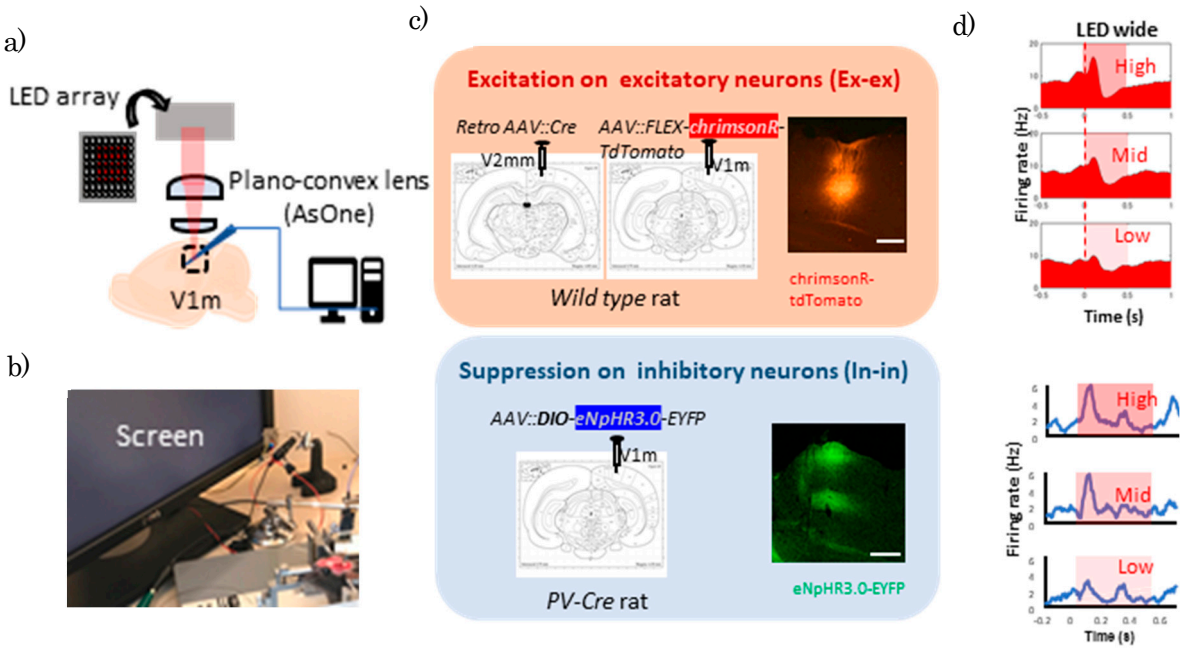
206　光遺伝学的な脳刺激型人工視覚の生理学的最適化	増田　明

【目的】全盲から回復させる治療法は現在非常に限られる。視覚を生み出すための情報経路である大脳皮質の視覚野を刺激することで、視覚体験を誘導させる「人工視覚」は、適応患者数が多いため有望な治療法の一つである。刺激方法として、現在の主流である埋め込み電極による電気刺激は侵襲度が高く、後遺症などのリスクが高い。光遺伝学的という光に応じたチャネルやポンプ開閉が可能な光駆動タンパク質を遺伝学的に細胞に導入することで、光による神経細胞の操作が可能になっている。脳外部から光照射することで、神経系を光遺伝学的に活性化できれば侵襲度が低い治療法として新たな有望な治療法となる可能性がある。光遺伝学では特定の細胞種のみを標的とした刺激も可能であり、本研究は人工視覚として光遺伝学が有効であることを検討し、さらに有望な神経活性化を生み出す光駆動タンパク質、細胞種の組合せを同定することを目的とした。

【方法】ラットの一次視覚野（V1）の神経細胞にアデノ随伴ウイルスベクター（AAV）を介して、興奮性細胞と抑制性細胞それぞれを標的に光による活性化、光による抑制を受ける光駆動タンパク質を導入した。光刺激システムとして、LED ドットマトリクス光を脳外部から脳表にレンズを介して集光する刺激装置を自作した。LED マトリクスを多点、同時に光らせる広範囲刺激と一点で光らせるドット刺激を用いて刺激中の視覚野への神経応答を、シリコンプローブを用いた電気生理学により測定した。

【結果】広範囲刺激によって活性化された神経細胞の数は、抑制性細胞を標的とした場合の方が、興奮性細胞を標的にしたものより統計的に有意に多かった。微小領域であるドット刺激時の神経応答では、興奮性細胞を標的としたものでは、応答を誘発するドット数が抑制性細胞を標的としたものよりも多かった。これらのことから、抑制性細胞を標的とした脳外部からの光遺伝学的刺激は、活性化細胞が多く、また限定した領域での刺激にも向いているという可能性が示唆された。

光遺伝学的脳視覚野刺激系と電気生理学実験による視覚野神経細胞の応答



206. 光遺伝学的な脳刺激型人工視覚の生理学的最適化

増田　明

*同志社大学 研究開発推進機構

Key words：人工視覚，視覚野，光遺伝学，電気生理学，細胞種

緒　言

全盲から視覚を回復する治療法創出への期待は非常に大きい。しかし全盲から回復させる治療法は現在非常に限られる。視覚を生み出すための情報経路である網膜、視神経、視床、大脳皮質を含む視覚神経系を刺激することで、視覚体験を誘導させる「人工視覚」は、現在研究されている有望な治療法の一つである。大脳皮質の一次視覚野を刺激する「脳刺激型の人工視覚」は、脳の損傷がない限り適応可能であるため、治療対象となる患者数が大幅に増加する［1］。現在、視覚野刺激型の人工視覚はすでに臨床研究が複数の国と地域で実施されているが、脳の血管への損傷、感染症の発生などの脳手術の術後後遺症が問題となっている。新しい神経細胞を駆動する方法として光遺伝学と呼ばれる細胞内機能を光で操作する技術が近年基礎研究分野でよく活用されている［2，3］。脳へ電極を直接挿入する電気刺激法に比べ、脳の表層外から刺激が可能な光遺伝学的刺激であれば、感染症や出血による脳機能障害などの術後後遺症の問題を解消できる。本研究では、光遺伝学的に脳外部から高精度光パターンを与えることで視覚野を刺激する「光遺伝学的脳刺激型」人工視覚の実現可能性を小型動物における電気生理学的計測手法により生理学的に評価、検討した。

方　法

すべての実験は同志社大学動物実験委員会から承認を受けた上で、科学的観点および動物愛護、環境保全、実験従事者の安全確保の観点を踏まえて定められた「同志社大学動物実験等の実施に関する規程」に基づいて実施された。

1. 一次視覚野における光駆動タンパク質の導入

ラットの一次視覚（V1）の神経細胞にアデノ随伴ウイルスベクター（AAV）を介して 2 種類の方法で光駆動タンパク質を導入した。対象となる神経細胞種は興奮性細胞と抑制性細胞である。それぞれに対し、組換え酵素である Cre を一次視覚野からの投射先である二次視覚野へ AAV 注入する方法、遺伝的に標識された系統である PV-Cre ラットを用いる方法により、細胞種特異的に発現させた。 光駆動陽イオンチャネルである ChrimsonR［4］および光駆動 Cl イオンポンプである eNpHR-3.0［5］を興奮性細胞、抑制性細胞それぞれに Cre を発現する動物の一次視覚野に AAV を介して発現させた。興奮性細胞を標的とする方法を Ex-ex、抑制性細胞を標的とする方法を In-in とした。遺伝子導入の領域は、ペントバルビタール麻酔下で 4%ホルマリンリン酸緩衝溶液による灌流固定を行い、脳切除し取り出した脳を 24 時間の後固定後、30%スクロース溶液による置換で脳を硬化させた状態で 40 μm 凍結切片を作製し、蛍光顕微鏡（BX51、Olympus）で観察した。

2. 光刺激装置と刺激方法

ウイルスベクターを投与した一次視覚野領域の脳表上部に多点を有する微小な発光ダイオード（LED）を留置し、凸レンズ 2 枚（AsOne）を介して光を集光させ、光遺伝学的にパターン刺激を行った。LED ドットマトリクス全体から光を照射する広範囲条件と、一つの LED ドットのみから照射させる単ドット条件で刺激を行った。脳表上の照度を疑似的に測定するため、LED、レンズ、スクリーンを同一の距離に置き、照度計（S121C、Thorlabs Inc.）により計測した。通常の視覚刺激を動物眼前に置いたコンピュータスクリーンにより提示した。

*現在の所属：株式会社 国際電気通信基礎技術研究所

3. 電気生理学

電気生理学的手法を活用することで、どの神経細胞種をどう操作すると人工視覚がうまく誘導できるか、どのような光刺激方法で、視覚野が活性化できるか、微小領域限定で活性化できるかを検討した。記録電極として、NeuroNexus 社あるいは Cambridge NeuroTech 社製のシリコン電極を用いた。神経信号は Intan technology 社製の前増幅器および RHD2000 記録装置を介したコンピュータ上で open ephys GUI ソフトにより取得し、Matlab 下での高速自動ソーティングソフト Kilosort［6］、Python 環境での手動ソーティングソフト phy により、単一細胞レベルでの発火活動を抽出し、解析した。光刺激システムの動作は Arduino により制御し、LED マトリクスの光照射と同一タイミングで単一 LED 素子（Kaito1927、Opto Supply）にも通電させ、発生した光をフォトダイオードセンサーモジュール（ALS-PT204-6C/L177、Everlight Electronics Co Ltd）にて検知させ、その電位情報を RHD2000 記録装置へ入力させた。これにより、光刺激と神経活動の時系列情報を同期させた。

4. 統計解析

LED 広範囲刺激、微小領域刺激、通常視覚刺激に対する応答性の有無は、刺激前の 0.5 秒間の発火頻度を基準にし、刺激開始から 0.5 秒までの発火頻度をすべての刺激試行で、ノンパラメトリックの Wilcoxon signed rank test により有意水準 $p<0.05$ で比較検定した。統計的な差が有意であった細胞のうち、刺激時の発火頻度が上昇していたものを刺激応答細胞とし、それらの数の割合の差を Fisher's exact test により検定した。

LED ドット刺激への応答に関する解析には、Permutation 試験（ランダム化試験）を行い、16 領域（4×4）ある LED ドットそれぞれの刺激時における発火頻度を、取得した発火パターンを並び替えたもの 1,000 個と比較し、統計的に有意に発火上昇しているか下降しているかを検定した（順位：＞上位 5%、＜下位 5%）。

結　果

1. 光刺激システムの評価

光刺激システムが脳表上に与える照度は、レンズ無し、レンズ 1 枚、レンズ 2 枚の条件で比較し、レンズ 2 枚によるものが最大であり、この条件で刺激を行った（図 1a）。脳固定装置に動物を固定した実験の様子を図 1b に示す。

2. 光刺激に応答する神経細胞の反応

視覚野へ導入された遺伝子発現を蛍光顕微鏡で確認した（図 1c）。遺伝子発現が認められた領域の近傍へ電極を挿入された動物個体において、全体として 267 個の興奮性神経細胞の活動を記録した。まず LED 広範囲光刺激に応答した神経細胞群を同定した（図 1d）。興味深いことに、誘導された発火パターンは光照射が継続する時間にもかかわらず減衰したり、減衰後逆転反応を示したりするものが目立った。

光刺激後、発火頻度を統計的に有意に上昇させた細胞の割合は、Ex-ex 条件では 11%、In-in 条件では 26.2%と In-in 条件の方が統計的に有意に応答する確率が高かった（Fisher's exact test、$p=0.005$）。次に、微小範囲刺激に応答した神経細胞を同定したが、Ex-ex では 3.1%、In-in では 6.8%であったが、統計的には有意な差ではなかった（Fisher's exact test、$p=0.22$）。通常の視覚刺激への応答についても、それぞれ 56.2%と 48.5%と差はなかった（Fisher's exact test、$p=0.29$）。

3. 微小領域光刺激に応答する神経細胞の反応

次に、微小範囲刺激した時の反応性を詳しく解析した。16 領域の各ドットへの応答性を調べると、細胞により、多くのドットに応答するものと、ごく限られたドットにのみ応答するもの、ほとんど反応性を示さないものに分かれた。興奮性細胞を標的とする方法では、多くのドットへ応答するものの割合が多く、抑制性細胞を標的とする方法では少ないドットへ応答するものが多くみられた（図 2A、B）。そこで各標的法について、神経細胞全体で応答するドット数がいくらなのかを計算すると、興奮性細胞を標的とする方法に比べ、抑制性細胞を標的とする方法が少なかった（Mann-Whitney's U test、$p=6.4\ e^{-13}$）（図 2C）。このことは、局所的な刺激応答性を実現したい場合、興奮性細胞を標的とする方法より、抑制性細胞を標的とする方法のほうが適していることを示唆する。

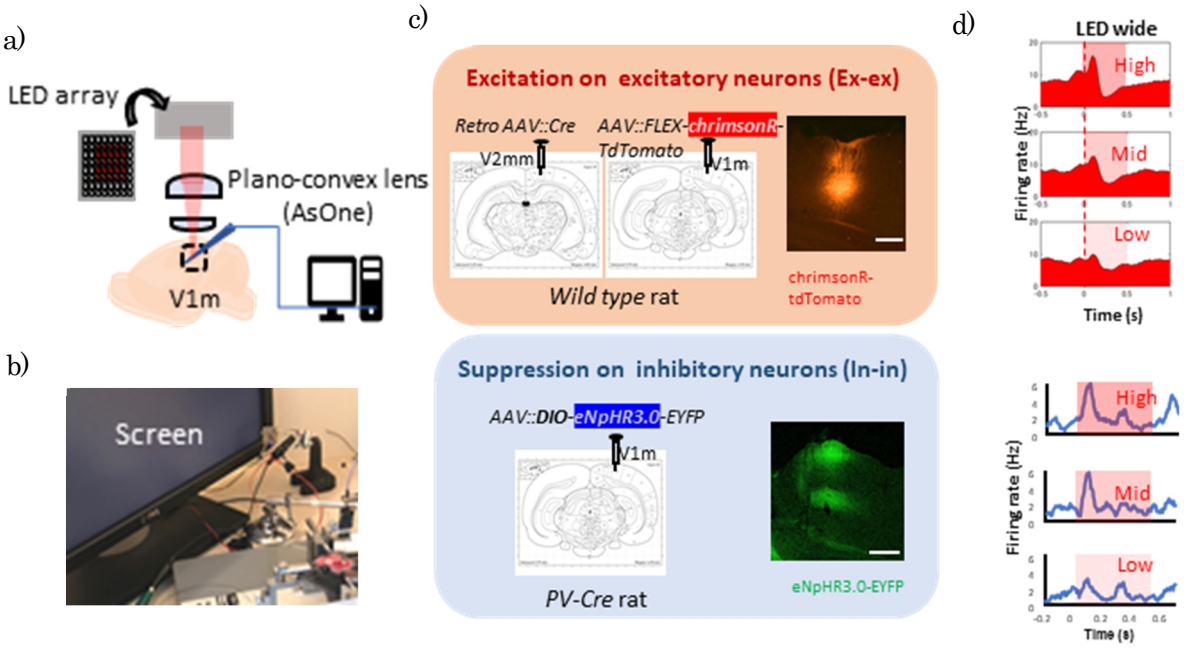


図 1. 光遺伝学的脳視覚野刺激系と電気生理学実験による視覚野神経細胞の応答

a) LED ドットマトリクスおよびレンズからなる光刺激システム。

b) シリコン電極による神経応答測定の様子。

c) 興奮性神経、抑制性神経を標的とした 2 つの戦略と遺伝子導入法（光駆動タンパク質の発現（スケールバー：200 μm）。

d) 電気生理学により確認した異なる刺激方法によりそれぞれ誘起された神経応答。

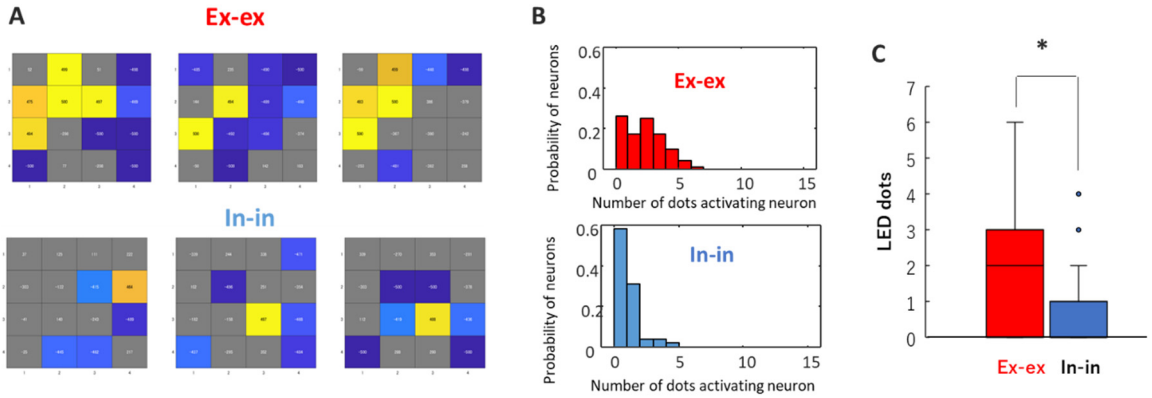


図 2. 異なる細胞種標的下での微小ドット光刺激に対する神経応答

a) 微小ドット光刺激により発火誘導を与えたドット領域（代表細胞例、黄色が発火上昇、青色が発火下降、ともに $p<0.05$、permutation test）。

b) 神経細胞ごとに発火誘導を受けたドット数の割合。

c) 細胞種標的法の違いにより刺激誘導可能な領域幅が異なる（$*p=6.4e^{-13}$、Mann-Whitney's U test）。

考　察

本研究では、視覚野を脳外部から光遺伝学的に光照射する刺激方法が人工視覚として有効かどうかを興奮性細胞、抑制性細胞それぞれを標的とした方法で動物における電気生理学によって検討した。その結果、興奮性細胞、抑制性細胞どちらを標的とした場合であっても、視覚野の神経細胞の発火活動を誘導できることが分かった。応答の解析に

より、抑制性細胞を標的とした場合の方が、活性化される細胞が多く、限定した刺激領域に応答を生じさせる可能性が示唆された。

共同研究者

本研究の共同研究者は、奈良先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科物質創成科学領域光機能素子科学研究室の春田牧人助教である。

文　献

1) Lewis PM, Ackland HM, Lowery AJ, Rosenfeld J V. Restoration of vision in blind individuals using bionic devices: A review with a focus on cortical visual prostheses. Brain Research 2015;1595:51–73. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.11.020.
2) Sohal VS, Zhang F, Yizhar O, Deisseroth K. Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. Nature 2009;459:698–702. https://doi.org/10.1038/nature07991.
3) Burton RAB, Klimas A, Ambrosi CM, Tomek J, Corbett A, Entcheva E, et al. Optical control of excitation waves in cardiac tissue. Nature Photonics 2015;9:813–6. https://doi.org/10.1038/nphoton.2015.196.
4) Klapoetke NC, Murata Y, Kim SS, Pulver SR, Birdsey-Benson A, Cho YK, et al. Independent optical excitation of distinct neural populations. Nature Methods 2014;11:338–46. https://doi.org/10.1038/nmeth.2836.
5) Gradinaru V, Thompson KR, Deisseroth K. eNpHR: A Natronomonas halorhodopsin enhanced for optogenetic applications. Brain Cell Biology 2008;36:129–39. https://doi.org/10.1007/s11068-008-9027-6.
6) Pachitariu M, Steinmetz N, Kadir S, Carandini M, Kenneth D. H. Kilosort: realtime spike-sorting for extracellular electrophysiology with hundreds of channels. BioRxiv 2016:061481. https://doi.org/10.1101/061481.