

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08138

研究課題名（和文）インビボイメージングによる非ヒト霊長類脳へのDREADD技術の最適化に関する研究

研究課題名（英文）Optimization of DREADDs technology to the non-human primate brain using in vivo imaging

研究代表者

永井 裕司（Nagai, Yuji）

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子医科学研究所 脳機能イメージング研究部・研究員

研究者番号：20415409

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：近年の遺伝子導入技術の発展やPETによる導入遺伝子の脳内発現を生体内で可視化する技術によって、脳神経活動を操作できる化学遺伝的技術の1つであるDREADDsがげっ歯類だけでなく非ヒト霊長類にも応用され始めている。本研究では今後さらに新しいDREADDs関連技術（ウイルスベクターや作動薬等）の開発が続くと予想されることから、非ヒト霊長類への効率的な最適化法を確立することを目指した。その結果、PETはDREADDsの発現や脳神経活動操作を実験期間の任意のタイミングで定量的に評価できることが示唆され、非ヒト霊長類を用いた脳科学研究へ効率的に適用可能なことが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

精神・神経疾患は脳機能ネットワークの破綻によって引き起こされると考えられ、その基盤となる脳機能ネットワークの動作原理を知ることは極めて重要である。その研究手法の1つとして脳神経活動を操作できるDREADDsがあり、操作の可否を決めるDREADDsの発現をPETを用いることで生きたまま確認することができるようになったため、研究を効率的に進めることができる。また将来DREADDsを精神・神経疾患の遺伝子治療へ応用されることも期待されており、DREADDsの生体内イメージングは治療の成否や治療効果の評価にも応用が可能と考えられる。

研究成果の概要（英文）：Recently, with the development of gene transfer technology and in vivo imaging of transgene expression in the brain by PET, DREADDs, one of the chemogenetic techniques that can repeatedly and remotely manipulate neuronal activity, is beginning to be applied not only to rodents but also to non-human primates. In this study, we aimed to establish an efficient optimization method for non-human primates, as we expect that new DREADDs-related technologies (viral vectors, agonists, etc.) will continue to be developed in the future. The results suggested that PET imaging can quantitatively evaluate the DREADDs expression and neuronal activity manipulation at any time during the experimental period and can be efficiently applied to neuroscience research using non-human primates.

研究分野：神経科学

キーワード：PET DREADD 化学遺伝学 非ヒト霊長類 in vivo imaging

1. 研究開始当初の背景

脳機能は、特定の機能を担当する多数の神経細胞からなる集団が形成され、それらがネットワークを構築して協調することで生み出されると考えられている。またそれらネットワークが破綻することで精神・神経疾患が発症すると考えられる。脳機能の異常がきたす疾患は多岐にわたり、その病態解明のために患者を対象とした研究のみならず多くの疾患モデル動物が用いられ様々な知見が得られている。特に非ヒト霊長類(サル類)の脳はヒトと解剖学的・生理学的な相関性が高く、ヒトと同様の高次脳機能を有し、脳機能の生物学的基盤に関する知見が豊富に存在することから妥当性の高いモデル動物として利用されている。

近年の遺伝子導入技術の進歩により、ウイルスベクターを脳の局所に注入して神経細胞集団に感染させ、その活動を操作する人工受容体を発現させることが可能となっている。その中で複数の脳部位の神経活動を同時に、繰り返し、非侵襲的に操作できる化学遺伝的技術の1つ Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs (DREADDs)は、近年我々が^[11C]clozapineを用いたポジトロンCT(PET)測定によりマカク属サル脳内のDREADDsを可視化することに成功し、DREADDsを介した神経操作により報酬関連行動に影響を与えることができたため[1]、げっ歯類だけでなくサル類にも応用され始めている。さらに我々は新しいPETトレーサーとして^[11C]DCZを開発し(特許取得済)これまでのトレーサーよりDREADDsの発現を鋭敏に検出できるようになったとともに、作動薬としての特性も有していることも明らかになってきた[2]。

一方で、今後も継続して開発されるだろうDREADDsの新しいウイルスベクターや作動薬に対してサル類に適用するための条件検討が必要だが、げっ歯類とサル類では必ずしも同じ条件が最適であるとは限らないため、サル類を用いた検討は必須である。しかしながら研究に利用できる個体数が限られるサル類を用いて従来の方で条件検討を行うには多大な時間的・経済的コストが必要となるため、より効率的な手法が求められる。さらにDREADDsを介した神経細胞操作により脳機能に影響を与えるためには、少なくとも導入部位でDREADDsが発現すると同時に神経活動の変化が起こらなければならない。それを解決するため、DREADDsの発現量およびそれを介した神経活動の操作に伴う血流や代謝の変化をin vivoで定量評価する方法が確立できれば効率的な条件の最適化が可能になる、と考えた。

2. 研究の目的

本研究ではサル類にDREADDsを適用するためのin vivoイメージング法を用いた効率的な条件の最適化手法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ^[11C]DCZを用いたPET測定によるDREADDs発現レベルの経時的な評価

DREADDs発現レベルをPETで経時的に評価するため、2頭のマカク属サルに対して興奮性DREADDsであるhM3Dqを発現するウイルスベクターを左右の尾状核および被殻に投与した。PET測定はトレーサーとして^[11C]DCZを用い、microPET Focus220を使ってイソフルラン麻酔下で測定した。hM3Dq発現レベルは小脳を参照領域としたoriginal multilinear reference tissue model (MRTMo)法[3, 4]を用いて結合能(BP_{ND})を算出し、ウイルスベクター投与前との差(ΔBP_{ND})を発現レベルとした。

(2) DREADD発現量とDREADD活性化に伴う糖代謝変化の評価

(1)で用いた2頭のマカク属サルに対して、hM3Dq活性化に伴う糖代謝の変化を評価するため^[18F]FDGを用いたPET測定をイソフルラン麻酔下で実施した。^[18F]FDG-PET測定開始1分前にDCZ(1μg/kg)または溶媒を投与し、PET測定開始後30~60分のデータを用いて^[18F]FDG集積量を全脳平均値で標準化した値(SUV_R)を用いてDCZと溶媒の負荷条件の差分(SUV_R)を糖代謝の変化量とした。

4. 研究成果

(1) hM3Dqを導入した2頭のマカク属サルに対してベクター投与後経時的にPET測定を実施した。図1に1頭の経時変化のグラフを示す。hM3Dq発現量はベクター投与後60日前後にピークに達し、その後約1年後まで発現レベルが維持されていることを確認できた。この傾向は2頭で一致していた。また図1の個体には濃度を2x10¹³gc/mlに統一したウイルスベクターを投与しており、ウイルスベクターの種類によって発現レベルが異なることも示された。例えばAAV2-hSyn1-hM3Dq(左側尾状核)とAAV2-hSyn1-hM3Dq-IRES2-AcGFP(右側

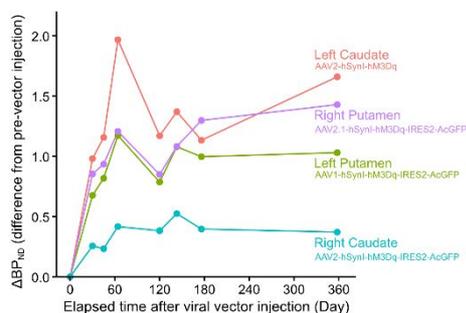


図1 DREADD発現量の経時変化
横軸はウイルスベクター投与日をDay 0とした経過日数、縦軸はDay 0との差分BP_{ND}値(ΔBP_{ND})を示す。ベクター投与前の値をDay 0にプロットした。60日前後にピークを迎え、そのレベルが約1年後まで維持されている。

尾状核)は IRES を介したタグの有無が異なっており、有りは無しより発現レベルが低かった。これは一般に IRES-GFP を含むウイルスベクターは導入遺伝子の発現が抑制されること [5-7] を反映していると考えられた。

(2)(1) で使用した 2 頭に対して DCZ (1 µg/kg) を負荷して hM3Dq を活性化した時の糖代謝の変化に関する PET 測定を [¹¹C]DCZ-PET と同時期 (10 日以内) に実施した。同時期の対となる hM3Dq 発現レベルに対して糖代謝の変化量をプロットしたところ正の相関を示した (図 2)。糖代謝の変化は hM3Dq 活性化による神経活動の変化を反映するもので、ウイルスベクターの種類に関わらず hM3Dq 発現レベルに依存するものと考えられた。

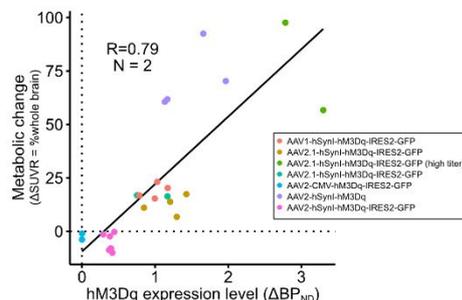


図2 hM3Dq発現レベルとhM3Dq活性化に伴う糖代謝変化の相関
hM3Dq発現レベルを横軸(ΔBPND)、hM3Dq活性化に伴う糖代謝の変化(ΔSUVR)を縦軸に示した。糖代謝の変化量はhM3Dq発現レベルと正の相関を示した。

以上の結果から、PET を用いた in vivo イメージングによる DREADDs の発現と神経活動の評価は、DREADDs を用いた実験期間の任意のタイミングで実施できることが示され、長期にわたる実験期間が必要なサルを用いた神経科学研究において実験効率を上げることが可能となることが示唆された。また導入した DREADDs の発現などを定量的に評価できるため、新規ウイルスベクター開発においても有用なツールであると考えられた。

今回、神経活動の変化を FDG による糖代謝の変化で示したが、神経活動の変化に伴って血流も変化することから [¹⁵O]H₂O を用いた PET 測定や機能的 MRI など他の in vivo イメージング法による評価も可能であると考えられる。また DREADDs を導入した神経細胞集団を選択的に操作できるため、神経活動変化に伴う糖代謝、脳血流、機能的 MRI で得られる BOLD 信号の変化が何を意味するのか検討するのに有用であると考えられ、それと脳機能の関係を検討するのに重要な役割を果たすと考えられる。

< 引用文献 >

1. Nagai et al (2016) PET imaging-guided chemogenetic silencing reveals a critical role of primate rostromedial caudate in reward evaluation. *Nat Commun* 7:13605
2. Nagai et al (2020) Deschloroclozapine, a potent and selective chemogenetic actuator enables rapid neuronal and behavioral modulations in mice and monkeys. *Nat Neurosci* 23:1157-1167
3. Ichise et al (1996) Noninvasive quantification of dopamine D2 receptors with iodine-123-IBF SPECT. *J Nucl Med* 37:513-520
4. Yan et al (2021) [¹¹C]deschloroclozapine is an improved PET radioligand for quantifying a human muscarinic DREADD expressed in monkey brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 41:2571-2582
5. Mizuguchi et al (2000) IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector. *Mol Ther* 1:376-382
6. Furler et al (2001) Recombinant AAV vectors containing the foot and mouth disease virus 2A sequence confer efficient bicistronic gene expression in cultured cells and rat substantia nigra neurons. *Gene Ther* 8:864-873
7. Zhou et al (1998) Co-expression of human adenosine deaminase and multidrug resistance using a bicistronic retroviral vector. *Hum Gene Ther* 9:287-293

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Oyama Kei, Hori Yukiko, Nagai Yuji, Miyakawa Naohisa, Mimura Koki, Hirabayashi Toshiyuki, Inoue Ken-ichi, Takada Masahiko, Higuchi Makoto, Minamimoto Takafumi	4. 巻 42
2. 論文標題 Chronic Behavioral Manipulation via Orally Delivered Chemogenetic Actuator in Macaques	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 2552 ~ 2561
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI.1657-21.2021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nagai Yuji, Miyakawa Naohisa et al.	4. 巻 23
2. 論文標題 Deschloroclozapine, a potent and selective chemogenetic actuator enables rapid neuronal and behavioral modulations in mice and monkeys	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1157 ~ 1167
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41593-020-0661-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Nagai Y, Miyakawa N, et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Deschloroclozapine: a potent and selective chemogenetic actuator enables rapid neuronal and behavioral modulations in mice and monkeys	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/854513	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yuji Nagai, Yukiko Hori, Ken-ichi Inoue, Kei Oyama, Naohisa Miyakawa, Toshiyuki Hirabayashi, Koki Mimura, Tetsuya Suhara, Masahiko Takada, Makoto Higuchi, Takafumi Minamimoto
2. 発表標題 Longitudinal assessment of DREADD expression and efficacy in the monkey brain
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 永井裕司
2. 発表標題 化学遺伝学受容体の新規リガンドdeschloroclozapineは迅速で選択的な神経細胞活動および行動を操作を可能する
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nagai Y, Miyakawa N, et al.
2. 発表標題 A novel ligand “ deschloroclozapine ” selectively visualizes and activates chemogenetic receptors in non-human primates
3. 学会等名 BrainPET 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永井裕司, 宮川尚久, Xi-Ping Haung, Samuel T. Slocum, Yan Xiong, 堀由紀子, 小山佳, 季斌, 平林敏行, 藤本淳, 三村喬生, Justin G. English, Jing Liu, 井上謙一, 熊田勝志, 関千江, 張明榮, 須原哲也, 高田昌彦, 樋口真人, Jian Jin, Bryan L. Roth, 南本敬史
2. 発表標題 化学遺伝学とPETイメージングによるサル脳活動操作とモニタリング
3. 学会等名 第66回日本獣医画像診断学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuji Nagai
2. 発表標題 A novel ligand selectively visualizes and activates chemogenetic receptors in non-human primates
3. 学会等名 The 93rd Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 人工受容体に結合する新規化合物、人工受容体のイメージング方法、アゴニストまたはアンタゴニスト、治療薬、コンパニオン診断薬、神経細胞のイメージング方法	発明者 南本敬史，永井裕司， 季斌，宮川尚久，樋 口真人，須原哲也	権利者 国立研究開発法 人量子科学技術 研究開発機構
産業財産権の種類、番号 特許、特許6926357	取得年 2021年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

-

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
---------	---------