

令和元年6月21日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K06983

研究課題名(和文) 光遺伝学を応用した新しい人工暗点モデルサル作成と知覚的充填の神経機構の解明

研究課題名(英文) A new artificial scotoma model by optogenetics and neural mechanisms of perceptual filling in

研究代表者

木下 正治 (Kinoshita, Masaharu)

弘前大学・医学研究科・准教授

研究者番号：60599083

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではウイルスベクターを用いた遺伝子導入法をマカクザルに適用し、機能性のタンパク質を神経細胞に発現させ、遺伝子導入した神経細胞の機能を操作し、特定の神経経路の機能を明らかにすることを目的とした。中脳上丘から視床枕への神経経路を選択的に遮断することにより上丘-視床枕経路が盲視の視覚情報処理に重要であることを示し、成果を論文として発表した(Kinoshita et al., Nature Communications (2019) 10(1), 135)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳機能を解明するために齧歯類などの小型モデル動物などに適用され多くの重要な成果を挙げている遺伝子導入による研究手法を、本研究ではよりヒトに近い霊長類(マカクザル)の脳に応用し、その視覚情報処理経路に関する新しい知見を得た。本研究の成果は単に新しい知見を加えたことのみならず、霊長類の脳機能の操作可能性を示すことで、将来的にはヒト脳疾患の新しい治療法開発への示唆を与えることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we applied a gene transfer method using a viral vector to macaque monkeys' brain to express functional proteins in neurons of a specific pathway and to manipulate its functions. By selectively blocking the neural pathway from the superior colliculus to the pulvinar, we showed the importance of the superior colliculus - pulvinar pathway for visual information processing of the blindsight.

研究分野：神経科学

キーワード：ウイルスベクター マカクザル 視覚情報処理

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脳の機能を回路レベルで理解するために神経機能を操作する研究手法には、微小電極を用いた局所的な電気刺激による神経刺激法や抑制性神経伝達物質の作動薬（アゴニスト）を用いた薬理的な神経活動抑制法などがあり、これらの手法を用いて多くの脳機能が解明されてきた。しかし電気刺激や薬理的な処理を用いるこれらの古典的な手法では、特定の神経細胞あるいは神経回路だけを選択的に操作するのは困難な場合がある。一方、機能性タンパク質の遺伝子を特定の神経細胞に導入し機能操作を行う手法が近年急速に発達し、齧歯類などの小型モデル動物で多くの重要な研究成果を挙げてきた。しかしマカクザルのような大きな脳を持つ動物の神経活動操作へのこれらの手法の応用はまだ限定的なものであった。

### 2. 研究の目的

本研究では霊長類の脳の機能をその神経回路レベルで理解するという試みの中で、ウイルスベクターを用いた遺伝子導入法をマカクザルの脳に適用して特定の機能性タンパク質を特定の神経経路に発現・操作し、特定神経回路の機能を明らかにすることを大きな目的とした。より具体的には機能性タンパク質として光感受性のあるタンパク質（opsin）の遺伝子を導入・発現させ、光照射によるミリ秒単位での神経活動の機能操作を行い、視覚情報を伝える特定神経経路の情報伝達を遮断し、その経路の機能を明らかにすることを目指した（目的1）。一方、大型の脳に対する光照射の範囲や強度の問題などの困難が予想されることから、光照射を必要としない特定の神経経路の機能操作法である二重遺伝子導入法（Kinoshita et al. (2012) *Nature*. 487:235-238）を応用し、霊長類における視覚情報処理経路の機能を解明するために、第一次視覚野（V1）を損傷した盲視（視覚的意識を伴わない視覚情報処理）のモデルサルに適用した。盲視とはV1の損傷により損傷視野の視覚刺激に対して視覚的意識を生じないが、見えないはずの視覚刺激に対して視線を向けたり指さしたりすることが出来る現象である。この視覚的意識を伴わない視覚情報処理がどのような神経経路を經由しているのかについて、a)中脳上丘から外側膝状体を経て大脳の高次視覚皮質に至るとする説と、b)中脳上丘から視床枕を経て大脳の高次視覚皮質に至るとする説がある（図1）が、本研究ではbの上丘-視床枕経路が盲視の視覚情報処理に必要であることを示すことを目指した（目的2）。

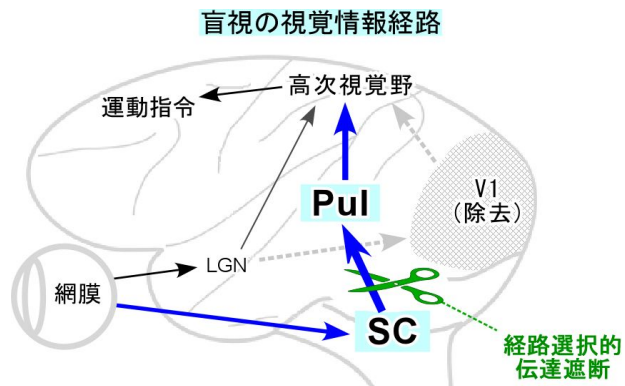


図1. LGN: 外側膝状体. SC: 中脳上丘. Pul: 視床枕

### 3. 研究の方法

目的1について、神経活動の機能操作が可能なレベルまで opsin 遺伝子導入の効率を確保するために導入する opsin 遺伝子とキャリアとなるウイルスベクターの検討を行った。また十分な効率で光照射を行うために、金属電極と光刺激のための光ファイバーを組み合わせた optrode の改良などを行った。

目的2について、右側のV1を吸引除去した2頭の盲視モデルマカクザルの視床枕にTetプロモータ下流に破傷風毒素遺伝子を搭載した逆行性ウイルスベクター（HiRet-TRE-eTeNT-EGFP）を注入し、さらに上丘にTetアクチベータを搭載した順行性ウイルスベクター（AAV-CMV-rtTAV16）を注入した。これにより、上丘に細胞体が存在し視床枕に軸索を投射しているニューロンのみ

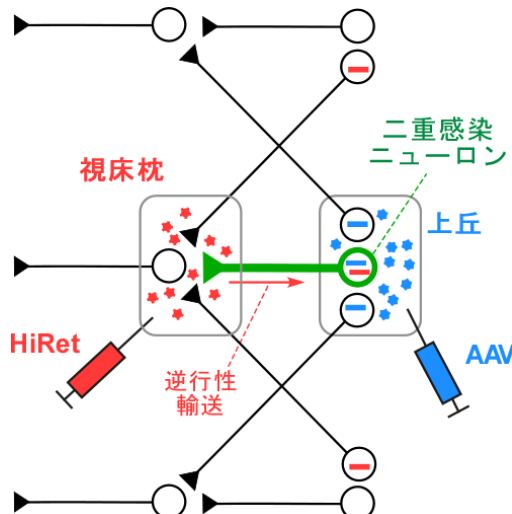


図2. 二重感染法による経路選択的伝達遮断。逆行性ウイルスベクターである HiRet は視床枕に投射するニューロンに遺伝子を導入し、順行性ウイルスベクターである AAV は上丘に細胞体の存在するニューロンに遺伝子を導入する。どちらのベクターでも単体では目的とする上丘-視床枕ニューロン以外にも遺伝子が導入されてしまうが、両ベクターの二重感染は上丘に細胞体が存在し視床枕に軸索を投射しているニューロンに限定される。

で二重感染が起こるようにした(図2)。導入遺伝子の発現を待ち、ドキシサイクリン(Dox)を投与することで二重感染したニューロン選択的に破傷風毒素を発現させることで、このニューロンの神経伝達を選択的に遮断した。盲視の視覚情報処理が行われているか検証するためにサルには視覚誘導性サッケード課題を訓練しており、Dox投与前後でその成績の変化を評価した。

#### 4. 研究成果

目的1に関しては未だ十分な効果を確認できるところまで至っていない。目的2に関して、二重感染法を用いて上丘-視床枕経路の神経伝達を選択的に遮断することにより、Doxの投与期間に視覚誘導性サッケード課題の成績低下を確認した。2頭に対して行った実験の内1頭から得られた結果を図3に例示した。図3Aに示したように、右のV1を吸引除去した動物においても左視野への視覚誘導性サッケード課題を一定の成績で行うことは可能であり、Dox投与前には盲視の視覚情報処理が行われていたと考えられる。一方図3BはDox投与開始から12日目に同様の課題を行わせた結果である。この時Dox投与により二重感染した上丘から視床枕へ投射するニューロンの神経伝達を選択的に遮断されていると考えられるが、サッケードの方向が分散し視覚誘導性サッケード課題の成績が低下していた。Dox投与前のサッケードの成績と投与後の成績について統計検定を行ったところ、図3A、Bに例示したサッケードターゲットに対する成績が有意に低下していた(図3C)。さらに同様の統計検定を損傷視野である左視野に提示したサッケードターゲットのそれぞれに行い、統計検定のP値を視野上にプロットした(図3D)。その結果、損傷視野の広範な領域でサッケード課題成績の有意な低下を観察した。同様な実験と解析はもう1頭のサルに対しても行い同様な結果を得た。

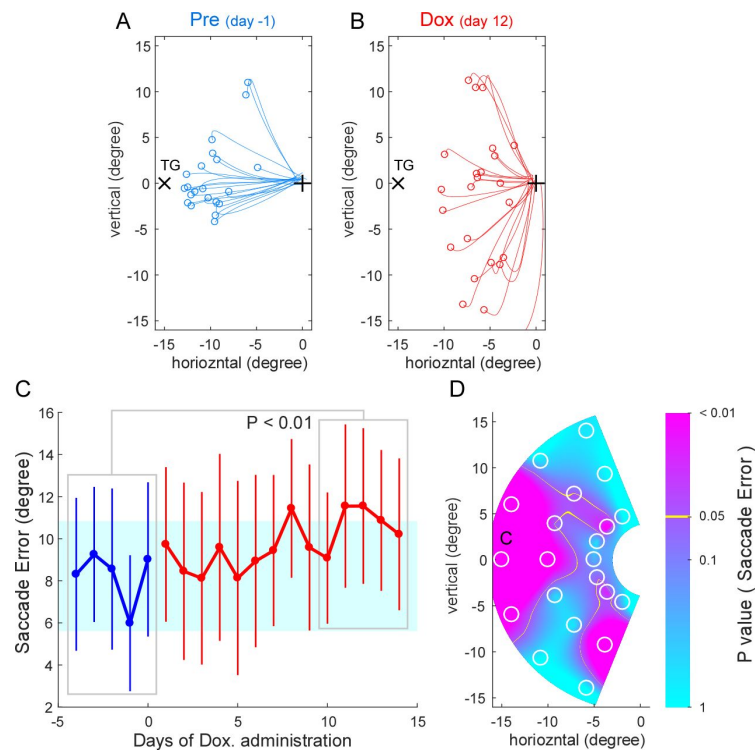


図3. Dox投与前後における視覚誘導性サッケード課題の成績変化。(A、B)視線の軌跡(+は注視点、Xはサッケードターゲットの位置、○はサッケードの到達点)の例。AはDox投与前日に行った実験中の1つのターゲットに対する複数試行の視線の軌跡を重ね描きしたもの。BはAと同様な表示をDox投与12日目のデータに対して行った物。サッケードの到達点が分散してしまっている。(C)横軸にDox投与開始からの日数を取り、縦軸にサッケードエラー(ターゲットから到達点までの距離)の大きさをプロットしたグラフ。四角で囲ったDox投与前5日分のサッケードエラーの分布と投与後10-15日のサッケードエラーの分布を比較するとエラーが有意に大きくなっていた(t検定)。(D)サッケードターゲットを表示した各点ごとに、エラーサイズ分布についてt検定を行い、そのP値を視野上にプロットした図。損傷視野の広範囲において有意にエラーが増大していた。

Dox 投与による上丘-視床枕経路の選択的な伝達遮断により、図 3 に示したサッケードエラーの増大だけでなく、ターゲット呈示からサッケード開始までの反応潜時の有意な延長も、実験を行った 2 頭のサルで確認された。これらの結果から上丘-視床枕経路が盲視の視覚情報を伝達していることが示唆された。これらの成果の詳細については下記発表論文 (1) にて報告した。また上丘-視床枕経路仮説と対立する LGN 仮説に関連して、本研究では実験終了後に LGN の組織学的な検索を行った。V1 損傷による逆行性変性によって LGN 細胞の減少が観察されることが予想され、健常側 LGN に対して損傷側 LGN 全体の萎縮が確認された (図 4 のインセット) が、健常側の細胞数と比較して V1 損傷と同側の LGN の細胞数はおよそ 17 - 34% 残存していた。また損傷側の残存細胞には健常側と比較してその細胞体が大きくなっている傾向が観察された (図 4 白矢印)。これらの観察事実の機能的な意義については現時点では不明であるが、V1 損傷に伴う LGN 細胞の何らかの変性を示している可能性が考えられる。本研究において盲視の視覚情報処理において上丘-視床枕経路が重要な役割を果たしていることを示すことが出来たが、このことは直ちに LGN 経路の役割を否定する物では無く、LGN も何らかの役割を果たしている可能性は排除できない。今回観察された LGN の組織学上の変化は V1 損傷後の LGN のなんらかの機能変化を示唆する可能性が考えられる。

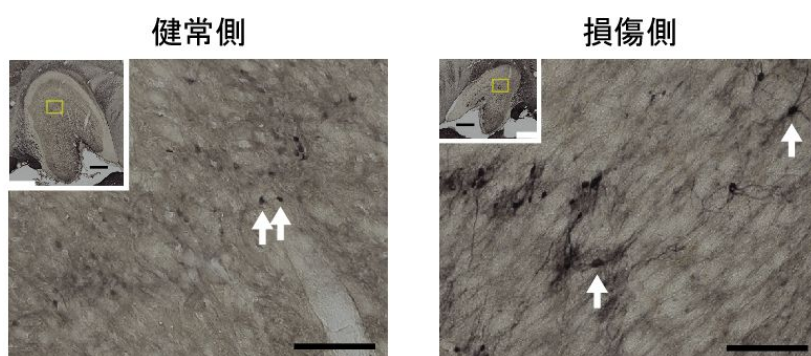


図 4. V1 損傷の反対側 (健常側) と同側 (損傷側) の LGN の免疫組織化学染色像。それぞれ左上のインセットに LGN の全体像を示し、インセット中で黄色の枠で示した部位の拡大像を示した。スケールバーはインセットでは 1 mm、拡大像では 100  $\mu$  m。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

(1) Masaharu Kinoshita, Rikako Kato, Kaoru Isa, Kenta Kobayashi, Kazuto Kobayashi, Hiroataka Onoe, Tadashi Isa. "Dissecting the Circuit for Blindsight to Reveal the Critical Role of Pulvinar and Superior Colliculus" *Nature Communications* (2019) 10(1), 135. (査読有)

DOI: doi.org/10.1038/s41467-018-08058-0

(2) Hung-Ya Tu, Takehito Watanabe, Hiroshi Shirai, Suguru Yamasaki, Masaharu Kinoshita, Keizo Matsushita, Tomoyo Hashiguchi, Hiroataka Onoe, Take Matsuyama, Atsushi Kuwahara, Akiyoshi Kishino, Toru Kimura, Mototsugu Eiraku, Kiyoshi Suzuma, Takashi Kitaoka, Masayo Takahashi, Michiko Mandai "Medium- to long-term survival and functional examination of human iPSC-derived retinas in rat and primate models of retinal degeneration" *EBioMedicine* (2019) 39, 562-74. (査読有)

DOI: doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.11.028

(3) Takamichi Tohyama, Masaharu Kinoshita, Kenta Kobayashi, Kaoru Isa, Dai Watanabe, Kazuto Kobayashi, Meigen Liu, Tadashi Isa. "Contribution of propriospinal neurons to recovery of hand dexterity after corticospinal tract lesions in monkeys" *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2017) 114(3), 604-609. (査読有)

DOI: doi.org/10.1073/pnas.1610787114

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。