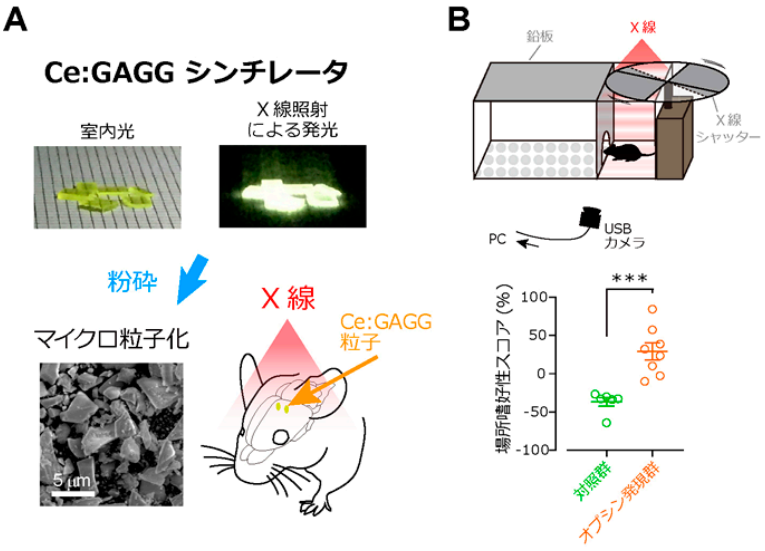
106　X線吸収性発光ナノ粒子による細胞機能操作法の開発	山下　貴之

【目的】光感受性タンパク質を用いて光照射により細胞分子機能を制御する技術（光操作技術）は、時空間精度の高さを背景として、ゲノム編集などの最新の生命科学技術と融合する形で生物医学系分野で広く活用されはじめており、副作用の少ない次世代の低侵襲治療法として幅広い医学応用が期待されている。ところが、光操作技術は、生体組織内で散乱・吸収されやすい可視〜近赤外光を刺激光とするため、深部や広範囲の組織へのアプローチを苦手とする。従来、刺激光を組織深部に届けるためには光ファイバーなど光照射装置を組織内に埋め込む手法が用いられているが、組織侵襲や有効体積の小ささなどが問題となる。そのため光操作技術は潜在能力を十分発揮する形での臨床応用が進んでおらず、根本的な問題解決が求められている。そこで、私たちは、生体組織を透過するX線を可視光へと変換する発光素材である無機シンチレータ粒子を組織に注射し、体外からのX線照射により遠隔的に光操作を行う独自技術（X線光操作法）を開発してきた。これまで、光操作技術の進歩が著しい神経科学分野での本技術の適用を目指して、高効率でX線を可視光に変換でき、かつ、潮解性を持たないため扱いやすいCe:CAGGを用いた技術開発を進めてきた。本研究では、Ce:GAGG粒子をマウス脳内に埋め込み、低線量のパルスX線照射により神経機能の操作を試みるとともに、本手法の安全性をさらに高めるため、Ce:GAGGナノ粒子の作製と本技術への応用も検討した。

【方法】まず、Ce:GAGG 発光により効率よく開口する光感受性イオンチャネル（オプシン）をスクリーニングした。次に、Ce:GAGG結晶の生体親和性を培養細胞とのインキュベーションおよび脳内への粒子注入により確認した後、スクリーニングにより見出した最適オプシンを生体マウス中脳ドーパミン神経に発現させ、X線照射により神経活性マーカーであるcFosの発現が誘導されるか、ドーパミン神経が関与する場所嗜好性に変化が現れるか、を検討した。さらに、化学合成によりCe:GAGGナノ粒子を合成し、様々な合成条件を検討することで蛍光量子収率の高い材料の作製を目指した。

【結果】Ce:GAGG 発光により興奮性オプシンであるChRmineと抑制性オプシンであるGtACR1が効率よく活性化することが分かった。また、Ce:GAGG結晶には顕著な細胞毒性がなく、Ce:GAGGマイクロ粒子は注射部位に長期間留まることが分かった。X線照射により、脳内に注射したCe:GAGG粒子塊が発光し、ChRmine発現細胞にcFosの有意な発現が誘導された。また、動物に悪影響を及ぼさない低線量のパルスX線照射により自由行動下のマウスの中脳ドーパミン神経を活性化し、場所嗜好性を変化させることに成功した。さらに、蛍光量子収率で90%程度のCe:GAGGナノ粒子が完成した。

Ce:GAGG シンチレータを用いたX線光操作実験



106. X 線吸収性発光ナノ粒子による細胞機能操作法の開発

山下　貴之

藤田医科大学 医学部 生理学Ⅱ講座

Key words：光遺伝学，X 線，ナノ粒子，電気生理学，動物行動

緒　言

光感受性タンパク質を用いて光照射により細胞分子機能を制御する技術（光操作技術）は、時空間精度の高さを背景として、ゲノム編集などの最新の生命科学技術と融合する形で生物医学系分野で広く活用されはじめており、副作用の少ない次世代の低侵襲治療法として幅広い医学応用が期待されている。ところが、光操作技術は、生体組織内で散乱・吸収されやすい可視～近赤外光を刺激光とするため、深部や広範囲の組織へのアプローチを苦手とする。従来、刺激光を組織深部に届けるためには光ファイバーなど光照射装置を組織内に埋め込む手法が用いられているが、組織侵襲や有効体積の小ささなどが問題となる。そのため光操作技術は臨床応用が進んでおらず、根本的な問題解決が求められている。そこで、私たちは、生体組織を透過する X 線を可視光へと変換する発光素材である無機シンチレータ粒子を組織に注射し、体外からの X 線照射により遠隔的に光操作を行う独自技術（X 線光操作法）を開発してきた。これまでの予備的実験により、高効率で X 線を可視光に変換でき、かつ、潮解性を持たないため扱いやすい Ce:CAGG が有効であることが分かってきた。そこで、光操作技術の進歩が著しい神経科学分野での本技術の適用を目指して、本研究では、Ce:GAGG を用いて X 線照射により神経細胞の活動を操作できること、マウスを実験対象として、動物行動の変化を誘発できることを証明することを目標とした。本手法の安全性をさらに高めるため、Ce:GAGG ナノ粒子の作製と本技術への応用も検討した［1，2］。

方法および結果

1. Ce:GAGG 発光により活性化するオプシンの探索

セリウムを微量ドープしたガドリニウムアルミニウムガリウムガーネット（Ce:GAGG）は、X 線照射により緑黄色光を放出する発光効率の非常に高いシンチレータであることが知られており、潮解性・吸湿性がなく、常温で固体であり、安定して扱いやすい。また、Ce:GAGG は X 線を照射した場合も紫外光を照射した場合も全く同じ波長スペクトラムの発光を示す。そこで、培養細胞系を用いて、Ce:GAGG の紫外光誘発性発光（PL）により効率よく開口する光感受性イオンチャネル（オプシン）を現在利用可能なオプシンからスクリーニングした。その結果、興奮性オプシンである赤色吸収型チャネルロドプシン ChRmine と抑制性オプシンであるアニオン透過型チャネルロドプシン GtACR1 が最も効率よく活性化することが見出された（図 1）。アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターによりこれらオプシンをマウスの中脳ドーパミン神経細胞や中隔帯細胞に発現させ、脳スライス上にて PL を照射したところ、わずか 1.7～3.3 μW/cm^{2}の強度の PL により活動電位頻度を有意に変動させることが可能であった［1］。

2. Ce:GAGG 結晶の生体親和性

Ce:GAGG 結晶の細胞毒性を調べるため、培養 HEK293 細胞やマウス海馬初代培養細胞の培養皿に Ce:GAGG 結晶を留置したものの、いずれの培養細胞においても細胞数は結晶を置かない対照群と違いはなかった。また、バルク Ce:GAGG 結晶を粉砕してマイクロ粒子化し、脳内に注入すると粒子は注入部位に集積するが、粒子塊周囲に、溶媒注入対照群よりも有意に高いグリア細胞の集積は観察されず、また、粒子塊周囲の神経細胞数も対照群と同等であった。以上の結果から、Ce:GAGG は生体無害であると考えられた［1］。

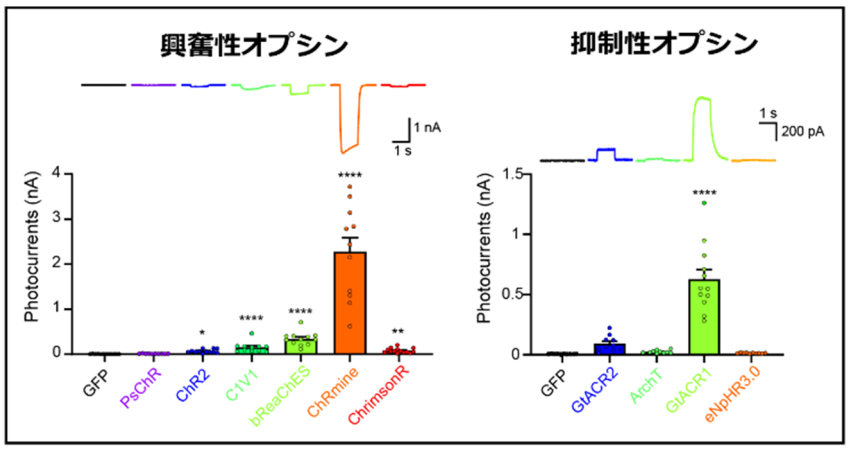


図 1. Ce:GAGG 発光により活性化するオプシンのスクリーニング

Ce:GAGG 発光によって誘導された異なるオプシンおよび GFP の光誘発性電流（上）とその振幅（下）。*p＜0.05、**p＜0.01、****p＜0.0001 vs GFP（Dunnett の多重比較検定）［1］。

3. 生体マウスにおける X 線光操作法の概念実証

脳内に注入した Ce:GAGG マイクロ粒子からの発光をシミュレーションすると、体外からの X 線照射により粒子塊周囲におよそ 2 μ W/cm^{2}の発光があることが試算され、十分に神経活性を変化させうることが分かった。実際に、AAV ベクターによりマウス中脳ドーパミン神経に ChRmine を発現させ、AAV 注入と同じ部位に Ce:GAGG マイクロ粒子を注入し、麻酔下にて体外から X 線を照射すると、神経活性マーカーである cFos の発現が誘導された。一方、対照群ではドーパミン神経における cFos の発現は有意に低かった。この結果から、脳内に注入した Ce:GAGG 粒子の X 線誘発性発光（シンチレーション）により特定神経の活性化が可能であることが示された［1］。

次に、自由行動下のマウスにおいて、Ce:GAGG シンチレーションによる神経操作を試みた。中脳腹側被蓋野（VTA）にあるドーパミン神経は動物の嗜好性に関わっており［3］、VTA ドーパミン神経の活性化・不活性化は、条件付け場所嗜好性（CPP）テストを用いて容易に検証できる。AAV ベクターにより両側 VTA のドーパミン神経に ChRmine あるいは stGtACR1（st＝細胞体集積型）を発現させ、同部位に Ce:GAGG マイクロ粒子を注入した。マウスを X 線照射側と X 線非照射側の 2 つの区画があるテストチャンバーに入れ、X 線照射による条件付け（1 日約 0.125 Gy 照射を 4 日間（合計約 0.5 Gy）、あるいは、1 日約 3.5 Gy 照射を 2 日間（合計約 7 Gy））を行った。条件付け後、ChRmine 発現群は GFP 発現対照群と比べて有意に X 線照射側に好んで滞在した。反対に、stGtACR1 発現群は、条件付け後、GFP 発現対照群と比べて有意に X 線非照射側に好んで滞在した（図 2）。これらの結果は、自由行動下のマウスにおいて Ce:GAGG シンチレーションにより中脳ドーパミン神経が活性化・不活性化されたことを示唆している［1］。

4. X 線被曝量の安全範囲の検討

さらに、マウスに対する X 線被曝による障害について、放射線感受性が高い海馬の未熟神経細胞や骨髄細胞を計数することで検討したところ、1.5 Gy 以上の X 線照射によりこれらの細胞数が減少することが分かった。上記の CPP 実験では合計約 0.5 Gy の線量でも行動変化を誘導できており、安全な X 線照射量で行動実験が可能であった。一方、合計 7 Gy の X 線照射を行った場合でも、骨髄細胞数の減少や神経新生への悪影響はあるが、マウスは体重減少なく生存し、X 線照射 1 日後の観察では自発的な行動に変化がない。そのため、7 Gy 程度の線量でも短期間の行動実験は可能と考えられた［1］。

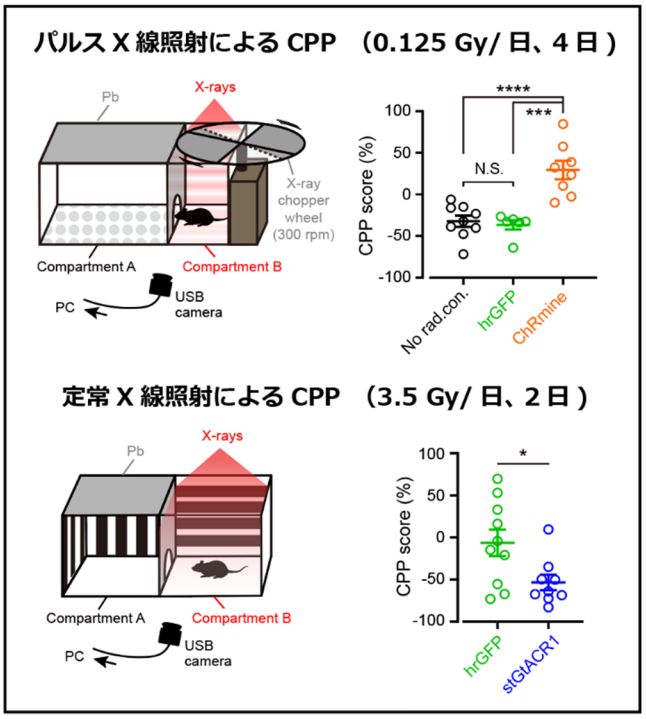


図 2. X 線照射による神経操作の成功例

遺伝子改変マウスと AAV ベクターの局所注入により VTA ドーパミン神経に ChRmine、hrGFP または stGtACR1 を発現させた。左のような実験用チャンバーを用いて、場所嗜好性試験（CPP）を行い、X 線照射側のコンパートメントへの場所嗜好性の上昇（上）あるいは低下（下）を誘導した。No rad. con.＝X 線を全く照射しない対照群。*p＜0.05、****p＜0.0001（Bonferroni の多重比較検定（上）、Mann-Whitney の U 検定（下））［1］。

5. Ce:GAGG ナノ粒子の作製

上記の研究結果により、生体内に埋め込んだシンチレータ粒子を用いて遠隔的な光感受性タンパク質の活性制御が可能であることが示された。上記実験で使用した Ce:GAGG マイクロ粒子をさらに小型化しナノ粒子化するため、バルク結晶の粉砕ではなく化学合成により Ce:GAGG ナノ粒子を合成した。東北大・越水正典先生の協力により、条件検討の結果、蛍光量子収率で 90%程度の材料が完成した。今後、このナノ粒子に streptavidin 被膜を施し、streptavidin 結合タグを付与した ChRmine と結合させることで、生体内シンチレーションによる光活性化タンパク質の活性化効率が従来法に比して高まるか否かを検討する［1］。

考　察

本研究により、X 線照射によって行動中の動物の体内に埋め込んだシンチレータを発光させ、周囲に発現させたオプシンを活性化できることが実証された。Ce:GAGG シンチレータ粒子は生体適合性が高く注射可能であり、顕著な細胞毒性もなく注射部位に長期間留まり、低侵襲な光操作ツールとして機能する。X 線の組織への透過性がほぼ無限であることから、この X 線光操作法は、サルやヒトを含めた大型動物にも適用できる可能性がある。ただし、生体内でシンチレータ粒子が発する発光強度は低いため、神経細胞の発火頻度を秒オーダーで調節するには十分であるが、ミリ秒オーダーで神経細胞の活動を操作するには不十分である。本技術を用いて効率的に細胞機能を調節するためには、より高いシンチレーション収率を持つシンチレータやオプシン結合性シンチレータナノ粒子の利用によってエネルギー変換効率を改良することが必要である［2］。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、藤田医科大学医学部生理学Ⅱ講座の松原崇紀助教（現・客員助教）、奈良先端科学技術大学院大学の柳田健之教授、河口範明准教授、吉本潤一郎准教授（現・藤田医科大学医学部教授）、中野高志特任准教授（現・藤田医科大学医学部准教授）、熊本大学国際先端医学研究機構の滝澤仁教授、瀬崎真衣子大学院生、名古屋大学環境医学研究所の山中章弘教授、東北大学大学院工学研究科浅井研究室の越水正典准教授（現・静岡大学電子工学研究所教授）である。

文　献

1） Matsubara T, Yanagida T, Kawaguchi N, Nakano T, Yoshimoto J, Sezaki M, Takizawa H, Tsunoda SP, Horigane SI, Ueda S, Takemoto-Kimura S, Kandori H, Yamanaka A, Yamashita T. Remote control of neural function by X-ray-induced scintillation. Nat Commun. 2021 Jul 22;12(1):4478. PMID: 34294698 DOI: 10.1038/s41467-021-24717-1.

2） Matsubara T, Yamashita T. Remote Optogenetics Using Up/Down-Conversion Phosphors. Front Mol Biosci. 2021 Nov 5;8:771717. PMID: 34805279 DOI: 10.3389/fmolb.2021.771717.

3） Tsai HC, Zhang F, Adamantidis A, Stuber GD, Bonci A, de Lecea L, Deisseroth K. Phasic firing in dopaminergic neurons is sufficient for behavioral conditioning. Science. 2009 May 22;324(5930):1080-4. Epub 2009 Apr 23. PMID: 19389999 DOI: 10.1126/science.1168878.