

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：33916

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22680

研究課題名(和文)低線量・低侵襲化を目的としたX線光遺伝学法の開発とその応用

研究課題名(英文)Development and application of X-ray optogenetics of low dose and low invasiveness

研究代表者

松原 崇紀(Matsubara, Takanori)

藤田医科大学・医学部・助教

研究者番号：50884475

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文):生体透過性の極めて高いX線とX線を可視光に変換させることのできるシンチレータ(Ce:GAGG)を用いて、脳深部のワイヤレス・ファイバーレス光遺伝学法を開発した(Matsubara et al., Nat. Communi. 2021)。オプシンを発現させた神経細胞周囲にシンチレータを注入することで、X線照射による神経活動を惹起し、神経細胞に特異的な行動を引き起こすことに成功した。本研究では高光感受性オプシン、粒子状のシンチレータ、X線のパルス照射を用いることで、脳組織に対する侵襲性およびX線の被曝量を低減させることに成功した。この技術は、将来的に様々な基礎研究や臨床治療に役立つことが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光遺伝学は、光感受性タンパク質を特定の細胞に発現させ、可視光を用いて神経活動を自由に操作できる方法である。しかしながら、可視光の生体透過性は極めて低いため、目的部位が深部の場合は光ファイバーを脳内に挿入する必要があり、脳組織の侵襲や行動制限を伴う。生体透過性が極めて高いX線を用いることで、それらの問題を解決することができる。また、X線の特性から大型の実験動物や鳥類、霊長類にも応用可能である。従って、この技術は制限のない状態で動物の行動観察や神経活動操作を可能にし、神経科学の研究を広く進展させることができる。

研究成果の概要(英文):We developed deep brain wireless and fiberless optogenetic tools using X-rays with high biological permeability and a scintillator (Ce: GAGG) that can convert X-rays to visible light (Matsubara et al., Nat. Communi. 2021). By injecting scintillators around opsin-expressing neurons, we have succeeded in inducing neural activity and neuron-specific behavior by X-irradiation. Using highly light-sensitive opsins, particle scintillators, and pulsed X-ray irradiation, we reduced the invasiveness to brain tissue and the radiation dose of X-rays. This tool is expected to be useful for various basic research and clinical treatments.

研究分野：神経科学

キーワード：光遺伝学 X線 シンチレータ ドーパミン神経

1. 研究開始当初の背景

光遺伝学は光感受性タンパク質を特定の細胞に発現させ、可視光を用いてその細胞を活性化させる技術である。しかしながら、使用している可視光は生体透過性が極めて低いことから、光ファイバーをその目的部位まで挿入する必要があり、動物の行動制限や組織に侵襲を生じさせる。その解決方法としてこれまでの報告によると近赤外光や μ LED を用いた光遺伝学法が開発されている。しかしながら、それらの方法には熱産生、生体透過性の制限、外科的処置の困難さ、光強度の弱さなどが問題点として挙げられており、システム神経科学の分野において使用されることが少ない。

これまでに、研究代表者は発案者である山下貴之博士（藤田医科大学・教授）とともに、生体透過性の極めて高い X 線と X 線を可視光に変換させるシンチレータ (Ce:GAGG) を用いて、脳深部神経細胞をワイアレス・ファイバーレスで操作する方法の開発に取り組んできた (Matsubara et al., *bioRxiv*, 2019)。開発当時は、X 線照射に伴い神経活動の分子マーカーである c-fos の発現や神経活動に特異的なマウスの行動を誘導することに成功したが、棒状のシンチレータを脳内に挿入するといった方法であるため、かなりの侵襲を伴う方法であった。また、シンチレータを発光させるために高強度の X 線を使用する必要があり、被曝線量も高かった。そこで、より脳内への侵襲が低く、低被曝線量の X 線光遺伝学法を開発する必要があった。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、本研究では独自に開発してきた X 線光操作法の問題点である脳への侵襲性と X 線被曝線量を極めて低くした方法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

Ce:GAGG の発光に最も適した新たなオプシンの探索と神経細胞への適応

Ce:GAGG は X 線および UV 照射により約 520nm の波長を発する。さまざまなオプシンを HEK293 細胞に発現させ、パッチクランプ法を用いて、UV 照射を行なった際に生じる誘発電流を測定した。その結果、興奮性オプシンでは最近見出された大電流オプシンである ChRmine が、抑制性オプシンでは stGtACR1 が最も有意に Ce:GAGG 結晶による約 520nm の蛍光波長に応答することがわかった。次に、ドーパミン神経特異的に Cre リコンビナーゼを発現する遺伝子改変マウス (DAT-Cre マウス) の中脳腹側被蓋野 (VTA) に Cre 依存的に ChRmine または stGtACR1 を発現するアデノ随伴ウイルスベクター (AAV-Ef1 α -DIO-ChRmine-eYFP または AAV-hSyn-SIO-stGtACR1-FusionRed) を局所注入した。注入より 3 週間後、急性スライスを作成し、パッチクランプ法を用いてオプシンを発現させた VTA のドーパミン神経から、UV 照射による Ce:GAGG 発光によって生じる電気的活動を記録した。

X 線照射による神経活動の操作

次に、生体マウスにおいて X 線照射による Ce:GAGG の発光が神経活動を誘導できるかどうかを確認するために、DAT-Cre マウスの VTA にアデノ随伴ウイルスベクターを用いて ChRmine を発現させた。3 週間の発現確認後、マイクロ粒子状に粉碎した Ce:GAGG 粒子 (平均 ϕ 2 μ m) を VTA 周囲に注入した。麻酔下にて X 線照射を行い、90 分後に灌流固定した。神経活動マーカーである c-fos の発現を確認するために、脳組織切片を作成したのち、免疫染色を行った。コントロール群として hrGFP 発現マウス、X 線照射なし、Ce:GAGG 粒子注入なしの 3 群を作成した。

X 線によるマウスの行動操作

VTA の DA 神経は場所嗜好性に関与することが知られている。従って、DA 神経を活性化すると滞在場所を好み、抑制すると滞在場所から逃避するといった行動を観察することができる。条件づけ場所嗜好性 (嫌悪性) 試験を用いてマウスの場所嗜好性を確認した。これまでの実験と同様に DAT-Cre マウスの VTA に ChRmine またはコントロールとして hrGFP を発現するアデノ随伴ウイルスを局所注入し、3 週間の発現確認後、Ce:GAGG 粒子を VTA 周囲に注入した。テストチャンパーへの馴化後、非刺激条件でマウスの滞在率を確認した。その後、マウスを片側のチャンパーに閉じ込め、一方のチャンパーでは X 線照射を行う条件付けを、もう一方のチャンパーでは X 線照射を行わない条件付けをそれぞれ 4 日間行なった。鉛を用いた自作のパルスチョッパーを用い

て、パルス状に X 線照射を行った。条件づけ後、再度マウスの場所滞在率を算出した。一方、DA 神経の抑制化実験では DAT-Cre マウスの VTA に stGtACR1 またはコントロール用の hrGFP を発現するアデノ随伴ウイルスを局所注入し、3 週間の発現確認後、Ce:GAGG 粒子を VTA 周囲に注入した。活性化実験と同様にテストチャンパーへの馴化後、非刺激条件でマウスの滞在率を確認した。マウスが自由にチャンパーの行き来ができる状態で X 線照射による条件付けを 2 日間行った後、再度マウスの場所滞在率を算出した。

Ce:GAGG の脳組織に対する侵襲性と X 線被曝線量の検討

脳内への異物の注入は物理的刺激による神経細胞の減少と注入部位周囲にミクログリアやアストロサイトの集積が生じる。そのため、脳内の Ce:GAGG 粒子周囲の神経細胞数とミクログリアおよびアストロサイトの局在を確認した。マウスの VTA 周囲に Ce:GAGG 粒子を注入し、注入 1 週間後および 4 週間後に灌流固定した。神経細胞のマーカーである NeuN 抗体、ミクログリアのマーカーである Iba1 抗体、およびアストロサイトのマーカーである GFAP 抗体を用いて Ce:GAGG 注入周囲の免疫染色を行った。ネガティブコントロール群として Vehicle 注入群、ポジティブコントロールとして光ファイバー挿入群を作成した。

一方で、X 線は累積線量に応じて放射線感受性の高い分裂細胞群に損傷を生じさせる。行動実験で用いた X 線量がマウスの分裂細胞に影響を与えているか否かを検討するために、行動実験で用いた X 線量と同等の X 線照射を行ったマウスを作成し、海馬歯状回顆粒細胞層における未成熟細胞数や血液脳関門の損傷の有無を Doublecortin および Mouse serum albumin の免疫染色にて確認した。さらには X 線照射後におけるマウスの行動量についても検討した。

4. 研究成果

Ce:GAGG の発光に最も適したオプシンの探索と神経細胞への適応

ChRmine を発現させた VTA ドーパミン神経は Ce:GAGG 結晶からの約 520nm の発光波長により、脱分極性の光電流を誘発でき、蛍光強度依存的に光電流の大きさも変化することがわかった。さらに、Ce:GAGG 発光 ($1.7\mu\text{W}/\text{cm}^2$) は VTA ドーパミン神経の発火頻度を増加させた。一方で、stGtACR1 を発現した VTA ドーパミン神経は、Ce:GAGG 結晶からの発光波長により、過分極性の光電流を誘発でき、蛍光強度依存的に光電流の大きさも変化することがわかった。さらに、Ce:GAGG 発光 ($1.7\mu\text{W}/\text{cm}^2$) は VTA ドーパミン神経の発火頻度を減少させた。これらの実験より、Ce:GAGG 結晶からの発光波長は ChRmine および stGtACR1 の活性化波長であり、それらのオプシンを発現した VTA ドーパミン神経は極めて弱い蛍光強度で神経活動を操作できる可能性が示唆された。

X 線照射による神経活動の操作

c-fos は神経活動の初期に出現するタンパク質である。X 線照射による Ce:GAGG 粒子からの発光は、ChRmine 発現 VTA ドーパミン神経の c-fos 陽性細胞数を増加させた。一方で、hrGFP 発現マウス、X 線照射なし、Ce:GAGG 粒子注入なしの 3 つのコントロール条件において、c-fos 陽性細胞がほとんど見られなかった。これらの結果より、X 線照射は Ce:GAGG 粒子の発光を介して VTA ドーパミン神経に発現している ChRmine を活性化させ、神経活動を誘導できる可能性が考えられた。

X 線によるマウスの行動操作

X 線照射による Ce:GAGG の発光がマウスの行動を操作できるかどうかを確認するために、条件づけ場所嗜好性 (嫌悪性) 試験を用いた。VTA ドーパミン神経に ChRmine を発現させたマウスにおける X 線照射側チャンパーの滞在率は、hrGFP を発現させたコントロールマウスよりも上昇していた (図 1a)。一方で、stGtACR1 を発現したマウスは、hrGFP を発現したコントロールマウスより X 線照射を行わなかったチャンパーでの滞在を好むようになった (図 1b)。

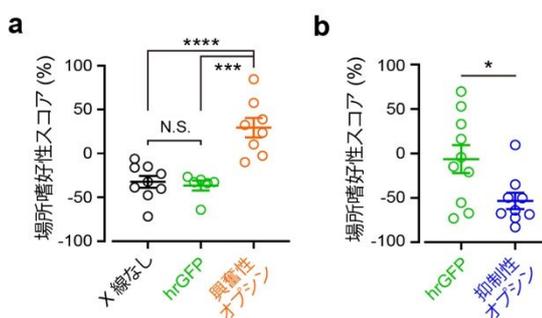


図 1. X 線照射によるマウス行動の操作

Ce:GAGG の脳組織に対する侵襲性と X 線被曝線量の検討

Ce:GAGG 粒子を注入した周囲の神経細胞数は Vehicle 注入群と変化がないことが明らかになった。注入後 1 週間後、4 週間後ともに周囲の神経細胞数が減少することはなかった。光ファイバーを挿入した周囲では、ほとんど神経細胞を確認することができなかった。Iba1 および GFAP 陽性細胞は Ce:GAGG 粒子および Vehicle 注入 1 週間後に一過的に上昇するものの、4 週間後にはほとんどその集積は見られなかった。

ChRmine 発現マウスを用いた活性化行動実験における X 線量は ~ 0.5 Gy であり、stGtACR1 発現マウスを用いた抑制化行動実験における X 線量は ~ 7 Gy であった。活性化行動実験で用いた X 線量では海馬歯状回顆粒細胞層における Doublecortin 陽性細胞数に変化は見られなかった。一方で、抑制化行動実験で用いた X 線量では Doublecortin 陽性細胞数が減少していることがわかった。 ~ 7 Gy の照射により減少した Doublecortin 陽性細胞数は照射後 8 週間経過してもその細胞数が回復することはなかった。また、X 線照射による血液脳関門の破損はどちらの X 線量においても認められなかった。抑制化行動実験における X 線量は一部の分裂細胞に影響していることがわかったが、X 線照射のないマウスと比較して運動量や運動速度には変化がないことが確認された。

以上の結果から、X 線光遺伝学法によりマウスの行動を操作できることを示した。本研究において Ce:GAGG 粒子および高光感受性オプシン、X 線のパルス照射を用いることにより、脳組織に与える侵襲の低減、被曝線量の軽減に成功した。しかしながら、神経細胞を抑制するためには長期的にオプシンを活性化させる必要があるため、被曝線量を軽減させることは難しかった。X 線は、そのほとんどのエネルギーが生体を透過することから、マウスのみならずより大きな実験動物(ラット、フェレット等)または霊長類を対象とした生体機能操作を実現できる可能性がある。しかしながら、この技術を臨床で用いる治療法へと昇華させるためには、更なる侵襲・被曝線量の低減やシンチレータを局部に送達する方法の開発が必要となる。

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 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Matsubara Takanori, Yanagida Takayuki, Kawaguchi Noriaki, Nakano Takashi, Yoshimoto Junichiro, Sezaki Maiko, Takizawa Hitoshi, Tsunoda P. Satoshi, Horigane Shin-ichiro, Ueda Shuhei, Takemoto-Kimura Sayaka, Kandori Hideki, Yamanaka Akihiro, and Yamashita Takayuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Remote control of neural function by X-ray-induced scintillation	5. 発行年 2020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) 10.1101/798702	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 -

1. 著者名 Matsubara Takanori, Yanagida Takayuki, Kawaguchi Noriaki, Nakano Takashi, Yoshimoto Junichiro, Sezaki Maiko, Takizawa Hitoshi, Tsunoda Satoshi P., Horigane Shin-ichiro, Ueda Shuhei, Takemoto-Kimura Sayaka, Kandori Hideki, Yamanaka Akihiro, Yamashita Takayuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Remote control of neural function by X-ray-induced scintillation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	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) 10.1038/s41467-021-24717-1	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 Matsubara Takanori, Yamashita Takayuki	4. 巻 8
2. 論文標題 Remote Optogenetics Using Up/Down-Conversion Phosphors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Biosciences	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) 10.3389/fmolb.2021.771717	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松原崇紀, 柳田健之, 河口範明, 中野高志, 瀬崎真衣子, 滝澤仁, 山中章弘, 山下貴之
2. 発表標題 シンチレータ・マイクロ粒子を用いた遠隔的神経機能操作法の開発
3. 学会等名 第67回中部日本生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松原 崇紀、柳田 健之、河口 範明、中野 高志、瀬崎 真衣子、滝澤 仁、山下 貴之
2. 発表標題 X線を用いた極低侵襲性ワイアレス光遺伝学
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会・CJK第1回国際会議
4. 発表年 2021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
研究協力者	山下 貴之 (Yamashita Takayuki) (40466321)	藤田医科大学・医学部 生理学II講座・教授 (33916)	

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