

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 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
(英語) Brain Mapping by Integrated Neurotechnologies for Disease Studies
(Brain/MINDS)

研究開発課題名： (日本語) 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
(英語) Neural networks underlying higher brain functions in common marmosets

研究開発担当者 (日本語) 霊長類研究所 教授 中村 克樹

所属 役職 氏名： (英語) Primate Research Institute, Professor, Katsuki NAKAMURA

実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

II. 成果の概要 (総括研究報告)

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

繁殖ペア6組で繁殖を行なった。欧米のガイドラインに準拠する個別ケージを利用できるケージラックを試作し導入した。グルテンフリーの飼料を試作し、マーモセットに与えた。

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

タブレット型PCを用いた認知実験を可能とするソフトウェアを作成した。疾患モデルマーモセットの病態評価のため、メガネ型視線計測装置を用いたアイコンタクトの定量化を実現するビデオコーディングソフトを完成させた。眼球位置計測システムを用いたサッカー課題をマーモセットに訓練した。眼球運動課題に関しては、理化学研究所の岡野グループや京都大学伊佐グループと情報交換を行った。マーモセットの3次元運動の定量化に成功した。音声コミュニケーション行動の定量化を目指し、記録した音声データから半自動的に音声を分類することに成功した。神経回路の解明のため、ECoGによる神経活動の記録システムを導入した。

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

前部および後部帯状皮質への狂犬病ウイルスベクター注入実験を継続し、実験個体数を増やした。得られた組織標本を解析した結果、前部帯状皮質と後部帯状皮質がいずれも腹側線条体、背側線条体の両方

とループ回路を形成していることが示唆された。また、大脳基底核、さらに小脳からの多シナプス性入力構築様式が前部帯状皮質と後部帯状皮質で異なっていることが明らかになり、このことはそれぞれの領域の機能の違いを反映していると考えられる。加えて、狂犬病ウイルスベクターを用いた逆行性越シナプスの多重トレーシング法における、ベクター注入からデジタルスライド解析装置による撮像、解析までのパイプラインをほぼ確立した。

①-4 疾患／病態モデルマーマセットの作出

福島県立医科大学の小林和人教授との連携により、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) ベクターのマーマセット脳における外来遺伝子の導入効率を線条体および大脳皮質への入力系において比較、検討した。その結果、NeuRet ベクターは HiRet ベクターと同等以上の遺伝子導入効率を有し、さらに HiRet ベクターが注入部位周辺において重篤な炎症を引き起こすのに対して、NeuRet ベクターではほとんど炎症所見がみとめられないことが明らかになった。また、片側性パーキンソン病モデルマーマセットの運動機能を評価するために開発した行動解析システムを利用し、2頭のマーマセットにおいてタスクトレーニングを完了した。さらに、黒質ドーパミンニューロン特異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を開発するためのプロモータ検討実験をおこなった。

①-5 マーマセットおよび研究技術や環境の提供・支援

東京医科歯科大学の岡澤グループと共同研究で、マーマセットの疾患モデル作出を進めている。認知機能に及ぼす影響を検討するため空間位置記憶課題を訓練し、注入前のデータを取得した。また、東京医科歯科大学に赴き、外科的処置の方法を教授するとともに、モデル作出のためのウイルスベクター注入を行なった。北海道大学の山崎グループに脳の提供を行った。理化学研究所の小倉グループに未熟な生殖細胞の提供を行なった。国立精神・神経医療研究センターに赴き、脳脊髄液採取法について教授した。理化学研究所（和光）と繁殖飼育管理に関して情報交換を行なった。実験動物中央研究所と、下痢個体に対する糞便移植による腸内細菌叢移植療法に関する情報交換を行った。麻酔によりマーマセットで低酸素血症が起こりやすいことを明らかにした。MRI 装置内での体温低下を防ぐため、保温ベストを開発した。

②-1 ミクロコネクトミクス法の開発

先進的大規模脳データ処理手法の開発とデータベース技術の検討ならびに開発支援(中核拠点 B③-1)「データベース・データ解析の基盤技術開発」(中核拠点 B③-1)の実現を支援するため、大規模脳データ処理手法の開発とデータベース技術の検討を進め、構造・機能マップ構築に向けた技術開発支援を行った。Harvard 大学の Hans-Peter Pfisters グループが開発した方法を参考に、連続切片電子顕微鏡画像データのデータベース化方法と複数画像にわたるアラインメント法を開発した。二次元細胞膜セグメンテーション法を開発しピクセル単位で正解率 90%の性能を達成した。ノイズ強度評価法を実装し、最適なノイズ除去法の選択を可能とした。

②-2 メゾコネクトミクス法の開発

開発した二光子顕微鏡画像に対する大域的神経線維構造抽出法を、山森グループ（理研）のマーマセットデータに適用した。脳梁などにある長い神経線維やその周辺領域で交差している線維を抽出することが可能となった。人工データを用いた評価により、先行研究によるよりも偽陽性を減少させられること

を示した。

②-3 マクロコネクトミクス法の開発

高角度拡散 MRI 画像からの大域的神経線維構造抽出法を、岡野グループ（理研）から提供されたマーモセット拡散 MRI データに適用し、基本的な神経束の同定を行った。複雑ネットワークの解析に基づき、領域間の結合強度と距離とが指数減衰測の関係にあることを明らかにした。また、メゾコネクトミクスで得られた構造抽出法との間で、結合行列による比較を行い、両者の間での一致度が 70%程度であることを示した。

②-4 比較・統合コネクトミクス法の開発

マーモセット個体間およびマクロ（MRI 画像）とメゾ（二光子トモグラフィ画像）との間の位置合わせ技術の開発を進め、その評価を行った。これにより、個体間では灰白質と白質との境界を含めて連続性を保った位置合わせができていたことがわかった。一方で MRI と二光子トモグラフィの間では小脳付近を除いて連続性を保った位置合わせが可能であることがわかった。精度評価のために、理研グループと連携してマーモセット脳ランドマークを新たに定義した。これにより、マクロ-メゾ間で平均 200 ミクロン程度のずれが生じることがわかった。

①-1 Efficient breeding of marmosets having high sociality

We bred common marmosets with 6 breeding pairs. We newly developed a rack for marmoset cages to meet EU and USA guidelines. We made a trial product of gluten-free diet for marmosets.

①-2 Elucidating neural networks underlying higher brain functions in common marmosets

We developed software for marmoset cognitive testing with a tablet PC. To quantify eye contact behavior of marmosets, we developed video coding software to analyze data from an eyeglasses-type eye tracker. We trained marmosets to perform fixation and saccade tasks. We exchanged information about saccade tasks with Prof. Okano's group at Riken and Prof. Isa's group at Kyoto University. We could trace 3D movements of marmosets using video-recording system. We could semi-automatically categorize some vocalizations of marmosets from recorded data. To examine neural networks underlying higher cognitive functions, we introduced ECoG systems for recording neural activity.

①-3 Analysis of multisynaptic neural networks in marmoset cerebrum

We continued to perform experiments of multi-colored rabies injections into the anterior and posterior cingulate cortices of common marmosets. The results indicated that each cortical area might form loop circuits with both the ventral and the dorsal striatum. Also, we found that the structural bases of multisynaptic inputs from the basal ganglia and the cerebellum were different in the anterior and posterior cingulate cortices. This represents the functional difference between the two cortical areas. In addition, we were about to establish the pipeline from injecting rabies viral vectors to obtaining and analyzing images of retrograde transsynaptic labeling by the aid of the digital slide analyzer.

①-4 Development in marmoset models of brain disease and pathology

In collaboration with Prof. Kazuto Kobayashi, Fukushima Medical University, we compared, in the input systems

of the striatum and the cortex of common marmosets, the efficiency of retrograde gene transfer of the NeuRet (FuG-E type) vector vs. the HiRet (FuG-B2 type) vector, each of which exhibited highly-efficient retrograde delivery in the macaque brain. The entire results revealed that the NeuRet vector displayed gene transfer efficiency more than comparable to the HiRet vector, and that the HiRet vector, but not the NeuRet vector, caused drastic inflammatory events around the injection site. Moreover, we carried out task training in two marmosets by making use of a newly-developed behavior analysis system for examining motor activity in a marmoset model of hemiparkinsonism. In addition, we explored a promoter suitable for developing an adeno-associated viral vector that expresses alpha-synuclein specifically in nigral dopamine neurons.

①-5 Providing marmosets and its sample and supporting researcher

In collaboration with Prof. Okazawa's group (Tokyo Medical and Dental University), we generate a marmoset disease model. To assess cognitive function, we trained marmoset monkeys in a spatially delayed matching-to-sample task and collected pre-injection data. At Tokyo Medical and Dental University, we injected a virus vector into a temporal brain region to generate another marmoset disease model. We provided brain samples to Dr. Yamazaki's group (Hokkaido University) and Dr. Ogura's group (Riken). We taught a method to collect cerebral spinal fluid at National Center of Neurology and Psychiatry. We exchanged information about animal husbandry management with the staffs at Riken. In collaboration with Central Institute for Experimental Animals, we try a fecal microbiota transplantation to treat diarrhea in common marmosets. We reported hypoxemia after one shot anesthesia in marmosets. We developed a warm vest for marmoset MRI imaging.

②-1 Development of micro-connectomics

For "development of advanced big-data processing, data-base technology, and support other projects" (B③-1), we developed the following work items and provided technical support for constructing the structure/function map of the brain. Referring to the method developed by the Hans-Peter Pfisters group of the Harvard University, we developed a database of sequential slice electron microscopic images and an alignment method over multiple slice images. We developed two-dimensional cell membrane segmentation method and achieved performance of 90% pixel-wise accuracy. We implemented a noise intensity evaluation method to assess noise reduction part.

②-2 Development of meso-connectomics

We developed a global tracking method for neuronal axons from images of marmoset two-photon tomography. Our method could detect long fibers on the corpus callosum and also putatively crossing fibers. We found that the proposed method outperformed previous methods in terms of the false positive rate, when applied to artificially-produced neuronal fiber images.

②-3 Development of macro-connectomics

When applied to the high-angular resolution diffusion imaging data of the marmoset, our global tracking method was found to detect some basic nerve bundles. Using the connectivity analysis, we found an exponential decay rule between the distance and strength of two brain regions. We compared the connectivity matrix given by the meso-connectomics with that given by the macro-connectomics, then realized 70% concordance rate between them.

②-4 Development of comparative and integrative connectomics

We developed image registration techniques for comparing between different individuals and between macro (MRI) and meso (two-photon) images. According to our registration method, we found a satisfactory continuity of the boundaries between white and gray matters. We also found the continuity for the registration between meso and macro images except for the cerebellum regions. After setting the landmarks of the marmoset brain, we found that the registration error between meso and macro images was about 200 microns.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 6 件)

1. Konoike N, Miwa M, Ishigami A, Nakamura K. Hypoxemia after single-shot anesthesia in common marmosets. **Journal of Medical Primatology**. 2017 Mar 21. doi: 10.1111/jmp.12262.
 2. Takaji M, Takemoto A, Yokoyama C, Watakabe A, Mizukami H, Ozawa K, Onoe H, Nakamura K, Yamamori T. Distinct roles for primate caudate dopamine D1 and D2 receptors in visual discrimination learning revealed using shRNA knockdown. **Scientific Reports**. 2016 Nov 2, doi: 10.1038/srep35809.
 3. Skibbe H, Reisert M. Spherical tensor algebra: A toolkit for 3D image processing. **Journal of Mathematical Imaging and Vision**. 2017, 1–33.
 4. Murakami Y, Koyama M, Oba S, Kuroda S, Ishii S. Model-based control of the temporal patterns of intracellular signaling in silico. **Biophysics and Physicobiology**. 2017, 14, 29-40.
 5. Shikauchi Y, Ishii S. Robust encoding of scene anticipation during human spatial navigation. **Scientific Reports**, 2016, 6, 37599. doi:10.1038/srep37599.
 6. Oba S, Nakae K, Ikegaya Y, Aki S, Yoshimoto J, Ishii S. Empirical Bayesian significance measure of neuronal spike response. **BMC Neuroscience**, 2016, 17. doi: 10.1186/s12868-016-0255-x.
-

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Hypoxemia after single-shot anesthesia in common marmosets, ポスター, Konoike N, Miwa M, Ishigami A, Nakamura K, 第 39 回日本神経科学大会, 2016/7/20-22, 国内.
2. コモンマーモセットの Twin-fight, ポスター, 三輪美樹, 平成 28 年度サル類の疾病と病理のための研究会, 2016/07/02, 国内.
3. 線条体尾状核ドーパミン受容体 D2R の発現抑制によるコモンマーモセットの行動変化 (Behavioral change caused by reducing dopamine D2 receptor mRNA expression in the caudate nucleus of the common marmoset), ポスター, 竹本篤史, 高司雅史, 横山ちひろ, 渡我部昭哉, 水上浩明, 小澤敬也, 尾上浩隆, 山森哲雄, 中村克樹, 第 6 回マーモセット研究会, 2016/12/12, 国内.
4. マーモセット下痢治療法としての腸内細菌叢移植 (Fecal microbiota transplantation to treat diarrhea in common marmosets), ポスター, 三輪美樹, 福田真嗣, 井上貴史, 兼子明久, 石上暁代, 中村克樹, 第 6 回マーモセット研究会, 2016/12/12, 国内.
5. 京都大学霊長類研究所におけるマーモセットの健康診断 (Medical examination of common marmosets in Primate Research Institute, Kyoto University), ポスター, 石上暁代, 兼子明久, 三輪美樹, 中村克樹, 第 6 回マーモセット研究会, 2016/12/12, 国内.

6. マーモセット MRI 撮像用保温ベスト(Warm vest for marmoset MR imaging), ポスター, 中村克樹, 鴻池菜保, 三輪美樹, 本澤史章, 染谷成則, 第 6 回マーモセット研究会, 2016/12/12, 国内.
7. 線条体尾状核ドーパミン受容体 D2R の発現抑制によるコモンマーモセットの行動変化. ポスター, 竹本篤史, 中村克樹, 第 6 回生理研—霊長研—脳研合同シンポジウム, 2017/03/09-10, 国内.
8. Comparison of efficiency of retrograde gene transfer between lentiviral vectors pseudotyped with FuG-E and FuG-B2 glycoprotein in primate brains: Cortical input system, ポスター, Tsuge H, Uezono S, Tanabe S, Fujiwara M, Nagaya K, Sugawara M, Miwa M, Konoike N, Kato S, Nakamura K, Kobayashi K, Inoue K, Takada M, 第 39 回日本神経科学大会, 2016/7/22, 国内.
9. Comparison of the efficiency of retrograde gene transfer between lentiviral vectors pseudotyped with FuG-E and FuG-B2 glycoprotein in primate brains: Striatal input system, ポスター, Tanabe S, Uezono S, Tsuge H, Fujiwara M, Nagaya K, Sugawara M, Miwa M, Konoike N, Kato S, Nakamura K, Kobayashi K, Inoue K, Takada M, 第 39 回日本神経科学大会, 2016/7/22, 国内.
10. The lentiviral vector pseudotyped with FuG-E glycoprotein is more suitable, compared with FuG-B2, for retrograde gene transfer in the cortical input system of primate brains. ポスター, Tsuge H, Uezono S, Tanabe S, Fujiwara M, Sugawara M, Miwa M, Konoike N, Kato S, Nakamura K, Kobayashi K, Inoue K, Takada M, 第 6 回マーモセット研究会, 2016/12/12, 国内.
11. Differences in efficiency of retrograde gene transfer and cytotoxicity between lentiviral vectors pseudotyped with FuG-E and FuG-B2 glycoprotein in primate brains. ポスター, Sugawara M, Tanabe S, Uezono S, Tsuge H, Fujiwara M, Miwa M, Konoike N, Kato S, Nakamura K, Inoue K, Takada M, Kobayashi K, 第 6 回マーモセット研究会, 2016/12/12, 国内.
12. 狂犬病ウイルスベクターを用いた逆行性越シナプスのラベル法によるマーモセット帯状皮質への入力様式の解明: 大脳基底核からの入力について, 口頭, 上園志織, 柘植仁美, 田辺創思, 藤原真紀, 長屋七奈, 長屋清美, 井上謙一, 高田昌彦, 第 112 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2017/3/29, 国内.
13. Mathematical modeling and dynamical analysis using structural and functional connectivity, ポスター, Tsukada H, Hamada H, Nakae K, Ishii S, Hata J, Okano H, Doya K. AINI 2016, 2016/5/28, 国内.
14. Brain decoding can be improved by diffusion imaging based registration, ポスター, Fuchigami T, Shikauchi Y, Nakae K, Shikauchi M, Ishii S. 4th AINI and 14th INCF Nodes Workshop, PS-19, 2016/5/28, 国内.
15. Descriptive, generative, and hybrid approaches for neural connectivity inference from neural activity data, ポスター, Baek J, Oba S, Yoshimoto J, Doya K, Ishii S. Computational Neuroscience 2016, 2016/7/5, 国外.
16. Machine-learning approaches to decoding neural activities, 口頭, Ishii S. CNS Workshop on Statistical Analysis of Neural Time Series, 2016/7/7, 国外.
17. Delayed activation of adenylate cyclase 1 as a causality detector of Action-Reward conditioning: Simulation and experiments, 口頭, Urakubo H, Aoki K, Yagishita S, Kasai H, Ishii S. Neuroscience 2016, 2016/7/22, 国内.
18. Machine-learning approaches to decoding biological systems, 口頭, Ishii S. OOIB Summer School 2016, 2016/8/18, 国内.

19. The role of adenylylase 1 in reinforcement synaptic plasticity: a modeling and experimental study, ポスター, Urakubo H, Aoki K, Yagishita S, Kasai H, Ishii S. SfN annual meeting (126.03), 2016/11/13, 国外.
 20. 機械学習に基づくブレインデコーディング, 口頭, 石井 信, 電子情報通信学会情報理論研究会, 2016/12/13, 国内.
 21. A model-free supervised learning approach for the estimation of fiber orientation distributions from diffusion-weighted MRI images of the brain white matter, ポスター, Matsui K, Skibbe H, Reisert M, Ishii S. Keystone Symposium Connectomics(X2), 2017/3/7, 国外.
 22. Estimating similarity measure of brain image registration, ポスター, Ito R, Nakae K, Ishii S. Keystone Symposium Connectomics(X2), 2017/3/6, 国外.
-

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 毎日新聞のコラム (中村克樹) : 「中村克樹の Do you 脳?」, 毎日新聞(隔週連載), 2016, 国内(脳研究や革新脳のことを広く一般の人に紹介している)
2. 兵庫県小野市の小学5年生向けの体験学習 (中村克樹) : 小野市うるおい交流館 エクラ, 小野市, 兵庫, 2016/10/26, 国内. (脳の不思議や脳そのものに対する興味をもってもらう授業をおこなっている)

(4) 特許出願