

審査の結果の要旨

氏名 田村 啓太

本研究は、認知機能の神経回路を研究するために、これまで主にげっ歯類モデル動物を対象が限られてきた光遺伝学的な神経回路解析手法を、霊長類モデル動物の脳深部領域に適用することを試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. マカクサルの脳深部で光照射と電気生理学的記録を行うために、ガラス被覆型オプトロードが開発された。このオプトロードは光ファイバーの先端を細く尖らせてタングステンワイヤーと一体的にガラスコートすることで作成され、全長にわたり滑らかなガラス被膜で覆われ、凹凸が小さく抑えられた。この構造は、脳に刺入する際の抵抗を減らし、脳組織に対する侵襲性を低減する上で有利であると考えられた。また、4本の光ファイバーで4方位から光照射することで電極の影が消え、光照射範囲が拡大した。

2. マカクサルの脳深部の標的に正確にウイルス液を注入するために、注入部位の神経活動を計測できるインジェクトロードと非常に小型のスティック状シリンジポンプからなるインジェクションシステムが開発された。インジェクトロードの先端は細く滑らかで、刺入時の侵襲性を減じるとともに吐出溶液のバックフローを軽減する上でも有利であると考えられた。シリンジポンプは油圧マニピュレータに搭載され、インジェクトロードと直接接続して使用された。このシステムによって、電気生理学的記録を行いながら標的部位を同定してウイルス液を注入することが可能となり、マカクサルの脳深部の皮質においてその有用性が示された。

3. 導入した遺伝子の発現を動物の生存中に *in vivo* で観察するために、光ファイバー蛍光測定システムが開発された。ウイルスベクターで **chanelrhodopsin-2-enhanced-yellow-fluorescent-protein (ChR2-EYFP)** を視床に発現させたラットの脳に、ガラス被覆型オプトロードを刺入し、光ファイバーを介して **EYFP** の蛍光の励起と読み取りを行ったところ、事後の組織学的観察結果とよく一致する蛍光トレースが得られ、ガラス被覆型オプトロードによって蛍光タンパク質の発現を *in vivo* 計測できることが示された。マカクサルの脳深部の視床や皮質でも **ChR2-EYFP** の発現を *in vivo* で蛍光観察できることが示され、マカクサルにおける長期の実験において有用であると考えられた。

4. ガラス被覆型オプトロードによって脳の局所において光誘発した神経活動の伝搬を調べるため、**functional MRI (fMRI)** による全脳観察が行われた。ラットの視床 (**posterior medial nucleus, POm**) に **ChR2-EYFP** を発現させ、**POm** に光刺激を行いながら **fMRI** 撮像を行った結果、同側の脳皮質領域に **blood-oxygenation-level-dependent (BOLD) signal**

の増加が観察された。同個体の脳を組織学的に観察したところ、大脳皮質第二次体性感覚野 (secondary somatosensory area, SII) への同側 POm からの軸索投射が認められ、fMRI の BOLD 信号の分布とよく一致した。このことから fMRI の結果は POm から SII への活動の伝搬を反映するものと考えられ、ガラス被覆型オプトロードによって下流領域に伝搬し得る有効な神経活動を光誘発できることが示された。

5. ガラス被覆型オプトロードによる電気生理学的記録特性を評価するために、ChR2-EYFP を発現させたマカクサルの視床において、光反応性シングルユニットの記録が行われた。その結果、注目するシングルユニットの波形は光照射時・非照射時で類似しており、同時に計測される他のユニット波形から良く分離されていた。光反応性のユニットの中には、高頻度光刺激に追従して発火するユニット、追従しないユニットが観察された。これらの結果から、ガラス被覆型オプトロードにより、マカクサル脳深部にて光反応性のシングルユニット活動を記録・解析できることが示された。

以上、本論文ではマカクサルの脳を光遺伝学的に研究するために必要となる基盤的技術の開発が記述された。本研究の成果によって、光遺伝学的手法の適用対象がげっ歯類から霊長類へと拡大され、これまでになく切り口で認知機能の理解が進むなど、今後の脳神経科学の発展に大きく貢献するものであり、学位の授与に値すると考えられる。