

研究報告書

「光学的 BMI による感覚・運動情報の解読と応用」

研究タイプ: 大挑戦型(※大挑戦型課題として延長無/増額無)

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者: 駒井 章治

1. 研究のねらい

光学的手法を用いた BMI を実現すべく、2光子レーザー走査顕微鏡の高速化、光遺伝学ツールの開発と確立、行動課題の確立を行い、これらを融合することにより、より緻密な脳情報の解読と制御を行うことを本研究のねらいとした。

本研究課題では 2 光子レーザー走査顕微鏡等の光学技術および光感受性チャンネルタンパク質を用いた選択的光学刺激を用いることによって、認知行動課題および運動遂行の神経基盤を担う局所回路の同定と、同局所回路刺激による行動制御を目的としている。具体的には Oregon Green488 BAPTA-1 (OGB-1) や GCaMP 等のカルシウム指示薬による多点同時活動記録および Two-photon Targeted Patch (TPTP) 法による細胞選択的記録を用いて視覚、体性感覚などの様々な感覚に対し、様々な物理量の刺激を提示することによって得られた神経活動から逆相関法や Bayes 推定法といった手法により入力信号を推定する。バー(主観的輪郭によるバーも含む)による視覚刺激の方位や方向を変化させることによる神経活動を計測し、単一細胞レベルでの神経コードの読み取りを試みる。ここで推定された入力信号を光感受性チャンネルタンパク質等を利用して選択的に特定の神経回路に戻すことによって、動物行動を模倣することが可能か否かを検討する。これにより実際に観察している神経回路がどういった情報をコードしており、かつそのコードされている情報がどういった行動を規定しているのかが明らかになるものと考えられる。ここで得られた研究結果は BMI へのさらなる応用に寄与できるものと考えられる。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究課題は大挑戦型であり様々な技術を用いることで、脳機能理解の上で未踏の領域に踏み込むことを目的としている。具体的には、脳機能の最小単位(局所回路)の機能を理解し、その応用として時空間分解能の良いブレイン・マシン・インターフェイスを実現することを目指す。これまでこの目的を達成するために必要な各種計測技術・ツールの開発を並行して行い大きく4つの研究課題に関して取り組んできた。脳機能を内外から観測する目的で神経と行動のイメージング技術の確立をめざし、微細刺激を行うための分子、光学ツールの作成とともに、脳神経移植技術の確立をめざしてきた。それぞれの課題は未だ道半ばではあるが、着実にそのゴールに向けて前進を続けてきている。本報告書ではこれまでの軌跡を取りまとめるとともに、今後の展開について述べる。

(2) 詳細

研究テーマ A「顕微鏡等の光学技術の開発」

2 光子レーザー走査顕微鏡の改良については深部観察を可能にするためにパルス列変調を用いた。低コストでダメージが少ない条件で、尖頭エネルギーを保つことが可能となった。更に昨年度は高速化を図るべくスキヤナの改良を試みてきた。Digital Mirror Device (DMD)を用いた高速刺激装置の作成の試みについては、歪曲収差の補正が困難であるためこの方法は実用的でないことが明らかとなった。しかし可視光を用いたケーゾド・グルタミン酸を利用した精密刺激にはある程度応用可能であることがわかったため、同様の方法を用いて光強度を上げ利用可能なものとした。これについては企業との共同研究により製品化されており、一定の成果を見たと考えられる。LCOS (Liquid Crystal on Silicon)を用いた高速且つ高解像度な刺激を可能にするシステムを構築も検討したが、本研究課題では3次元刺激が必要であるため、更なる検討を要することが明らかとなった。現在KNTスキヤナを用いることでスキヤニングを高速化することを試みるための機種選定を行っている。『KTNスキヤナ』は、カリウム(K)、タンタル(Ta)、ニオブ(Nb)から成る光学結晶を利用した光デバイスであり、KTN結晶の「電圧を加えると屈折率を自在に変えられる」という性質を利用すれば、入射したレーザー光の進む方向を自由に変えると考えられる。

小型光学 ECoG の開発については京都大学工学部の小寺教授のご指導、ご協力の下、香川大学の鈴木准教授と共同研究を行わせていただく事となった。MEMS 技術を用いてレンズを搭載した多点計測が可能でデバイスのプロトタイプを作製した。スライスを用いて光遺伝学への応用が可能なものとしてプロトタイプを作成したが、グリッド上ではあるが任意の場所を刺激することは可能となったが、平面的な刺激にとどまり、生体脳への応用のためにはさらなる検討が必要となることが明らかとなった。この点をクリアした後には小型化を図り、個体脳への応用が可能なものに作り込んでいく予定である。光遺伝学用遺伝子改変動物の作成の事前準備としておよびMEMSデバイス開発のスピードアップのためにES細胞を用いて神経細胞への分化誘導の条件確立も行いつつある。

研究テーマ B「光遺伝学ツールの開発」

独マックスプランク研究所の Rolf Sprengel 博士により供与された AAV をバックボーンとするチャンネルロドプシン、ハロロドプシンの同時発現誘導ウイルスベクターを改良し、より操作の簡便なレンチウイルスベクターへの乗せ替えを試みてきた。しかし両分子の他に蛍光分子を発現させる必要があるため分子量が大きくなり、作製が困難であった。そこでそれぞれのロドプシン分子を単独で発現するウイルスベクターを一先ず作製し、光応答性を確認した。ここでは培養細胞の培養条件や形質転換の条件、ベクター精製条件等の条件検討を行い、一連のウイルスベクター作成フローを確立することができた。しかしここでハロロドプシンを発現する神経細胞は抑制応答を示すが、チャンネルロドプシン分子が光応答を示さないことが明らかとなった。点変異の疑いがあったため幾度となくシーケンスを行ったが、配列に異常は見られなかった。そこで新たにプラスミドを購入し、これまで作製してきたバックボーンに導入し、利用可能なものの確立を行うこととした。通常型の hChR2(H134R)および長期活性型の hChR2(C128A)、チャンネル動態の非常に速い ChETA を導入したウイルスベクターの作成を行った。更に抑制性として eNpHR3.0 および Arch-T の導入も行った。

研究テーマ C「局所神経回路解析に資する行動解析」

行動試験に関しては、バイオリソースが抱負な齧歯類、特にマウスを用いて認知課題を行ってきた。タッチパネルを設置したオペラントチャンバーに強化子を提示するポートを設置し、垂直、水平バーの弁別課題と、縞模様の途中で位相をずらしたもの、縞模様の途中にギャップを設置したもの、カニツツアタイプの錯視課題を行うことで、視覚刺激による視覚弁別課題を行ってきた。試行依存性を排除する目的で、視覚刺激の空間分布を均一にするような統制刺激を用意し、これを用いての弁別課題を行ってきた。その結果バーの弁別課題では 80%を超える正答率、錯視課題においても 70%を超える正答率を得ることができるようになり、齧歯類を用いてもこういった視覚弁別課題を行うのに必要な能力を備えていることが明らかとなった。

研究テーマ D 「神経幹細胞移植による脳活動制御と機能回復」

特定の神経活動を制御するためにはオンラインで、活動を検知し、これを単一細胞レベルで制御することが必要とされる。細胞種としては比較的均一で、機能的には極めて多様性である大脳皮質から、目的の神経細胞に対して漏れなく刺激・抑制を行うことは極めて困難である。しかしながら脳の大きな部分を占める大脳皮質の機能を理解するためにはこの問題を解決する必要がある。一つの方略として事前に光遺伝学的操作を行うための分子を導入した神経細胞を移植し、その後これら神経細胞が定着し機能させられる条件の解明を目指した。移植細胞は個体の経験によらず、移植後の入力にのみ依存してネットワークを構築する。一方で強制的に入力を与えることにより、周辺の神経細胞を巻き込んで機能ネットワークを構築することが想定される。そこで移植神経細胞を中心とした機能ネットワークの経験による構築過程と、構築されたネットワークの生理機能を移植細胞を中心に検討することにより、ネットワーク形成様式の解明と特定の細胞を中心に形成される機能ネットワークの生理機能の解明につながるものと考えられる。そこで、正常脳に対して神経幹細胞を移植し、人為的に入力を与えることで見られる神経応答の変化様式を詳細に解析することを試みた。

移植神経細胞の分化運命は個体活動もしくは神経活動に依存することが明らかとなった(学会発表済、論文準備中)。つまり神経細胞移植後に行動学的に活動を上昇させることによって、神経細胞への分化特に興奮性神経細胞に分化する確率を上昇させることが明らかとなった。今後はより詳細な分化誘導の条件を検討するとともに、移植神経細胞を中心に構築されたネットワークの解析を行う予定である。これらのことは損傷脳に対する脳・神経移植の条件の理解につながるるとともに、精神疾患や発達障害への応用、さらにはニューロリハビリテーションへの応用も可能となると考えられる。

3. 今後の展開

これまで確立に努めてきたいくつかの技術や手法はそれぞれが目標に近づいてきた。今後はこれら技術を組み合わせることで脳の情報処理の実際的なところの理解を深めていく予定である。脳に関する研究結果は世に溢れているが、未だ解決に至っていない脳情報処理の一般則の理解を目指すと共に、我々動物の行動(特に日常行動)のあり方についての原理原則の解明を目指したいと考えている。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究課題は「光学的 BMI による感覚・運動情報の解釈と応用」と題した大挑戦型研究であり、各種技術を用いることで、局所回路機能の理解と応用を目的とした。光遺伝学導入のために作成した分子ツールの確立に非常に時間がかかってしまったことは否定しようもない事実である。信頼のおけるソースから供与いただいたものであったために過信してしまったことが原因であったといえる。制限酵素地図による確認やシーケンスを何度となく繰り返し、トランスフェクションの条件検討を慎重に行ったが、正しくインサートを挿入することが困難であった。しかしここで困難を克服した経験によりウイルスベクターやターゲティングベクター作成のノウハウを得る好機となったことも事実である。今後様々な分子を特定神経細胞に導入する際にこれまでの経験が我々の強みとなって研究を援助してくれるものと期待している。光遺伝学遂行にあたり、全世界の研究者が直面している前述のような大きな問題は未だ解決の糸口を見ないが、光遺伝学が神経科学研究推進の大きな一歩であることは間違いない。今ここで少し時間をいただき、時間をかけてこれらのツールと向き合うことができたことに心から感謝したい。脳機能の最小単位(局所回路)の機能を理解し、その応用として時空間分解能の良いブレイン・マシン・インターフェイスを実現する。この大きな目的を達成するために必要な各種計測技術・ツールの開発を並行して行ってきた。脳機能を内外から観測する目的で神経と行動のイメージング技術の確立をめざし、微細刺激を行うための分子、光学ツールの作成とともに、脳神経移植技術の確立をめざしてきた。それぞれの課題は未だ道半ばではあるが、着実にそのゴールに向けて前進を続けてきている。それぞれの技術やツールを組み合わせ、データを得ることはもちろん困難を極めるものである。すべてを最適化せずして、データは得られない。しかし最もローテクで手付かずであった「マウスを使った錯視弁別課題」についても一定の成果を見つつあり、論文に投稿しているところである。解析対象および解析ツールが出揃ってきたので、今後はこれを十分に活用し脳の真の理解に必要なことを進めていきたいと考える。

本研究課題の目的を達成するために分子生物学、光学、行動科学が三位一体となって遂行する必要があったが、この手の研究としては伊佐先生が報告された研究が好例であるといえよう(Kinoshita ら, 2012)。ここからも本研究課題は今後の神経科学のあるべき姿の縮図を示したものであるといえる。個人研究であるさきがけ研究においてこういった課題の遂行は非常に困難であった。若手であるからこそ個人研究という枠にとどまらず、むしろグループ研究を促進できるような仕組みを検討していただければと考える。

本報告に合わせて、各方面からのサポートや共同研究により本研究課題が進められたことを心から感謝するとともに、ここに感謝の意を表したい。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

大挑戦型課題として挑戦的な目標を持つため、当初の目標を完遂するまでには至っていない。しかし、要素的研究課題の一部は達成され、他の部分も進展が求められる。相応の成果を

達成しつつあると考える。本研究では、定量的な視覚刺激を与え、時空間的に神経活動を記録し、そのデータを用いて局所神経回路を駆動することにより、特定の行動を引き起こすシステムの開発を目指した。従来の心理物理学的研究の範囲を超えて、得られた脳情報を活用して行動を引き起こす手法を開拓するという点で、BMI の発展に繋がることが期待された。しかし、従来の研究で用いられた手法を超えた研究を行うには当然、従来の技術を改良し、本研究に最適化するための方法論の確立が必要である。本研究では、2光子レーザー走査顕微鏡の高速化、目的に合わせた光遺伝学的ツールの開発・確立、行動課題の確立が必要であった。前2者については幾つかの試みを経て、進展しているが、まだ完成までには至っていない。行動課題については、困難を克服して、げっ歯類の錯視弁別課題を確立するに至った。当初の研究目標はシステム的研究と分子・細胞学的要素研究との間隙を埋めることを目指した挑戦的な融合研究であったが、今後、方法論の確立とともに、これらを用いた融合研究が早期に行われることを期待するものである。

本研究成果が評価され、「共感性」の新学術領域計画班に採択されている。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- | |
|---|
| 1. Harada A., Shiosaka S., Ishikawa Y. and Komai S., Acute stress increases neuropeptide mRNA expression in the mouse hippocampus through the glucocorticoid pathway., <i>Neuroscience Letters</i> 436 273-277, 2008 |
| |
| |
| |

(2) 特許出願

研究期間累積件数:1 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

▼2014/11/16

Author/Presenter : Jin Watanabe and Shoji Komai

Title : Mutual influence of mice in social context.

Society for Neuroscience, 43rd Annual Meeting, Washington DC, USA

▼2014/07/08

Author/Presenter : Jin Watanabe, Shota Okabe, Reina Yamada, Takatomi Kubo, Takefumi Kikusui, Kazushi Ikeda and Shoji Komai

Title : Mutual Influence of mice in social context.

FENS2014, Milan, Italy

▼2013/6/20

Author/Presenter : Yusuke Suzuki, Kazushi Ikeda and Shoji Komai

Title : Neuronal correlates of fine motor control under panic-like state.

日本神経科学学会、京都

▼2012/10/16

Author/Presenter : Yusuke Suzuki, Kazushi Ikeda and Shoji Komai

Title : Segmentation of a gap-crossing action into fine motions under an emergency situation in rats.

Society for Neuroscience, 42nd Annual Meeting, New Orleans, USA

▼2012/10/16

Author/Presenter : Fumi Okuyama and Shoji Komai

Title : Subjective contours in mouse early visual cortex.

Society for Neuroscience, 42nd Annual Meeting, New Orleans, USA

▼2010/11/17

Author/Presenter : S. S. N. HO, S. KOMAI, I. VAN WELIE, M. HAUSSER

Title : Synaptic integration in cerebellar Golgi cells during sensory stimulation

Society for Neuroscience, 40th Annual Meeting, San Diego, USA

▼2010/11/16

Author/Presenter : Mitsunori Arai and Shoji Komai

Title : Integration of exogenous neural stem cells in the adult mice cortex with neuronal activity.

Society for Neuroscience, 40th Annual Meeting, San Diego, USA

▼2009/10/20

Author/Presenter : Mitsunori Arai and Shoji Komai

Title : Functional differentiation of neural stem cell into excitatory and inhibitory neurons

Society for Neuroscience, 39th Annual Meeting, Chicago, USA

著作物

- Komai S., 20. Activity regulation in the study of neural plasticity, “Optogenetics.” Springer Japan, Tokyo, in press.
- Cetin A., Komai S., Behavioral control by light-exciting and silencing neuronal activity. “Methods in Neuroethological Research.” Springer Japan, Tokyo, 2013.
- 駒井章治、神経活動に伴う神経可塑性現象の解明、「オプトジェネティクス(光遺伝学)」、株式会社エヌ・ティー・エス、東京、2013.

プレスリリース

“Transplanted Stem Cells Become Healthy Functioning Neurons After Exposure to Brain’s Signaling Molecules”, *Neurology Today*, 7 January 2010; Volume 10(1); P 14–15