

伊佐 正

京都大学大学院医学研究科
教授

霊長類の大規模回路の光遺伝学的操作による高次脳機能の解明

§ 1. 研究実施体制

(1)「光遺伝学による脳回路機能操作技術開発」グループ

- ① 研究代表者:伊佐 正 (京都大学医学研究科、教授)
- ② 研究項目
 - ・ラットを用いたウィルスベクター、オプシン等の条件検討
 - ・サルを用いたウィルスベクター、オプシン等の条件検討
 - ・ドーパミン、アセチルコリン投射系の操作と機能回復
 - ・LIP-DLPFC 経路などの操作による盲視のメカニズム解明

(2)「脳光刺激計測用デバイス開発」グループ

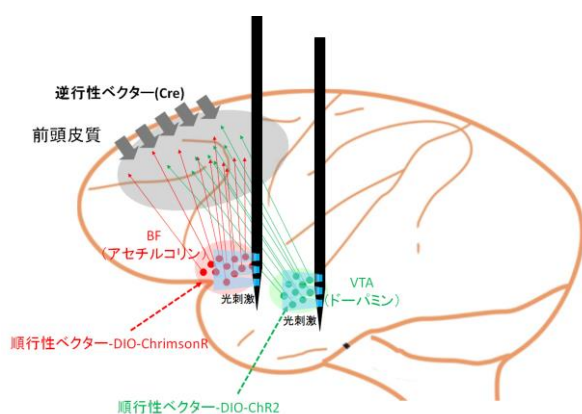
- ① 主たる共同研究者:太田 淳 (奈良先端科学技術大学院大学物質創成科学研究科、教授)
- ② 研究項目
 - ・脳表広域光刺激デバイスの開発
 - ・脳内刺入型光刺激デバイス及びその高機能化
 - ・脳表・刺入ハイブリッド光刺激デバイスの開発

(3)「ウィルスベクター開発」グループ

- ① 主たる共同研究者:小林 憲太 (自然科学研究機構生理学研究所、准教授)
- ② 研究項目
 - ・ウィルスベクターの改善と供給

§ 2. 研究実施の概要

光を感知して電荷を通す膜タンパクを遺伝子工学を用いて特定の細胞に発現させ、光によって膜電位を操作する(脱分極=活性化、過分極=抑制)光遺伝学技術は、げっ歯類をはじめとする小型モデル動物では、神経科学のパラダイムを変えるような大きな成功を収めたが、サルなどの中一大動物における成功は限定的で、また既知の知見を確認する域をあまり出していない。これは、(1)現在用いられているウィルスベクターによる遺伝子導入・発現効率が限定的であること、(2)広範囲の脳組織の神経活動を制御しないと行動の変容には至らないにも関わらず、現在用いている光学系では十分に広い範囲の脳組織を照射できていないことが主な原因ではないかと考えられる。このようなサルにおける光遺伝学技術の開発が将来ヒトにおける応用を考える上では避けて通れない課題である。そこで本研究課題では、マカザルにおける特定神経回路の光遺伝学的操作技術を確立することを目指す。そのための第一段階として、皮質下の腹側被蓋野(VTA)から前頭葉皮質に向かうドーパミン作動性経路及び前脳基底部(BF)から前頭葉皮質に向かうコリン作動性経路にそれぞれ青色光、赤色光で主に活性化する Channelrhodopsin2(ChR2)及び Chrimson R を発現させ、それらを光照射によって操作する。伊佐らのこれまでの研究から、このような皮質下から



から前頭葉の運動皮質への入力が脊髄損傷からの機能回復を促進するのではないかとという仮説が得られているので、検証する。経路選択的操作には、投射先である前頭葉皮質に Cre を搭載した逆行性輸送されるウィルスベクターを注入、そして DIO に目的とするオプシンを搭載した順行性のウィルスベクターを細胞体の位置(VTA、BF)を注入し、2重感染した細胞において選択的にオプシンが発現するようにする。そして光照射は

「皮質表面」ないしは「皮質下(VAT、BF)」のいずれかで行う(図)。

平成28年度は、伊佐グループでは、霊長類での実験の予備実験として、ラットを用いる実験を開始した。VTA から特に密に投射を受ける前頭葉領域を順行性ベクターである AAV-GFP の VTA への注入によって明らかにした。そして、小林グループによって作成された3種類の逆行性特異的ベクターを前頭葉皮質に注入。一方で VTA については、順行性ベクターとしてアデノ随伴ウィルスベクター(AAV)の血清型とプロモータを最適化するため、5種類の AAV ベクターを作成し、注入した。現在これらの組み合わせの中で最適の組み合わせを解析中である。

一方、太田グループでは、前頭皮質で光刺激を行い、光による活性状態を ECoG により確認できる光電気集積アレイ化デバイスの設計に着手した。前頭皮質への光刺激では、脳内への光の伝搬を評価することは重要であり、光学シミュレーションにより評価を進めている。また、実際に光刺激によりドーパミンが放出されていることを確認するために、まずラットにおけるマイクロダイアリシス実験系の構築を開始した。更に、マイクロダイアリシスと光刺激デバイスを集積化する構造についての検討を進めた。