

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 28 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12633

研究課題名(和文) 小型動物を用いた段階的に分析可能な人工視覚実験系の確立

研究課題名(英文) Development of a step-by-step analyzable artificial vision experimental system using small animals

研究代表者

増田 明 (Masuda, Akira)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・客員助教

研究者番号：30612121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：人工視覚は視覚系を刺激し視覚体験を再現する技術で、視覚障害の回復に期待される。視覚再生の高度化のためには、脳活動と実現視覚の関係明確化が重要と考え、人工視覚のための刺激-神経応答-行動の関係を明確化するプラットフォームを確立することを目的とし、以下の3つ、赤色LEDアレイと集光レンズによる多点光刺激システムの開発、小型神経活動イメージングデバイスに多点電気生理測定機能の組み込み、一次視覚野への光刺激およびデュアルリッキングシステムを用いた人工視覚分離課題の構築を実施し、それぞれ動作検証を行った。今後これらを組み合わせることで、刺激-神経応答-行動の関係を明確化されることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人工視覚の研究は、視覚障害者の回復に期待される技術であり、視覚障害者だけでなく、その周囲の支援を行う方も含め、社会的に重要な意義を持つ。この研究では、人工視覚の刺激、神経応答、行動の関係を明確にするための要素技術としてプラットフォームを確立し、これらを組み合わせることで、刺激、神経応答、行動の関係をより明確にし、さらにはより自然に近い人工視覚の実現へ応用されることが期待される。その先には、視覚障害者の生活の質を向上させ、彼らの社会参加を促進する可能性があると思われる。

研究成果の概要(英文)：Artificial vision stimulates the visual system to reproduce experiences and holds promise for restoring visual impairments. To achieve advanced restoration, understanding the relationship between brain activity and artificial vision perception is crucial. Our objective is to establish a platform that clarifies the stimulus-neural response-behavior relationship. We pursue three tasks: (1) developing a multi-point light stimulation system with a red LED array and focusing lens, (2) integrating electrophysiological measurement into a compact neural activity imaging device, and (3) constructing an artificial vision segregation task with light stimulation and a dual-licking system in the primary visual cortex, validating performance for each. Combining these efforts will comprehensively elucidate the stimulus-neural response-behavior relationship in the future.

研究分野：生体医工学

キーワード：人工視覚 光遺伝学 視覚野 小動物 神経細胞 行動

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

人工視覚は、喪失視力の回復が見込める数少ない手法のひとつである。脳の視覚野を刺激する「脳刺激型」の人工視覚は、網膜を刺激する網膜刺激型の人工視覚と比べ、適応患者数が多いという利点がある。視覚野刺激型の人工視覚システムはすでに臨床研究が行われているが、動物実験を利用した基礎研究が不足している。動物を用いた人工視覚の効果を行動学的に評価できる実験系が確立されておらず、人工的な視覚体験形成の基本的メカニズムについて不明点が多い。特に、刺激を受ける一次視覚野のどの細胞のどのような脳活動で人工的な視覚体験が引き起こされているかという問いが未解明のままである。この未解明点が残っている大きな原因は、電気刺激で脳を刺激する場合、複数の神経細胞種が同時に活性化され複雑となること、電極刺激では刺激と同時に神経活動を計測することが困難なこと、様々な刺激方法や神経活動測定方法を試せる動物実験での評価法が確立されていないということがあげられる。このような点のため、人工視覚による再建される視覚間隔が一定でないという問題が生じている。安定的な人工視覚を実現させるには、「どの細胞が、どのように活動した時に、どのような疑似的視覚が発生するか」を明確にする必要がある。また、脳を刺激する方法として、従来の高侵襲型の電気刺激法に代わり、光遺伝学的な刺激方法が近年検討され始めている。現在の主流である埋め込み電極による電気刺激は侵襲度が高く、後遺症などのリスクが高い。光遺伝学的という光に応じたチャネルやポンプ開閉が可能な光駆動タンパク質を遺伝学的に細胞に導入することで、光による神経細胞の操作が可能になっている。脳外部から光照射することで、神経系を光遺伝学的に活性化できれば侵襲度が低い治療法として新たな有望な治療法となる可能性がある。光遺伝学では特定の細胞種のみを標的とした刺激が可能であり、人工視覚の神経処理がより詳細に分割して計測および評価することが可能と思われる。

2. 研究の目的

本研究は、小型動物を用いた段階的に分析可能な人工視覚の実験系を確立し、刺激—神経応答—行動という3段階を結び付け、段階的に分析し関係を明確化させるプラットフォームを構築することを目的とした。

3. 研究の方法

段階的に分析可能な実験系を構築するために、(1)光遺伝学を用いた細胞種特異的な局所的刺激系、(2)大規模に神経活動を捉えるイメージング系、(3)実現視覚を行動学的に評価する人工視覚課題という要素技術についてその方法を項目ごとに記載する。

(1) 多点光刺激系の開発

多点を有する微小な発光ダイオード(LED)を動物頭部上方へアームにより留置し、集光レンズを介して集光させた光刺激システムを作成した。脳表上の照度を疑似的に測定するため、LED、レンズ、スクリーンを同一の距離に置き、照度計により計測し、放射照度を測定した。また、光遺伝学的刺激として動作検証のため、アデノ随伴ウイルスベクターを用いた遺伝子導入法の検討も行い、特定のタンパク質の発現を確認した上でその動物頭部への刺激を行った。刺激方法としては、LEDドットマトリクス全体から光を照射する広範囲条件と、1つのLEDドットのみから照射させる単ドット刺激の2つの条件を置いた。また、3×3の赤色LEDアレイを小型顕微鏡内に組み込むため光学系の開発を行った。

(2) 神経イメージングの開発

小型脳活動イメージングデバイスに電気生理測定機能を組み込んだ多機能神経活動イメージングデバイスを開発した。この小型デバイスは、CMOSイメージンセンサー、ファイバーオプティックプレート(FOP)、青色LED、および光学フィルター、多点電極アレイからなる。材料の選択には、生体適合性、信号の干渉、および電気測定モジュールの下に配置するイメージングモジュールなどを考慮した。高カリウム誘導性の神経興奮モデルにおいて電氣的な神経興奮およびカルシウムイオン蛍光プローブの蛍光増加を検出できるかどうか、また作成したデバイスが電気生理学的信号と神経活動イメージング信号の両方を検出する機能を持っているかどうかを検証した。

(3) 人工視覚分離課題:

デュアルリッキングシステムを用いた人工視覚分離課題の行動実験を行った。「人工視覚分離課題」とは、脳一次視覚野へ光刺激を与えたときの刺激特性の違いを動物へ学習させる新規の分離学習課題である。ラットの脳内に光駆動タンパク質を発現させ、光刺激に応じてリッキング行動を報酬として行う課題を設定した。

4. 研究の成果

(1) LED ドットマトリクス全体から光を照射する広範囲条件と、一つの LED ドットのみから照射させる単ドット条件で刺激を行った(図 1A)。脳表上の照度を疑似的に測定するため、LED、レンズ、スクリーンを同一の距離に置き、照度計 (S121C, Thorlabs Inc.) により計測し、 1 cm^2 へ広域定時した場合、 0.2 mW/cm^2 程度の放射照度が見込めることが分かった。なお、各ドットが格子状に集光されるため、局所的な放射照度はより高いと想定される。視覚野へ導入されたウイルスベクターより発現が誘導された光遺伝学用タンパク質 (ChrimsonR あるいは eNpHR-3.0) を蛍光顕微鏡下における脳薄切り切片で確認した(図 1B)。それらの動物個体において、興奮性神経細胞の活動を記録し、その挙動を解析した。LED 広範囲光刺激に応答した神経細胞群を同定したところ、興味深いことに、誘導された発火パターンは光照射が継続する時間にもかかわらず減衰したり、減衰後逆転反応を示したりするものが目立った。光刺激後、発火頻度を統計的に有意に上昇させた細胞の割合は、条件によって 11.5 ~ 26.2% とばらついた(図 1C)。次に、微小範囲刺激に応答した神経細胞を同定したが、条件によって 3.1 ~ 6.8% であった。測定した視覚野神経細胞は通常の視覚刺激への応答性は 48.5 ~ 52.6% であった。これらのことから、少なくとも 10% 程度以上の神経細胞へ興奮性を誘導できることが確認できた。

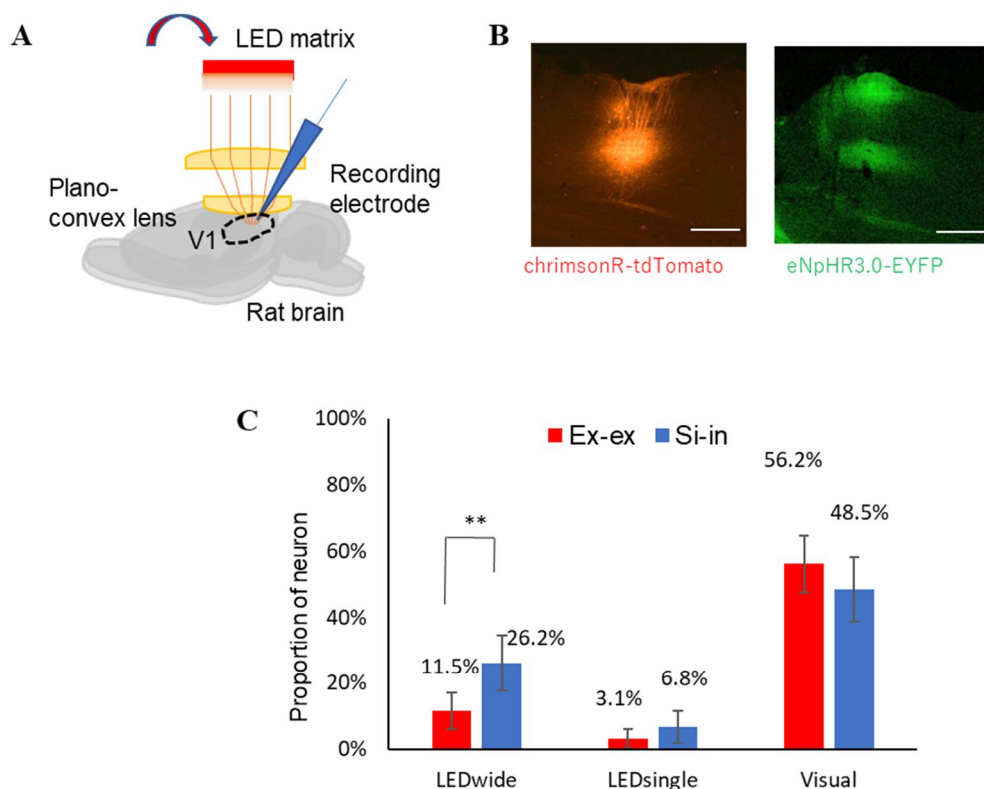


図. 1 多点LEDアレイを用いた集光型光遺伝学的刺激システムの作成
 (A) システムの概略と電気生理学的検証
 (B) 光遺伝学タンパク質の発現 (白スケールバー: $200\ \mu\text{m}$)
 (C) 光照射による視覚野神経細胞における活動上昇の割合

(2) 作成したデバイスの構成を図2に示す。培養系において、1 Mの KCl を 100 μ L 細胞チャンパーに添加し、刺激後に捉えられた蛍光信号の強度は、生理的条件よりも $16 \pm 3.5\%$ 上昇した。刺激前と比較し、細胞の電気信号の電位が $8.5 \pm 4.2 \mu$ V 増加し、発火率が 13% 増加した。これらことから、作成したデバイスが電気生理学的信号と神経活動イメージング信号の両方を検出する機能を持っていることを確認した。

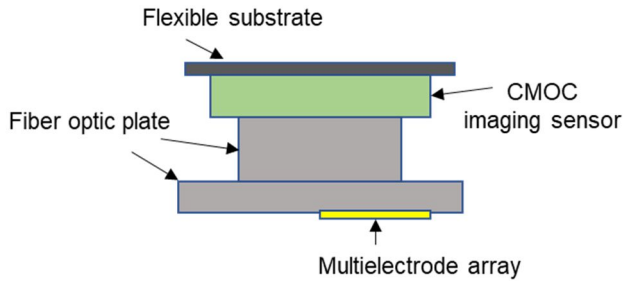


図. 2 多点記録電極を備える小型神経活動イメージング装置

(3) 一次視覚野へ光刺激を与えたときの刺激性質の違いを動物へ学習させ、その際、ラットの左右脳半球それぞれの視覚野領域に対し、アデノ随伴ウイルスベクターを介して細胞種を問わず ChRmine を発現させたあるいは抑制性細胞特異的に神経活動を抑制させる光駆動タンパク質である Jaws を発現させ、620nm のレーザー光にて頭頂付近から左右どちらかの一次視覚野へ照射した。左右の視覚野のどちらかへ光刺激を行い、その方向で Licking すると正解となるという学習を与えた結果、光刺激した方向を選択する回数が試行回数を重ねるにつれ増加した(途中 50 回試行で左右を切替、図3)。このことから、光遺伝学の人工視覚における一定水準の分離学習の成立を確認した。

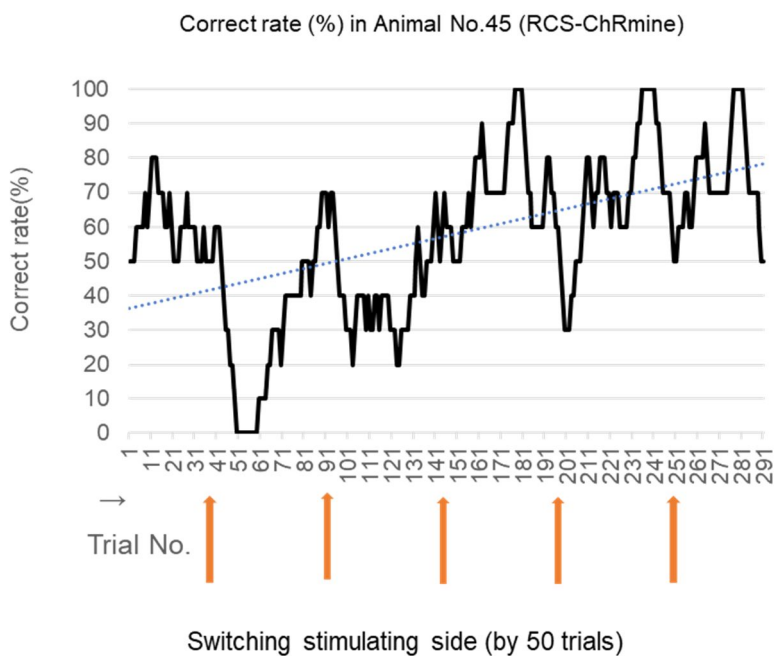


図. 3 全盲ラット視覚野の異所への光刺激による正答率の変化
(正答率は直近10回の平均により算出)

以上の成果により、安定的な人工視覚を実現するための脳活動と光刺激の関係を明確化するためのプラットフォームの開発を完了した。光刺激系の改良、神経イメージングデバイスの開発、人工視覚分離課題の実施という3つの項目において、進展を達成した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Masuda Akira, Takahashi Susumu	4. 巻 -
2. 論文標題 Comparison of Cell-type Specific Optogenetic Cortical Stimulation Targeting Distinct Neural Populations for the Restoration of Vision	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 2021 10th International IEEE/EMBS Conference on Neural Engineering (NER)	6. 最初と最後の頁 954-957
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1109/NER49283.2021.9441189	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Stephanie Sutoko, Akira Masuda, Akihiko Kandori, Hiroki Sasaguri, Takashi Saito, Takaomi C Saido, Tsukasa Funane	4. 巻 24
2. 論文標題 Early identification of Alzheimer's disease in mouse models: Application of deep neural network algorithm to cognitive behavioral parameters	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2021.102198	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 Sais Barbara Teixeira, Haruta Makito, Tso Kuang-Chih, Hagita Mizuki, Hagiwara Takanori, Sugie Kenji, Kimura Ayaka, Takehara Hironari, Tashiro Hiroyuki, Sasagawa Kiyotaka, Ohta Jun	4. 巻 34
2. 論文標題 Miniaturized Cell Fluorescence Imaging Device Equipped with Multielectrode Array	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sensors and Materials	6. 最初と最後の頁 1587 ~ 1587
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18494/SAM3758	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Akira Masuda, Susumu Takahashi
2. 発表標題 Activity Patterns of the Visual Cortical Neurons for Optogenetic Visual Prosthesis
3. 学会等名 第60回日本生体医工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akira Masuda, Susumu Takahashi
2. 発表標題 Cell-type-selective cortical stimulation with optogenetic tools for visual restoration
3. 学会等名 The 43rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akira Masuda, Susumu Takahashi
2. 発表標題 A physiological comparison between two distinct types of optogenetic cortical stimulations for visual restoration
3. 学会等名 12th FENS (Forum of Neuroscience) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Barbara Teixeira Sais, Makito Haruta, Kuang-Chih Tso, Mizuki Hagita, Takanori Hagiwara, Kenji Sugie, Ayaka Kimura, Hironari Takehara, Hiroyuki Tashiro, Kiyotaka Sasagawa, Jun Ohta
2. 発表標題 Compact device for simultaneous cell electrophysiological signal and fluorescence imaging acquisition
3. 学会等名 NEURO2022
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究分担者	春田 牧人 (Haruta Makito) (40733663)	奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教 (14603)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	高橋 晋 (Takahashi Susumu) (20510960)	同志社大学・脳科学研究科・教授 (34310)	

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