

平成 27 年度 委託研究開発成果報告書【公開版】

1. 研究開発課題名と研究開発代表者名

事業名	革新的技術による脳機能ネットワークの全容解明プロジェクト	
研究開発課題名	革新的技術による脳機能ネットワークの全容解明（中核拠点） （マーモセットの高次脳機能マップの作成とその基盤となる神経回路の解明及び参画研究者に対する支援）	
機関名	国立大学法人京都大学	
研究開発 担当者	所属 役職	霊長類研究所 教授
	氏名	中村 克樹

2. 研究開発成果の内容

① マーモセットの高次脳機能マップの作成および研究環境の提供

① -1 家族形態の環境下で社会性の高いマーモセットの効率の良い繁殖・飼育

マーモセットの繁殖用ペアを3組増やし繁殖規模を拡大することができた。今後も可能な範囲で拡大する。新たな個体（血）を購入し、繁殖用として検疫・導入して中期的な繁殖に対応可能な体制に備えた。また、飼育下ではしばしば3仔生まれるが、効率の良い繁殖を目指す一環として、3仔目を無駄にしない社会性を保った人工哺育法を試みている。エンリッチメントを推進して、よりよい環境で飼育する体制を充実させた。国立研究開発法人理化学研究所（和光）、理化学研究所（神戸）、公益財団法人実験動物中央研究所、大学共同利用機関法人自然科学研究機構基礎生物学研究所等に、ガムに関する情報提供を行った。

① -2 マーモセットの高次脳機能の解析系の開発と基盤となる神経回路の解明

認知実験装置に関しては、使用していた PC を新たなものに交換し、マーモセットの反応をより正確に検出できるようになった。OS や市販の PC の変化に備えるため、タブレット型 PC への移行を検討した。マーモセット用のチェアを設計し導入し、眼球位置計測システムを立ち上げたため、サッカー課題をマーモセットに訓練することができるようになった。この点に関しては、理化学研究所の岡野チームと情報交換を行っている。臨床グループとの実験結果や情報の共有を可能とするヒト・マカクザル・マーモセットで共通して用いることができるサッカー課題を開発している。疾患モデルマーモセットの病態評価のため、アイコンタクトの定量化をメガネ型視線計測装置で試みた。測定に適した条件の検討を行っている。マーモセットの3次元的運動の定量化に成功した。また、音声コミュニケーション行動の定量化を試みている。平成26年度に導入した小型動物 MRI 装置による構造 MRI 撮像法を確立した。また、MRI 用マーモセットステレオ装置を設計開発したため、脳内の局所に正確に注入することが可能となった。疾患モデルの評価のため DTI を *in vivo* および *ex vivo* での撮像も試みた。

① -3 マーモセットの脳を巡る多シナプス性神経回路の解析

マーモセット脳 MRI に基づく P2A レベル実験室におけるマーモセット脳への狂犬病ウイルスベクター注入および実験個体飼育のためのセットアップ、平成26年度に新規導入したデジタルスライド解析装置によるマーモセット脳組織標本の画像取得プロトコルの確立と解析方法の検討をおこない、狂犬病ウイルスベクターを用いた *in vivo* レベルでの一連の研究態勢を立ち上げた。

① -4 疾患/病態モデルマーモセットの作出

技術開発個別課題を担当する公立大学法人福島県立医科大学（福島県立医大）の小林和人教授との連携により、平成26年度に開発し、マカクザル脳で高い逆行性感染能を示した NeuRet (FuG-E 型) ベクターと HiRet (FuG-B2 型) ベクターのマーモセット脳における外来遺伝子の導入効率を比較、検討するため、線条体および大脳皮質への注入実験をおこない、特に線条体注入例について組織学的解析を進めた。また、パーキンソン病モデルマーモセットの行動評価を実施するために階段採餌課題装置、運動機能評価タスク、および装着型活動量連続計測装置を開発した。さらに、黒質ドーパミンニューロン選択的にアルファシヌクレインを発現するアデノ随伴ウイルスベクターおよびレンチウイルスベクターの開発と、黒質線条体ドーパミン神経路選択的に神経伝達を阻害するための Tet-ON システムを用いた遺伝子操作ベクターシステムの改良をおこなった。

① -5 マーモセットおよび研究技術や環境の提供・支援

国立大学法人東京医科歯科大学の岡澤チームと共同で、マーモセットの疾患モデル作出を進めている。マーモセット脳内に分子を局所微量注入する方法を検討し、2頭で注入を試みた。また、認知機能に及ぼす影響を検討するため4頭に空間位置記憶課題を訓練した。福島県立医大の小林チームに個体の提供を行った。国立大学法人北海道大学の渡辺チームに脳の提供を行った。国立研究開発法人理化学研究所（和光）、理化学研究所（神戸）、公益財団法人実験動物中央研究所等に、脳脊髄液採取法・避妊法・経口補液法について情報提供した。

②脳ヘテロビッグデータに対する大規模数理解析手法

②-1 ミクロコネクトミクス法の開発

連続切片電子顕微鏡画像の z 軸方向解像度が数十 nm 程度と比較的低解像であることを考慮して、機械学習に基づいた画像補完（解像度向上）技術の開発を進めてきた。マウスの公開データへ適用した結果、異なる個体や部位をトレーニングデータとして利用した補完処理よりも、同じ個体と部位をデータとして利用した処理の方が精度の良いことがわかった。これはマーモセットの画像補完のためには、マーモセットの電子顕微鏡画像データベースの作成が必要であることを意味している。また、細胞膜セグメンテーション法に関しては、最新の方法である深層 Convolution Neural Network に基づくモデルへの拡張を行った。その結果、マウスデータにおいて、70%弱の精度で実施可能であることが分かった。

② -2 メゾコネクトミクス法の開発

二光子トモグラフィからの大規模線維構造抽出のための手法の開発を行い、山森グループ（国立研究開発法人理化学研究所）から提供されたマーモセットデータに対して適用を行った。この手法では個々の神経線維を同定するため、その抽出に必要となる画像解像度に関して、特に coronal plane

の解像度設定が難しいことが予想される。マーモセット実データに対して、解像度を 5 μm から 25 μm まで変化させながら線維構造を抽出することで、最適な計測パラメータの評価を行った。その結果、coronal plane に対して 5 μm -10 μm 程度の解像度が必要であることが分かった。

② -3 マクロコネクティクス法の開発

Marco Reisert (研究協力者) の協力を得て、拡散 MRI 画像に対する確率的構造探索法を、岡野グループ (国立研究開発法人理化学研究所) から提供されたマーモセット高角度分解能データ (128 軸、200 μm isotropic) への適用を進めた。その結果、標準的な構造探索法である FACT (Mori et. al. 2002) に比して、より長い線維構造を抽出できることが分かった。また、光学顕微鏡画像向けに開発した神経線維追跡法 (Skibbe. et. al., 2014) を、高角度分解能拡散 MRI に適用可能となるように拡張を行い、マーモセットデータに適用した。その結果を前述の確率構造探索法と比較した結果、白質を通る神経線維構造に関してほぼ一致した結果が得られた。これにより、光学顕微鏡画像向けの手法が高角度分解能拡散 MRI にも適用できると考えられる。