

日本医療研究開発機構  
再生・細胞医療・遺伝子治療実現加速化プログラム  
(幹細胞・再生医学イノベーション創出プログラム)  
事後評価報告書

公開

## I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 新生・再生ニューロンの光操作による脳機能再生に関する研究開発  
(英語) Regeneration of brain functions by optical manipulation  
of newly-generated neurons

研究開発実施期間: 令和3年6月1日～令和6年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 今吉 格  
(英語) Itaru Imayoshi

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:  
(日本語) 京都大学・医生物学研究所・教授  
(英語) Kyoto University・Institute for Life and Medical Sciences・Professor

## II 研究開発の概要

哺乳類の脳神経系は、一般的に再生能力に乏しく、損傷時や病態時における神経細胞(ニューロン)の脱落や神経回路異常が生じた際に、もとの状態や機能を取り戻すことは極めて困難である。しかし、近年の研究により、哺乳類の生後脳・成体脳においても、海馬や側脳室といった特定の脳領域では神経幹細胞が存在し、恒常的にニューロン新生が生じていることが示されてきた。また、iPS細胞や多能性幹細胞の培養技術や、それらからの試験管内でのニューロン分化誘導方法の開発の発展により、損傷時や病態時にこれらの分化誘導したニューロンを細胞移植し、神経回路の再生による機能回復を目指すアプローチについても、精力的に研究開発が進められている。

したがって、これらの再生医学の知見や再生・細胞移植医療技術を、哺乳類の神経回路修復や脳機能の回復に繋げるには、新生・再生ニューロンが残存する神経ネットワークに取り込まれたり、それらの機能修飾に寄与することを促進できるような技術開発が求められていると考えられる。しかしながら、新生・再生したニューロンを特異的にターゲットし、神経機能ネットワークへの組み込みを積極的・人為的に促進し、認知機能の機能回復につなげる手法の開発は未だ不十分である。そのため、本研究課題では、新生・再生ニューロンだけでなく、周囲のニューロンの神経活動をモニターしつつ、光遺伝学的手法を用いて、新生・再生ニューロンへの介入操作を行い、神経

機能ネットワークへの組み込みを促進するような実験系やプロトコル開発を実施した。

### 1: 自然老化・AD・脳傷害モデルマウスの認知機能異常と、その回復過程の評価系の構築

実験モデルマウスについて、特に、頭部固定状態でのにおいて、認知機能異常と、その回復過程の評価が可能な実験系の構築を実施した。具体的には、空間記憶学習、恐怖条件づけ課題、歩行運動、バーチャルリアリティ (VR) 空間におけるナビゲーション課題について、それぞれ実験系を構築し、自然老化・AD(アルツハイマー病)モデルマウス・脳傷害モデルマウスについて、評価・検証を行った。

### 2. 新生・再生したニューロンの活動イメージングと光操作の両立を可能にする顕微鏡システムの構築

海馬や足脳室・嗅球において新生するニューロン、もしくは、胎児脳由来の幼若ニューロンの成体マウス脳における細胞移植モデルにおける再生ニューロンは、脳組織の深部に位置している。時には、脳表から1ミリメートル(mm)以上の深さに配置していることもあり、それらの機能イメージングや光操作には、深部組織由来の蛍光シグナルを検出できるような高感度多光子顕微鏡技術が必要であった。また、狙ったニューロンや細胞特異的なパターン照射技術についても、特に深さ方向の空間解像度を意識した技術開発が必要であった。また、新生・再生ニューロンが、移植した宿主脳に組み込まれて、脳神経回路全体にどのような影響・変化を及ぼすのかについて解析するために、マウス脳の全脳イメージング技術の開発を行なった。

### 3. 新生・再生ニューロンを人為的に教育し、回復させたい認知機能への積極的な関与・貢献を誘導する光操作手法の開発

生後脳・成体脳における新生ニューロン産生や、移植・再生ニューロンにおける遺伝子発現操作の信頼性と効率の向上のために、遺伝子発現の光操作システムの改善を行った。具体的には、光応答性転写因子の暗所におけるバックグラウンド活性を低下させ、光照射時の誘導遺伝子発現量を向上させるような改良を行い、また、分子サイズを小さくする改善にも成功し、その結果、アデノ随伴ウイルスベクターを含む各種ウイルスベクターへの搭載とニューロンへの導入が可能になった。

また、上述した顕微鏡下における行動実験課題と、脳深部あるいは広範囲脳領域の機能イメージングが可能な顕微鏡技術を組み合わせ、自然老化・ADモデルマウス・脳傷害モデルマウスの機能異常やその回復過程の評価を試みた。また、開発した光応答性分子の励起光のパターン照射技術を用いて、細胞移植した再生ニューロンを、単一細胞レベルで光操作し、かつ、その周囲の細胞も含めて、機能イメージングが可能であることを実証した。また、大脳皮質の運動野に移植した胎児脳由来の幼若ニューロンについて、光操作や環境入力の違いによって、宿主脳での定着効率や軸索投射にどのような影響が及ぶのかについて検証を行った。損傷脳・病態脳モデルマウスについても同様の検証を行い、神経回路の組織構造や機能回復に与える影響についても検証を行った。

本研究開発課題で実施したような、哺乳類脳における新生・再生ニューロンの光操作により、特定の認知機能を担う神経ネットワークへの組み込みを亢進し、認知機能や行動表出を改善できるような新規技術は、将来的な、ヒトへの臨床応用を目指し、老化・AD・脳梗塞などの病態脳や障害脳の脳機能再生を可能にするような再生医学の新規手法の実現につながると期待される。本研究課題では、マウスをモデルとして研究開発を行ったが、今後は、非ヒト霊長類モデルを使用した検証や、デジタル脳などの *in silico* シミュレーションプラットフォームにおいて、新生・再生ニューロンの機能操作の作用点を同定し、より効率のよい人為的操作を実施するようなアプローチも期待される。

また、一方で、神経発達異常(発達障害)、遺伝性神経疾患、神経変性疾患、神経障害のいずれにおいても、健常あるいは疾患・障害前の神経回路ネットワークを完全に回復することは原理的に極めて困難であると考えられる。それは、哺乳類脳の複雑な組織構築によるだけでなく、神経回路ネットワークは脳の発生・発達と同時進行的に形成され、生後の様々な環境入力や経験によって、数年・数十年の時間をかけて、一期一会のプロセスによって形成されるものであることが背景にあると考えられる。したがって、脳損傷におけるリハビリ時のように、残存しているニューロンや神経回路の可塑性を発現させ、部分的に手の動きの制御も担当できるように機能変化させるといった手法と、本研究で取り組んだような再生・細胞医療・遺伝子治療戦略の開発が、発達障害や脳の神経疾患の患者の方の QOL 向上につながるものと考えられ、そのような検証も必要であると考えられる。

The mammalian central nervous system generally has poor regenerative capacity, and it is extremely difficult to recover its original state and function when neuronal cells (neurons) are degenerated or neural circuits become aberrant under the injury or pathological conditions. However, recent studies have shown that even in the postnatal and adult mammalian brain, neural stem cells exist in specific brain regions, such as the hippocampus and lateral ventricles, and that neurogenesis occurs constantly. In addition, with the development of iPSC cell and pluripotent stem cell culture techniques and methods for inducing neuronal differentiation from these cells *in vitro*, approaches that aim at functional recovery through regeneration of neural circuits by cell transplantation of these induced neurons in the brain injury or pathological conditions are also being intensely researched and developed.

Therefore, in order to link these regenerative medicine findings and regenerative/cell transplantation medical technologies to the repair of neural circuits and recovery of brain functions in mammals including humans, it is considered necessary to develop technologies that can facilitate the incorporation of newborn/regenerated neurons into remaining neural networks and their contribution to functional modification. However, the development of methods to specifically target new or regenerated neurons and actively and artificially promote their incorporation into the neural functional network, leading to the recovery of cognitive function, is still insufficient. Therefore, in this research project, we developed an experimental system and protocols to intervene and manipulate newborn and regenerated neurons using optogenetics while monitoring the neural activity of not only the newborn and regenerated neurons but also the surrounding neurons to promote their integration into the neural functional network.

The novel technology to improve cognitive function and behavioral expression by increasing the incorporation of new and regenerated neurons into the neural network responsible for specific cognitive functions through optical manipulation in the mammalian brain, as conducted in this project, is expected to lead to the realization of a novel method of regenerative medicine that enables the regeneration of brain functions in pathological brains such as aging, AD, stroke, and brain damage, aiming for clinical application to humans in the future. This new technology is expected to lead to the realization of a novel method of regenerative medicine that enables the regeneration of brain functions in pathological brains such as aging, AD, and brain infarction, as well as in damaged brains. In this research project, mice were used as the model for research and development, but in the future, approaches such as validation using non-human primate models and *in silico* simulation platforms such as digital brains are expected to identify the point of action of functional manipulation of new and regenerated neurons and to perform more efficient artificial manipulation.