

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：21601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22474

研究課題名(和文)新規化学遺伝学ツールによる脳機能回復戦略の研究

研究課題名(英文) Study on brain functional recovery by an ionotropic receptor-mediated chemogenetic technology

研究代表者

小林 和人 (Kobayashi, Kazuto)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：90211903

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病や認知症などの神経疾患では、特定の神経細胞種の変性により、脳機能の障害が発現する。最近、我々の研究グループは、昆虫の興奮性イオン透過型受容体を利用して目的の神経細胞種の活動を選択的に促進させる新規の化学遺伝学的技術の開発に成功した。本研究では、この化学遺伝学技術を応用して、リガンド前駆体の末梢投与により脳内標的ニューロンを活性化する技術を開発し、さらに、線条体間接路ニューロンを標的として、その活性を通じて運動行動の変容を誘導することを試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、今後、パーキンソン病、認知症の病態モデル動物に対して、これらの症状の原因となる神経細胞種の機能を亢進し、病態の改善・回復を目指す新たなストラテジーの開発に繋がる。

研究成果の概要(英文)：Certain neurological diseases, such as Parkinson's disease and dementia are caused by degeneration of selective neuronal types, resulting in the impairments in brain functions. Recently, we developed a new strategy for selective activation of target neurons of interests by using ionotropic receptor-mediated chemogenetic technology with the insect IR84a/IR8a complex. In the present study, we will activate target neurons in the brain by using the peripheral injections of a ligand precursor for IR84a/IR8a receptors and control the activity of striatal indirect pathway neurons as targets, inducing the behavioral modulation. The results obtained from this study will lead to the development of a new strategy for the recovery and treatment of some symptoms in the diseases by the facilitation of target neuron activity.

研究分野：分子神経生物学

キーワード：化学遺伝学 神経活動促進 機能回復 パーキンソン病 認知症

1. 研究開始当初の背景

近年、本国は「超」高齢社会に突入し、脳の老化と関連深い神経疾患であるパーキンソン病、認知症などの患者数の急激な増加は喫緊の社会問題である。パーキンソン病は、中脳に局在し線条体へ投射するドーパミン神経の選択的変性に起因し、固縮、無動、振るえなどを含む運動機能の障害を主症状とする疾患である。認知症は、記憶や認知機能の障害を示し、神経細胞の変性や脳の萎縮に起因すると考えられるが、アセチルコリンの分解を阻害する薬剤がその症状改善に有効なことから、前脳基底コリン性神経細胞の変性あるいは機能低下が症状に関係することが以前より示唆されている。このように、いくつかの神経・精神疾患は特定の神経細胞の変性や機能低下が病気の症状に結び付くことが知られており、これらの神経細胞の機能の促進を誘導することは、病態改善のために有益な治療戦略を提供する。

我々の研究グループは、これまで行動制御を媒介する脳内の神経回路機構を解明するために、回路を構成する特定の神経細胞種や経路の役割の研究を行ってきた (Kato et al. *Rev. Neurosci.*, 2014; Kobayashi et al. *J. Neural Transm.*, 2018)。特に、標的となる神経細胞機能を操作し、その結果、行動や回路の動態に現れる影響を解析することによってそれぞれの細胞種の役割と行動との因果関係の解明を行った (Kato et al., *J. Neurosci.*, 2011; Okada et al., *Nat. Commun.*, 2014; Kato et al., *Cell Rep.*, 2018 他)。最近、昆虫の興奮性イオン透過型受容体を利用して目的の神経細胞種の活動を選択的に促進させる新規の化学遺伝学的技術の開発に成功した。本法は、末梢から薬剤を投与することにより、脳内の特定の神経細胞種の活動を増進させることが可能であり、受容体の性質から効率的で持続的な細胞応答を誘導することも可能なため、既存の技術に比較して優れた点が多いと考えられる。

本研究では、この新規の化学遺伝学技術を応用して、パーキンソン病、認知症の病態モデルに対して、これらの症状の原因となる神経細胞種の機能を亢進し、病態の改善・回復を目指す新たなストラテジーの開発を目指す。このモデル系として、線条体間接路の機能に着目し、末梢からの薬剤投与による *in vivo* の脳内標的ニューロン活性化および運動機能の変容の誘導に取り組む。

2. 研究の目的

本研究課題では、第一に、昆虫の興奮性イオン透過型受容体を利用して目的の神経細胞種の活動を選択的に促進させる新規の化学遺伝学的技術を応用し、リガンド前駆体を末梢血より注入し、脳内へ移行させ、標的の神経細胞を促進する技術の開発に取り組む。一般に、メチルエステル誘導体は血液脳関門を効率的に透過し、脳内でエステラーゼにより代謝されることが知られている。チロシン水酸化酵素 (TH) 遺伝子プロモーターの制御下に、ショウジョウバエのイオン透過型受容体 (ionotropic receptor/IR) の 2 種類のサブユニット IR84a と IR8a を発現する TH-IR84a/IR8a マウス系統を利用し、リガンドであるフェニル酢酸 (PhAc) のメチルエステル (MPhAc) を尾静脈から注射することによって、脳内へ移行させ、PhAc に代謝された後、PhAc がノルアドレナリン神経を活性化できるかどうかをテストする。第二に、ウィルスベクターを用いて標的の神経細胞において選択的に IR84a と IR8a 受容体遺伝子を発現させる誘導系を構築す

る。ドーパミン D2 受容体 (D2R) 遺伝子のプロモーターの制御下に Cre を発現する D2R-Cre 系統を利用し、線条体間接路細胞に受容体遺伝子の発現を誘導する実験系を確立する。この動物を用いて、リガンド投与により、標的のニューロンの活動を亢進し、神経伝達物質の放出や運動行動への影響を解析する。

3. 研究の方法

(1) リガンドの末梢投与：生理食塩水 (10 単位/ml のヘパリンを含む) を入れたインスリン用シリンジ (マイジェクタ, 29G, 50 μ l) を PE-10 チューブで歯科麻酔用注射針 (30G) と接続し、針先を動物の尾静脈に刺入した状態で医療用アロンアルファにより固定した。投与の直前に、マイジェクタを vehicle (1.5% Tween80 と 2.5% エタノールを含む生理食塩水) あるいはメチルフェニル酢酸溶液 (10 ~ 20 mg/kg, 5 ml /kg) が入ったものに交換し、投与タイミングで、約 30 秒かけて全量を静脈内に投与した。

(2) ウィルスベクター注入：全身鎮痛および局所麻酔を施しながら、定位脳手術装置を用いて注入した。AAV ベクターを使用した実験では、AAV2-CBh-Flex-EGFP-IR84a (2.06 x 10¹² copies/ml) と AAV2-CBh-Flex-HA-IR8a (3.17 x 10¹² copies/ml) を 1 : 1 で混合し、D2R-Cre ラットの背側線条体外側部 (片側) に、0.15 μ l/min の流速で 1 サイトにつき 0.75 μ l 注入した。注入座標は、AP: +0.15, ML: 3.8, DV: -4.4 & -3.4; AP: +0.15, ML: 4.2, DV: -4.4 & -3.4; AP: -0.35, ML: 3.7, DV: -4.7 & -3.7; AP: -0.35, ML: 4.1, DV: -4.7 & -3.7 (単位は mm、AP および ML はプレグマ起点、DV は dura 起点) であった。レンチウイルスベクターを使用した実験では、Vsvg-MSCV-Flex-EGFP-IR84a-2A-HA-IR8a (4.36 x 10¹² copies/mL) をラット線条体 (片側) に、0.1 μ l/min の流速で 1 サイトにつき 0.4 μ l 注入した。注入座標は、AP: +0.15, ML: 3.8, DV: -4.4 & -3.4; AP: +0.15, ML: 4.0, DV: -4.4 & -3.4; AP: +0.15, ML: 4.2, DV: -4.4 & -3.4; AP: -0.35, ML: 3.7, DV: -4.7 & -3.7; AP: -0.35, ML: 3.9, DV: -4.7 & -3.7; AP: -0.35, ML: 4.1, DV: -4.7 & -3.7 であった。

(3) 組織解析：動物に深麻酔を施し、経心臓的に 4% PFA 溶液をかん流、脳を固定した。抜脳後に固定液に 16 時間浸漬した後、10、20 および 30% スクロース含 PB で段階的にクライオプロテクションし、-80°C にて凍結保存した。凍結脳を -20 のクライオスタット内で厚さ 30 μ m に薄切した。切片をブロッキング処理した後に、抗 GFP 抗体 (ニワトリ、abcam ab13970)、抗 HA 抗体 (ウサギ、cell signaling 3724)、抗 IR8a 抗体 (モルモット、スイス・ローザンヌ大学 Benton 研究室)、抗 D1R 抗体 (ヤギ、北海道大学医学部渡辺研究室) および抗 A2AR 抗体 (同) で 16 時間インキュベーションし、それぞれに対応する二次抗体によって蛍光標識した。標識シグナルを顕微鏡 (ニコン社製 A1 もしくは KEYENCE 社製 BZ-X700) を用いて観察した。

(4) In vivo 電気生理：TH-IR84a/IR8a マウスを 0.5 ~ 1.0% イソフルランで麻酔しつつ定位脳手術装置に固定し、LC 直上 (AP: -1.2, ML: 0.9 mm、ラムダ起点) の頭骨を穿孔して記録電極 (先端直径 2 ~ 3 μ m、インピーダンス 15 ~ 20 M Ω) を LC 位置 (2.2 ~ 3.5 mm、dura 起点) まで刺入した。発火頻度と波形から NE ニューロンを同定し、溶媒あるいはリガンドの尾静脈投与の前後で発火頻度をモニターした。

(5) マイクロダイアリシス：全身鎮痛および局所麻酔を施しながら、定位脳手術装置を用いてガイドカニューレ留置手術をおこなった。TH-IR84a/IR8a マウスでは前帯状皮質 (ACC) を標的とし、ガイドカニューレ (25G、エイコム) を AP: +0.7, ML: 0.3,

DV: -0.4 (単位は mm、AP および ML はブレグマ起点、DV は dura 起点) に留置した。D2R-Cre ラットでは淡蒼球外節 (GPe) を標的とし、ガイドカニューレを AP: -0.9, ML: 3.0, DV: -5.1 に留置した。動物の体力回復の後にガイドカニューレにダイアリシスプローブ (エイコム) を挿入し、プローブ内に人工脳脊髄液をかん流し、フラクション・サンプル (1 フラクションが 30 分) を HPLC で分析した。溶媒あるいはリガンドの尾静脈投与の前後で、細胞外ノルアドレナリン濃度 (マウス) あるいは細胞外 GABA 濃度 (ラット) をモニターした。

(6) 回転運動の解析: 直径 30 cm, 側壁の高さ 55 cm のアクリル製の円筒型装置 (底面はすり鉢状) に首輪を装着したラットを入れた。動物の直上 60 cm の位置にパソコンと接続したロータリーエンコーダー (テルモ) を設置し、ロータリーエンコーダーと首輪をワイヤーで接続して、ラットの回転運動を Matlab (The Math Works) で記録した。溶媒あるいはメチルフェニル酢酸 (10 mg/kg, 5 ml/kg) の腹腔投与の 10 分後にコカイン (15 mg/kg, 1 ml/kg) を腹腔投与し、その直後に動物を装置において 60 分間の回転行動をモニターした。

4. 研究成果

末梢投与法の確立: PhAc の前駆体である MPhAc を尾静脈から注射することによって、TH-IR84a/IR8a トランスジェニックマウスの脳内ノルアドレナリン細胞の活動を *in vivo* 電気生理学的手法により測定し、この神経細胞の活動が増加することを見出した。また、マイクロダイアリシス法を利用して大脳物質でのノルアドレナリン分泌量の増加することを確認した。この結果は、前駆体が脳内で代謝されたのち、PhAc がノルアドレナリン細胞に作用して、その活動を活性化させたことを示唆する。

線条体における導入遺伝子の誘導: ウィルスベクターを用いて標的の神経細胞において選択的に IR84a と IR8a 受容体遺伝子を発現させる誘導系を構築した。アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いて IR84a と IR8a 受容体遺伝子を標的細胞において選択的に発現させる誘導系の構築に取り組んだ。このベクター系において組換え反応を介して、ある程度の神経細胞で 2 種類の受容体遺伝子の発現することに成功したが、AAV ベクターは搭載できる導入遺伝子のサイズが限られるため、2 つの受容体遺伝子を別々のベクターに搭載し、2 種類のベクターが共発現する細胞においてのみ、機能的な受容体が形成されるため、導入の効率に課題があった。そこで、レンチウイルスベクターに切り替え、IR84a と IR8a 受容体を 2A ペプチドで連結した融合遺伝子として発現させる実験系の開発に取り組んだ。IR84a には GFP を融合し、IR8a にはヘマトアグルチニン (HA) のタグを融合し、できるだけ短い導入遺伝子サイズになるように設計した。この融合遺伝子を搭載したレンチウイルスベクターを D2R-Cre を発現するトランスジェニックラット系統の線条体に注入し、両受容体遺伝子が D2R 陽性細胞に高頻度に発現することを確認した。

リガンド依存性の線条体ニューロンの活性化と行動変容: D2R-Cre トランスジェニックラットから脳スライスを作製し、パッチクランプ法によって、GFP-IR84a-2A-IR8a を発現するニューロンの神経活動を記録し、リガンドであるフェニル酢酸の投与によって活動の上昇が起こることを確認した。また、マイクロダイアリシスによって淡蒼球の GABA 分泌がリガンド依存性に亢進することを確認し、同様に片側の線条体での受容体の発現によって、リガンド投与後、回転行動の誘導されることを見出した。これらの

結果から、IR84a-IR8a 受容体の発現は、リガンド依存性に線条体の標的のニューロン活動を増加させることが示された。

これらの結果は、ウィルスベクターを用いて目的のニューロンにイオン透過型受容体を発現させ、リガンド前駆体を利用して脳内の標的ニューロンの活性化を誘導し、さまざまなニューロン種の機能低下に起因する病態の改善に利用できることを示している。今後、パーキンソン病モデルや認知症モデルの動物に本法を適用し、病態や障害の改善に有効なことを実証していく計画である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fukabori Ryoji, Iguchi Yoshio et al.	4. 巻 40
2. 論文標題 Enhanced Retrieval of Taste Associative Memory by Chemogenetic Activation of Locus Coeruleus Norepinephrine Neurons	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 8367 ~ 8385
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI.1720-20.2020	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 該当する

1. 著者名 Yoshimi Kazuto et al.	4. 巻 140
2. 論文標題 Combi-CRISPR: combination of NHEJ and HDR provides efficient and precise plasmid-based knock-ins in mice and rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Human Genetics	6. 最初と最後の頁 277 ~ 287
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00439-020-02198-4	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 Okada Kana, Nishizawa Kayo, Kobayashi Tomoko, Sakata Shogo, Hashimoto Kouichi, Kobayashi Kazuto	4. 巻 11
2. 論文標題 Different cholinergic cell groups in the basal forebrain regulate social interaction and social recognition memory	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 135789
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-93045-7	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Shigeki Kato, Kazuto Kobayashi
2. 発表標題 Comparative analysis of retrograde gene transduction efficiency between various modified virus types
3. 学会等名 The 43rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤 成樹, 小林 和人
2. 発表標題 特定神経標識のための新しいベクター開発とその応用
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤 成樹, 小林 和人
2. 発表標題 高頻度逆行性ウイルスベクターによる線条体subdivisionへの入力解析
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 Yoshio Iguchi, Ryoji Fukabori, Shigeki Kato, Yasunobu Yasoshima, Kazuto Kobayashi
2. 発表標題 Role of the locus coeruleus-basolateral amygdalar noradrenergic projection in the retrieval of taste aversion memory in mice: a pharmacological and chemogenetic circuit manipulation study
3. 学会等名 第81回動物心理学会
4. 発表年 2021年

〔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			
スイス	University of Lausanne			