

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19492

研究課題名(和文) マカクザルを対象とした光遺伝学技術の適用

研究課題名(英文) optogenetic application to the macaque monkey

研究代表者

山田 洋(Yamada, Hiroshi)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：70453115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、霊長類に光遺伝学を適用する方法を確立し、汎用性の高い実験を行うことを目的として光操作実験を行った。脳の中で広範な領域に観察される大脳皮質-線条体投射に着目し、特に、前頭葉-線条体の神経投射を選択的に操作することで、前頭葉の活動が線条体の活動を引き起こす仕組みを明らかとするための実験を行った。ウィルスの注入を前頭前野に行い、当該脳部位及び、投射領域の線条体に光刺激を行った。線条体を光刺激した所、応答する細胞があまり観察されなかったため、注入部位の前頭前野の光刺激を行った。その結果、応答細胞は少数ではあるが観察されることを確認した。今後継続して現在の手法を改良し、実験を成功に導きたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、神経科学の最先端の技術として開発が進む光遺伝学の技術を霊長類に適用することを目指して研究を行った。現在、神経科学は様々な技術開発が進み転換期を迎えている。新たな実験技術を導入・適用することで、これまで調べるのが難しかった脳の活動の仕組みを、ヒト認知機能のモデル動物のサルで調べることを目指した本研究は、ヒトの心が生まれる仕組みの解明に繋がる可能性を持つ。今後、更に方法を精査することで、本研究の更なる成功により、霊長類の脳が複雑な認知機能を生み出す仕組みの解明に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：We conducted experiments for the purpose of establishing a method of applying optogenetics to primates. Among the cortico-striatal projection observed in a wide area in the brain, the activity of the fronto-striatal projection is manipulated in the striatum. An experiment was conducted to clarify the mechanism that causes the activity of striatal neurons by cortical inputs. After recording and analyzing neural activity from the prefrontal cortex where the virus was injected, the virus was injected and the striatum of the brain region and the projection region was light-stimulated. When the striatum was stimulated optically, few responding cells were observed, so light stimulation of the dorsolateral prefrontal cortex at the injection site was performed. As a result, it was confirmed that a small number of responding cells were observed. In the future, I hope to continue to improve the current method and lead the experiment to success.

研究分野：神経科学

キーワード：光遺伝学 サル 認知機能

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

光遺伝学の技術を用いると、脳の活動を極めて短い時間で操作できるため、記憶や判断などのごく短い間に生じる脳の活動を操作することが可能となる。しかし、実験動物の中で最もヒトに近い脳を備えたマカクザルでは、光遺伝学の適用例が極めて限られている。更に、思考や判断といった高次の認知機能を生み出す脳部位を対象にした光操作は、ほとんど報告されていない。そこで、光遺伝学の技術をマカクザルに適用することで、価値判断に関わる認知機能を操作する。霊長類を対象とした光操作技術は、本研究分野において有用なツールとなるため、将来的に様々な認知機能の解明に貢献し、大きな発展が見込まれる。

2. 研究の目的

光遺伝学の技術をマカクザルの前頭葉に適用することで、価値判断を生み出す前頭葉の神経回路の活動を光刺激で操作する。特に、前頭葉 - 線条体の神経投射を選択的に操作することで、前頭葉の活動が線状体の価値判断に関わる活動を引き起こす仕組みを明らかとする。本研究では、次の二つの目的の達成を目指し研究を実施した。

目的1) マカクザルに対する光遺伝学の適用：代表者は、光遺伝学を用いて、非ヒト霊長類(マカクザル)の脳活動を操作する技術の確立を目指す。神経細胞に光受容体遺伝子を導入・発現させることで、脳活動を光刺激で操作することを可能とする。時間分解能が高い光の物理的な性質を活かして、ごく短い時間(数十ミリ秒~数百ミリ秒)で起こる脳活動の操作を実現する。

目的2) 前頭葉 - 線条体の神経路を対象とした光操作： 霊長類の前頭葉を中心とする神経回路は進化の過程で大きく発達した。前頭葉は、思考や判断などの高次の認知機能に関わることが示されてきたが、近年、ものの良し悪しを判断する“価値判断”に関与することが明らかとなっている。加えて、前頭葉と繋がりを持つ大脳基底核や辺縁系などの複数の脳領域が協調して働くことで、一つの判断が生まれると考えられる。しかし、これらの神経回路が判断を生み出すメカニズムについては、大きな謎のままである。代表者は、前頭葉の一部である前頭眼窩野とその入力を受けとる線条体が、ともに価値判断に関わる点に注目し、前頭眼窩野から線条体へと送られる神経投射を選択的に操作する。光操作技術を用いることでこの神経回路を一時的に活性化する。そして、前頭眼窩野 - 線条体が価値判断に果たす役割を検証する。

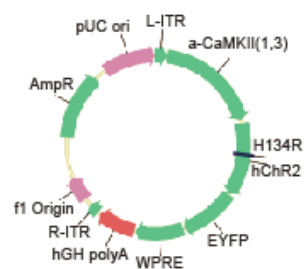
3. 研究の方法

前頭眼窩野 - 線条体の神経投射を、光刺激で選択的に操作する。光刺激を用いて大脳皮質 - 線条体投射を選択的に賦活させるために、ウィルスベクターを用いて前頭眼窩野の細胞に光受容体遺伝子のチャンネルロドプシン2を発現させる。そして、線条体の神経終末に光受容体遺伝子が発現する性質を利用し、前頭眼窩野 - 線条体投射を選択的に賦活する。

光受容体遺伝子の導入 前頭眼窩野は比較的大きな脳領域である。過去の解剖学的な知見から、前頭眼窩野が、線条体の腹側部、及び、中央部に密な投射を送ることがわかっている。その密な投射がある限られた前頭眼窩野の領域に、光受容体遺伝子を導入する。代表者は、前頭眼窩野の中央部を電気生理学的に同定することで、目的遺伝子の導入部位を決定する。

ウィルスベクター 代表者は、アデノ随伴ウィルスの血清型2 (AAV2)を用いて、次に述べる目的遺伝子を導入する。ウィルスベクターは、連携研究者から提供を受ける。前頭眼窩野の約10箇所(2ミリ間隔)にマイクロシリンジを用いてウィルスを注入する。注入電極を用いて細胞活動を確認後、ウィルスを注入する。

光受容体遺伝子 本研究では、チャンネルロドプシン2を用いることで、前頭眼窩野 - 線条体の神経投射を選択的に興奮させる。AAV-CaMKIIa-hChR2(H134R)-EYFP(右図)、あるいは、AAV-CMV-hChR2(H134R)-EYFPを用いる。



図：AAV-CaMKIIa-hChR2(H134R)-EYFP

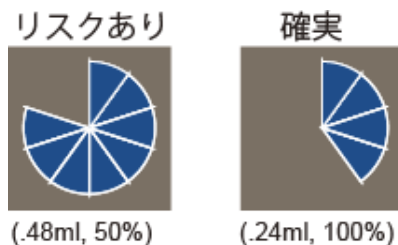
光受容体の発現の確認 1頭のマカクザルを用いて導入遺伝子の発現を確認する。感染細胞で光受容体と共に発現される、レポーター遺伝子として組み込んだ蛍光タンパク質(YFP)の発現により、前頭葉と線条体における光受容体の発現を確認する。

光刺激誘発活動の同定 レーザーを照射するための光ファイバーと神経細胞活動を記録するための電極が一つになったオプトロードを線条体に刺入し(右図)青色のレーザー光を照射する(100~1000ms, 473 nm wavelength, <1000 mW mm⁻²)。光受容体を導入したマカクザルの線条体を光刺激することでシナプス終末を活性化し、誘発された線条体の神経細胞活動を同定する。



行動課題 価値判断課題では、サルは目の前に提示された2つの視覚刺激(円グラフ)から1つを選ぶギャンブルを行う(右下図)。一方の選択肢は、一定量報酬が確実にもらえる安全な選択肢で、もう一方は、50%の確率で大きな報酬がもらえるリスクを伴う選択肢である。円グラフの面積が10段階で変化し、ジュースの量を0.06ml毎にサルに提示する[.06ml, .12ml, ..., .54ml, .60ml]。複数の異なる組み合わせの選択肢を用意し、サルのギャンブルに対する好みを測定する。

作業仮説 光刺激を用いて、前頭眼窩野から入力を受ける線条体の細胞を同定する。その後、ギャンブル課題中に活動を測定し、1.神経細胞活動が判断に関連するか、2.選択肢の価値を反映するかを検証する。最後に、光刺激を用いて前頭眼窩野からの入力を引き起こした際に、3.価値を反映した活動が変化するか、4.動物の判断行動が影響を受けるかを検証する。



4. 研究成果

本研究は、霊長類に光遺伝学を適用する方法を確立し、汎用性の高い実験を行うことを目的として、特に前頭葉 - 線条体の神経投射に注目し、前頭葉の活動が線状体の活動を引き起こす仕組みを明らかにするための研究を行った。光操作により動物の行動を操作するにあたっては、前頭葉の当該領域が動物の行動に応じて活動するかを事前に明らかにする必要がある。そのため、前頭前野から細胞活動の記録と解析を行った後に、当該部位へのウイルスベクターの注入を行い光受容体遺伝子を導入した。

前頭前野へのウイルスの注入後、感染が十分広がるのを待った後に、当該脳部位及び、投射領域の線条体に光刺激を行った。線条体を光刺激した所、応答する細胞があまり観察されなかったため、注入部位の背外側前頭前野の光刺激を行い、応答細胞は少数ではあるが観察されることを確認した。また、行動を詳細に観察したところ、ウイルスの注入前に比べて、眼球運動が若干遅く不正確になっていたため、実験操作により目的外の影響が現れた可能性が考えられた。この点を確認するために、脳の切片を作成し染色を行ったところ、ウイルスの注入部位の一部に目的外の損傷が観察された。今後継続して現在の手法を改良し、実験を成功に導きたい。

この研究を通して、線条体の細胞活動の性質を記録・解析したため、その結果を2報の論文として報告した。萌芽研究として、上記のように一定の進捗を得ることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Enomoto K, Matsumoto N, Inokawa H, Yamada H, Kimura M
2. 発表標題 Topographic distinction of reward value signals in the presumed dopamine neurons and striatal projection neurons in monkeys.
3. 学会等名 The Japanese Neuroscience Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamada H, Matsumoto M
2. 発表標題 Temporally stable expected value signals in ventral, but not in dorsal striatum of monkey
3. 学会等名 The Japanese Neuroscience Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamada H, Matsumoto M
2. 発表標題 Stable and unstable signals for encoding expected values in ventral and dorsal striatum of monkeys.
3. 学会等名 Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田 洋, 松本 正幸
2. 発表標題 Stable and unstable signals for encoding expected values in ventral and dorsal striatum of monkey
3. 学会等名 次世代脳プロジェクト 2018年度冬のシンポジウム
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

筑波大学 研究者総覧
<https://trios.tsukuba.ac.jp/researcher/0000003502>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------