

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「光の特性を活用した生命機能の時空間
制御技術の開発と応用」
研究課題「霊長類の大規模回路の光遺伝学的操
作による高次脳機能の解明」

研究終了報告書

研究期間 2016年10月～2022年3月

研究代表者：伊佐 正
(京都大学大学院医学研究科 教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

遺伝子工学を用いて、光を感知して電荷を通す膜タンパクを特定の細胞に発現させ、光によってミリ秒単位で膜電位を操作することを可能にした光遺伝学技術は、げっ歯類をはじめとする小型モデル動物では、神経科学のパラダイムを変えるような大きな成功を収めた。しかしサルなどの中大動物においてはウイルスベクターによる遺伝子導入・発現効率が限定的であることや広範囲の脳領域の神経活動を制御するのに十分な光照射が困難であるため、成功は限定的であった。そこで本研究課題で我々は、マカクザルにおける特定神経回路の光遺伝学的操作技術を確立することを目指した。そのための第一段階として、皮質下の腹側被蓋野(VTA)から前頭葉皮質に向かうドパミン作動性経路に赤色光で活性化する ChrimsonR を発現させ、それらを光照射によって操作し、高リスク高リターン(HH)か低リスク低リターン(LL)のいずれかを選択する意思決定を操作することを試みた。そのために、まずサルに上記のような意思決定課題を訓練し、前頭葉の様々な領域を薬理的に機能阻害する実験を行い、腹外側前頭前野(vIPFC)の機能阻害によってリスク依存的な意思決定が損なわれることを明らかにした。そして、VTA に順行性ウイルスベクターを注入した3頭の結果を解析したところ、VTA 腹側部からは vIPFC や眼窩回皮質、帯状回皮質、運動野/運動前野、側頭葉吻側部に投射が強いことから、vIPFC が報酬情報に関連するとされる VTA から入力を受けることがわかった(Zubair et al. Cerebral Cortex 2021)。一方で、サルの脳表面を広範囲に光刺激することが可能な多チャンネル LED と皮質脳波電極(ECoG)、温度センサーを組み合わせた脳表光刺激用赤色 LED・ECoG アレイスタックデバイスの作製に成功し、それを用いた光刺激による皮質でのドパミン放出の増加を確認した(Ohta et al. IEEE Access, 2021)。

そこで、2頭のサルの両側の VTA に ChrimsonR を発現させる AAV ベクターを注入し、上記のようなリスク依存的に意思決定を行っている期間中に前述の脳表光刺激用デバイスを用いて、vIPFC への光刺激により VTA-vIPFC 経路を選択的に活性化したところ、光刺激によってサルの HH 志向性が增強されたが、期待値依存性には変化は観察されなかった。さらにこのような刺激を繰り返すと、日を超えて効果が蓄積し、刺激していなくても HH 志向性が高いレベルで固定することが明らかになった。

一方で、前脳基底部からのアセチルコリン投射系については、マイネルト核から運動野への投射系を見出すことができたので、今後回路操作の実験を進める。

また、皮質-皮質間結合を操作して脳・脊髄損傷後の機能回復機構を明らかにする研究においては、脊髄損傷のサルにおいて回復初期に損傷反対側運動前野から同側運動前野への信号の流れが同側運動野を活性化して、機能回復に貢献することを、化学遺伝学的手法によって一方向性に遮断することで、回復してきた巧緻運動が障害されることにより実証できた。また一次視覚野損傷後に視覚情報が運動前野背側部に入力し、上肢運動の回復に貢献し得ることを明らかにした。これにより回路操作によって視覚運動制御への関与を検証すべき脳部位が明らかになった。今後はこれらの課題について光遺伝学的手法による操作実験を展開する。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. 中脳-前頭葉ドパミン投射経路の活性化によるリスク依存性意思決定モードの操作概要:

高リスク・高リターン(HH)か低リスク・低リターン(LL)のいずれかを選択するよう訓練した2頭のサルの両側腹側被蓋野(VTA)にウイルスベクターで ChrimsonR を発現させ、腹外側前頭前野(vIPFC)に装着した脳表広域光刺激デバイスを用いて課題中に赤色光を照射して VTA-vIPFC 経路を活性化したところ、vIPFC の特定の部位においてサルの HH 志向性が增強された。そして、この効果は繰り返し刺激で長期にわたり蓄積することもわかった。

2. 霊長類皮質-皮質間経路を一方向性に遮断する技術の開発

概要:

従来脳幹や脊髄での経路選択的操作はできていたがサルでの皮質間経路では困難だった。今回 Convection enhanced delivery 法によって大量のウイルスベクター液を両側の運動前野に注入し、運動前野間の信号伝達を化学遺伝学的手法(DREADD)によって一方向性に遮断する技術開発に成功した。それにより、頸髄部分損傷の回復初期過程において損傷反対側から同側の運動野への交連線維が、同側運動野を活性化し、精密把持運動の回復に貢献することを証明できた。

3. マカクザル脳表面広域光刺激 LED アレイデバイスの開発

概要:

マカクザル脳のような大きな領域を任意の形状で光刺激可能なマイクロLEDアレイデバイスを新たに開発した。脳深部である VTA をほぼ全領域光刺激できる刺入型光刺激 LED アレイデバイス、脳表に設置し、光刺激とマイクロダイアリシスを同時に実現できる広域光刺激 LED アレイデバイス、光刺激と ECoG を同時に実現できる広域光刺激 LED アレイデバイスを開発し、実際にマカクザル脳に埋植し、良好な結果を得ることに成功した。

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1. ギャンブル依存症のメカニズムの解明と治療法開発につながる可能性

概要:

ギャンブル依存症は重大な社会的問題であるが、治療のための有効な手立てがなかった。ギャンブル依存の患者では、リスク志向性が健常人に比して高いことが知られている。今回の研究によってリスク嗜好性の基盤となる神経回路機構が明らかになり、それが刺激によって増強ないしは減弱する方向に操作できることが明らかになってきたことで、脳刺激によるギャンブル依存症の治療につながる可能性が期待される。

2. 霊長類皮質-皮質間経路を一方向性に操作する技術の開発

概要:

霊長類の脳において高効率で2重感染によって回路操作を可能にするウイルスベクターの組み合わせを Convection enhanced delivery 法によって大脳皮質に打ち込んで一方向性の機能制御を可能にした。これは、今後脳疾患や障害の治療の可能性に道を拓くものと考えている。

< 代表的な論文 >

1. Vancraeynest P, Arsenault JT, Li X, Zhu Q, Kobayashi K, Isa K, Isa T, Vanduffel W (2020) Selective mesoaccumbal pathway inactivation affects motivation but not reinforcement-based learning in macaques. *Neuron*, 2020 Jul 31; S0896-6273(20)30530-4. doi: 10.1016/j.neuron.2020.07.013.

概要:

ウイルスベクター2重感染法によりサルの腹側被蓋野(VTA)から側坐核に投射する経路を選択的に遮断したところ、(1)VTA にシードを置いた覚醒下の安静時 MRI 計測により、前頭葉と側頭葉を中心とする広汎な脳領域間の結合性が増強すること、(2)動機付け行動選択課題において「より我慢強く待ってより多くの報酬がもらうことを好む」行動特性が、「より短い待ち時間で少ない報酬を得る」ような傾向に変化すること、(3)一方で、報酬がより高い確率で得られるゴールを選択するという強化学習課題における学習速度には変化が見られないことが明らかになった。

2. Koshimizu Y, Isa K, Kobayashi K, Isa T (2021) Double viral vector technology for selective manipulation of neural pathways with higher level of efficiency and safety. *Gene Therapy*, 28:339-350.

概要:

齧歯類ラットの大脳皮質運動関連領域に投射する中脳腹側被蓋野ニューロンで逆行性感染ウイルスベクター4種類と順光性感染ウイルスベクター3種類を組み合わせるとニューロン感染能と安全

性を比較した。その結果、逆行性感染ウイルスベクターでは AAV2retro が最も有用であった。そして、順行性感染ウイルスベクターでは AAVDJ が短期的な使用に適し、AAV5 が長期的な使用に適していた。これらの成果はウイルスベクターを用いる霊長類の研究に寄与することが期待される。

3. Ohta Y, Guinto MC, Tokuda T, Kawahara M, Haruta M, Takehara H, Tashiro H, Sasagawa K, Onoe H, Yamaguchi R, Koshimizu Y, Isa K, Isa T, Kobayashi K, Akay YM, Akey M, Ohta J (2021) Micro-LED Array-Based Photo-Stimulation Devices for Optogenetics in Rat and Macaque Monkey Brains. IEEE Access, in press. doi: 10.1109/ACCESS.2021.3111666.

概要:

マカクザルのような大型動物の脳に大面積の光刺激を行うためのマイクロ LED アレイデバイスを開発した。PFC と VTA に光刺激を行う平面状および直線状のマイクロ LED アレイデバイスを設計・作製した。光刺激によるドーパミン濃度変化をマイクロダイアリシスによる検証した。まずラットを用いて、デバイスの動作検証を行い、マカクザルの脳に適用した。その結果、PFC と VTA の両方で光刺激によるドーパミン濃度変化の検出に成功し、開発したマイクロ LED アレイデバイスの有効性を実証した。

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 「光遺伝学による脳回路機能操作技術開発」グループ

研究代表者:伊佐 正 (京都大学大学院医学研究科 教授)

研究項目

- ・ラットを用いたウイルスベクター、オプシン等の条件検討
- ・サルを用いたウイルスベクター、オプシン等の条件検討
- ・ドパミン、アセチルコリン投射系の操作と認知機能ないしは機能回復への影響を解析
- ・皮質-皮質間経路などの操作による脳・脊髄損傷回復メカニズム解明

② 「光刺激・記録プローブ作製技術開発」グループ

主たる共同研究者:太田 淳 (奈良先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科 教授)

研究項目

- ・脳表広域光刺激デバイスの開発
- ・脳内刺入型光刺激デバイス及びその高機能化
- ・脳表・刺入ハイブリッド光刺激デバイスの開発

③ 「ウイルスベクター開発」グループ

主たる共同研究者:小林 憲太 (自然科学研究機構生理学研究所 准教授)

研究項目

- ・ウイルスベクターの改善と供給

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

これまでに研究の推進において、ベルギーのカトリック大学ルーバン校(KU Leuven)の Wim Vanduffel 教授とそのグループと緊密に連携してきた。Vanduffel グループとは当初 2012 年に我々が開発したウイルスベクター2重感染による経路選択的遮断法をもちいて腹側被蓋野(VTA)から側坐核(NAc)に投射する経路を遮断する実験を 2014 年より行ってきた。この研究については、我々がルーバンに出向いてウイルスベクターの注入を行い、MRIと行動実験はルーバンで行い、組織学的解析は日本で行うということでルーバンから大学院生が来日して研究を行った。その間常時 skype による Meeting を行い、行動課題やその結果の解析法について議論を行い、さらに VTA から側坐核への投射系(Meso-limbic projection system)と前頭葉への投射系(Meso-cortical projection system)が概ね分かっていることなどが分かってきた。今回の VTA から vIPFC への投射経路の操作については、これらの経験から、VTA へのウイルスを正確に行うための位置決め技術や、課題設定等について、多くのノウハウを学ぶことができ、日本で実験を行うのに大いに役に立った。また、今回の研究の中で VTA からの投射先を高感度順行性ウイルスレーザーを用いて明らかにする研究(Zubair et al. 2021)は KU Leuven の大学院生の Mouhammad Zubair 氏と Sjoird Murriss 氏が京都に長期滞在して行った研究である。

また、光遺伝学的刺激実験について、げっ歯類で試す段階では、我々の長年の共同研究者であるタイ国チュラロンコン大学准教授の Thongchai Sooksawate 博士が再三来日し、大いに貢献してくれた。

また、ウイルスベクターの設計においては京都大学霊長類研究所の高田昌彦教授と井上謙一助教から最新の情報を得て生理研の小林がいち早く作製し、提供を受けた。

また、LED と ECoG を組み合わせたプローブの作製にあたっては、(株)ユニークメディカル社から製造過程の皮質脳波電極素材の供給を受け、それに奈良先端大の太田研究室で LED を実装するというかたちで製作を進めた。

また、今後リスク依存的な意思決定研究を依存症との関係で進めていく点については京都大学病院精神科の鶴身孝介助教、東京医科歯科大学の高橋英彦教授(前京都大学精神科准教授)、

さらに京都大学病院神経内科の高橋良輔教授や医学部人間健康科学科の澤本伸克教授に指導
いただいている。