

# 研究報告書

## 「光操作による神経ネットワークの高解像度 5D 解析法の確立を目指した基盤技術開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2016 年 10 月 ~ 2020 年 3 月

研究者: 井上 謙一

### 1. 研究のねらい

複雑かつ精微な脳内ネットワークによって実現する高次脳機能のメカニズムを理解するとともに、脳機能障害としての精神・神経疾患の病態を把握し、効果的な治療法を開発するために、ヒトに近縁の霊長類などの高次脳機能を持つ動物において、特定の神経回路機能に介入し、行動学的および生理学的解析を行う戦略は極めて有効である。これまで研究代表者は、光遺伝学を利用して、ターゲットとする神経路のみを選択的に活性化し、神経活動および行動の変化を誘発することに霊長類で初めて成功した。本研究では、種々の要素技術開発を行うことにより、この神経路選択的な光操作による脳機能解析法を、個々の神経細胞の活動と神経ネットワークとしての活動、およびそれにより発現する行動との関係性を明らかにできる、神経回路の刺激・活動計測法へ発展させることを目的とする。具体的には、効果的な光刺激を実現するための遺伝子導入手法を確立するとともに、記録部位および刺激部位を拡大し、特定の神経投射を介する入力、ターゲットである脳領域内のネットワークダイナミクスにどのような影響を与え、それが行動発現にどのように寄与するのかを詳細に解析できる新規の光操作・計測手法を、霊長類を対象として開発することを目指す。

この目標を達成するために、本研究では、脳のサイズなどの問題から光遺伝学の利点を生かしくい霊長類を対象として、以下の4つの要素技術開発を実施する。

- A) 効果的な光刺激を実現するために、目的ニューロン集団に安定かつ十分な発現を担保できる遺伝子導入手法
- B) 十分なオプシン発現を確認した上で刺激実験を開始することを可能とする、生体内でのオプシン発現状態の可視化手法
- C) 特定の投射系の選択的な光刺激が、領域間ネットワークおよび領域内ネットワークの活動に与える影響を解析する手法
- D) 光刺激を広範囲かつ選択的に実施すると同時に、同刺激が領域内ネットワークの活動に与える影響を解析する手法

また、本研究では開発する技術を利用して、霊長類の眼球運動情報処理ネットワークの動作原理、特に上丘における大脳皮質および大脳基底核からの入力、上丘内の情報処理にどのような影響を与えて眼球運動の発現に寄与するのかを解析することを目標とする。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究では霊長類を対象とした神経路選択的な光操作法を、個々の神経細胞の活動と神経ネットワークとしての活動、およびそれにより発現する行動との関係性を明らかにできる、神経回路の刺激・活動計測法へ発展させることを目的とした基盤技術開発を行った。ま

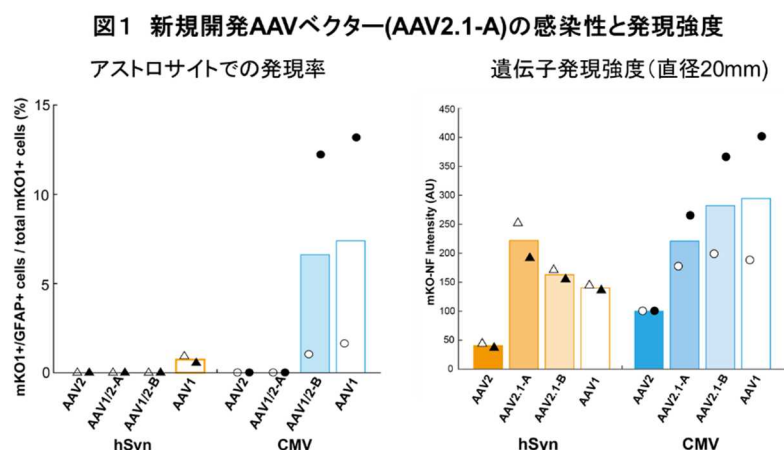
ず、効果的な光刺激を実現する遺伝子導入手法として、新規改変 AAV ベクター(AAV2.1)を開発し、同ベクターが、霊長類において高い神経細胞選択性と外来遺伝子発現能を有し、霊長類における効率かつ安定的な神経活動操作・計測を実現することを実証した。神経路選択的な光操作によるネットワーク解析法としては、まず米国 NIH との共同研究により、刺激の価値をコードする尾状核尾部を起始とする直接路・間接路の選択的光刺激を試みた。その結果、両経路で投射先において価値をコードするニューロンに光刺激による抑制が観察されること、直接路の刺激では刺激部位である黒質網様部が投射する上丘において長い脱抑制反応が見られ、また刺激点受容野へのサッカード頻度が上昇することが明らかとなり、同経路が上丘を介して直接眼球運動をドライブできることが示唆された。特定の投射系の選択的な光刺激が領域内ネットワークの活動に与える影響を解析する手法としては、光ファイバー出射ポート付きの多点電極を利用した。上丘の一点における前頭眼野ニューロンの軸索刺激に対する上丘の全層からのニューロン記録を試みたところ、これに一部成功し、前頭眼野 上丘投射系の光刺激による上丘活動の変化様式が固視課題時とサッカード課題時で大きく異なること、刺激効果は比較的長期間持続することなどが示唆された。また、光刺激を広範囲かつ選択的に実施すると同時に、同刺激が領域内ネットワークの活動に与える影響を解析する手法として、ドイツ・フライブルグ大学との共同研究により、マイクロ高輝度 LED を実装した刺激用シリコンプローブと記録用プローブをスタック結合させた刺激・記録プローブを開発し、ラットにおいて層選択的な光刺激と多層からの神経活動記録を実現した。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A 「神経細胞選択的かつ高発現型のアデノ随伴ウイルスベクターの開発」

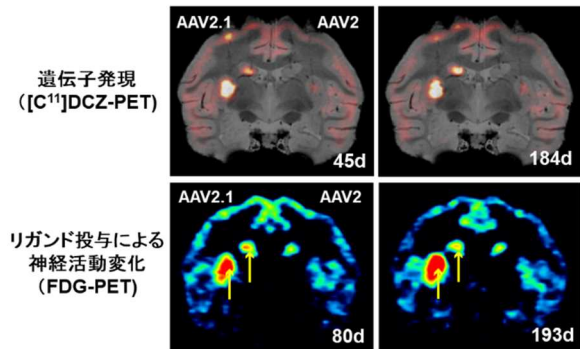
霊長類の活動操作実験において多様な目的に対応することが可能で、神経路選択的な光刺激法等を安定かつ効率的に実施することを可能とするベクターシステムを確立することを目指した。具体的には、高い遺伝子発現能に加え、脳内での炎症反応に関連することが示唆された(論文1)グリア感染能を抑えた AAV ベクターの開発を行い、高いニューロン特異性を有する AAV2 と強い外来遺伝子発現能を持つ AAV1 のモザイク AAV ベクター(AAV2.1)を開発した。GFP 遺伝子を挿入したベクターを2頭のマカクサル脳に注入し、組織学的解析を実施した結果、当該ベクターが AAV2 と同等のニューロン特異的な感染能を保持しつつ、AAV1 と同等以上の

外来遺伝子発現能を示すことを明らかにした(図1)。このベクターをベースとして、ニューロン特異的プロモータと発現増強配列を搭載したベクターを開発し、DREADD 発現ベクタ



ーを2頭のマカクサル線条体に注入した実験系において、同ベクターが1年以上にわたり導入遺伝子を安定的に高いレベルで発現し、DREADD リガンド投与による神経活動変化を誘導できることを、放射能医学総合研究所南本敬史チームリーダーとの共同研究により明らかにした(図2)。また、組織学的解析により、当該ベクターが主に注入部位のニューロンの細胞体や樹状突起から感染し、また注入部位に顕著な炎症反応は見られないことを明らかにした(その他成果3)。さらに、同ベクターを利用してマカクサル前頭眼野ニューロンおよびドーパミンニューロンの光刺激による活動操作に成功したほか、大阪大学藤田一郎教授との共同研究により、GCaMP 遺伝子発現 AAV2.1 ベクターを利用することでマカクサルにおける視覚野の2光子カルシウムイメージングに成功した。現在原著論文の作成を進めている。

図2 AAV2.1による霊長類脳活動操作



### 研究テーマ B 「生体内でのオプシン発現状態の可視化手法の開発」

実験が長期間に及ぶことの多い霊長類における光遺伝学的実験では、刺激実験前に、目的とする部位に十分な遺伝子発現が生じているかを確認できることが好ましい。本テーマでは近年放医研南本チームリーダーとの共同研究により化学遺伝学における DREADD レセプターの発現動態を PET で可視化することに成功した(図2)ことにヒントを得て、タンパク-化学物質の選択的結合を利用した光感受性タンパク発現状態の生体モニタリング法の開発を共同研究 FS により実施した。その結果、マカクサル脳内でニューロン内に発現させた eDHFR の発現を放射性標識 TMP により PET で検出することに成功したが、組織学的解析で示された eDHFR 発現量と PET シグナル強度は比例関係にないことが示唆された。この原因として放射性標識 TMP の細胞内取り込み効率がニューロン種により異なる可能性を考え、2種の細胞膜外局在型 eDHFR 発現ベクターを開発し、マカクサル脳内に注入した。今後細胞内 eDHFR と細胞膜外局在 eDHFR の発現量と PET シグナルの関係性を検討し、最終的に光感受性タンパクの発現量を高精度で検出する手法として確立させることを目指す。

### 研究テーマ C 「神経路選択的な光刺激を利用した、領域間および領域内ネットワーク解析手法の確立」

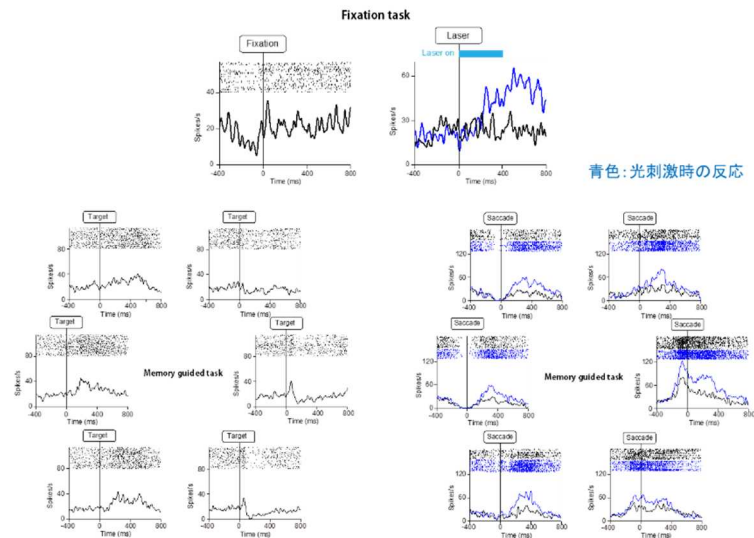
神経路選択的な光刺激を利用した領域間ネットワーク解析として、米国 NIH 彦坂興秀氏との共同研究により、刺激の価値をコードする尾状核尾部に ChR2 発現ベクターを注入し、大脳基底核内部回路のうち直接路(尾状核 黒質網様部)と間接路(尾状核 淡蒼球内節)を選択的に光刺激する実験を行った。その結果、いずれの刺激においても光刺激が投射先である黒質網様部、淡蒼球内節の価値に反応するニューロンの活動を抑制することが確認されたが、刺激の活動変化は黒質網様部と淡蒼球内節で異なっており、特に淡蒼球内節では大きなバウンド活動が見られた。また、直接路の刺激においては黒質網様部が投射する上丘において長い脱抑制反応が見られ、Free View 課題において受容野へのサッカード頻



度が上昇することが明らかとなり、尾状核尾部 - 黒質網様部の経路が上丘を介して直接眼球運動をドライブできることが示唆された(その他成果1、Amita et al., in revision)。

一方、領域内ネットワーク解析手法として、光刺激による特定神経路の選択的活動制御と多点(多層)記録の併用による層ダイナミクス解析手法の確立をマカサル前頭眼野 上丘路をターゲットとして進めた。マカサルに固視課題および視覚誘導性サカード課題、記憶誘導性サカード課

図3 前頭眼野—上丘投射の光刺激に対する上丘ニューロンの応答例



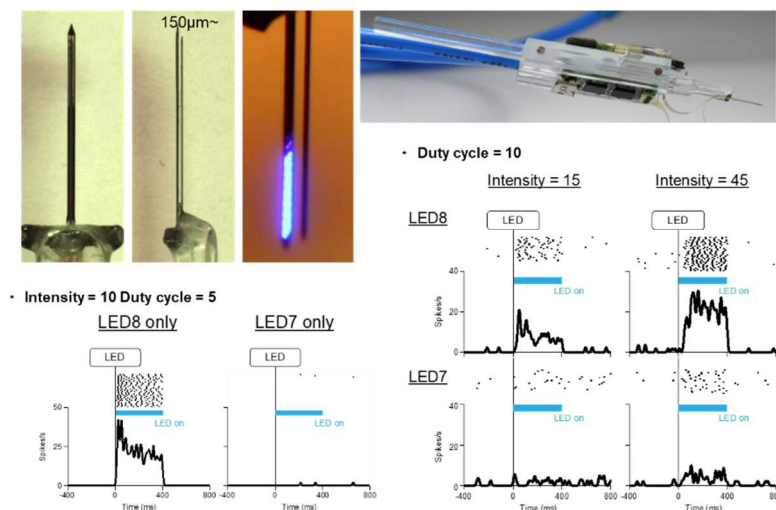
題のトレーニングを行い、前頭眼野の眼球運動誘発部位に ChR2 を発現する AAV2.1 ベクターを注入した。ついで、光ファイバー出射ポート付きの多点電極を利用して、上記課題実行中のサルに対し、上丘の一点における前頭眼野ニューロンの軸索刺激に対する上丘の全層からのニューロン記録を試みた。その結果、上丘の一点刺激において多層のニューロンの活動が変化することが確認され(図3)、前頭眼野 上丘投射系の光刺激による上丘活動の変化様式が固視課題時とサカード課題時で大きく異なること、刺激効果は比較的長期間持続すること、および固視課題時・眼球運動課題時の活動パターンと光刺激に対する反応パターンに相関があることが示唆された。特に固視課題時には多くのニューロンで強い抑制が掛かっていることが示唆されたため、今後 Free View 課題を追加して記録実験を継続する。同実験では上丘の一点における光軸索刺激と多層からの記録を両立させることには成功したものの、単一の電極とファイバーを利用した自身の先行研究と比較すると、光ファイバー出射ポートの位置とサイズの問題のため、刺激軸索の直接投射を受けるニューロンの記録が難しく、また固視課題中の眼球運動の惹起にも至らなかった。特定投射系選択的な光刺激による領域内ネットワーク活動の変化を解析するためには、より記録点近傍への光刺激を実施する必要があると考えられたため、今後領域内連携によりそのような刺激と記録を実現する電極の開発と評価を進める。また、黒質網様部 上丘路の光刺激に関しては、開発したベクターと hDlx プロモータを利用して、黒質網様部 GABA ニューロンの上丘における軸索に高効率にハロロドプシンを発現させることに成功したが、光刺激による神経活動記録には至っていないため今後進める予定である。

#### 研究テーマD「広範囲かつ選択的な光刺激による領域内ネットワーク解析手法の確立」

脳の大きな霊長類において光遺伝学を効率的に機能させるには、広い範囲における光刺激が必要となる。また、光刺激による領域内ネットワーク解析のためには、多点・多層記録法により同一ニューロンを記録しつつ、刺激点を変化させることが有用と考えられる。本テ

マでは、ドイツ・フライブルグ大学との共同研究により、マイクロ高輝度LEDを実装した刺激用シリコンプローブと記録用プローブをスタック結合させた刺激・記録プローブの開発を行い、同プローブを利用して、ChR2発現ベクターを注入したラットにおいて、層選択的な光刺激と多層からの神経活動記録

図4 ラット運動野における層選択的光刺激・多層神経活動記録



を同時に行うことに成功し、温度上昇を抑えた刺激パラメーターでも測定ニューロンの活動上昇を確認した(図4)。また、同プローブの霊長類脳への適用実験を行ったが、硬膜貫通方法に問題が生じ、霊長類脳での層選択的な光刺激と多層からの神経活動記録には至っていない。現在専用の硬膜貫通器を試作済みであり、これを利用することで同プローブの霊長類への適用を目指すとともに、専用のバキュームインサーターなどを開発して刺激記録実験における安定性や利便性の向上を図っている。

### 3. 今後の展開

研究テーマAで開発したベクターは、テーマ内で行った検証実験以外にも、国内外の複数の霊長類研究者と行っている化学遺伝学・光遺伝学的活動操作などで良好な結果を示している。今年度中の原著論文投稿を目指すとともに、今後はニューロン種選択的遺伝子発現法などの開発を通して、より有用性を高める研究を進めていきたい。研究テーマBに関しては、得られた有望な結果を発展させて、光感受性タンパク質の発現量を高精度で検出する手法として確立させることを目指すとともに、大型動物における汎用的な目的遺伝子発現の生体モニタリング法への応用を検討する。研究テーマCに関しては、神経路選択的な光刺激法の領域間ネットワーク解析における有用性が示されたため、今後この手法の霊長類への適用を進めていく。また、電極の開発等を進めて領域内ネットワーク解析へも適用できる手法への発展を目指すとともに、上丘への入力の上丘内部回路動態に与える影響の解明を目指す。研究テーマDに関しては既にげっし類では領域内ネットワーク解析に有用な刺激・記録法となったと考えられるため、原著論文として発表し広めるとともに、霊長類への適用を進め、将来的にはマルチシャंक埋め込みプローブに発展させることを目指す。

### 4. 自己評価

本研究では霊長類を対象とした神経路選択的な光操作による脳機能解析法を、個々の神経細胞の活動と神経ネットワークとしての活動、およびそれにより発現する行動との関係性を明らかにできる、神経回路の刺激・活動計測法へ発展させることを目的とした基盤技術開発を行った。実施した研究テーマ4つ全てで一定の進展が見られた。まず研究テーマAでは霊長類での

神経活動操作・神経活動イメージングを促進していくために必須と考えられる神経細胞選択的かつ高発現型の AAV ベクターを開発することができ、1年以上の長期間にわたる安定的な遺伝子発現とそれに伴う神経活動制御を実現した。同ベクターは既に国内外の複数の霊長類研究者と行っている化学遺伝学・光遺伝学的活動操作などで良好な結果を実現しており、今後長期的な研究期間を要する霊長類の神経活動操作・神経活動イメージングに極めて有用なベクターとなることが考えられる。研究テーマ B は当初計画には無かったが、領域内に合成化学の専門家がいたことにより領域会議を通じて着想に至り、共同研究 FS として実施した結果、マカクサル脳内での遺伝子発現の PET 検出に成功した。現時点では発現量とシグナル強度比などの課題により実用的とは未だ言えないものの、大型動物における汎用的な目的遺伝子発現の生体モニタリング法へ発展する可能性がある結果と考えられる。また、MRI など他の検出法への応用も期待できる。研究テーマ C に関しては、本研究の基盤となった研究(Inoue et al., 2015)以来、刺激による行動変化の報告がなかった霊長類において、神経路選択的な光刺激を他の神経路(大脳基底核神経回路)および他の伝達系(抑制性投射)で実現でき、また刺激部位から投射を受ける領野での活動変化も記録できた。これにより、霊長類領域間ネットワーク解析における有用性が示されたと考えている。一方、神経路選択的な光刺激法の領域内ネットワーク解析に関しては、特定の一点における光軸索刺激と多層からの記録を両立させることには成功したものの、刺激軸索の直接投射を受けるニューロン記録には電極の改良を含めた更なる実験の必要性が示唆された。また刺激軸索の直接投射を受けないニューロン記録が可能になったことからいくつかの新しい知見が得られたものの、上丘への入力为上丘内神経ネットワークに与える効果の解明には至っておらず、今後の課題となっている。研究テーマ D はチャレンジな課題であったが、共同研究先との緊密な連携により、げっし類においてユニークな刺激実験系を確立することができた。今後連携を維持して早急に霊長類への適用を進めたい。

合成化学研究者、プローブ開発研究者との連携は、本領域に参加していなければ成し得なかったと考えられる。霊長類へ新規技術を導入していくにあたり、他分野の専門家と直接ディスカッションし共同で開発を進めることは極めて効果的であり、非常に貴重かつ有意義な期間であった。今後期間内に生まれた共同研究をさらに発展させていきたい。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Tanabe S, Uezono S, Tsuge H, Fujiwara M, Miwa M, Kato S, Nakamura K, Kobayashi K, \*Inoue K, \*Takada M (2019) A note on retrograde gene transfer efficiency and inflammatory response of lentiviral vectors pseudotyped with FuG-E vs. FuG-B2 glycoproteins. Scientific Reports, 9: 3567.
2. Kubota S, Sidikejiang W, Kudo M, Inoue K, Umeda T, Takada M, \*Seki K (2019) Optogenetic recruitment of spinal reflex pathways from 1 large-diameter primary afferents in non-transgenic rats transduced with AAV9/Channelrhodopsin 2. Journal of Neurophysiology, 597:5025-5040, 2019

### (2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

< 学会発表 >

1. Amita H, Kim H.F, Inoue K, Takada M, Hikosaka O. Optogenetic modulation of saccade-controlling circuits in the monkey basal ganglia. Neuroscience 2017, Washington, DC, USA
2. Maeda K, Inoue K, Takada M, Hikosaka O. Pathway-selective optogenetic modulation of amygdala-basal ganglia circuits in macaque monkeys. Neuroscience 2019, Chicago, USA
3. Kimura K, Nagai Y, Tanabe S, Zheng A, Fujiwara M, Nakano M, Minamimoto T, Inoue K, Takada M. The modified adeno associated virus vectors enable neuron specific efficient gene transduction in the primate brain. Neuroscience 2019, Chicago, USA

< 総説 >

4. \*Galvan A, \*Stauffer WR, Ackerson L, El-Shamayleh Y, Inoue K, Ohayon S, Schmid M. (2017) Nonhuman primate optogenetics: Recent advances and future directions. J Neurosci. 37:10894-10903
5. \*Matsumoto M, Inoue K, Takada M. (2018) Causal role of neural signals transmitted from the frontal eye field to the superior colliculus in saccade generation. Front Neural Circuits. 12:69