

## 戦略的国際共同研究プログラム (SICORP)

### 日本-シンガポール「細胞の動的計測・操作を可能にするバイオデバイスの技術基盤の開発」領域 事後評価結果

#### 1. 共同研究課題名

「神経細胞を近赤外光操作するバイオ・ナノデバイスシステムの開発」

#### 2. 日本－相手国研究代表者名（研究機関名・職名は研究期間終了時点）：

日本側研究代表者

八尾 寛（東北大学大学院生命科学研究科・名誉教授）

シンガポール側研究代表者（研究代表者退職のため 2018 年度より変更）

アンジェロ・アル（シンガポール国立大学・助教）

シャオガン・リュウ（シンガポール国立大学・教授）※2018 年度から

#### 3. 研究実施概要

脳神経の機能を調べるためには、電極を用いた刺激を与えて反応を観察する方法がとられているが、試験動物の脳を傷つけるので、脳の深部にある神経の機能を調べる方法としては好ましくない。チャネルロドプシン (ChR) は、視神経で可視光を神経刺激に変換しているタンパク質である。遺伝子工学を用いて、目的とする脳神経で ChR を発現することが可能になると、脳を光照射することによって神経を刺激して神経の機能を解析・制御することができる (オプトジェネティクス) ものと期待される。本研究課題は、日本側が特定の脳神経で ChR を発現させることを可能にするラット系統を樹立すること、及びシンガポール側と協力して、(可視光が届かない) 脳の深部にあつて ChR を発現している神経細胞を光刺激するためのアップコンバージョン技術 (近赤外光エネルギーを可視光に変換する技術) の開発を目的として、次の実施計画のもとに共同研究を実施した。

実施計画：日本側は、脳神経細胞のオプトジェネティクス技術を確立することを計画した。まず、目的とする脳神経細胞で ChR を発現するラットをシステムティックに作製するために必要な遺伝子組換え技術を確立する。この技術を用いて、脳神経組織の表面に存在する神経細胞で ChR を発現させたラットを作製し、可視光照射の刺激によって当該の神経細胞が興奮することを確認する。次に、シンガポール側は、可視光が届かない脳深部に在る ChR 発現した神経細胞を刺激するために、生体組織透過性に優れた近赤外光と、近赤外光を可視光に変換するランタニドナノ粒子 (LNP) を開発して、アップコンバージョン技術を確立する。そして、シンガポール側から LNP の提供を受けて、日本側は、ChR 発現ラットの脳神経細胞と LNP との親和性を改良して、オプトジェネティクス技術とアップコンバージョン技術を組み合わせた、脳神経細胞の機能解析実験技術を

完成させる。

実施状況：日本側は、ChR を改良した高感度チャンネルロドプシン ChRFR(C167A) (本事後評価報告書では ChRFR と略す) を Cre-loxP コンディショナルに発現するドライバーラット株を開発した。このラット株を利用して遺伝子組換えをおこない、脳表面に近い神経細胞で ChRFR を発現しているトランスジェニックラットを作製した。このラットの脳に可視光を照射すると、ChRFR を発現している脳神経細胞が興奮することを確認した。すなわち、脳オプトジェネティクスまでを研究計画通りに実施した。しかし可視光は脳組織を透過しないので、ChRFR を発現するトランスジェニックラットであっても、脳深部にある神経細胞を興奮させるためにはアップコンバージョン技術を確立することが必要である。一方、シンガポール側は、計画通りにアップコンバージョンに適した LNP を開発し、さらにドーパミン神経細胞でチャンネルロドプシン 2 (ChR2) を発現したマウスを用いて、近赤外光の照射によってドーパミンを放出することを実証した。その後、日本側は、シンガポール側が開発した LNP の提供をうけて、ChRFR を発現している脳神経細胞との親和性を改良する研究を実施した。しかし、LNP は期待どおりに機能しなかった。

#### 4. 事後評価結果

##### 4-1. 研究の達成状況、得られた研究成果及び共同研究による相乗効果 (論文・口頭発表等の外部発表、特許の取得状況を含む)

日本側は、ChRFR を Cre-loxP コンディショナルに発現するドライバーラット株を開発した。このラット株を利用して遺伝子組換えをおこない、延髄前呼吸性神経 (Pre-I) で ChRFR を発現しているトランスジェニックラットを作製した (Igarashi *et al.*, *Scientific Rep.*, 2018)。このトランスジェニックラットの Pre-I 神経に青色光を直接照射すると呼吸リズムの位相がずれた。すなわち可視光で Pre-I 神経を刺激することができたので、LNP を用いたアップコンバージョン光操作に適していることが確認された。

同じころ、シンガポール側は LNP の開発に成功していた。この LNP を用いて、マウス腹側被蓋野にあるドーパミン細胞で ChR2 を発現させたトランスジェニックマウスに対し、頭蓋骨上部から近赤外光をパルス照射する実験をおこなった。その結果、ChR2、LNP、及び近赤外光に対して依存的にドーパミンニューロンの活動が促進されたことが示唆される実験結果を得た。

両者の論文が発行されたとき、本共同研究の研究期間は一年以上残されていた。日本側が当初計画していた「オプトジェネティクスーアップコンバージョン実験系の開発」を実施するためのラットと試薬 (LNP) が整った。しかし、シンガポール側から譲渡された LNP は一度も利用されなかった。この理由について、日本側研究代表者は、シンガポール側からは数回 LNP を入手したが、輸送中に粒子が凝集し、計画していた実験に使えなかったためとしているが、こういった時にこそ、本国際共同研究の旅費を利用して、日本側研究代表者あるいは共同研

研究者がシンガポールへ直接出向き、相手側チーム立会いのもとに実験・議論をおこなって、問題解決を図るべきであった。このように日本側とシンガポール側の共同実験を一度も実施することなく、本共同研究課題は相乗効果（オプトジェネティクスーアップコンバージョン実験系の開発）が得られないまま、研究期間が終了したことは残念である。

これら本研究課題に関連した研究成果は、研究期間中に相手側との共著論文 0 編、日本側著者単独による論文 17 編、国際会議での口頭発表 1 件として公表された。

#### 4-2. 研究成果の科学技術や社会へのインパクト、わが国の科学技術力強化への貢献

日本側が開発した高感度チャンネルロドプシンChRFRは、波長450-520nm の青緑色ブロードバンド光に高い感度を有しているため、LNP を用いたアップコンバージョン光操作の光刺激受容体として最適である。この遺伝子を組込んだトランスジェニックラット株は、高感度チャンネルロドプシンをCre-loxP コンディショナルに発現するので、オプトジェネティクスを用いる多様な研究に応用できる高い汎用性が期待されることから、ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」(NBRP-Rat) に寄託された。また、シンガポール側が開発したLNPは調整方法が公開され、だれにでも譲渡されている。このラット株とLNPを用いて、オプトジェネティクスーアップコンバージョンを用いた研究を誰でも容易に実施することが可能になった。今後、生物学・行動学・医学・薬学の研究分野で利用されることが期待される。

また、このトランスジェニックラット株に関する論文は多数公開されている。これらの研究にかかわった若手研究者は学会発表で表彰されるなど、確かな業績を残して研究者として育っている。彼らが近い将来に、本共同研究課題に関連した研究分野で活躍することを期待したい。

以上