

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700489

研究課題名(和文) 霊長類記憶機構の解明：ウイルスベクターを用いた光遺伝学と高磁場 fMRI の融合研究

研究課題名(英文) Elucidation of memory mechanisms in primate brain: A combinatorial study using viral vector-based optogenetics and high-field functional MRI

研究代表者

大橋 陽平 (Yohei, Ohashi)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・特任講師

研究者番号：20597629

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000 円、(間接経費) 990,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究は、霊長類下部側頭葉の神経細胞群が、記憶の符号化・想起時に果たす役割を、光遺伝学的手法を用いて、その神経細胞活動を制御することで、明らかにすることが目的である。研究期間内においては、下位目標を含め以下4点を達成した。1. ラット小脳プルキンエ細胞の光遺伝学的操作及び血圧との因果関係の証明、2. 霊長類用オプトロード(光ファイバー内包ガラス被覆式タンゲステン電極)の開発、3. 霊長類及びげっ歯類の運動皮質におけるウイルスベクターに搭載された内部プロモーターの機能解析、4. 霊長類及びげっ歯類の視床への光遺伝学の適用と機能的磁気共鳴画像(opt-fMRI)の取得条件の最適化、である。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study was to elucidate the role of the neurons in the macaque inferior temporal cortex during the encoding and retrieval of memories by using optogenetic control of the neuronal activities. During the research period, I accomplished the following four works. 1. optogenetic control of cerebellar Purkinje cells in vivo and elucidation of causal relationships between cerebellar Purkinje cells in the lobule VI and blood pressure, 2. development of a novel glass-coated optrode for monkey optogenetics, 3. functional analysis of seven promoters in rat and monkey motor cortex after lentiviral vector-mediated gene transfer, 4. application of optogenetic techniques to rat and monkey thalamus and optimization of experimental conditions of an opt-fMRI.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・融合基盤脳科学

キーワード：光遺伝学 オプトジェネティクス 霊長類 大脳皮質 視床 高磁場fMRI アデノ随伴ウイルスベクター
ー レンチウイルスベクター

1. 研究開始当初の背景

記憶とは「脳に蓄積されている過去に関する情報」であり、我々自身の存在の基盤のみならず、ヒトが社会を構築・維持する上でも必要不可欠なシステムである。当研究代表者の出身・所属研究室(宮下保司研究室)では、この記憶システムを研究するにあたり、視覚対連合記憶課題遂行中のマカクサルを用い、その下部側頭葉を対象として、行動学・電気生理学・組織学・分子生物学的解析を行なうことで、多くの知見を蓄積してきた(Sakai and Miyashita, *Nature*, 1991; Higuchi and Miyashita, *PNAS*, 1996; Hasegawa et al., *Science*, 1998; Tomita et al., *Nature*, 1999; Tokuyama et al., *Nature Neuroscience*, 2000; Naya et al., *Science*, 2001; Yoshida et al., *PNAS*, 2003; Takeda et al., *Neuron*, 2005)。これらの研究の結果、視覚対連合記憶課題の遂行に関連した活動を示す神経細胞が下部側頭葉に数多く存在することが確かめられてきた。これらの神経細胞は、記憶の符号化をするもの、想起に関わるもの、手がかり刺激情報を保持するものなどいくつかのタイプに分類される。しかし、これらの神経細胞群は、記憶課題の遂行に関連した活動を示すことが明らかにされているものの、記憶課題の遂行に「必要」であるといった因果関係は自明ではなく、また下部側頭葉の局所回路の作動原理も明らかにされていない。

光遺伝学(オプトジェネティクス; Optogenetics)は、「遺伝子工学と光学を組み合わせて、特定のタイプの細胞の研究を行なう分野」であり、中でも特に青色レーザー照射で神経細胞を msec 単位で活性化できるチャンネルロドプシン2や、橙色レーザー照射で神経細胞活動を msec 単位で抑制することが可能なハロロドプシン(Zhang et al., *Nature*, 2007)は極めて有用で、この方法論の出現により神経科学研究の様相が大きく変化しつつある。宮下保司研究室においても当研究代表者らにより、2006年頃よりその feasibility の検討が行なわれ、現在では高力価レンチウイルスベクターを用いたラット及びマカクサルへの *in vivo* 遺伝子導入(Ohashi et al., *Mol. Cell. Neurosci.*, 2011; Sato, Ohashi et al., GCOE「生体シグナルを基盤とする統合生命学」3rd Retreat, 2010)、レーザー照射によるラット脳の生理機能制御に成功している(Tsubota, Ohashi, et al., *PLoS One*, 2011 (研究開始当時は *in preparation*))。

本研究においては、以上のような現状を踏まえ、マカクサル神経回路の光操作に着手する。マカクサルへの光遺伝学の適用の報告例は、現在までに少数(Han et al., *Neuron*, 2009)しかないが、上記 pilot study の結果、実現可能であると判断するに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、霊長類下部側頭葉の神経

細胞群が、記憶の符号化・想起時に果たす役割を、光遺伝学的手法を用いて、その神経細胞活動を制御することで、明らかにすることである。

具体的には、光を感受して神経細胞活動を制御するチャンネルロドプシン2/ハロロドプシンを、ウイルスベクターによりサル下部側頭葉に共発現させる。光制御下の神経活動を機能的磁気共鳴画像法(fMRI)により解析することで、下部側頭葉と機能的に結合関係を持つ領域の探索を行なう。またこのサルを用いて、覚醒下課題遂行中に、光制御を行なうことで、1. 記憶想起時の下部側頭葉局所回路の作動原理、2. 記憶想起と下部側頭葉の因果関係、を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 本研究の前段階として、以下3つの下位目標を設定した。それぞれにつき概要を説明する。

ラットを用いた光遺伝学実験系の確立。レンチウイルスベクターを用いて、ラット小脳プルキンエ細胞特異的にチャンネルロドプシン2及びハロロドプシンを発現させ、その神経細胞活動を光照射により制御可能であることを実証する。また、小脳第9小葉のプルキンエ細胞を特異的に標的とすることで、血圧の制御をも試みた。

霊長類に適用可能な新型オプトロードの開発。光遺伝学実験にはオプトロードと呼ばれる光照射と電気生理記録を同時に可能にする電極が一般的に使用される。しかしながら、当研究代表者らが本研究を開始した時点においては、霊長類の大きな脳に適用可能なオプトロードは存在していなかった。そのため、通常霊長類の電気生理記録に使用されるタングステン電極に4本の光ファイバーを組み合わせ、さらにこれをガラスコートすることにより、霊長類用のオプトロードの作製を試みた。

霊長類及びげっ歯類におけるウイルスベクターに搭載された内部プロモーターの機能解析。霊長類、特にマカクザルに対し、遺伝学的手法を適用する場合、ウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行なうことが一般的である。その際、目的遺伝子の発現量・発現パターンは、ウイルスベクターに搭載された内部プロモーターの特性により決定される。しかしながら、霊長類の脳における内部プロモーターの特性は十分に解明されていない。本下位プロジェクトにおいては、レンチウイルスベクターを用いて、マカクザルの運動皮質において、7種のプロモーター(MSCV, CMV, CAG, EF1a, RSV, Synapsin I, CaMKIIa)の特性について詳細に調べた。さらにはラットとの種差についても検討を行なった。

- (2) 上記研究結果に基づき、以下を遂行した。まず、霊長類大脳に効率良く光遺伝学的手法を適用するため、チャンネルロドプシン 2 (またはそのバリエーション) 及びハロロドプシンを共発現させることが可能なアデノ随伴ウイルスベクターを作製した。また、レンチウイルスベクターも作製した。これらをラットの視床に注入し、数週間の飼育期間を経た後、電気生理学的に光反応性を確認し、機能的磁気共鳴画像法にて BOLD 信号の取得を試み、組織学的に目的の蛋白質の発現を確認した。続いて、ラットと同様にマカクザルの視床にもウイルスベクターを接種し、数週間の飼育期間を経た後、電気生理学的に光反応性を確認し、機能的磁気共鳴画像法にて BOLD 信号の取得を試み、組織学的に目的の蛋白質の発現を確認した。

4. 研究成果

- (1) 3 つの下位目標の成果について記載する。

ラットを用いた光遺伝学実験系の確立。L7 プロモーター及びチャンネルロドプシン 2/ハロロドプシンを搭載したレンチウイルスベクターを開発した。本ベクターは小脳プルキンエ細胞特異的に遺伝子発現をもたらすこと、小脳プルキンエ細胞の神経活動を活性化 (青色光)・不活性化 (橙色光) できることを証明した。さらには、小脳虫部第 9 小葉に存在する循環制御部位内のプルキンエ細胞活動と動脈圧との因果関係を明らかにした (Tsubota, *Ohashi et al.*, *PLoS One*, 2011)。また、上記循環制御部位の生理学的意義を明らかにすることを目的として、ラットの姿勢変化時に第 9 小葉プルキンエ細胞活動を抑制する実験を実施した。これにより、姿勢変化後の動脈圧の安定性の維持に、第 9 小葉プルキンエ細胞活動が必要であることが示された (Tsubota, *Ohashi et al.*, *Neuroscience*, 2012)。

霊長類に適用可能な新型オプトロードの開発。霊長類の電気生理記録に使用されるタングステン電極に 4 本の光ファイバーを組み合わせ、さらにこれをガラスコートすることにより、霊長類用のオプトロードを作製した。このオプトロードは、曲がりにくくかつ長い軸を持ち、表面はなめらかで硬く、鋭い先端形状を特徴としている。また、4 つの光ファイバーから同時に光照射することで従来型よりも広範囲の光照射が可能である。4 つの光ファイバーのうち 1 つを検出器に接続することにより、*in vivo* で励起された GFP 等の蛍光を検出することも可能であった。本研究では、この新型オプトロードをラット及びマカクザ

ルに適用し、実際に大型動物の脳深部領域 (視床) においても電気生理学記録・光照射・蛍光測定を同時に可能にすることを実証した (Tamura, *Ohashi et al.*, *J. Neurosci. Methods*, 2012)。

霊長類及びげっ歯類におけるウイルスベクターに搭載された内部プロモーターの機能解析。レンチウイルスベクターに搭載された 7 種のプロモーターの特性について、ラット及びマカクザルの運動皮質において詳細に解析した。まず、神経細胞-グリア細胞特異性について記載する。ラットの切片においては、CMV プロモーターを除く全てのプロモーターは、神経細胞に強い特異性を有していた (MSCV, $100 \pm 0.0\%$; CAG, $99.5 \pm 0.3\%$; EF1a, $99.9 \pm 0.1\%$; RSV, $99.5 \pm 0.3\%$; synapsin I, $100 \pm 0.0\%$; CaMKIIa, $100 \pm 0.0\%$)。CMV プロモーターの場合は、主に感染範囲の端において GFP 陽性アストロサイトが中程度 ($9.4 \pm 3.4\%$) 観察された。CMV プロモーターで観察された GFP 陽性アストロサイトの数は、他のプロモーターの場合よりも有意に多かった ($p < 0.01$, one-way ANOVA followed by Tukey-Kramer multiple comparison test)。一方、サルの切片においては、全てのユビキタスプロモーターで中程度の GFP 陽性アストロサイトが観察された (MSCV, $13.4 \pm 5.3\%$; CMV, $7.4 \pm 2.2\%$; CAG, $14.7 \pm 2.2\%$; EF1a, $7.8 \pm 2.7\%$; RSV, $7.0 \pm 2.8\%$)。ラットと同様に、synapsin I 及び CaMKIIa プロモーターは、サルの運動皮質においても強い特異性を有していた (synapsin I, $99.9 \pm 0.2\%$; CaMKIIa, $99.9 \pm 0.2\%$)。次に興奮性神経細胞 - 抑制性神経細胞特異性について記載する。ラットの切片においては、全てのプロモーターで GFP 陽性抑制性神経細胞が認められた (MSCV, $8.7 \pm 1.5\%$; CMV, $9.2 \pm 4.3\%$; CAG, $5.8 \pm 0.6\%$; EF1a, $5.4 \pm 1.0\%$; RSV, $4.6 \pm 1.6\%$; synapsin I, $5.4 \pm 1.4\%$; CaMKIIa, $6.3 \pm 1.1\%$)。プロモーター間での抑制性神経細胞の割合には有意差は認められなかった ($p = 0.604$, one-way ANOVA)。これら GFP 陽性抑制性神経細胞の割合は、ラット運動皮質の非感染領域における抑制性神経細胞の割合 ($17.3 \pm 1.6\%$, $n = 6$ rats) と比べて、有意に低かった ($p < 0.05$, one-way ANOVA followed by Dunnett's test)。一方、サルの切片においては、synapsin I 及び CaMKIIa プロモーターではほぼ全ての GFP 陽性神経細胞が興奮性神経細胞であった (synapsin I, $0.3 \pm 0.1\%$; CaMKIIa, $0.0 \pm 0.0\%$)。ユビキタスプロモーターでは、低い割合ではあるが GFP 陽性抑制性神経細胞が認められた (MSCV, $5.8 \pm 2.6\%$; CMV, $13.4 \pm 2.0\%$; CAG, $3.7 \pm 1.3\%$; EF1a, $7.8 \pm 2.0\%$; RSV,

4.9±0.7%)。これら GFP 陽性抑制性神経細胞の割合は、CMV プロモーターを除いて、サル運動皮質の非感染領域における抑制性神経細胞の割合(17.9±1.4%, n=2 monkeys)と比べて、有意に低かった(p<0.01, one-way ANOVA followed by Dunnett's test)(Yaguchi, Ohashi et al., Human Gene Therapy Methods, 2013)。

- (2) 上記研究成果に基づき、以下の結果を得た。作製したアデノ随伴ウイルスベクター (AAV5-CaMKIIa-ChR2-HA-P2A-eNpHR3.0-EYFP-WPRE-hGHpA と AAV5-CaMKIIa-ChIEF-HA-P2A-eNpHR3.0-EYFP-WPRE-hGHpA)をラットの視床に接種したところ、オプトロード(光ファイバー内包ガラス被覆式タングステン電極)にて、2種のベクター共に青色光照射で神経細胞活動の活性化・橙色光照射で神経細胞活動の抑制が可能であることがわかった。さらには、組織学的にもチャンネルロドプシン2及びハロロドプシンの共発現を確認できた。しかしながら、ChIEFを発現している領域においては、比較的多くの神経細胞の脱落が認められたため、ChIEF蛋白質の細胞毒性が示唆された。続いて、上記アデノ随伴ウイルスベクター及びレンチウイルスベクター (Lenti-CaMKIIa-ChIEF-tdTomato-WPRE)をラットの視床に接種し、光照射下にてMRI撮像を実施し、BOLD信号の取得を試みた。結果、特定の条件下において、BOLD信号の取得に成功した。同様にマカクザルにおいても、視床にウイルスベクターを接種した。接種後40日を経て、オプトロードを用いて、電気生理学的に青色光刺激反応性の神経細胞を確認した。続いて、同定した反応性の神経細胞が存在する領域の青色光刺激下/非刺激下(Block design)において、麻酔下にて機能的磁気共鳴画像の取得を複数回試みた(Opt-fMRI)。しかしながら、BOLD信号は、刺激直下(視床)及びその投射先(大脳皮質)においても、その検出は困難であった。これらサルの実験結果を踏まえ、opt-fMRIの条件を最適化するために、再度ラットを用いた検討を実施した。結果、再現性良くBOLD信号を得るためには、1)オプシン蛋白質の高発現が必要、2)光照射は広範囲である方が良い、3)光強度(ワット数)には最適値がある(一定値を越えるとBOLD信号の取得が困難になる)が明らかとなった。今後は上記知見に基づいて、記憶課題遂行中のマカクザルに光遺伝学的手法を適用し、記憶想起と霊長類下部側頭葉の神経細胞群の因果関係を解明する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

Yaguchi M, Ohashi Y, Tsubota T, Sato A, Koyano K W, Wang N, Miyashita Y, Characterization of the properties of seven promoters in the motor cortex of rats and monkeys after lentiviral vector-mediated gene transfer, Human Gene Therapy Methods, 査読有, 24(6), 2013, 333-344

DOI: 10.1089/hgtb.2012.238

Tsubota T, Ohashi Y, Tamura K, Optogenetics in the cerebellum: Purkinje cell-specific approaches for understanding local cerebellar functions, Behavioural Brain Research, 査読有, 255, 2013, 26-34

DOI: 10.1016/j.bbr.2013.04.019

Iwai L, Ohashi Y, van der List D, Usrey W M, Miyashita Y, Kawasaki H, FoxP2 is a parvocellular-specific transcription factor in the visual thalamus of monkeys and ferrets, Cerebral Cortex, 査読有, Sep;23(9), 2012, 2204-2212

DOI: 10.1093/cercor/bhs207

Tamura K, Ohashi Y, Tsubota T, Takeuchi D, Hirabayashi T, Yaguchi M, Matsuyama M, Sekine T, Miyashita Y, A glass-coated tungsten microelectrode enclosing optical fibers for optogenetic exploration in primate deep brain structures, Journal of Neuroscience Methods, 査読有, Vol.211, 2012, 49-57

DOI: 10.1016/j.jneumeth.2012.08.004

Tsubota T, Ohashi Y, Tamura K, Miyashita Y, Optogenetic inhibition of Purkinje cell activity reveals cerebellar control of blood pressure during postural alterations in anesthetized rats, Neuroscience, 査読有, Vol.210, 2012, 137-144

DOI: 10.1016/j.neuroscience.2012.03.014

Tsubota T, Ohashi Y, Tamura K, Sato A, Miyashita Y, Optogenetic manipulation of Purkinje cell activity in vivo, PLoS ONE, 査読有, 6(8) e22400, 2011, 電子版

DOI: 10.1371/journal.pone.0022400

[学会発表](計17件)

Yaguchi M, Ohashi Y, Tsubota T, Sato A, Koyano K W, Wang N, Matsuyama M, Sekine T, Miyashita Y, EGFP expressions in the cerebral cortex of rats and monkeys under control of various promoters

after lentiviral transduction, The Society for Neuroscience 43rd Annual Meeting, 2013年11月09日~2013年11月13日, San Diego San Diego Convention Center (USA)

Koyano K W, Takeda M, Matsui T, Ohashi Y, Hirabayashi T, Kakizawa K, Watanabe T, Miyashita Y, MRI-assisted single-unit recording revealed precise neuronal map in the perirhinal cortices of macaque monkeys performing a visual pair-association task, The Society for Neuroscience 43rd Annual Meeting, 2013年11月09日~2013年11月13日, San Diego, San Diego Convention Center (USA)

矢口雅江、大橋陽平、坪田匡史、佐藤礼奈、小谷野賢治、王寧群、松山真、関根岳、宮下保司、ラットおよびサル大脳皮質におけるレンチウイルスベクターを用いたプロモーター7種類の比較, 第36回日本神経科学大会, 2013年06月20日~2013年06月23日, 国立京都国際会館(京都府)

坪田匡史、大橋陽平、田村啓太、矢口雅江、松山真、関根岳、宮下保司、レンチウイルスベクターを用いた、ラットバレル皮質における局所的な NMDAR1 のノックダウン, 第36回日本神経科学大会, 2013年06月20日~2013年06月23日, 国立京都国際会館(京都府)

Iwai L, Ohashi Y, van der List D, Usrey W M, Miyashita Y, Kawasaki H, FoxP2 is a parvocellular-specific transcription factor in the visual thalamus of monkeys and ferrets, The Society for Neuroscience 42nd Annual Meeting, 2012年10月13日~2012年10月17日, New Orleans, Ernest N. Morial Convention Center (USA)

Tsubota T, Ohashi Y, Tamura K, Yaguchi M, Matsuyama M, Sekine T, Miyashita Y, Cerebellar regulation of blood pressure during postural alterations revealed by Purkinje cell-specific optogenetic inhibition, The Society for Neuroscience 42nd Annual Meeting, 2012年10月13日~2012年10月17日, New Orleans, Ernest N. Morial Convention Center (USA)

Tamura K, Ohashi Y, Tsubota T, Takeuchi D, Hirabayashi T, Yaguchi M, Matsuyama M, Sekine T, Miyashita Y, Applying optogenetics to macaque deep brain structures: Development of a glass-coated tungsten optrode enclosing optical fibers, The Society for Neuroscience 42nd Annual Meeting, 2012年10月13日~2012年10月17日, New Orleans, Ernest N. Morial

Convention Center (USA)

坪田匡史、大橋陽平、田村啓太、矢口雅江、松山真、関根岳、宮下保司、プルキンエ細胞特異的な光遺伝学的神経活動抑制法を用いた、姿勢変化時の血圧維持における小脳の役割の研究, 第35回日本神経科学大会, 2012年09月18日~2012年09月21日, 名古屋国際会議場(愛知県)

Yaguchi M, Ohashi Y, Tsubota T, Sato A, Koyano K W, Wang N, Matsuyama M, Sekine T, Miyashita Y, Analysis of EGFP expression in the cerebral cortex under control of seven different promoters in lentiviral vectors: Comparison of rats and monkeys, 第12回東京大学生命科学シンポジウム, 2012年06月30日, 東京大学安田講堂(東京都)

Tsubota T, Ohashi Y, Tamura K, Sato A, Miyashita Y, Selective manipulation of cerebellar Purkinje cell activity using optogenetics in vivo, The Society for Neuroscience 41st Annual Meeting, 2011年11月13日, Washington DC, Walter E. Washington Convention Center (USA)

田村啓太、大橋陽平、坪田匡史、竹内大吾、平林敏行、矢口雅江、松山真、関根岳、宮下保司、Development of a novel glass-coated optrode for monkey optogenetics, グローバル COE プログラム「生体シグナルを基盤とする統合生命学」第5回リトリート, 2012年03月03日~2012年03月04日, ハヶ岳ロイヤルホテル(山梨県)

坪田匡史、大橋陽平、田村啓太、佐藤礼奈、矢口雅江、松山真、関根岳、宮下保司、Cell-type-specific optogenetic manipulation of Purkinje cell activity in vivo using lentiviral vectors, グローバル COE プログラム「生体シグナルを基盤とする統合生命学」第5回リトリート, 2012年03月03日~2012年03月04日, ハヶ岳ロイヤルホテル(山梨県)

田村啓太、大橋陽平、坪田匡史、竹内大吾、平林敏行、矢口雅恵、松山真、関根岳、宮下保司、ガラス被覆式光電氣的プローブの開発: サル脳機能の光遺伝学的解明を目指して, Kyoto University and The University of Tokyo, Global COE Joint Symposium, 2012年01月20日, 東京大学山上会館(東京都)

坪田匡史、大橋陽平、田村啓太、佐藤礼奈、矢口雅江、松山真、関根岳、宮下保司、レンチウイルスベクターを用いた小脳プルキンエ細胞特異的な光遺伝学的神経活動操作手法, Kyoto University and The University of Tokyo, Global COE Joint Symposium, 2012年01月20日, 東

京大山上会館（東京都）
田村啓太，大橋陽平，坪田匡史，竹内大吾，平林敏行，矢口雅江，王寧群，宮下保司，光ファイバーを内包したガラス皮膜タンゲステン電極の開発：動物脳深部における蛍光測定、光遺伝学的光刺激およびシングルユニット記録，第 34 回日本神経科学大会，2011 年 09 月 16 日，パシフィコ横浜（神奈川県）
坪田匡史，大橋陽平，田村啓太，佐藤礼奈，松山真，宮下保司，小脳プルキンエ細胞活動の *in vivo* 光遺伝学的操作手法の確立，第 34 回日本神経科学大会，2011 年 09 月 16 日，パシフィコ横浜（神奈川県）
大橋陽平，坪田匡史，佐藤礼奈，小谷野賢治，田村啓太，松山真，矢口雅江，王寧群，宮下保司，2 シストロン性レンチウイルスベクターを用いたラット及びサル神経回路の選択的可視化法，第 34 回日本神経科学大会，2011 年 09 月 16 日，パシフィコ横浜（神奈川県）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.physiol.m.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大橋 陽平 (OHASHI, Yohei)

東京大学・大学院医学系研究科・特任講師

研究者番号：20597629