

研究報告書

「動物行動の神経基盤解明のための非侵襲光操作法の開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2016 年 10 月 ~ 2020 年 3 月

研究者: 山下 貴之

1. 研究のねらい

体外から安全かつ自由に特定の細胞機能を操作することができれば、科学研究における介入実験の手段としてのみならず、様々な疾患の治療手段として幅広く活用されと考えられる。近年、藻類などが持つ光感受性タンパク質(オプシン)を特定の細胞に発現させることで、光照射により細胞機能を制御することが可能となってきた。この方法は光遺伝学(optogenetics)と呼ばれ、高い時間精度を背景に神経科学分野にて幅広く利用が進んでいる。しかしながら、オプシンを活性化する光の波長は可視光領域であり、体外から照射しても体の奥にある組織には到達しない。その欠点を回避するため、従来は光ファイバーを組織に刺入して可視光を送達する方法が採用されてきた。ところが、光ファイバーの刺入は組織侵襲性が高い上に、実験上の様々な不都合を生むことが明らかになっており、光ファイバーを用いずに可視光を組織深部へ送達する手法の開発が求められている。そこで、本研究は、生体組織をよく透過する様々な電磁波を吸収して可視光を放出する物質を組織深部に埋め込み、体外からの電磁波照射により遠隔的に組織深部にて発光させ、その光エネルギーでオプシンを活性化させる手法の開発を行った。具体的には、近赤外光を可視光へ変換するアップコンバージョン素材、あるいはX線を可視光へ変換するシンチレーターを用いた無線・遠隔的な光操作法について、マウスの脳神経細胞への応用をモデル系として技術開発を進めた。本手法の更なる進展により、侵襲が少なく遠隔的な細胞機能操作が汎用化すれば、脳神経科学分野を中心に光遺伝学の応用範囲が拡大するとともに、がん治療分野を含めた臨床分野への応用も期待される。

2. 研究成果

(1) 概要

光遺伝学のさらなる汎用化を目指して、自由に行動する動物の神経活動を遠隔・無線的に操作する新しい光遺伝学的手法の開発を行った。具体的には、近赤外光照射により可視光を発するアップコンバージョン粒子を用いた光操作法とX線照射により可視光を発するシンチレーターを用いた光操作法の2種類について開発を行った。

アップコンバージョン粒子を用いた方法については、各種条件検討の結果、マイクロサイズの緑色発光ランタニド粒子(LMP)が緑色光に反応するオプシン(C1V1 および GtACR1)を効率よく活性化することを明らかにした。LMP とこれらオプシンを組み合わせると、光ファイバーを刺入せずに、脳表から約 2 mm 程度までの深さにおいては体外からの近赤外光照射により神経細胞活動の制御と関連行動の誘発・抑制が可能であることを、マウスを用いて示した。ところが、2 mm よりもさらに組織深部における本手法の適用は、近赤外光の組織透過性の限界と近赤外光照射面にあたる体表における組織温度上昇が問題となり、現段階では困難であることが明らかになった。

アップコンバージョン粒子を用いた手法の問題に鑑み、近赤外光に比して格段に組織透過性の高いX線を可視光へ変換するシンチレーターを用いることを新たに考案した。各種条件検討を行ったところ、黄色発光シンチレーターであるCe:GAGGが赤色シフトしたオプシンであるbReaChESとGtACR1を効率よく活性化することが明らかになった。さらに、Ce:GAGGの棒状結晶とこれらオプシンを組み合わせ、X線照射によるマウス中脳ドーパミン神経の活動操作を試みたところ、マウスの場所嗜好性の変化を誘導できたことから、Ce:GAGG結晶からの発光による神経活動操作の実行性が証明された(特願 2019-155659; Matsubara et al., bioRxiv, 2019)。シンチレーターを用いた光操作法の開発は、X線の生物医学的な応用範囲を拡大し、様々な機能生物学的研究や新たな治療戦略の開発に役立つと期待される。

(2) 詳細

研究テーマA「アップコンバージョンの光遺伝学への応用」

本研究開始以前に、八尾寛教授(東北大学・当時)との共同研究により、培養神経細胞における概念実証に成功していた(Hososhima et al., Scientific Reports, 2015)ことから、本さきがけ研究では、当該論文で用いたアップコンバージョン粒子(ランタニド・ナノ粒子、LNP)の*in vivo* マウス標本への適用を目指した。しかしながら、組織内に拡散したLNPでは神経活動を操作するために十分なアップコンバージョン発光を得ることは難しく、それどころか高強度の近赤外光照射に伴う脳表面組織の熱傷という回避できない問題を引き起こすことが分かった。そこで、組織内においても十分なアップコンバージョン発光を得るためランタニド粒子のサイズを大きくし、マイクロサイズのランタニド粒子(LMP)を用いて神経操作を試みたところ、

0.1-0.2 mW/mm² の近赤外光パルス照射により、LMP周囲の神経細胞に発現させた脱分極型オプシンC1V1を活性化し、活動電位上昇およびそれに伴う行動変化を引き起こすことが明らかとなった(図1)。この強度の近赤外光照射では、脳表面温度は40度未満となり、組織熱傷は最小限に抑えられる(図2)。さ

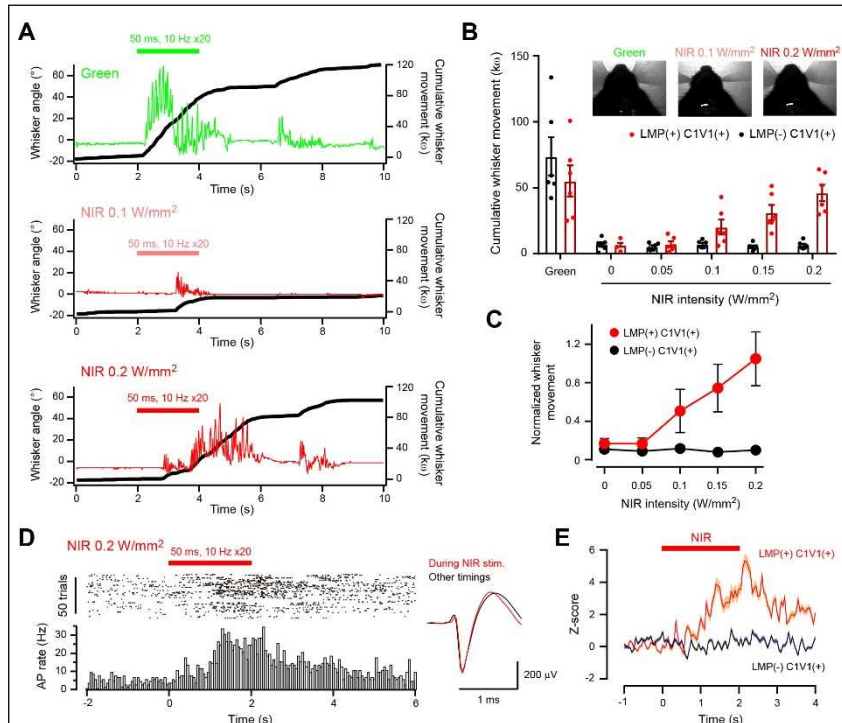


図1 近赤外光とアップコンバージョンによる大脳皮質一次運動野洞毛領域の光操作 (Miyazaki et al., Cell Reports, 2019; Fig. 4)

らに、拡散フィルターを通して近赤外光を照射することにより広範囲の近赤外照射が可能な行動実験チャンバーを作成し、脳表より約 2 mm 程度の深さにある背側線条体の活性化と関連行動の誘発に成功した。

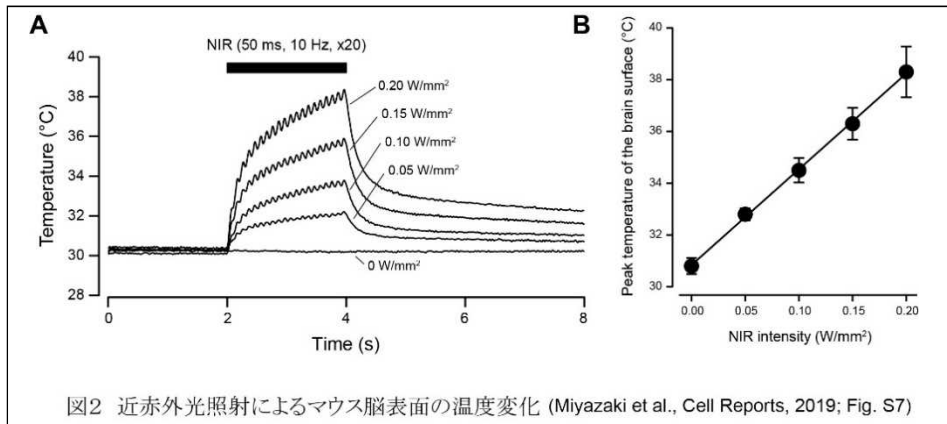


図2 近赤外光照射によるマウス脳表面の温度変化 (Miyazaki et al., Cell Reports, 2019; Fig. S7)

研究テーマ B 「X 線を用いた新たな光操作法の開発」

上記の近赤外光を用いた手法の場合、体表から 2-3 mm 程度以上の深度では神経操作が難しく、また体表における熱発生を抑制することも必要であることが分かってきたため、さらに深部に到達しうる X 線を用いた新規技術について開発を行った。X 線を可視光に変換する素材であるシンチレーター結晶サンプルを柳田健之教授(奈良先端科学技術大学院大学)より入手し、透明かつ潮解性のないCe:GAGG(黄色発光)およびCe:YSO(青色発光)を候補として、HEK293 細胞に各種オプシンを発現させ、シンチレーターからの発光に誘発された電流変化を記録することにより、発光波長に適したオプシンの探索を行った(図3)。結果として、Ce:GAGG の黄色発光に対しては興奮性の bReaChES と抑制性の GtACR1 が適することが分かり、Ce:YSO の青色発光に対しては興奮性のステップ・ファンクション・オプシン SSFO と抑制性の GtACR2 または GtACR1 が適することが明らかとなった。

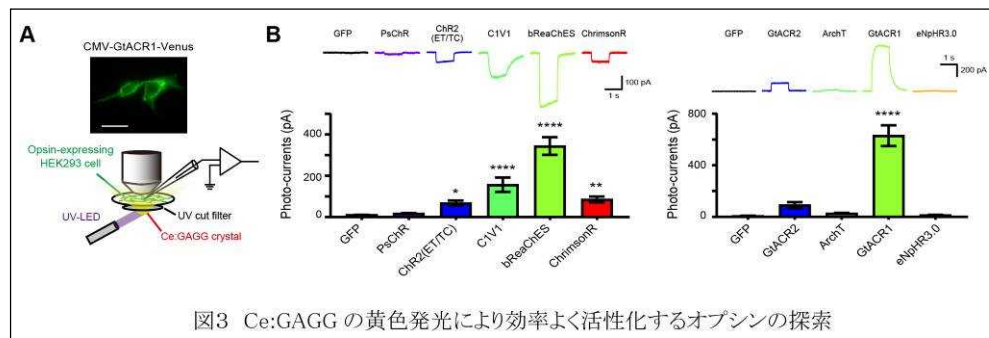
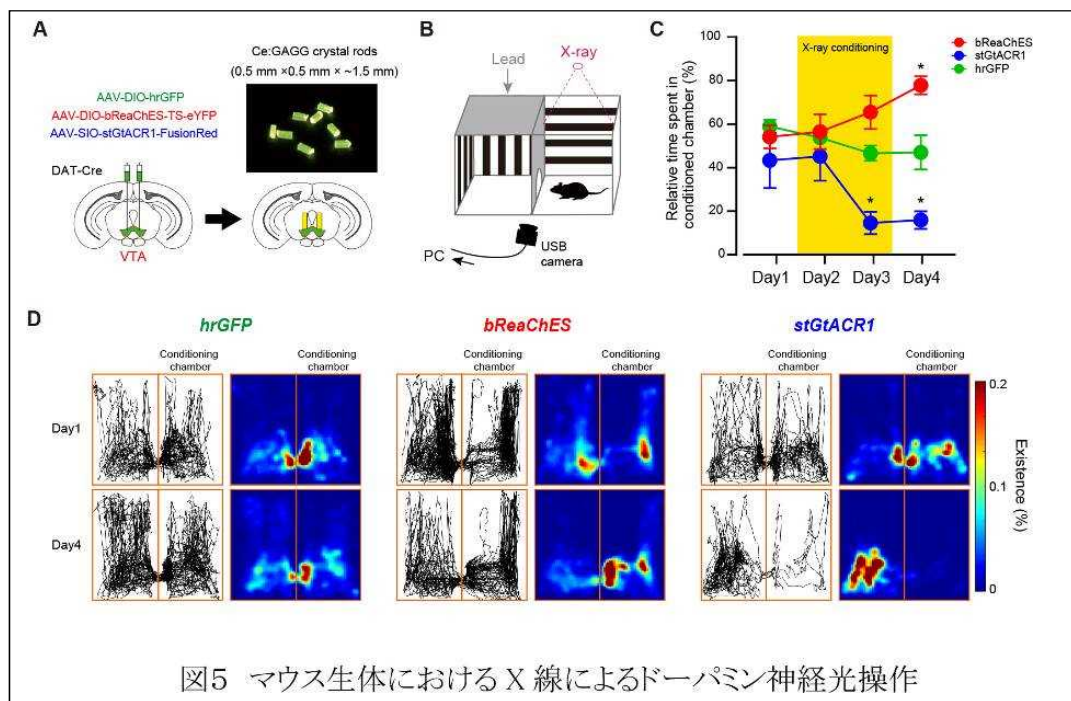
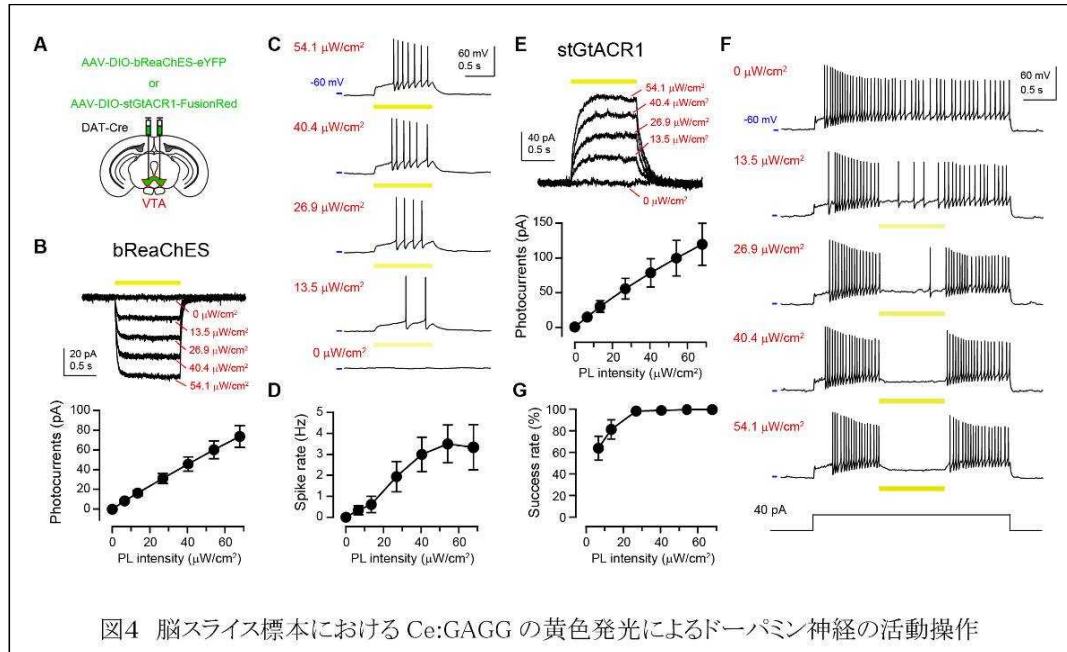


図3 Ce:GAGG の黄色発光により効率よく活性化するオプシンの探索

次に、遺伝子改変マウスを用いて中脳ドーパミン神経にこれらオプシンを発現させ、急性脳スライス標本を用いて、シンチレーターからの発光により神経活動を操作できるか否かを検討した。Ce:GAGG と Ce:YSO のいずれも 10 uW/cm² 程度の弱い発光でも神経活動を操作できることが明らかになった(図4)。さらに、生きたマウスにおいても、上記と同様に中脳ドーパミン神経に bReaChES を発現させて、その直上に Ce:GAGG 結晶(縦 0.5 mm 横 0.5 mm 長さ 1.0-1.5 mm)を留置し、場所嗜好性テストを行ったところ、X 線(0.5 Gy/min)を照射した

チャンバーに対して、bReaChES 発現マウスではより嗜好性が上昇し、GtACR1 発現マウスでは嗜好性が低下した(図 5)。VTA ドーパミン神経の活性化は場所嗜好性を上昇させ、不活性化はそれを低下させることが知られていることから、これらの結果は自由行動中のマウスにおいても Ce:GAGG からの発光によりドーパミン神経活動の操作が可能である、つまり、X 線を用いた神経機能の無線遠隔操作が可能であることを示唆している (Matuabara et al., bioRxiv, 2019; 特願 2019-155659)。



3. 今後の展開

本研究結果により X 線を用いた神経機能操作が可能であることが示された。このことは、生きた動物個体の深部組織においても、X 線を用いて特異的に細胞機能を光で操作できることを示唆する。しかしながら、本手法は X 線被爆という根本的な問題を抱えており、これをいかに軽減するかが手法の汎用化の鍵となる。X 線照射法の改善策としては、生体透過性が高く(生体へのダメージが少なく)、かつ、シンチレーター発光効率の高い X 線波長の検討、パルス照射装置の開発、ターゲット照射システムの開発などが有効と考えられる。また、シンチレーター素材の改善策としては、より発光効率の高い液体シンチレーターのコンポジット粒子化、分子ターゲットのためのタグ付け修飾などが考えられる。これらの手法改善のためには、物理・化学・生物学・医学の学際的なコラボレーションが必要である。

4. 自己評価

研究目的の達成状況は順調であったと考える。特に X 線を用いた光操作法の開発は、前例がない非常に挑戦的な研究であった。ゼロから独自の人脈を開拓して候補材料の調達を行うところから始め、条件検討を経て概念実証実験に成功し、特許出願にまで到達したことは自身としても高く評価したい。ところが、X 線を用いる手法は被爆の問題が避けられず、特許出願後の企業との交渉が全く進まなかったことは残念であった。本手法の潜在的な応用可能性をさらにアピールできるよう手法の改善を進めたい。

研究費の執行状況は妥当と考える。独自研究グループとして研究を進めはじめてから 1 年半程度経過した段階で本さきがけ研究を開始したため、研究開始当初はメンバーが少なく、実験設備への投資が主な研究費の使い道であった。徐々に研究グループメンバーを増員し、実験用の消耗品と技術補助員の人件費への充充分が増加した。

研究論文としては、最も挑戦的な研究であった X 線の神経操作の開発の論文文化はもとより時間がかかることを想定していたが、すでにプレプリントとして内容を公開しており(Matsubara et al., bioRxiv, 2019)、各種学会でもデータを紹介している。本論文は現在投稿・改訂を複数回繰り返しており、1 年以内に原著論文として報告できる予定である。今後、本研究を契機として、X 線光操作法が光の届かない組織深部における遠隔的細胞機能操作法のスタンダードとして成長し、生物医学分野で広く利用されるよう研究を継続したい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Yamashita T*, Vaviladeli A*, Pala A*, Galan K*, Crochet S, Petersen SSA, Petersen CCH. Diverse long-range axonal projections of excitatory layer 2/3 neurons in mouse barrel cortex. *Frontiers in Neuroanatomy*. 2018. 12, 33. (*, Co-first authors)
2. Busse L, Cardin J, Chiappe E, Halassa M, McGinley M, Yamashita T, Saleem A. Sensation during active behaviors. *The Journal of Neuroscience*. 2017. 37, 10826-10834.
3. Yamashita T, Yamanaka A. Lateral hypothalamic circuits for sleep-wake control. *Current Opinion in Neurobiology*. 2017. 44, 94-100.

(2)特許出願

研究期間累積件数:1 件(公開前の出願件名については件数のみ記載)

(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)

1. 受賞:山下貴之「文部科学大臣表彰 若手科学者賞」、2017 年 4 月
2. 和文総説:山下貴之「脳深部の遠隔的光操作法」 月刊「細胞」、2020 年 2 月号
3. 学会発表:Yamashita T. “Remote control of neuronal function using inorganic phosphor absorbing electromagnetic waves” CSH-Asia Conference: Latest Advances in Development & Function of Neuronal Circuits、淡路、2018 年 9 月 28 日(一般口演)
4. 学会発表:山下 貴之 “Deep brain stimulation using X-rays” 第 11 回光操作研究会、名古屋、2019 年 9 月 12 日(招待講演)
5. プレプリント:Matsubara T, Yanagida T, Kawaguchi N, Nakano T, Yoshimoto J, Tsunoda SP, Horigane S, Ueda S, Takemoto-Kimura S, Kandori H, Yamanaka A, Yamashita T*. Remote control of neural function by X-ray-induced scintillation. bioRxiv. 2019. 798702; doi: <http://dx.doi.org/10.1101/798702>. (*, Corresponding author)