、コミュニケーション・親行動などの社会行動の評価、脳波等の生理指標のデータ解析を併せてコモンマーモセットの行動を総合的に評価することで、今後の脳研究や精神疾患研究においてコモンマーモセットの重要性がますます増えるだろうと期待されます。



コモンマーモセットの親子



◀ 活動量を測定するペンダント型装置



▲ 認知機能評価装置



▲ 前肢の筋力を測定する装置



▲ 前肢を伸ばし食物を取る検査装置

研究成果のご紹介

- ・ B. A. 't Hart et al. "The marmoset monkey: a multi-purpose preclinical and translational model of human biology and disease." *Drug Discovery Today*, 17; 1160-1167, 2012.
- ・ R. Koba et al. "Characteristics of serial order learning in common marmosets (*Callithrix jacchus*)." *Journal of Comparative Psychology*, 126; 279-287, 2012.
- ・ A. Takemoto et al. "Development of a compact and general-purpose experimental apparatus with a touch-sensitive screen for use in evaluating cognitive functions in common marmosets." *Journal of Neuroscience Methods*, 199; 82-86, 2011.
- ・ S. Yuasa et al. "Stereotaxic atlas of the marmoset brain. With immunohistochemical architecture and MR images." *National Institute of Neuroscience*, 2010.

ウイルスベクターによる 神経機能操作技術の最先端

京都大学大学院
生命科学研究所・医学研究科 教授

渡邊 大
WATANABE, Dai

目的

- 霊長類モデル動物の脳で神経活動制御を可能にするウイルスベクター技術の開発
- 自由行動下の動物個体の神経活動を単一細胞の精度で計測する技術の開発

成果

- 霊長類モデル動物で薬物投与依存的に神経伝達を遮断する技術を開発した。
- ワイヤレス神経活動計測システムを開発した。

ヒトの高度な脳機能を解明し、さらにその異常によって生じる精神・神経疾患の治療法を確立するためには、進化上ヒトと近い脳をもち、行動の面からも共通点の多いサルを対象として研究することで多くの知見が得られると期待されています。しかしながら、マウスのような小型のモデル動物を使って開発されてきた遺伝子工学・分子遺伝学を駆使した脳神経系の研究手法の多くは、サルを対象とした研究ではいまだ整備されていません。サルを使って遺伝子や細胞のレベルで体系的かつ効果的に脳研究を進めるための手法を開発する必要があります。

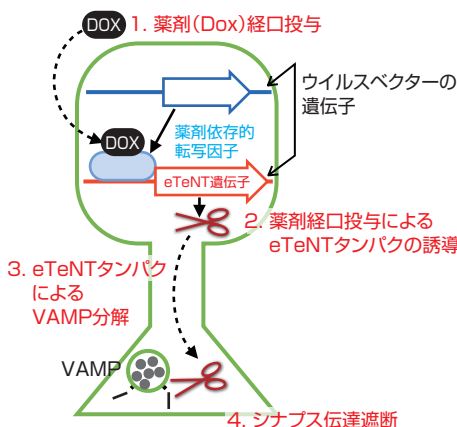
本研究の第一の目的は、ウイルスベクターにより霊長類モデル動物の神経細胞へ遺伝子導入を行い、その神経細胞の機能を薬剤投与や特定の波長の光を照射することで操作する技術を開発することです。脳は非常に多種類の神経細胞から構成され相互に接続し極めて複雑なネットワークを構築していますが、このような技術により特定の神経細胞の活動を薬剤や光照射により選択的にスイッチオン・オフすることができれば、その影響を詳しく調べることで各神経細胞の機能を明らかにすることができるようになります。さらに、積極的に神経活動をコントロールすることで、パーキンソン病やうつ病など精神・神経疾患の症状を従来の薬剤より副作用が少なく効果的に改善することができるかもしれません。また本研究の第二の目的は、このような神経活動制御の効果を詳細に研究するために、動物の行動を阻害することなく、単一神経細胞の電気的活動を計測できるような神経活

動計測システムを開発することです。

私たちは、生理学研究所、福島医科大学、自治医科大学と連携して、ミリ秒から数週まで様々な時間スケールで神経活動を操作するための様々なウイルスベクターの開発を行いました。その試みの一つとして神経細胞間の情報伝達を遮断することが知られている破傷風菌由来のテタヌス毒素(TeNT)の遺伝子を改変し、より効果的なenhanced TeNT (eTeNT)の開発に成功しました(図左)。TeNTは神経細胞のシナプス機能に重要なVAMPタンパク質選択的に作用し、シナプスを介した神経細胞間の情報伝達を遮断します。私たちの開発したeTeNTは、TeNTのVAMP選択的な活性を変えずに、その作用を増強したものです。このeTeNTを用いることで、ヒトをはじめ霊長類にのみ可能な巧みな手指のコントロールに関する神経回路機構の一端を明らかにすることができました。これは四肢の制御に関わる神経回路がヒトと大きく異なるマウスなど従来の動物モデルで調べることができなかった問題であり、今後脊髄損傷の治療法の開発等に大いに役立つと思われます。

また、自由行動下の動物個体からの単一神経細胞の電気的活動を計測しうる機器として、ワイヤレス方式の神経活動計測システムを開発しました(図右)。小型かつ軽量であるため、ヒトとよく似た家族を単位とする社会をもち、音声を使って情報交換をするマーモセットのような小型霊長類においても、その行動を損なうことなく脳の電気的活動を単一細胞の精度で調べることが可能になりました。

ウイルスベクターによる 神経活動制御



超小型のワイヤレス 神経活動計測システム



研究成果のご紹介

- ・ M. Kinoshita et al. "Genetic dissection of the circuit for hand dexterity in primates." *Nature*, 487: 235-238, 2012.
- ・ R. Matsui et al. "Avian adeno-associated virus vector efficiently transduces neurons in the embryonic and post-embryonic chicken brain." *PLoS ONE*, 7: e48730, 2012.
- ・ H. Fujimoto et al. "Neural coding of syntactic structure in learned vocalizations in the songbird." *The Journal of Neuroscience*, 31: 10023-10033, 2011.
- ・ R. Sanuki et al. "miR-124a is required for hippocampal axogenesis and retinal cone survival through Lhx2 suppression." *Nature Neuroscience*, 14: 1125-1134, 2011.
- ・ K. Kaneda et al. "Selective optical control of synaptic transmission in the subcortical visual pathway by activation of viral vector-expressed halorhodopsin." *PLoS ONE*, 6: e18452, 2011.



遺伝子改変コモンマーモセットによる ヒト神経疾患モデルの開発

慶應義塾大学 医学部
生理学教室 教授

岡野 栄之
OKANO, Hideyuki

目的

- 遺伝子導入による神経変性疾患モデル動物の作出
- 7テスラMRIを用いたマーモセット脳画像解析と神経基盤データの構築

成果

- 家族性パーキンソン病の原因遺伝子を導入した遺伝子改変マーモセットの作出に成功した。
- 脳活動を捉えるMRニューロイメージング法の開発に成功し、また発達・成体期における脳地図を公開した。

コモンマーモセットは、私たちヒトと同じ霊長類に属しています。そのため、代謝経路や生理学・解剖学的な特徴がヒトと非常に類似しています。また、繁殖効率が良く、霊長類の中では非常に多産であることも特徴の一つです。そのため、遺伝的背景の比較が容易であるという利点を利用して、私たちは遺伝子改変マーモセットを作出することに成功しました(E. Sasaki et al., Nature 2009)。この技術により、マウスでは不可能であった高次脳機能の解明や、ヒトの病気に限りなく近い疾患モデル動物の作出が可能になり、病気の仕組みの理解や、新しい治療方法の開発につながると考えています。

“モデル動物”とは、普遍的な生命現象を理解するために研究対象となる生物のことで、ある遺伝子に欠損や配列の異常があるためヒトと類似した病気になる動物などがその一例です。ヒトと同類である哺乳類のマウスやラットをモデル動物として用いた研究は現代の医学の発展に欠かせないものでした。しかし、これらの動物の脳とヒトの脳は構造や働きが大きく違うため、脳や脊髄などの病気を理解し、治療法を開発するには限界がありました。

そこで、よりヒトに近い霊長類であるコモンマーモセットに注目して研究を行うことにしました。私たちは、遺伝子改変技術を利用して、家族性パーキンソン病の原因遺伝子を導

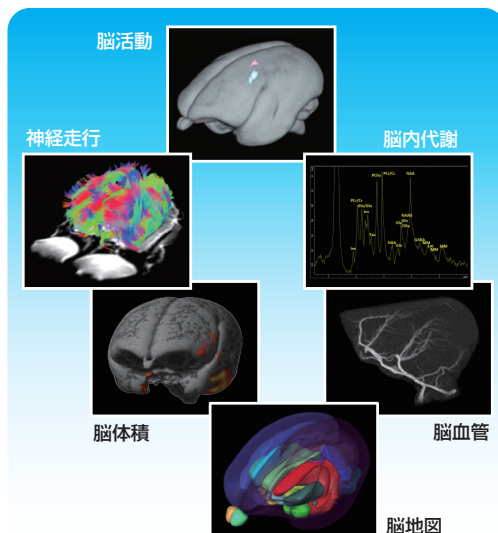
入した霊長類を世界で初めて作出しました。パーキンソン病は、アルツハイマー病に次いで頻度の高い神経変性疾患で、高齢化社会を迎えている我が国では社会問題化しつつあります。有効な治療法の開発のために、世界中でパーキンソン病モデルマウスを作る試みが行われてきましたが、患者さんの症状を反映する動物の作出には成功していません。私たちが作ったモデルマーモセットによって、神経病の治療が飛躍的に発展することを願っています。

また、病気の理解と治療法の開発のためには、小さなマーモセットの脳を観察する方法が必須です。貴重な動物を傷つけずに観察するため、私たちは非侵襲的な診断装置であるMRIに着目しました。MRIは臨床医学の中核を担う診断法であり、基礎研究を臨床研究に展開させるためにも重要な役割を果たします。しかし、マーモセット用の装置はありませんので、私たちは7テスラの高磁場装置を用い、マーモセット専用の計測システムを整備しました。これにより、安全かつ高精度に脳の白質神経路や脳活動を捉える方法が実現しました。今後、この評価システムを遺伝子改変モデルに用い、脳の病気の発症やその治療効果を調べる研究を併せて行っていきます。

遺伝子改変マーモセット



MR ニューロイメージング



研究成果のご紹介

- K. Hikishima et al. "Atlas of the developing brain of the marmoset monkey constructed using magnetic resonance histology." *Neuroscience*, 230; 102-113, 2013.
- K. Sawamoto et al. "Cellular composition and organization of the subventricular zone and rostral migratory stream in the adult and neonatal common marmoset brain." *Journal of Comparative Neurology*, 519; 690-713, 2011.
- S. Shiozawa et al. "Gene targeting and subsequent site-specific transgenesis at the β -actin (ACTB) locus in common marmoset embryonic stem cells." *Stem Cells and Development*, 20; 1587-1599, 2011.
- K. Hikishima et al. "Population-averaged standard template brain atlas for the common marmoset (*Callithrix jacchus*)." *Neuroimage*, 54; 2741-2749, 2011.
- E. Sasaki et al. "Generation of transgenic non-human primates with germline transmission." *Nature*, 459; 523-527, 2009.

脳科学研究に役立つアデノ随伴ウイルスベクターの開発

自治医科大学 分子病態治療研究センター
遺伝子治療研究部 教授

小澤 敬也

OZAWA, Kei-ya

目的

- 脳科学研究に適したアデノ随伴ウイルスベクターの開発
- アデノ随伴ウイルスベクターの普及

アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターは遺伝子導入に適した性質をもつことから、遺伝子治療に際して幅広く使用されています。AAVベクターを利用する臨床研究はこれまで世界中で90種類以上が承認されており、実際に数多くのヒトにベクターの投与がなされ、効果が認められてきています。中枢神経系への遺伝子導入にも適しており、大脳皮質や大脳基底核などを対象として様々な試みがなされています。私たちがパーキンソン病に対する臨床研究を行っています。本研究ではこのようなAAVベクターを脳科学領域に応用し、目的の遺伝子を標的部位で発現させること、及び目的の遺伝子を標的部位において発現抑制(ノックダウン)することが大きな柱でした。この目的を達するために、基礎生物学研究所・山森グループならびに生理学研究所・伊佐グループなどと共同で研究を行い、私たちは主にベクター開発の部分を担当しました。

AAVにはこれまで多くの血清型が知られており、それぞれがベクターとして使用可能になってきています。これらのベクターを使用した際には、有効な組織が異なっていることも分かりつつありますが、詳細な性質の違いに関しては十分に明らかにされていません。このため様々な血清型由来のベクターを作製し、マウス及びサルの脳内における遺伝子導入の状況を検討しました。

その結果、大脳皮質を標的とする場合には1型のベクターが最も有効と考えられました。また、GFP(緑色蛍光タ

成果

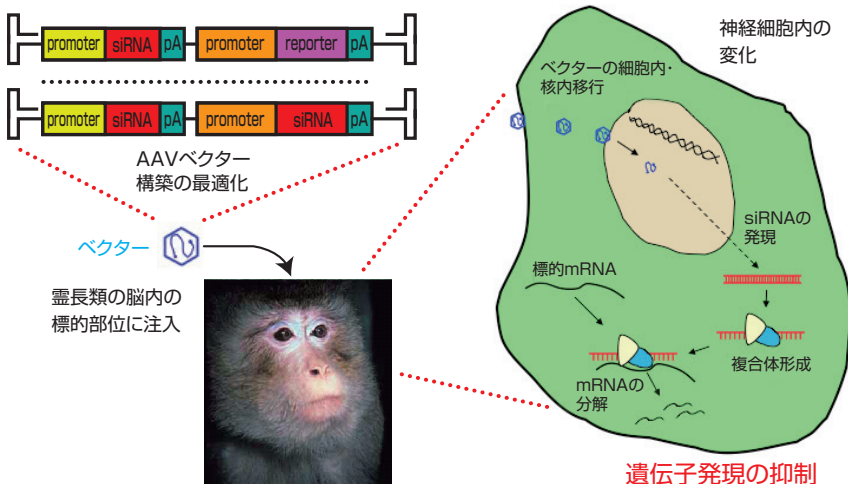
- 目的とする遺伝子を発現させるのに適したベクターを見いだした。
- 目的とする遺伝子の発現を部位特異的に抑制することに成功した。

ンパク質)を発現するベクターを大脳皮質に注入した際には注入した部位周辺の損傷が問題となっていました。神経組織に特異性の高いプロモーターを使用することでこの問題を避けられることが分かり、組織の損傷はGFPの強い発現が原因と考えられました。なお、大脳基底核や脊髄を対象とする場合には2型のベクターが有効と考えられました。

ベクターに用いる血清型やプロモーターの最適化を進める一方で、目的とする遺伝子のノックダウンを可能とするための検討を行いました(図)。このためにはRNA干渉法といって、遺伝子発現を抑制するためのRNA配列(siRNA)を導入する目的のベクターの開発を行い、目的とする遺伝子に対応したベクターをできるだけ簡単に作製できるようなシステムを目指しました。目的遺伝子に対応するsiRNA配列のオリゴヌクレオチドを挿入するだけでノックダウン用のベクターが作製可能なシステムを多数作り上げ、培養細胞レベルで最適なものを選択しました。このシステムを利用したベクターは動物個体のレベルでも有効で、サルにおいて目的部位のドーパミン受容体遺伝子をノックダウンすることにも使用され、成功に至りました。

以上の成果から、目的とする遺伝子を意図した場所で発現させることと、すでに発現している遺伝子をノックダウンすることが自由自在にできるようになり、AAVベクターが脳科学研究に一層役立つものとなったように思われます。

AAVベクターを用いたRNA干渉法による遺伝子発現の抑制



研究成果のご紹介

- ・ J. Mimuro et al. "Minimizing the inhibitory effect of neutralizing antibody for efficient gene expression in the liver with adeno-associated virus 8 vectors." *Molecular Therapy*, 21; 318-323, 2013.
- ・ M. Ogura et al. "Interleukin-10 expression induced by adeno-associated virus vector suppresses proteinuria in Zucker obese rats." *Gene Therapy*, 19; 476-82, 2012.
- ・ H. Mizukami et al. "Gene therapy for diabetic retinopathy in animal models and humans." In: *The Open Diabetes Journal—Novel animal model of diabetic complications: The SDT rat*, 4; 119-122, 2011.
- ・ S. Muramatsu et al. "A phase I study of aromatic L-amino acid decarboxylase gene therapy for Parkinson's disease." *Molecular Therapy*, 18; 1731-5, 2010.
- ・ M. Lock et al. "Characterization of a recombinant adeno-associated virus Type 2 reference standard material." *Human Gene Therapy*, 21; 1723-85, 2010.



トランスジェニックマーモセット 作出法の開発

実験動物中央研究所
応用発生学研究所 部長

佐々木 えりか

SASAKI, Erika

目的

- 低侵襲^{しんしゅう}、高精度なコモンマーモセット発生工学技術の開発
- 脳科学研究に役立つ遺伝子改変コモンマーモセット作出技術の確立

成果

- 非侵襲的に受精卵を採取・移植する方法、効率の良い未受精卵の成熟培養法を確立した。
- ウイルスベクターを用いて、次世代に導入遺伝子が伝達可能な遺伝子改変マーモセット作出に世界で初めて成功した。

コモンマーモセットは小型の霊長類で、ヒトに生理学的、解剖学的性質がよく似ている一方、霊長類の中では珍しく高い繁殖能力をもった動物です。

これまで脳科学研究を始めとする医学生物学研究には、実験動物としてマウスが多く用いられてきました。しかし、ヒトとマウスでは系統的に距離があるため、マウスを用いて行われた実験の結果をヒトにそのまま応用することができない場合があります。そのような研究にコモンマーモセットは実験動物として重要な役割を果たしていますが、コモンマーモセットでは、マウスのように遺伝子改変によりヒトの疾患のモデルを作出する方法は確立されていませんでした。今後、パーキンソン病やアルツハイマーといった高次脳機能が障害される疾病の早期発見、早期治療、病気発症のメカニズムを理解するためには、霊長類で遺伝子改変を行う方法の確立が必要でした。

私たちは、コモンマーモセットを用いて、遺伝子改変動物作出を実現するために効率が良く、動物に対して低侵襲に行うことが可能な発生工学技術を確立しました。その結果、これまで開腹手術が必要だった受精卵の採取及び子宮内への移植を、開腹手術を伴わずに行うことが可能となり、動物への侵襲を減じたのみならず、これまで問題となっていた動物の子宮-卵巣の癒着による卵管内での輸卵障害なども認められなくなりました。また、コモンマーモセット卵

子の成熟培養の培地にブタの卵胞液を添加すると成熟率が上昇すること、さらにブタ卵子成熟培養用の完全合成培地POMを用いるとコモンマーモセットでも効率よく成熟卵子が得られ、この卵子を用いて体外授精して得られた受精卵から産子を得ることに成功しました。

また私たちは、遺伝子改変コモンマーモセットを作出するために、レンチウイルスベクターを用いてコモンマーモセットの受精卵へ外来遺伝子である緑色蛍光タンパク質(GFP)遺伝子cDNAを導入し、効率よく遺伝子改変マーモセットを作出する方法を確立しました。この方法により、5匹のトランスジェニックマーモセット作出に成功しました。この5匹のうち4匹は、皮膚、毛、血液など様々な組織で、残りの1匹は胎盤でGFPを発現していることが示されました。また、このうち4匹は、生殖細胞にもこのGFP遺伝子cDNAが挿入されており、この遺伝子が次世代へ伝達すること、GFPとして次世代の組織の中で機能していることが示されました。このことにより、霊長類でも遺伝子改変動物を作出して疾患モデルとして様々な研究に使用することが可能であることが示されました。

今後、この方法を応用して、現在は難治性疾患として治療が困難な病気の発症予防法、治療法の開発に役立てたいと考えています。

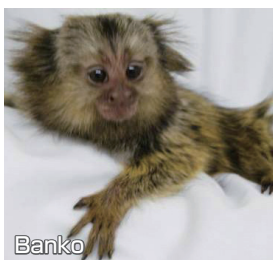
トランスジェニックマーモセットの作出



Hisui



Wakaba



Banko



Kei



Kou Kouichi

GFP遺伝子が
伝ったKou
の子

研究成果のご紹介

- K. Hikishima et al. "Atlas of the developing brain of the marmoset monkey constructed using magnetic resonance histology." *Neuroscience*, 230; 102-113, 2013.
- K. Hanazawa et al. "Minimally invasive transabdominal collection of preimplantation embryos from the common marmoset monkey (*Callithrix jacchus*)." *Theriogenology*, 78; 811-816, 2012.
- I. Tomioka et al. "Birth of Common Marmoset (*Callithrix jacchus*) offspring derived from in vitro-matured oocytes in chemically defined medium." *Theriogenology*, 78; 1487-1493, 2012.
- I. Tomioka et al. "Generating induced pluripotent stem cells from common marmoset (*Callithrix jacchus*) fetal liver cells using defined factors, including Lin28." *Genes to Cells*, 15; 959-969, 2010.
- E. Sasaki et al. "Generation of transgenic nonhuman primates with germline transmission." *Nature*, 459; 523-527, 2009.

霊長類クローン技術の開発

外丸 祐介
SOTOMARU, Yusuke

目的

- 霊長類における生殖工学技術の基盤整備とクローン技術の構築
- クローン技術を応用した遺伝子組換えマーモセット作成(遺伝子組換えES/体細胞の核移植)技術の開発

成果

- 生殖工学技術の基盤を築き、世界初の受精卵クローンマーモセットを作成した。
- 着床可能な体細胞クローン胚の作成手技を構築したが、他の哺乳動物とは異なり個体作成は困難であることが分かった。

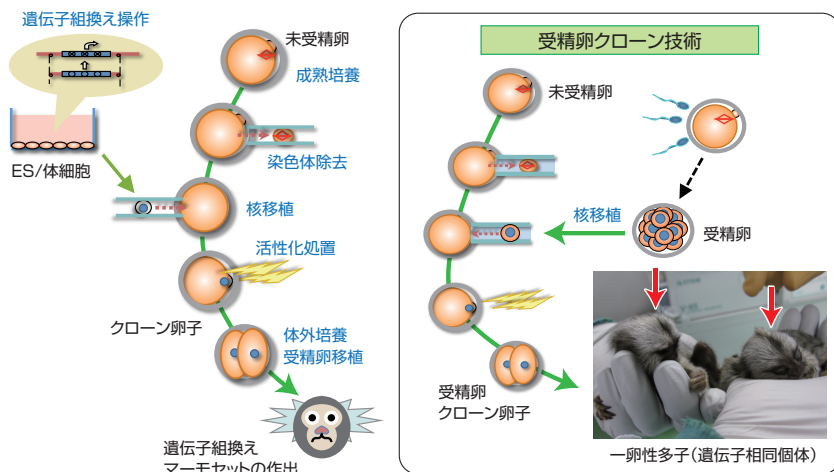
私たちは、実験動物中央研究所と慶應義塾大学との連携のもと、クローン技術をマーモセットに応用することで、脳科学研究に有用な遺伝子改変モデル動物の作出を目指しています。この背景には、霊長類ではマウスのような自由度の高い遺伝子組換え個体の作成手段が確立されていないことがあります。動物への遺伝子組換えは、外来遺伝子をゲノム配列上に単純に導入するトランスジェニック(Tg)と、ノックアウト/ノックイン(KO/KI)といった標的とする遺伝子配列を置換する遺伝子相同組換えに大別できます。TgマウスはDNAを受精卵の核へ顕微注入することで作成されますが、これについては課題Cの成果により、ウイルスベクターによる手法をさらに改良することでTgマーモセットが得られました。これに対して、KO/KIマウスは胚性幹(ES)細胞への遺伝子相同組換え操作とこの細胞を用いた生殖腺キメラ作成による手段で作成されます。しかし、マーモセットを含めた霊長類では生殖腺への分化・寄与が可能なES細胞がまだ樹立されておらず、現状ではKO/KI個体を作成できません。そこで、核移植によりKO/KI操作を施したES細胞や体細胞をドナーとしたクローンを作成することで、KO/KIマーモセットを作成する手段の開発に取り組んできました。

この一方で、ヒツジを始めとしたウシやマウスなどの様々な哺乳動物で受精卵やES/体細胞をドナーとしたクローンが得られているにも関わらず、霊長類ではいまだES/体細胞クローンの成功例はありません。また、マーモセットの生殖

工学技術に関する報告も多くはありません。このため、クローン作成の基盤となるホルモン投与による卵巣刺激、卵子の採取・体外培養等の生殖工学技術の整備・至適化に取り組みながら、効率的なクローン卵子作成のための核移植プロトコル(手順)の構築を進めることで、クローンの作成試験を実施してきました。そして、この成果として、初期発生段階にある8~32細胞期の受精卵の核をドナーとして核移植を行うことで、1組の一卵性双子クローンを含む3匹の個体が得られ、世界初の受精卵クローンマーモセットを作成することができました。この技術は、マウス・ラットのような近交系が存在しない霊長類においては、動物実験実施の上で有意義な、遺伝子背景の同一な個体の作成手段として有効であり、また他の霊長類への応用も期待できるものです。

しかしながら、本研究で目標とするES/体細胞クローンに関しては様々な手段を試してきましたが、着床までは確認できたものの、現段階では産子を得るには至っていません。受精卵をドナーとした場合には、個体までの発生に十分な核の再プログラム(=初期化)を誘導できるプロトコルにはたどり着きましたが、より分化度の高いES/体細胞からクローン個体を得るためには、これまでとは異なるアプローチによるプレイクスルーが必要であるようです。

遺伝子組換えマーモセット作成へのクローン技術の応用



研究成果のご紹介

- S. Shiozawa et al. "Gene targeting and subsequent site-specific transgenesis at the β -actin (ACTB) locus in common marmoset embryonic stem cells." *Stem Cells and Development*, 20; 1587-1599, 2011.
- Y. Sotomaru et al. "Preimplantation development of somatic cell cloned embryos in the common marmoset (*Callithrix jacchus*)." *Cloning Stem Cells*, 11; 575-583, 2009.
- E. Sasaki et al. "Generation of transgenic non-human primates with germline transmission." *Nature*, 459; 523-527, 2009.

高頻度逆行性遺伝子導入ベクターの開発と応用

福島県立医科大学 医学部
附属生体情報伝達研究所
生体機能研究部門 教授

小林 和人
KOBAYASHI, Kazuto

目的

- 遺伝子改変技術により、特定の神経回路の機能を操作・制御するアプローチの構築
- 神経終末より導入され、細胞体において導入遺伝子を発現する高頻度逆行性ウイルスベクター系を開発

高次な脳機能の仕組みや神経・精神疾患の病態の機序を理解するためには、様々な行動を媒介する神経回路のメカニズムの解明が重要です。この目的を達成するための有益な方法として、遺伝子改変技術を応用して特定のニューロンタイプの機能を改変するアプローチが開発されてきました。例えば、イムノキシンによる神経細胞の除去、テタヌスニューロキシンによる神経伝達の阻害、光遺伝学による神経活動の制御などの技術が含まれます。

私たちの研究グループは、これらの遺伝子操作技術を基盤に、霊長類モデルを利用した特定の脳神経回路の研究に応用するために、経路選択的な神経機能の操作・制御技術の構築を目指しています。この目的のために、神経終末部より導入され、軸索を逆行性に輸送された後、遠方に存在する細胞体において目的の遺伝子の発現を誘導する逆行性遺伝子導入ウイルスベクターは有益な役割をもちます。ウイルスベクターの表面に存在するスパイクタンパク質は、宿主細胞との相互作用に関与し、その導入特異性に重要なことが知られています。

私たちは、スパイクタンパク質を改変し、特に、狂犬病ウイルス糖タンパク質(RV-G)の細胞外・膜貫通領域と水疱性口内炎ウイルス糖タンパク質(VSV-G)の細胞内領域から構成される融合糖タンパク質B型を作成することにより、高頻度な逆行性遺伝子導入(highly efficient retrograde gene transfer: HiRet)を示す新規のウイルスベクター系を開発しました(図の左上)。HiRetベクターは、げっ歯類及び霊長

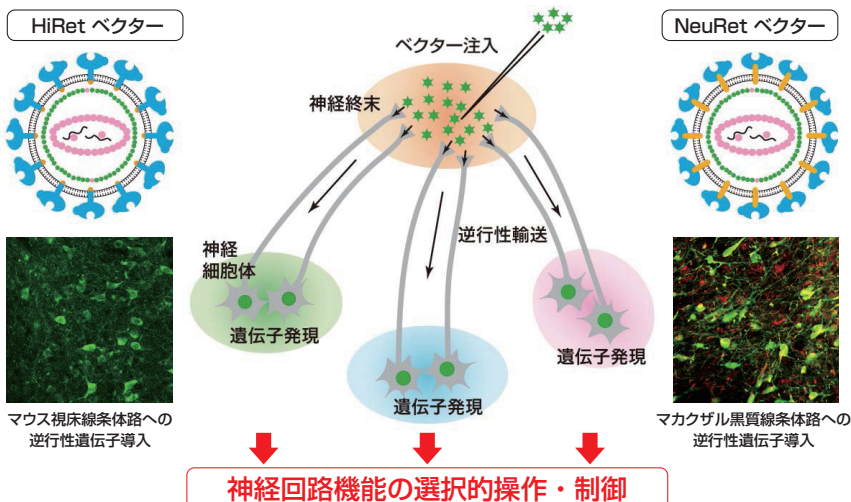
成果

- 高頻度及び神経細胞特異的な逆行性遺伝子導入を示すHiRet/NeuRetベクターを開発した。
- 上記の技術を応用し、霊長類モデルにおける経路選択的な神経伝達抑制や神経路除去など、中枢神経回路研究を推進した。

類(マカクザル)の脳内において種々の神経路に高い効率で逆行性遺伝子導入する活性をもちます。また、RV-GとVSV-Gの接続部位を変換した新たな融合糖タンパク質C型を作成し、神経細胞特異的な逆行性遺伝子導入(neuron-specific retrograde gene transfer: NeuRet)を示すベクター系を開発しました(図の右上)。NeuRetベクターは、高頻度な逆行性導入の活性を維持しつつ、注入部位において神経細胞に特異的に導入され、グリア細胞には導入されないという特徴を有します。これらのベクターは、選択的な神経回路の操作・制御技術の開発において根幹となる重要な研究ツールを提供します。

HiRet/NeuRetベクター系を用いて逆行性の遺伝子導入をすることにより、特定の脳領域に入力する多くの神経路に目的の遺伝子を導入することができます。その後、上流の脳領域に神経機能を改変する処理を行うことにより、経路選択的な神経機能の改変を誘導することができます。具体的には、霊長類モデルにおける特定の神経路の除去(京都大学・高田グループとの共同)や神経伝達遮断(生理学研究所・伊佐グループとの共同)を行うストラテジーの開発につながり、中枢神経回路のメカニズムの解明に応用されました。

HiRet/NeuRetベクターは、特定神経路の機能の解析ばかりでなく、特定の経路で働く遺伝子の役割の研究にも応用できます。また、本ベクター系は、将来的にパーキンソン病や運動ニューロン疾患などの神経難病に対する遺伝子治療のための有益な技術としても期待されています。



研究成果のご紹介

- S. Kato et al. "Dissecting circuit mechanisms by genetic manipulation of specific neural pathways." *Reviews in the Neurosciences*, 24; 1-8, 2013.
- M. Kinoshita et al. "Genetic dissection of the circuit for hand dexterity in primates." *Nature*, 487; 235-238, 2012.
- S. Kato et al. "Selective neural pathway targeting reveals key roles of thalamostriatal projection in the control of visual discrimination." *The Journal of Neuroscience*, 31; 17169-17179, 2011.
- S. Kato et al. "Neuron-specific gene transfer through retrograde transport of lentiviral vector pseudotyped with a novel type of fusion envelope glycoprotein." *Human Gene Therapy*, 22; 1511-1523, 2011.
- S. Kato et al. "A lentiviral strategy for highly efficient retrograde gene transfer by pseudotyping with fusion envelope glycoprotein." *Human Gene Therapy*, 22; 197-206, 2011.

脳科学研究戦略推進プログラム 課題C 成果報告書

■ 発行元 **文部科学省研究振興局ライフサイエンス課 脳科学係**

〒100-8959 東京都千代田区霞が関三丁目2番2号

tel: 03-5253-4111 (代表) / fax: 03-6734-4109

<http://www.lifescience.mext.go.jp/> (ライフサイエンスの広場)

脳科学研究戦略推進プログラム事務局

〒444-8585 愛知県岡崎市明大寺町字西郷中38 生理学研究所内

tel: 0564-55-7803, 7804 / fax: 0564-55-7805

<http://brainprogram.mext.go.jp/>

平成25年6月発行

本書を無許可で複写・複製することを禁じます

©2013 MEXT SRPBS Printed in Japan



Strategic Research Program for Brain Sciences

Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology - Japan