慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	自由行動下カルシウムイメージングによる霊長類の複雑な歩行運動メカニズムの解明
Sub Title	Elucidation of complex gait locomotion mechanism in primates by free-living calcium imaging
Author	近藤, 崇弘(Kondō, Takahiro) 佐藤, 裕太(Satō, Yūta)
Publisher	
Publication year	2021
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2020.)
JaLC DOI	
Abstract	本研究では、マーモセットの線条体における神経活動を小型顕微鏡によるカルシウムイメージングにより観察した。D1細胞、D2細胞特異的にイメージングするために、細胞種特異的プロモーターの開発をおこなった。また、介入実験として6-OHDA投与によるパーキンソン病モデルを作成した。先行研究を遵守してMedial forebrain bundleへと6-OHDAを投与したところ、マーモセットの歩行運動機能が著しく低下し、PDモデルを作成することはできた。さらに、これらの行動評価としてDeep Learningを用いた行動トラッキング系を確立しており、本技術を用いたPD症状の定量化を行なった。 In this study, we observed neural activity in the striatum of the marmoset using calcium imaging with a small microscope, and developed cell type-specific promoters for D1 and D2 cell-specific imaging. We also created a Parkinson's disease model by administering 6-OHDA as an intervention experiment. When 6-OHDA was administered to the medial forebrain bundle in compliance with previous studies, the marmoset's gait motor function decreased significantly, and we were able to create a PD model. In addition, we established a behavioral tracking system using Deep Learning to evaluate these behaviors, and quantified the PD symptoms using this technology.
Notes	研究種目：若手研究 研究期間：2019～2020 課題番号：19K16190 研究分野：神経科学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_19K16190seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　３ 年　 ６ 月　 ２ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：若手研究
研究期間：2019～2020
課題番号：１９Ｋ１６１９０

研究課題名（和文）自由行動下カルシウムイメージングによる霊長類の複雑な歩行運動メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of complex gait locomotion mechanism in primates by free-living calcium imaging

研究代表者
近藤　崇弘（Kondo, Takahiro）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：７０７５９８８６

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、マーモセットの線条体における神経活動を小型顕微鏡によるカルシウムイメージングにより観察した。D1細胞、D2細胞特異的にイメージングするために、細胞種特異的プロモーターの開発をおこなった。また、介入実験として6-OHDA投与によるパーキンソン病モデルを作成した。先行研究を遵守してMedial forebrain bundleへと6-OHDAを投与したところ、マーモ セットの歩行運動機能が著しく低下し、PDモデルを作成することはできた。さらに、これらの行動評価としてDeep Learningを用いた行動トラッキング系を確立 しており、本技術を用いたPD症状の定量化を行なった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究の３つの柱であった(1)プロモーター開発(2)マーモセット線条体イメージング(3)行動解析技術開発のうち(1)(3)を確立したものの、今後より良い技術をさらに導入することが線条体の特異的イメージングに必要である。特に、プロモーター開発においては近年シングルセル解析技術の発展により、エンハンサーを利用した人工プロモーター開発技術が進んでいる。D1・D2ターゲティングもこれらの開発状況との兼ね合いで今後より特異的なイメージングを進めていく。今後は疾患研究を進めることでパーキンソン病のメカニズム解明や治療薬検証に展開する。

研究成果の概要（英文）：In this study, we observed neural activity in the striatum of the marmoset using calcium imaging with a small microscope, and developed cell type-specific promoters for D1 and D2 cell-specific imaging. We also created a Parkinson's disease model by administering 6-OHDA as an intervention experiment. When 6-OHDA was administered to the medial forebrain bundle in compliance with previous studies, the marmoset's gait motor function decreased significantly, and we were able to create a PD model. In addition, we established a behavioral tracking system using Deep Learning to evaluate these behaviors, and quantified the PD symptoms using this technology.

研究分野：神経科学

キーワード：マーモセット　カルシウムイメージング　小型蛍光顕微鏡　線条体　パーキンソン病　AAV

※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、研究者個人に帰属します。

様　式　C－１９、F－１９－１、Z－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

Inscopix 社が開発した小型顕微鏡 nVista は、内視鏡レンズを脳へ埋植することで自由行動下における数 100 個の神経細胞の活動を Ca イメージングにより観察することができる装置である(Ghosh et al., *Nat Methods.* 2011)。申請者これまでに霊長類初となる自由行動下でのマーモセットのカルシウムイメージングに成功した (Kondo et al., *Cell Rep.* 2018)。従来の 2 光子顕微鏡によるイメージング技術は動物の頭部を装置に固定する必要があったが、そのような行動制限のない小型顕微鏡は複雑な運動制御中の神経活動を計測することを可能とする。そこで、本研究ではマーモセット歩行運動中の線条体神経活動を解析することで、ヒトに近い複雑な運動制御のメカニズムを解明できるのではないかと考えた。

２．研究の目的

線条体は運動制御に重要な役割を担う。パーキンソン病などで線条体の機能異常が起きると、無動や固縮などの様々な運動障害が生じる。これまで、線条体はアクセルの役割を担う D1 受容体神経(以下 D1 細胞)と、ブレーキの役割を担う D2 受容体神経(以下 D2 細胞)がオン・オフの関係で機能することで運動の開始・停止を制御すると教科書的には考えられてきたが、近年の光遺伝学や人工知能研究の発展により D1 細胞と D2 細胞は相対する関係でなく、お互いが協調して(運動開始時に両者が同期的に発火など)複雑な動作を制御していることが明らかになってきた(Parker et al., *Nature* 2018, Markowitz et al., *Cell* 2018)。しかし、ヒトのより複雑な運動制御メカニズムを知るためには霊長類による 3D の歩行運動からのアプローチにより知見を蓄積する必要がある。そこで、本研究ではマーモセットを用いて歩行運動中の線条体の解析することで、ヒトに近い複雑な運動制御のメカニズムを解明することを目指した。

３．研究の方法

(1)D1・D2 細胞特異的イメージングのためのウイルス開発(プロモーター開発)
細胞型ターゲティングのために、げっ歯類ではしばしば Cre-driver 系統が用いられてきたが、霊長類では Cre-driver 系統が容易には利用できないため、細胞型特異的なプロモーターを有するウイルスベクターを開発する必要がある。そこでマーモセット用の D1・D2 受容体特異的プロモーターをそれぞれ開発し、げっ歯類の線条体においてその特異度を検証した。

(2)マーモセット線条体記録
　マーモセット線条体のカルシウムイメージングをおこなった。具体的には、運動野を微小電極刺激により同定し、一次運動野の肘支配領域から後方 1.5mm, 側方 1.5mm の位置に既に運動野で実績のある AAV(Thy1S-tTA と TRE-GCaMP 混合による Tet-off システム)を 6.5mm の深さに注入する。AAV 注入から 2 週間後に小型顕微鏡レンズを刺入・固定し、脳の炎症から回復するためにさらに 3 週間待ち線条体のイメージングをおこなった。

(3)マーモセット行動解析システムの開発
　マウスの機械学習を用いた先行研究では、マウスの動作を「立ち止まる」「四つんばいになる」「移動する」の 3 種類の単語に分け、さらにこの組み合わせを『移動してから立つ』のように文法として検出している。マーモセットはより複雑で、「右/左方向を向いたまま前に進む」「横歩き」「急発進」「急停止」などの複数の単語が存在しており、この組み合わせば膨大になると予想される。まず初めの段階として、マウスの動作系を立ち上げ、さらにマーモセットにそのままの系で適応させることを目指した。

４．研究成果

(1)D1・D2 細胞特異的イメージングのためのウイルス開発(プロモーター開発)
マウスの D1 細胞には Tac1 遺伝子が、D2 には Penk 遺伝子がそれぞれ特異的に発現している。そこで、ECR　browser にてマウスとヒトの相同性解析をおこないマーモセット TAC1、PENK 遺伝子の上流に哺乳類間で保存されている領域を同定した。この保存領域をマーモセットのゲノムから単離し、レポーター遺伝子とともに AAV にパッケージングし(それぞれ AAV-cjTAC1, AAV-cjPENK)、ラット線条体へ注入した。
AAV-cjTAC1 では GCaMP 発現細胞の 79%　が DRD1 免疫反応陽性であったが、GCaMP 発現細胞の全てが PENK 免疫反応陽性であった。また、AAV-cjPENK では GCaMP 発現細胞の 17%が DRD1 免疫反応陽性であり、GCaMP 発現細胞の全てが PENK 免疫反応陽性であることがわかった。

(2)マーモセット線条体記録
Tet-off システムにより、マーモセットの線条体から 50-80 個程度の同時細胞観察が可能となった。マーモセットにおけるレバー引き課題中の神経活動を記録し、神経活動からレバー軌跡をデ

コーディグしたところ(サポートベクトルマシンを使用)、ある程度の精度でレバー軌跡の予測が可能なことがわかった($R^2 = 0.630 \pm 0.159$ (標準偏差，10 サンプル))。同解析を一次運動野でおこなったとき($R^2 = 0.851 \pm 0.109$ (標準偏差，5 サンプル))と比較するとやや精度が低いものの、線条体においても精緻な運動制御がおこなわれることが予測された。

(3)マーモセット行動解析システムの開発
DeepLabCut は深層学習により動物の身体を自動でトラッキングできる技術で、オープンソースとして利用可能である(Mathis et al., *Nat Neurosci.* 2018)。この技術は日々進化しており、最近では 3D 環境で自由行動するマーモセットの複数個体同時追尾が可能になる技術が実装された(version 2.2)。本研究でにおいても DeepLabCut 技術を実装するために、まずはマウスとマーモセットの 2D 歩行における技術の実装をおこなった。この技術を用いて脊髄損傷モデルにおける歩行障害を詳細に定量化することに成功した(Sato and Kondo et al., Submitted)

行動解析の技術やカルシウムイメージングの技術は国内外における神経科学研究において最もレッドオーシャンの領域の一つである。そのため、技術の進歩が非常に早く次々と新しい技術が開発されている現状である。本研究の３つの柱であった(1)プロモーター開発(2)マーモセット線条体イメージング(3)行動解析技術開発のうち(1)(3)においては、より良い技術をさらに導入することが線条体の特異的イメージングに必要である。特に、プロモーター開発においては近年シングルセル解析技術の発展により、エンハンサーを利用した人工プロモーター開発技術が進んでおり、これまで不可能であった parvalbumin 細胞のターゲティングなどが報告されている(Vormstein-Schneider et al., *Nat Neurosci.* 2020)。D1・D2 ターゲティングもこれらの開発状況との兼ね合いで今後より特異的なイメージングを進めていく。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計2件（うち査読付論文　2件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　2件）

１．著者名 Leventoux Nicolas、Morimoto Satoru、Imaizumi Kent、Sato Yuta、Takahashi Shinichi、Mashima Kyoko、Ishikawa Mitsuru、Sonn Iki、Kondo Takahiro、Watanabe Hirotaka、Okano Hideyuki	４．巻 9
２．論文標題 Human Astrocytes Model Derived from Induced Pluripotent Stem Cells	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Cells	６．最初と最後の頁 2680～2680
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells9122680	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 Nemoto Akisa、Kobayashi Reona、Yoshimatsu Sho、Sato Yuta、Kondo Takahiro、Yoo Andrew S.、Shiozawa Seiji、Okano Hideyuki	４．巻 10
２．論文標題 Direct Neuronal Reprogramming of Common Marmoset Fibroblasts by ASCL1, microRNA-9/9*, and microRNA-124 Overexpression	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Cells	６．最初と最後の頁 6～6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells10010006	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 －

〔学会発表〕　計2件（うち招待講演　1件／うち国際学会　1件）

１．発表者名 Takahiro Kondo, Yuta Sato, Tetsuo Yamamori, Akiya Watakabe, Mark J. Schnitzer, Junichi Ushiba , Hideyuki Okano
２．発表標題 Miniture microscopes for large-scale imaging of neuronal activity in naturally behaving marmosets
３．学会等名 Marmoset bioscience symposium（国際学会）
４．発表年 2019年

１．発表者名 近藤崇弘
２．発表標題 小型蛍光顕微鏡を用いた自由行動下のマーモセットカルシウムイメージング
３．学会等名 第２回 遺伝子導入技術の利用による霊長類脳機能操作とイメージング研究会（招待講演）
４．発表年 2021年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究協力者	佐藤　裕太 (Sato Yuta)	慶應義塾大学 (32612)	

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