

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06880

研究課題名（和文）霊長類に対して光遺伝学を応用した神経経路選択的な伝達遮断法を実現する

研究課題名（英文）Blockade of specific neural pathway in non human primates brain by using optogenetic method.

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） 3,400,000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ていた。成果としては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等を示した論文を発表した(T Isa, T Tohyama, M Kinoshita, Current Research in Neurobiology (2022) 100058)。

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の遺伝子導入による研究手法は、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。本研究ではよりヒトに近い霊長類（マカクザル）の脳にこの研究手法を応用した成果について報告した。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. As the outcome, we published the paper showing the importance of the neural pathway from the superior colliculus to the pulvinar for visual information processing of the blindsight.(T Isa, T Tohyama, M Kinoshita, Current Research in Neurobiology (2022) 100058)

研究分野：Neuroscience

キーワード：ウイルスベクター マカクザル

1. 研究開始当初の背景

脳の仕組みを理解するための研究手法には様々な方法があるが、神経回路を積極的に操作することでその機能を理解するための手法としては微小電極を用いた局所的な電気刺激法や神経伝達物質の作動薬(アゴニスト)などの微量注入を行う薬理的な方法が古くから用いられ、多くの神経回路の機能が解明されてきた。しかし様々な領域に軸索を伸ばし、複雑な神経回路を形成している脳に対しては、電気刺激法や薬理学的手法のような古典的な手法だけでは特定の神経細胞あるいは神経回路を選択的に操作するのは困難な場合がある。しかし、近年、特定のタンパク質の遺伝子を特定の神経細胞に導入して神経細胞の機能操作を行う手法が発達し、齧歯類などの小型モデル動物で多くの研究成果を挙げてきた。しかしより人に近いと考えられる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

本研究の大きな目的としては、霊長類であるマカクザルの脳に対してウイルスベクターを用いた遺伝子導入法を適用し、特定のタンパク質を特定の神経経路に発現させてその機能を操作し、特定の神経回路の機能を明らかにすることである。より具体的な目的としては、発現させる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、光ファイバーを用いた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)。一方げっ歯類などの脳と比較して物理的に大きな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たことから、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、第一次視覚野(V1)を損傷した盲視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(視覚的意識を伴わない視覚情報処理)。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経由しているのかについて、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、中脳上丘(SC)から視床枕(Pul)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SC-Pul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)。

3. 研究の方法

目的1については、導入遺伝子が神経の機能操作に十分な量のopsinタンパク質が発現することが重要であり、そのために導入するopsin遺伝子の種類とキャリアとなるウイルスベクターの検討を行った。また十分な効率で神経細胞への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オプトロードの改良などを行った。

目的2について、右側V1を吸引除去した盲視モデルマカクザルのPul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、SC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、SCに細胞体が存在し、かつPulに軸索を投射しているニューロンのみ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。盲視ザルの視覚情報伝達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カー課題を訓練し、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について、未だに十分な神経活動操作の効果を確認できるところまで至っていない。

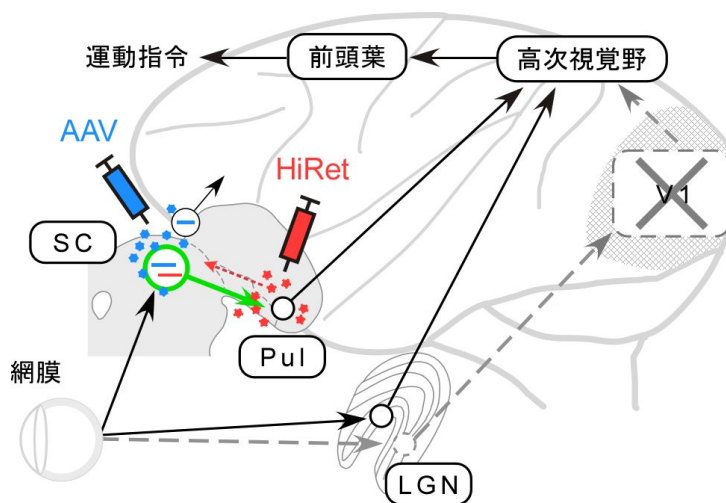


図1. 盲視の視覚情報伝達経路。SC:中脳上丘。Pul:視床枕。
LGN:外側膝状体。V1:第一次視覚野。破線矢印はV1損傷により機能しなくなった視覚情報伝達経路。

目的 2 について、二重感染法を用いて SC-Pul 経路の神経伝達を選択的に遮断することにより、Dox 投与中に視覚誘導性サッケード課題の成績低下を確認した。一例として、右の V1 を吸引除去した(左視野に障害が現れる)サル¹の視覚誘導性サッケード課題の結果を図 2 に示す。図 2 左

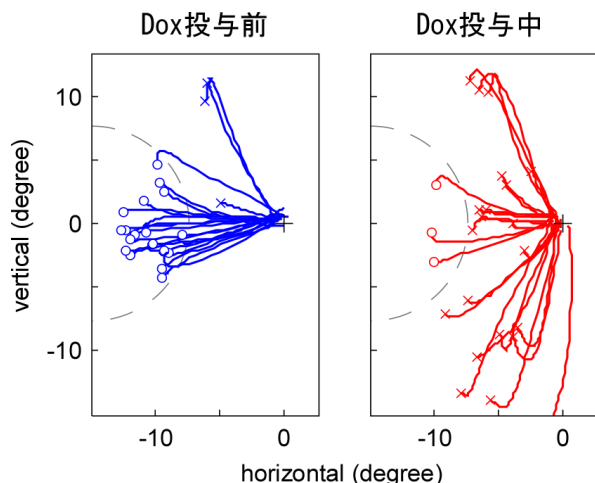


図 2. Dox 投与前後における視覚誘導性サッケード課題の成績変化。左は Dox 投与前日に行った1つのターゲットに対する複数試行の視線の軌跡を重ね描きしたもの(青線)。右は Dox 投与期間中の視線の軌跡(赤線)で、サッケードの到達点が分散している。+ は注視点の位置。サッケードターゲットは破線で示した丸の中心に提示した。× はサッケードの到達点を示す。

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る。このことから V1 を除去したマカクザルにおいても視覚情報はいずれかの視覚情報経路を経由して高次視覚野に伝達されていると考えられる(図 1 参照)。一方図 2 右は 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。Dox 投与により二重感染した SC から Pul 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。この時、サッケードの到達点はそのターゲットから外れ、方向が分散しており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、その成績が有意に低下していた。これらのことから大型の脳をもつ霊長類(マカクザル)の脳にウイルスベクターを用いた遺伝子導入法を適用することで、盲視の視覚情報が SC-Pul 経路を経由して高次視覚野に伝達されている可能性が高いことを示すことができた。これらの結果を含んだ以下の論文を公表した(Isa Tadashi, Takamichi Tohyama, Masaharu Kinoshita. “Phylogenetic View of the Compensatory Mechanisms in Motor and Sensory Systems after Neuronal Injury.” *Current Research in Neurobiology* (2022): 100058)。これらの結果は盲視の神経経路の解明というだけではなく、古典的な電気刺激法や薬理学的な手法では難しかった、特定神経経路の機能を理解するための遺伝子導入法が大型の脳をもつマカクザルに対して有効であり、今後同様な手法を用いて様々な神経経路の機能解明が進むことが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Isa Tadashi, Tohyama Takamichi, Kinoshita Masaharu	4. 巻 3
2. 論文標題 Phylogenetic view of the compensatory mechanisms in motor and sensory systems after neuronal injury	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Research in Neurobiology	6. 最初と最後の頁 100058 ~ 100058
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.crneur.2022.100058	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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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