

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：34310

研究種目：学術変革領域研究(B)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H05166

研究課題名（和文）モデル動物脳におけるマルチセルラ情報表現

研究課題名（英文）Multicellular Information Representation in the Animal Brains

研究代表者

正水 芳人（Masamizu, Yoshito）

同志社大学・脳科学研究科・教授

研究者番号：90608530

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 23,800,000円

研究成果の概要（和文）：マクロズーム・多点走査型共焦点顕微鏡を用いて、広範囲の脳領域をin vivo カルシウムイメージングする系と、2光子顕微鏡を用いて脳深部をin vivo カルシウムイメージングする系を立ち上げた。次にローズベンガル色素を用いて、大脳皮質・一次運動野を損傷させる系を確立した。さらに脳損傷部位に神経細胞塊を移植する系を確立した。また生物規範的な軸索伝導の数値モデルの記述も行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳をバイオコンピューティングシステムとして扱った場合の特徴は、その損傷耐性と自己組織性にある。本研究で構築した実験系を用いることによって大脳皮質損傷後の自己修復、さらには損傷部位への神経細胞塊移植による自己組織的機能補填の脳内基盤が解明され、ロバスト性の高いコンピューティングシステム設計への貢献が期待される。

研究成果の概要（英文）：We developed systems of in vivo calcium imaging using the multi-point laser scanning confocal microscopy, which enables wide-field imaging, and the two-photon excitation laser scanning microscopy, which allows deep-depth imaging. Next, we established a system to damage the primary motor cortex using rose bengal. Furthermore, we confirmed the anatomical and functional connections between the transplanted neuronal spheroid and cerebral neocortex. A bio-inspired mathematical model of axonal conduction has also been constructed.

研究分野：神経科学

キーワード：多細胞バイオ計算 損傷耐性 自己組織性 カルシウムイメージング 脳梗塞 in vivoカルシウムイメージング

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

脳をバイオコンピューティングシステムとして扱った場合の大きな特徴は、その損傷耐性と自己組織性にある。これらの神経基盤を解明しモデル化するためには、多数の神経細胞の活動を計測する必要がある。計測には多電極計測が有用であるが、この計測法は長期間同一の神経細胞の活動を記録することが難しく、発火しない神経細胞を検出することもできない。これらの問題を解決する計測法として、細胞内カルシウムイオンを蛍光強度で検知できるセンサーを用いた *in vivo* イメージングが有用である。神経細胞内のカルシウムセンサーのシグナル変化は、神経活動と相関があることが知られている。我々は、長期間、多細胞で同一の神経細胞の活動を計測することに成功している (Sadakane[#], Masamizu[#], Watakabe[#], Terada[#] *et al.*, *Cell Reports*, 2015, [#] co-first authors)。さらに、課題実行時の霊長類 (Ebina[#], Masamizu[#] *et al.*, *Nature Communications*, 2018) およびげっ歯類 (Masamizu[#], Tanaka[#] *et al.*, *Nature Neuroscience*, 2014) で、*in vivo* カルシウムイメージングを行う系を確立し、運動学習の神経基盤として、大脳皮質・運動野に運動記憶が神経活動パターンとしてコードされることを明らかにした。

2. 研究の目的

脳損傷によって脳は障害を受け、その機能素子である神経細胞が死滅する。しかし損傷が小規模であれば、可塑的に接続構造を変化させ、脳はシステム全体としての機能を自己修復させることができる。また損傷が大規模な場合でも、神経細胞を移植し、自己組織化させることによって修復できる。機能回復過程の神経基盤の解明は、生命科学の重要課題であるのみならず、ロボスタ性の高いコンピューティングシステムの設計にも直結する。本研究ではモデル動物 (げっ歯類のマウス) を対象とし、*in vivo* カルシウムイメージングを用いて運動課題実行時の大脳皮質での多細胞 (マルチセルラ) 神経活動、大脳皮質・運動野損傷後の自己修復、さらには損傷部位への神経細胞移植による自己組織的機能補填の脳内基盤を解明するための実験手法構築を目指す。また理論計算によると、大脳皮質での神経発火パターンの時空間構造の生成には、神経軸索における信号伝搬遅延が重要な役割を果たす。しかし実験でのエビデンスは薄いため、脳スライス標本を用いた神経軸索のパッチクランプ法による遅延時間分布の解析も進める。

3. 研究の方法

マクロズーム・多点走査型共焦点顕微鏡を用いて広範囲の脳領域を *in vivo* カルシウムイメージングする系と、2光子顕微鏡を用いて脳深部を *in vivo* カルシウムイメージングする系を立ち上げた。次にローズベンガル色素を用いて、大脳皮質・一次運動野を損傷させる系を確立した。さらに脳損傷部位に神経細胞塊を移植する系を確立した。また生物規範的な軸索伝導の数理モデルの記述も行った。

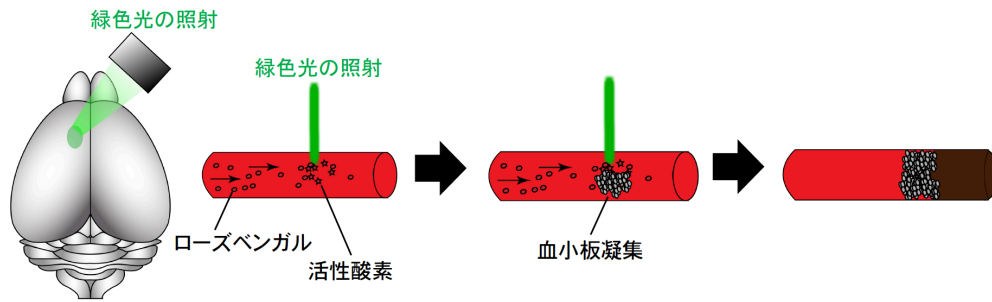
4. 研究成果

(1) *in vivo* カルシウムイメージングを行う系の確立

マクロズーム・多点走査型共焦点顕微鏡のスキュンユニットは、広げたレーザー光を多数のピンホールを持つ高速回転する円盤に照射し、1000本のレーザー光線に分割することで、観察視野を1000点同時に走査するため、一点走査型よりも高速に広視野でのイメージングが可能である。この顕微鏡を用いて、大脳皮質上の頭蓋骨を取り除きガラス窓を設置し、大脳皮質を広範囲に *in vivo* カルシウムイメージングで観察する系を確立した。2光子顕微鏡は、励起に近赤外光を用いることによって内部散乱の影響を受けにくく、脳深部の観察が可能である。この顕微鏡を用いて、脳 (赤色のカルシウムセンサー) と移植した神経細胞塊 (緑色のカルシウムセンサー) の活動を2色同時 *in vivo* カルシウムイメージングで観察する系を確立した。

(2) ローズベンガル色素を用いて、大脳皮質・一次運動野を損傷させる系の確立

自己修復過程の神経基盤を解明するためには、損傷前後の脳活動を *in vivo* カルシウムイメージングで計測する必要がある。まずはローズベンガル色素を用いて、大脳皮質・一次運動野を損傷させる系を確立した。ローズベンガル色素に緑色の光が照射されると血中の溶存酸素から活性酸素が発生し、血管内皮細胞に障害が生じ、血小板が凝集する。このことにより、血栓が形成され、脳梗塞を作製することが可能となる (図1)。次にローズベンガル色素による損傷前後で、大脳皮質の活動が計測可能かどうかを検討した。損傷前後のイメージングに関しては、A03松井班とディスカッションを行い検討した。



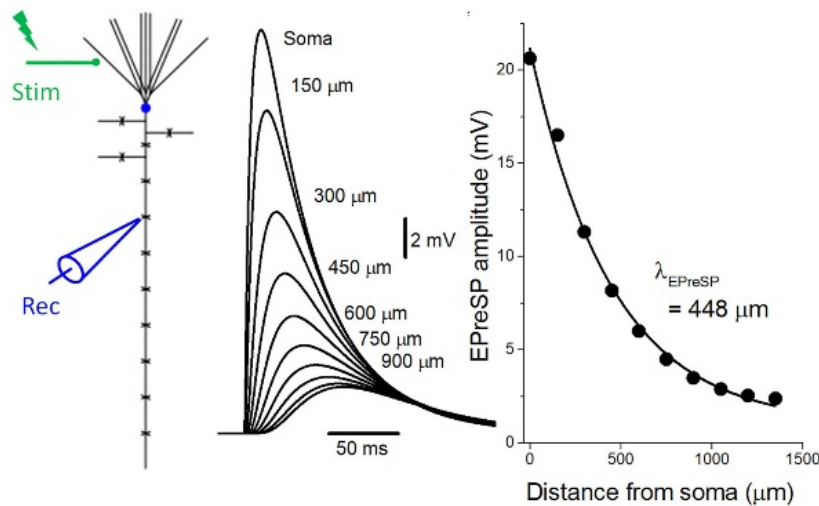
(図1) ローズベンガル色素を用いた脳梗塞モデルの作製

(3) 脳損傷部位に神経細胞塊を移植する系の確立

損傷部位へ神経細胞塊を移植し、移植した神経細胞塊と脳との間で双方向に軸索伸長があるかどうかを *in vivo* イメージングで明らかにした。さらに移植した神経細胞塊と脳との間で機能的な結合があることを、光遺伝学の技術と *in vivo* カルシウムイメージングの技術を組み合わせることによって明らかにした。神経細胞塊の作製に関しては、A02 山本班とディスカッションを行い検討した。

(4) 生物規範的な軸索伝導の数理モデルの記述

脳スライス標本を用いた神経軸索のパッチクランプ法による解析と、シミュレーションを用いた数理モデル解析を併用して、神経軸索の脳内信号伝搬の調節における役割を追求した。数理モデルの構築と短期可塑性の記述に関して A01 香取班の加藤らとディスカッションを行い検討を進めた。軸索の閾値下応答の解析と、軸索 K チャンネルによる可塑性制御に関する成果を得た。従来、軸索は電氣的にコンパクトで細胞体の閾値下応答は軸索にほとんど分布しないと考えられてきた。これに対し生物規範的な実験に基づく定量的モデルを用いて、閾値下応答は想定以上に軸索膜に広く伝播し ($\lambda = 448 \mu\text{m}$)、広範に短期可塑性の調節に寄与することを明らかにした (図2, Kamiya, *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2022)。



(図2) 海馬苔状線維モデルを用いた軸索の閾値下応答の解析

また、軸索活動電位は全か無かの法則に従うデジタルな信号と考えられてきたが、脳の軸索に特徴的な不活性化型カリウムチャンネルにより活動電位の持続時間や短期可塑性に活動依存的な影響を与えることを海馬苔状線維の定量的な数理モデルでのシミュレーションで明らかにした (Zheng, Kamiya, *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2023)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fumeng Zheng, Haruyuki Kamiya	4. 巻 17
2. 論文標題 Simulation test for impairment of use-dependent plasticity by inactivation of axonal potassium channels on hippocampal mossy fiber	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fncel.2023.1154910	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Haruyuki Kamiya	4. 巻 16
2. 論文標題 Modeling analysis of subthreshold voltage signaling along hippocampal mossy fiber axons	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fncel.2022.966636	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Yoshito Masamizu
2. 発表標題 Development of techniques to construct novel brain's neural circuits
3. 学会等名 The 10th RIEC International Symposium on Brain Functions and Brain Computer（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshito Masamizu
2. 発表標題 Technical development to construct novel neural circuits in the brain
3. 学会等名 The 11th RIEC International Symposium on Brain Functions and Brain Computer（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 正水 芳人
2. 発表標題 神経回路を創出するための基盤技術開発
3. 学会等名 第83回応用物理学会秋季学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshito Masamizu
2. 発表標題 Development in technology for the production of new neural circuits in the brain
3. 学会等名 The 12th RIEC International Symposium on Brain Functions and Brain Computer（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yoshito Masamizu
2. 発表標題 Technological development to construct brain's neural circuits
3. 学会等名 2023 International Symposium on Nonlinear Theory and Its Applications (NOLTA2023)（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 神谷温之
2. 発表標題 海馬苔状線維投射の刺激誘発性バースト
3. 学会等名 第101回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Haruyuki Kamiya
2. 発表標題 Stimulus-induced bursts of hippocampal mossy fibers
3. 学会等名 The 12th RIEC International Symposium on Brain Functions and Brain Computer (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	神谷 温之 (Kamiya Haruyuki) (10194979)	北海道大学・医学研究院・教授 (10101)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	西村 周泰 (Nishimura Kaneyasu)		
研究 協力者	尾崎 弘展 (Osaki Hironobu)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------