

(続紙 1)

京都大学	博士 (理学)	氏名	木村 慧
論文題目	Development of novel mosaic adeno-associated virus vector for stable manipulation and imaging of neural activity in nonhuman primate brains (霊長類脳における神経活動の操作やイメージングに適した新規モザイクアデノ随伴ウイルスベクターの開発)		
(論文内容の要旨)			
<p>脳は、互いに結合した多数の神経細胞からなる複雑な神経回路ネットワークで構成されている。個々の神経回路の機能を理解するためには、回路ごとに選択的な操作を行う技術が必要となる。近年、ウイルスベクターを用いた遺伝子導入により、神経細胞やその回路の活動を操作する手法が注目されている。特に組換えアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターは、光遺伝学や化学遺伝学などの様々な最先端技術に利用されている。しかし、ヒトに近い脳構造をもつ霊長類における神経回路操作実験への応用は、げっ歯類に比べて非常に限定されている。そこで申請者は、霊長類の脳における神経活動の操作やイメージングに適した新規モザイク AAV ベクターを開発した。</p> <p>申請者は、AAV の血清型 1 と血清型 2 (AAV1 と AAV2) の両方に由来するカプシドタンパク質で構成される新型モザイク AAV ベクター (AAV2.1 ベクター) を開発し、AAV2.1 ベクターのもつ特性を、元となった AAV2 および AAV1 と比較した。大脳皮質におけるこれらのベクターの遺伝子発現レベルを比較したところ、AAV2.1 ベクターが神経細胞において最も高い発現レベルを示した。また、ベクターの感染指向性を調べたところ、AAV2 と AAV2.1 ベクターは高い神経細胞特異性を示したが、AAV1 はグリア細胞への感染性を示した。結論として、AAV2.1 ベクター (特に AAV2.1-A タイプ) は従来型の AAV ベクターと比較して、高い導入遺伝子発現能と神経細胞特異性を併せもつことが示された。</p> <p>次に申請者は、AAV2.1 ベクターを霊長類脳における神経活動の化学遺伝学的操作に応用するため、興奮性 DREADD 受容体を発現する AAV2.1 ベクターを線条体に注入した。その結果、AAV2.1 ベクターは従来型のベクターに比べ高い受容体発現を示し、神経活動の変化をもたらすことが示された。また、AAV2.1 ベクターによる導入遺伝子発現は 1 年間持続することが確かめられた。</p> <p>さらに申請者は、AAV2.1 ベクターの霊長類大脳皮質における <i>in vivo</i> カルシウムイメージングへの応用を実施した。GCaMP6s を発現する組換えベクターを作製し、マカクザルの視覚野に注入した。その結果、ベクター注入後 8 ヶ月にわたって安定的に蛍光シグナルが得られ、神経活動を記録することができることが確認された。</p> <p>申請者が開発した AAV2.1 ベクターは、霊長類脳における高い遺伝子発現効率と神経細胞特異性を併せもつという点で、従来の AAV ベクターにはみられない利点がある。AAV2.1 ベクターは、さまざまな脳機能の根底にある神経ネットワークメカニズムの解明に役立つだけでなく、精神・神経疾患の研究のための霊長類における有用な動物モデルの確立等にも寄与することが期待される。</p>			

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

木村慧氏は、神経細胞や神経回路の活動の選択的制御や神経活動の広範囲記録に有用な遺伝子導入法を霊長類の脳に適用するのに好適なアデノ随伴ウイルスベクター (AAV ベクター) の開発に取り組み、成功した。

脳は多種の神経細胞からなる複雑な神経ネットワークから構成され、そのネットワークが適切に働くことにより、さまざまな脳機能を実現していると考えられている。このメカニズムを究明するためには、神経活動を記録することがもちろん重要であるが、それに加えて特定の神経細胞や神経回路の活動を選択的に制御し、その影響を確認する介入研究が不可欠である。そのための手段として特に現在げっ歯類で重用されているのが、光遺伝学や化学遺伝学などの手法である。化学遺伝学では、ウイルスベクターを用いて、生体分子とは結合しないようにデザインされた受容体の遺伝子を脳の特定部位に導入し、その受容体に結合する外来分子を投与することで、特定の神経細胞の活動を増強したり抑制したりすることができる。しかし、げっ歯類の脳研究に用いられているAAVベクターには複数の性質の異なる血清型のものがあり、霊長類の脳に投与すると炎症反応を引き起こし、ベクター投与の効果が導入遺伝子の働きによるものか炎症反応によるものか区別できないなどの問題がある。ヒトで高度に発達した脳機能の解明や、精神・神経疾患治療のための研究には、ヒトの脳に構造や機能の近い霊長類の脳を対象としたAAVベクターの開発が急務である。

木村氏はこの問題を解決するため、神経細胞特異性が低く炎症を起こしやすいが遺伝子発現能の高いAAV1ベクターとグリア細胞に感染しにくく炎症は起こしにくい遺伝子発現能の低いAAV2ベクターのカプシドタンパクを組み合わせたAAV2.1ベクターを開発し、特にAAV2.1-Aタイプが元になったAAV1ベクター、AAV2ベクターと比較して神経細胞特異性が高く、炎症を起こしにくく、遺伝子発現能が高いことを霊長類の脳で実証した。

また、このようなAAV2.1ベクターを用いて線条体に興奮性DREADD受容体を発現させ、従来のベクターを用いるより効率的に特定の神経細胞を興奮させられること、しかもそれが注入後1年経っても持続していることを確認した。これは遺伝子治療技術の改善に大きく貢献する成果である。

さらに、GCaMP6sを発現するAAV2.1ベクターを霊長類の視覚野に注入することにより、ベクター注入後8か月間安定してin vivoカルシウムイメージングを行うことに成功した。これは、AAV2.1ベクターが長期的な神経活動計測に有用であることを示した成果である。

神経細胞特異性が高く、遺伝子発現能が高いAAV2.1ベクターは、今後の霊長類神経回路研究の発展に役立つという基礎研究上の波及効果が大きいだけでなく、疾患モデル動物の作製や遺伝子治療技術の開発などの応用研究にも大いに貢献することが期待できる。

よって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものと認める。また、令和6年1月22日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行い、その結果をもって令和6年1月24日に霊長類学・野生動物系教員会議で合格と認めた。

要旨公表可能日：令和 年 月 日以降