

日本ーシンガポール 国際共同研究「バイオデバイス」 平成 29 年度 年次報告書	
研究課題名（和文）	神経細胞を近赤外光操作するバイオ・ナノデバイスシステムの開発
研究課題名（英文）	Near-infrared (NIR) optogenetics using up-conversion system
日本側研究代表者氏名	八尾 寛
所属・役職	東北大学 大学院生命科学研究科・教授
研究期間	平成 28 年 1 月 1 日～平成 31 年 3 月 31 日

1. 日本側の研究実施体制

氏名	所属機関・部局・役職	役割
八尾 寛	東北大学・大学院生命科学研究科・教授	研究代表者
石塚 徹	東北大学・大学院生命科学研究科・講師	チャンネルロドプシンの最適化
湯浅 英哉	東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授	アップコンバージョンナノ粒子の表面修飾
山中 章弘	名古屋大学・環境医学研究所・教授	ウイルスベクターの最適化
松井 広	東北大学・医学系研究科・准教授	イン・ビボ脳の近赤外光操作性の評価

2. 日本側研究チームの研究目標及び計画概要

WP2: チャンネルロドプシン活性化

昨年度の研究において、標的ニューロンの周囲に LNP のクラスターを形成することにより、LNP アップコンバージョンによる ChR 活性化効率が増大することを見出している。そこで、

相手国チーム(WP1)より、生体内における LNP クラスター形成に最適化された LNP の提供を受ける。これを、マウスのイン・ビボ大脳皮質に投与し、細胞間隙に形成される LNP クラスターを評価する。また、このようなクラスターが ChR を発現しているニューロンの周囲に形成されることが理想的である。この目的のため、相手国チーム(WP1)より、表面をリガンドで修飾した LNP の提供を受けるとともに、このリガンドを結合するような構造を細胞外ドメインに配した ChR を作製する。

WP3: 脳神経回路モデルを用いた評価

ChR を脳・脊髄神経系に発現させるウイルスベクターを最適化し、マウス大脳皮質ニューロンに発現させる。相手国チーム(WP1)において、神経細胞適合性において最適化されたアップコンバージョンナノ粒子ならびに日本側チーム(WP2)において最適化された ChR 活性化法について、イン・ビボ脳における神経細胞の近赤外光操作性を評価する。同様のイン・ビボ評価システムを用い、800nm および 980nm 近赤外光の照射パターンを ChR 活性化に最適化する。

3. 日本側研究チームの実施概要

WP2: チャネルロドプシン活性化

本研究においては、ランタニドナノ粒子(LNP)などのアップコンバージョンナノ粒子をドナー、チャネルロドプシン(ChR)をアクセプターとし、近赤外光で、神経細胞活動を操作する技術を最適化し、その効率を向上させることを目的としている。この目的を実現するにあたり、WP2 では、LNP をチャネルロドプシンの近傍にクラスター化することを試みた。しかし、ストレプトアビジンで表面修飾したランタニドナノ粒子は、凝集体を形成しやすく、作成、輸送、保存に課題が残された。また、細胞外ドメインにアフィニティ・タグを付加したチャネルロドプシンとストレプトアビジンの結合が弱いという問題が新たに見つかった。ストレプトアビジン-ビオチン結合システムに代わる新たな接着システムを考案する必要がある。

WP3: 脳神経回路モデルを用いた評価

興奮性ニューロン特異的にチャネルロドプシンを発現するよう最適化された AAV ベクターを用いて、イン・ビボ脳に神経細胞にチャネルロドプシンを発現させるとともに、発現ニューロンの近傍に LNP を投与した。光ファイバーを介し、近赤外レーザー光(980 nm)を頭蓋骨越しに AAV/LNP 投与部位にパルス照射したところ、パルスに同期した局所場電位応答とウイスカの運動が引き起こされた。引き起こしうる最小のレーザーパワーで持って、近赤外光操作性を評価したところ、アップコンバージョンによるチャネルロドプシンの活性化の効果と温度上昇の効果を判別できなかった。日本側チーム(WP3)の山中章弘(名古屋大学)らの研究においては、アップコンバージョンによるチャネルロドプシンの活性化の運動促進効果が温度上昇の効果と分離できたものの、その差が大きくない問題点が残されている。また、マウス運動促進は、チャネルロドプシンの活性化と温度上昇の相乗効果かもしれない。われわれは、イン・ビボ大脳皮質ニューロン間には強い相互抑制があり、局所の興奮が広範囲に伝播しないことを見出している。アップコンバージョンを用いた近赤外光光操作において、温度の影響を最小限に留める程度の弱いパワーでニューロンを活動させるには、相互抑制効果を低下させる脱抑制が効果的であると考えられる。