

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860724

研究課題名(和文) 光遺伝学を用いたパーキンソン病の新しいニューロモジュレーションの研究

研究課題名(英文) Optogenetic neuromodulation for Parkinson's disease

研究代表者

大山 彦光 (Oyama, Genko)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：00407256

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病に対するニューロモジュレーション法として電気刺激を用いた脳深部刺激療法が臨床応用されているが、電気刺激は非選択的で、神経を興奮させているのか抑制しているのかが不明であった。本研究では、マウスのドパミン神経細胞に光反応性蛋白を発現させ、光照射によってドパミン放出が誘発または抑制されることを証明し、ドパミンニューロン特異的なニューロモジュレーション法を確立した。

研究成果の概要(英文)：Deep brain stimulation (DBS), which utilizing electrical stimulation, has been clinically available for neuromodulation of Parkinson's disease. The electrical stimulation is nonselective, and the mechanism of DBS was unknown whether excitatory or inhibitory. In this study, we showed that dopamine release was controlled by illuminating light on dopaminergic neurons in which photosensitive protein was expressed. We established neuromodulation which can control dopaminergic release.

研究分野：神経内科

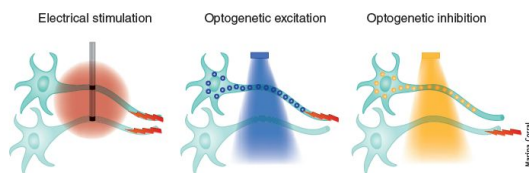
キーワード：光遺伝学 ドパミン 脳深部刺激療法 チャネルロドプシン アークロドプシン

1. 研究開始当初の背景

(1) パーキンソン病(PD)は黒質細胞の変性の結果、線条体におけるドパミン濃度が低下して基底核回路の異常をきたし、動作緩慢、筋強剛、姿勢反射障害、振戦などの運動症状を呈する疾患である。現在、PDに用いられているニューロモジュレーション法には、電気刺激による脳深部刺激療法(DBS)がある。DBSの運動機能に対する治療効果は明らかであるものの、その機序については、電気刺激によって神経活動を刺激しているのか抑制しているのかという根本的な問題が明らかになっておらず、DBSによる線条体でのドパミン放出に対する影響に関しては一定の見解が得られていない。また、従来の電気刺激では選択性の高い刺激が出来ないため、刺激強度によって刺激範囲が広がってしまい、目的神経核以外に刺激が及んでしまうことが副作用の原因となる。

(2) 光遺伝学は、光活性化蛋白であるチャンネルロドプシンや、ハロロドプシン、アークロドプシンなどを特定のニューロンに遺伝子工学的手法を用いて発現させ、特定ニューロンに特定の波長の光を照射することによってニューロン特異的に興奮または抑制することができ、*in vivo*で秒単位の時間的精度で制御ができる新しい技術である。また、電気刺激では周囲まで同時に刺激が波及してしまうのに対して、特定の細胞群の発火そのものを興奮または抑制し制御することができる(図1)。

図1 電気刺激と光刺激の違い



(3) 細胞外ドパミン濃度変化をリアルタイムで測定する方法は現在 *in vivo* voltammetry法と microdialysis 以外は存在しない。前者は時間分解能に優れる一方、後者は物質同定能に優れる。Fast-scan cyclic voltammetry (FSCV)による *in vivo* voltammetry法を用いることで、光遺伝学を用いた黒質線条体経路の光刺激によるドパミン放出の変化を可リアルタイムで視化することができる。

(4) これらの背景から、光刺激による線条体におけるドパミン放出を調整することにより、PD に対する新しいニューロモジュレーション法の開発を着想するに至った。

2. 研究の目的

(1) 光刺激によってドパミンニューロンの興奮・抑制を制御し、新しいニューロモジュレーション法を確立する。

(2) 視床下核および淡蒼球内節における光刺激を行い、線条体のドパミン放出に対する影響を調べ、DBSの機序について検討を行う。

(3) パーキンソン病モデルおよびジスキネジアモデルマウスにおける治療効果を調査し、光刺激によるニューロモジュレーション法の従来の電気刺激によるニューロモジュレーション法に対する優位性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 黒質細胞光刺激による線条体ドパミン放出の測定系の樹立:C57bl/6J マウスの黒質にチャンネルロドプシンまたはアークロドプシンをエンコードした adeno-associated virus (AAV)を定位的に注入する。持続麻酔下にマウス頭蓋骨をドリルで穿孔し、マニピュレーターを用いて光刺激用ガラスファイバーまたは電気刺激用電極を黒質に挿入する。さらに、2台のマニピュレーターを用いて線条体に Voltammetry 用カーボンファイバー記録電極、硬膜上に参照電極と Aux 電極を設置し固定する。測定には FSCV を用いる。三角波(0.4V-1.3V, 10Hz)をカーボンファイバー電極に与えるとドパミンの酸化電流が 600mV の電位で測定でき、これを解析ソフト(TH-1, ESA laboratories)で解析することによりドパミン濃度を測定できる (Natori S, Yoshimi K, et al. 2009)。コンピューター制御下に光刺激装置を用いて波長 473nm(青色)または 590nm(黄色)のレーザー光刺激(Bass CE, Grinevich VP, et al. 2010)を行う。各条件の光刺激による線条体ドパミン濃度の変化を測定し、電気刺激による反応と対比する。黒質の青色光刺激によるドパミン放出(図2)と、黒質線条体路の黄色光刺激による抑制を測定する(図3)。

図2 青色光によるドパミン放出実験

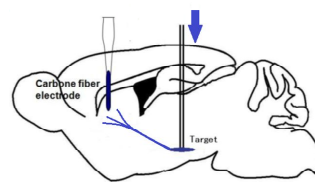
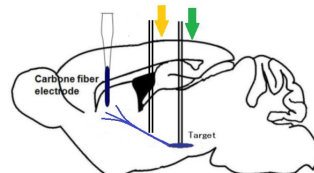


図3 黄色光によるドパミン放出抑制実験



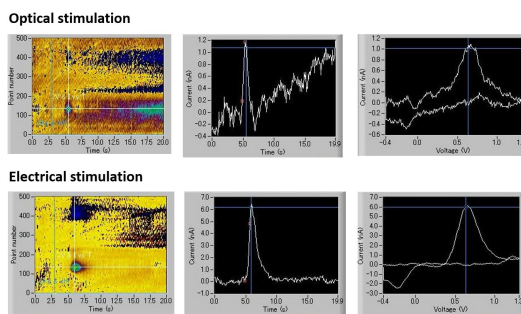
(2) 視床下核・淡蒼球内節の光刺激実験  
 黒質刺激による線条体ドパミン濃度測定系を応用し、視床下核または淡蒼球内節にチャンネルロドプシンまたはアークロドプシンを発現させ、光刺激および光抑制による線条体ドパミン濃度の変化を測定する。これによって視床下核と淡蒼球内節の DBS のメカニズムを解明する。

(3) パーキンソン病モデルおよびジスキネジアモデルマウスにおける治療効果の検討  
 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)による黒質破壊 PD モデルマウスにおける検討。PD モデルマウスにおける理想的なニューロモジュレーション法を検討する。さらに、6-hydroxydopamine (6-OHDA)による線条体破壊および levodopa 長期投与によるジスキネジアモデルマウスにおいても、視床下核・淡蒼球内節の光刺激による線条体ドパミン放出を測定し、PD のジスキネジアの病態解明を行い、ジスキネジアモデルにおける最適なニューロモジュレーション法を検討する。

#### 4. 研究成果

(1)チャンネルロドプシンをドパミンニューロンに発現させたマウスにおいて、黒質の光刺激および電気刺激による線条体のドパミン放出を比較した。図4に光刺激および電気刺激による Fast Scan Cyclic Voltammetry によるドパミン検出の一例を示す。

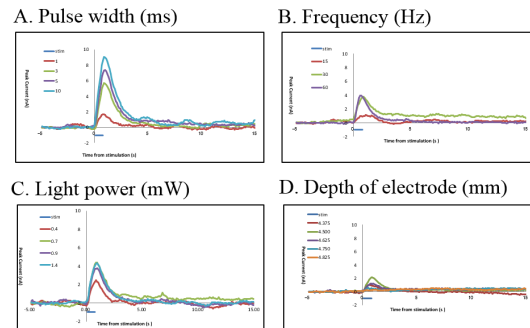
図4 光刺激・電気刺激によるドパミン放出



上段に青色光刺激によるドパミン放出を示し、下段に電気刺激によるドパミン放出を示す。左は、FSCV カラープロットであり、X軸が時間、Y軸にスキャン電圧、Z軸に記録された電位変化をカラースケールで表示している。中央のパネルには、X軸に時間とY軸に記録された電位変化を表示しており、いずれも刺激と同時にドパミンが急激に放出されることが確認できた。右は、X軸にスキャン電位、Y軸にファラデー電位とした、ボルタモグラムを表し、ピークがドパミン固有のピークであることが確認できた。ドパミン神経の青色光刺激によっても、電気刺激と同様にドパミン放出が確認された。

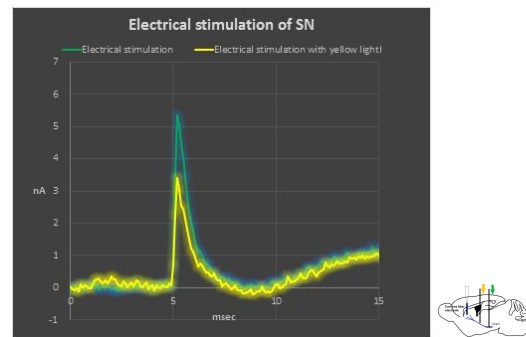
また、光刺激によるドパミン放出は、光パルスのパルス幅、周波数、光強度、光ファイバーの挿入深度によって変化がみられた(図5)。

図5 光刺激の条件検討



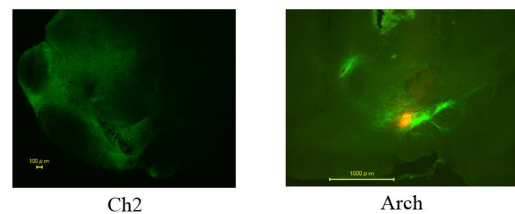
(2) アークロドプシンをドパミンニューロンに発現させたマウスの黒質の電気刺激を行い、同時に黄色光刺激を行った。黄色光刺激によって電気刺激によるドパミン放出が抑制されることを証明した(図6)。

図6



(3) 光ファイバー挿入部位のチャンネルロドプシンおよびアークロドプシンの発現を組織学的に確認した(図7)。

図7 光ファイバー挿入部の光蛋白発現確認



(4) 上記(1)-(3)で示したように、本研究によって、光遺伝学を応用し、ドパミン神経からのドパミン放出を調整することが可能であることを証明された。従来の電気刺激によるニューロモジュレーションは神経核活動に対し抑制的か興奮的かが明らかでなかった。光刺激によるニューロモジュレーション法は、神経特異的に、神経活動を抑制的にも興奮的にも制御することができる。

ため、従来よりも小集団ニューロンでの基底核回路生理の解明に繋がる可能性があり、さらには、より局所的かつ低侵襲な治療法に発展できる可能性がある。

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

#### 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0件)

〔学会発表〕(計2件)

Jo T, Oyama G, et al. Optogenetic Dopaminergic Stimulation in Mice. 18<sup>th</sup> international Congress of Parkinson's disease and Movement Disorders. 2014. 6.8-12. Stockholm (Sweden)

Oyama G, Jo T, et al. Optogenetic Dopaminergic Stimulation in Mice. Rth Asian and Oceanian Parkinson's and Movement Disorders Congress. 2014. 11. 28-30. Pataya (Thailand)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

なし

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

大山 彦光(OYAMA, Genko)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：10234567

(2)研究分担者