

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03533

研究課題名(和文) X線を用いた脳機能操作法の確立

研究課題名(英文) Establishment of a methodology to control brain functions using X-ray

研究代表者

山下 貴之 (Yamashita, Takayuki)

藤田医科大学・医学部・教授

研究者番号：40466321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生体を透過するX線を可視光に変換するシンチレータを組織に埋め込み、体外からのX線照射により組織内で発光させて周囲に発現させた光感受性タンパク質を活性化する手法(X線光遺伝学)の開発を試みた。その結果、無機シンチレータであるCe:GAGGとその発光に対応した光感受性タンパク質を組み合わせることで、X線を体外から照射することにより生体マウスの脳深部機能を遠隔的に操作できることが分かった。Ce:GAGG粒子は生体無害であり、また、臨床レベルの安全なX線照射量により脳深部機能操作が可能であった。以上から、X線光遺伝学は従来法より低侵襲な無線遠隔的細胞機能操作法であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、X線照射によって行動中の動物の体内に埋め込んだシンチレータを発光させ、周囲に発現させた光感受性タンパク質を活性化できることが実証された。Ce:GAGGシンチレータ粒子は生体適合性が高く注射可能であり、顕著な細胞毒性もなく注射部位に長期間留まり、低侵襲な光操作ツールとして機能する。X線の組織への透過性がほぼ無限であることから、このX線光操作法は、サルやヒトを含めた大型動物にも適用できる可能性がある。また、光を用いたゲノム編集など他の光操作技術と組み合わせることで多岐に渡る応用展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a novel method named X-ray optogenetics in which a scintillator that converts X-rays into visible light is implanted in tissues is used to activate light-sensitive proteins expressed in the surrounding tissues. Our experiments revealed that Ce:GAGG micro-particles are biocompatible and can be used to manipulate deep brain functions of living mice under X-ray irradiation. Manipulation of deep brain functions was achieved using X-ray irradiation at a clinical dose level. Our results thus indicate that X-ray optogenetics enables minimally invasive, wireless control of cellular functions in living animals.

研究分野：神経生理学

キーワード：光遺伝学 X線 シンチレータ

## 1. 研究開始当初の背景

光遺伝学は、高い時間分解能で生きた動物の特定の神経機能を制御することが出来る強力な技術であり、2000年代後半ごろから神経科学分野にて広く使われるようになった。光遺伝学でよく用いられる刺激光は可視光領域であり、生体透過性が低い。そのため、組織内への光照射には光ファイバーを刺入する手法が一般的に用いられている。しかしながら、この方法は侵襲性が高く、また、照射体積が小さいなど様々な問題がある。これらの問題を根本的に解決するため、本研究代表者は、生体組織を格段に透過しやすい X 線を可視光に変換する発光素材である無機シンチレータを用いた神経活動の遠隔操作技術 (X 線光遺伝学) を独自に開発してきた。セリウムを微量ドープしたガドリニウムアルミニウムガリウムガーネット (Ce:GAGG) は、X 線照射により緑黄色光を放出する発光効率の非常に高いシンチレータであることが知られており、潮解性・吸湿性がなく、常温で固体であり、安定で扱いやすい。研究開始当初までの予備実験により、Ce:GAGG の発光により活性化する光感受性タンパク質が見つかっており、生体マウスを用いたテストにおいても Ce:GAGG 棒状結晶からの X 線誘発性発光によりマウスの行動変化が観察されていた。

## 2. 研究の目的

本研究では、Ce:GAGG を用いて X 線光遺伝学の概念実証を行い、さらに手法の安全性の検討を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) Ce:GAGG 発光により活性化するオプシンの探索

Ce:GAGG は X 線を照射した場合も紫外光を照射した場合も全く同じ波長スペクトラムの発光を示す。そこで、培養 HEK 細胞に 10 種類の光感受性イオンチャンネル (オプシン) を各々発現させ、パッチクランプ法により、Ce:GAGG の紫外光誘発性発光 (PL) により誘発される電流を測定し、比較することで、最も活性化される興奮性・抑制性オプシンを選出した。さらに、遺伝子改変マウス (DAT-Cre) とアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターの局所注入を用いて、中脳ドーパミン (DA) 神経細胞に特異的に上記で見出した興奮性・抑制性オプシンを発現させた。そのマウス脳から急性スライスを作成し、パッチクランプ法により PL 誘発性電流を測定して、DA 神経の活動操作に必要な Ce:GAGG 発光強度を検討した。

### (2) Ce:GAGG 結晶の生体親和性の検討

Ce:GAGG 結晶の細胞毒性を調べるため、培養 HEK293 細胞やマウス海馬初代培養細胞の培養皿に Ce:GAGG 結晶を留置して細胞の増殖に対する影響を調べた。また、バルク Ce:GAGG 結晶を粉碎してマイクロ粒子化し、脳内に注入すると粒子は注入部位に集積するが、粒子塊周囲にグリア細胞の顕著な集積などの炎症を示す所見が見られるかを検討した。

### (3) 生体マウスにおける X 線光操作法の概念実証

AAV ベクターによりマウス中脳 DA 神経に上記で見出した興奮性オプシンを発現させ、AAV 注入と同じ部位に Ce:GAGG マイクロ粒子を注入し、麻酔下にて体外から X 線を照射し、神経活性マーカーである cFos の発現が誘導されるかを検討した。さらに、場所嗜好性試験をリードアウトとして、Ce:GAGG マイクロ粒子からの X 線誘発性発光によりマウス中脳 DA 神経の活性化と不活性化が可能か否かを検討した。

### (4) X 線被曝量の安全範囲の検討

マウスに対する X 線被曝による障害について、放射線感受性が高い海馬の未熟神経細胞や骨髄細胞を計数することで検討した。

## 4. 研究成果

### (1) Ce:GAGG 発光により活性化するオプシンの探索

培養 HEK 細胞におけるスクリーニングの結果、興奮性オプシンである赤色吸収型チャネルロドプシン ChRmine と抑制性オプシンであるアニオン透過型チャネルロドプシン GtACR1 が最も効率よく活性化することが見出された(図1)。アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターによりこれらオプシンをマウスの中脳ドーパミン神経細胞や中隔帯細胞に発現させ、脳スライス上にて PL を照射したところ、わずか 1.7~3.3  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  の強度の PL により活動電位頻度を有意に変動させることが可能であった。

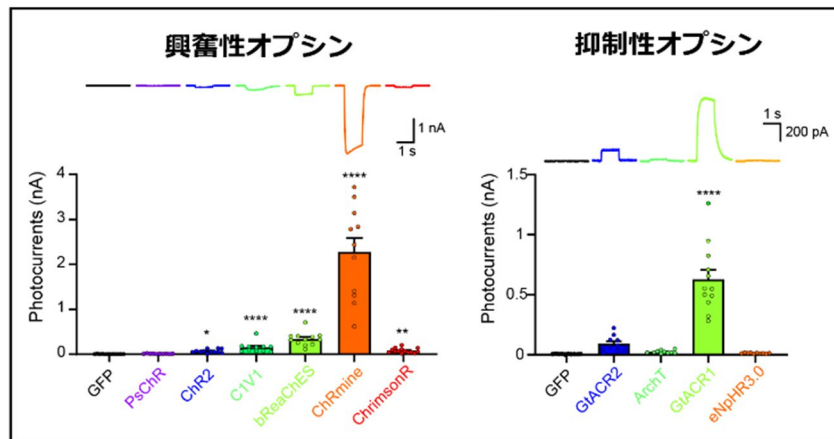


図1. Ce:GAGG 発光により活性化するオプシンのスクリーニング

Ce:GAGG 発光によって誘導された異なるオプシンおよび GFP の光誘発性電流(上)とその振幅(下) \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ 、Dunn の多重比較検定 vs GFP (興奮性オプシン)、Dunnett の多重比較検定 vs. GFP (抑制性オプシン)。

### (2) Ce:GAGG 結晶の生体親和性

培養 HEK293 細胞やマウス海馬初代培養細胞の培養皿に Ce:GAGG 結晶を留置したものの、いずれの培養細胞においても細胞数は結晶を置かない対照群と違いはなかった。また、バルク Ce:GAGG 結晶を粉碎してマイクロ粒子化し、脳内に注入すると粒子は注入部位に集積するが、粒子塊周囲に、溶媒注入対照群よりも有意に高いグリア細胞の集積は観察されず、また、粒子塊周囲の神経細胞数も対照群と同等であった。以上の結果から、Ce:GAGG は生体無害であると考えられた。

### (3) 生体マウスにおける X 線光操作法の概念実証

AAV ベクターによりマウス中脳 DA 神経に ChRmine を発現させ、AAV 注入と同じ部位に Ce:GAGG マイクロ粒子を注入し、麻酔下にて体外から X 線を照射すると、神経活性化マーカーである cFos の発現が誘導された。一方、対照群ではドーパミン神経における cFos の発現は有意に低かった。この結果から、脳内に注入した Ce:GAGG 粒子の X 線誘発性発光(シンチレーション)により特定神経の活性化が可能であることが示された。

中脳腹側被蓋野(VTA)にある DA 神経は動物の嗜好性に関わっており、VTA の DA 神経の活性化・不活性化は、条件付け場所嗜好性(CPP)テストを用いて容易に検証できる。AAV ベクターにより両側 VTA の DA 神経に ChRmine あるいは stGtACR1 (st=細胞体集積型)を発現させ、同部位に Ce:GAGG マイクロ粒子を注入した。マウスを X 線照射側と X 線非照射側の 2 つの区画があるテストチャンバーに入れ、X 線照射による条件付け(1日約 0.125 Gy 照射を 4 日間[合計約 0.5 Gy]、あるいは、1日約 3.5 Gy 照射を 2 日間[合計約 7 Gy])を行った。条件付け後、ChRmine 発現群は GFP 発現対照群と比べて有意に X 線照射側に好んで滞在した。反対に、stGtACR1 発現群は、条件付け後、GFP 発現対照群と比

べて有意に X 線非照射側に好んで滞在した ( 図 2 )。これらの結果は、自由行動下のマウスにおいて Ce:GAGG シンチレーションにより中脳ドーパミン神経が活性化・不活性化されたことを示唆している。

( 4 ) X 線被曝量の安全範囲の検討

さらに、マウスに対する X 線被曝による障害について、放射線感受性が高い海馬の未熟神経細胞や骨髄細胞を計数することで検討したところ、1.5 Gy 以上の X 線照射によりこれらの細胞数が減少することが分かった。上記の CPP 実験では合計約 0.5 Gy の線量でも行動変化を誘導できており、安全な X 線照射量で行動実験が可能であった。一方、合計 7 Gy の X 線照射を行った場合でも、骨髄細胞数の減少や神経新生への悪影響はあるが、マウスは体重減少なく生存し、X 線照射 1 日後の観察では自発的な行動に変化がない。そのため、7 Gy 程度の線量でも短期間の行動実験は可能と考えられた。

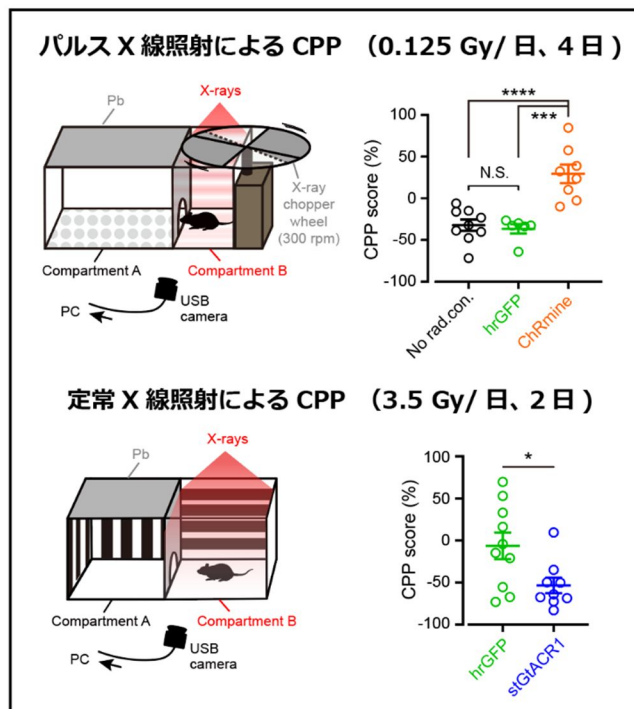


図 2 . X 線照射による神経操作の成功例

遺伝子改変マウスと AAV ベクターの局所注入により VTA ドーパミン神経に ChRmine、hrGFP または stGtACR1 を発現させた。左のような実験用チャンバーを用いて、場所嗜好性試験 ( CPP ) を行い、X 線照射側のコンパートメントへの場所嗜好性の上昇 ( 上 ) あるいは低下 ( 下 ) を誘導した。No rad. con. = X 線を全く照射しない対照群。\* $p < 0.05$ 、\*\*\*\* $p < 0.0001$ 、Bonferroni の多重比較検定 ( 上 )、Mann-Whitney の U 検定 ( 下 )。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

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 771717
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 -

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 4478
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 Wang Han-Ying, Eguchi Kohgaku, Yamashita Takayuki, Takahashi Tomoyuki	4. 巻 40
2. 論文標題 Frequency-Dependent Block of Excitatory Neurotransmission by Isoflurane via Dual Presynaptic Mechanisms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 4103 ~ 4115
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI.2946-19.2020	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 山下 貴之	4. 巻 52
2. 論文標題 脳深部の遠隔的光操作法	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 月刊「細胞」	6. 最初と最後の頁 63-66
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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12件（うち招待講演 7件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 山下 貴之
2. 発表標題 シンチレータの神経科学分野への応用
3. 学会等名 第69回応用物理学会春季学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山下 貴之
2. 発表標題 X線を用いた神経回路操作法の開発と応用
3. 学会等名 第70回 脳の医学・生物学研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山下 貴之
2. 発表標題 X線光遺伝学の開発と応用可能性
3. 学会等名 量子科学技術研究開発機構DOFI meeting（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山下 貴之
2. 発表標題 X-optogenetics and its application to deep tissue manipulation
3. 学会等名 熊本大学 令和3年度医学・生命科学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2021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
4. 発表年 2021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 山下 貴之
2. 発表標題 神経科学におけるドーパミン濃度測定の意義
3. 学会等名 電気化学会第88回大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松原 崇紀、柳田 健之、河口 範明、中野 高志、吉本 潤一郎、堀金 慎一郎、上田 修平、竹本-木村 さやか、山中 章弘、山下 貴之
2. 発表標題 Bidirectional remote control of deep neuron activities using X-rays
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山下 貴之
2. 発表標題 X線を用了組織深部における無線・遠隔的光操作法の開発
3. 学会等名 XFEL構造生物ミーティング(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下貴之
2. 発表標題 Remote and wireless control of neuronal function using X-ray
3. 学会等名 第57回日本生物物理学学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takayuki Yamashita
2. 発表標題 Deep brain stimulation using X-rays
3. 学会等名 第11回光操作研究会(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松原 崇紀、柳田 健之、河口 範明、中野 高志、吉本 潤一郎、堀金 慎一郎、上田 修平、竹本-木村 さやか、山中 章弘、山下 貴之
2. 発表標題 Remote control of neuronal populations by X-ray-induced scintillation
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年



〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 オプシンの活性を調節する方法	発明者 山下 貴之、松原 崇紀、柳田 健之、 河口 範明	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-155659	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	柳田 健之  (Yanagida Takayuki)  (20517669)	奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・教授   (14603)	

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