

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月25日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K06993

研究課題名(和文)自由行動中動物の脳深部からの可塑性イメージング

研究課題名(英文)Optical imaging of neural plasticity from freely moving animal

研究代表者

矢和多 智(Yawata, Satoshi)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：90455246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：神経細胞においてその応答性が変化する、ことすなわち可塑性が記憶や学習の基盤であると考えられている。電気生理学的手法やCa<sup>2+</sup>イメージングにより応答性を計測することは可能になったが、可塑性をリアルタイムに生体から計測することはできなかった。本研究で、自由行動中動物の脳組織より「可塑性関連分子の活性動態」と「神経活動」を同時計測する技術を開発した。数週間以上の長期にわたり、同一の細胞からの計測を行うことが可能であり、学習過程における可塑性動態の解析ができる。このシステムを用い、認知課題学習中のマウス線条体において、可塑性関連分子の活性動態の計測を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、自由行動中動物から「可塑性」と「神経活動」を同時にイメージングできる新しい計測技術の開発を行った。記憶や学習の獲得において、いつ、どのような神経細胞で、どのような可塑性により、どのように神経情報が修飾・修正されていくかを観察することが可能となった。

また、この技術は細胞内シグナル分子の活性を生体内からリアルタイムに計測できる技術であり、神経の情報処理機構の解明においてのみならず、病態モデルマウスの解析や薬物動態の解析にも利用可能な重要な技術である。

研究成果の概要(英文)：Candidate mechanisms of memory and learning are neural plasticity, including changes in the connection between neurons, and changes in the intrinsic excitability. Recently, Förster resonance energy transfer (FRET) bioprobes are developed and widely recognized as powerful tools to measure the activity of intracellular signaling molecules related to neural plasticity. These FRET probes enable us to visualize plasticity, but measuring systems are poorly established. In this study, I developed novel optical imaging system for FRET biosensor to visualize “neural plasticity” from a “deep brain area” of “freely-moving animal” with “single cellular resolution”. Furthermore, the measurement of “neural activity” by Ca<sup>2+</sup> imaging could be performed simultaneously. Using this novel imaging technique, I observed neural activity and ERK activity from medium spiny neurons in dorsal striatum during visual discrimination task.

研究分野：神経生物学

キーワード：イメージング 内視鏡 線条体 可塑性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

神経細胞は、その応答性を変化させること(可塑性)で記憶や学習を行っている。可塑性は個々の神経細胞において、細胞外からの信号が情報処理され、細胞内シグナル分子を介し、特定の遺伝子発現が調整されることで引き起こされると考えられている。近年、細胞内シグナル活性の変化を計測することが可能な蛍光プローブが開発され、これらを用いることで記憶や学習が行われているとき、神経細胞でどのような変化が起こっているのかを計測することが可能になった。脳機能の解明には、自由行動中の動物の、脳深部組織から、単一細胞の空間分解能で、細胞内シグナルの活性を測定することが、非常に重要である。しかしながら、既存の計測技術には、これら全てを満たすものがなかった(下表)。

|       | 多光子顕微鏡 | 頭部搭載型カメラ | Fiber photometry | 内視顕微鏡 |
|-------|--------|----------|------------------|-------|
| 自由行動  | *****  | *****    | *****            | ***** |
| 深部計測  | *****  | *****    | *****            | ***** |
| 空間解像度 | *****  | *****    | *****            | ***** |
| 多色観察  | *****  | *****    | *****            | ***** |

(表) 既存の計測技術と内視顕微鏡の性能比較

本研究で開発した内視顕微鏡は、シナプス等の神経微細構造を観察するには空間解像度が足りないが、単一細胞の神経情報の解読には十分な解像度を有する。

### 2. 研究の目的

自由行動下動物の脳深部から細胞内シグナル活性を測定することが可能な計測技術を確立し、高次脳機能に関わる可塑性の制御メカニズムの解明を行う。

### 3. 研究の方法

「自由行動中の動物」の、「脳深部組織」から、「単一細胞の空間分解能」で、「細胞内シグナルの活性の測定」を達成するために以下の方法を用いた。

#### 蛍光プローブの選定と遺伝子組換えマウスの作製

プローブに用いる蛍光タンパク質を変更することで、より輝度の高いプローブを開発し、そのプローブを安定して高発現する遺伝子組換えマウスの作製を行った。

#### 内視顕微鏡技術の開発

内視顕微鏡の光学系の最適化および計測精度の向上を行った。細胞内シグナルの活性プローブとして FRET プローブを用いるため、プローブに最適化した光学系を構築した。また、安定した長期間の計測を可能にするため、光学系の安定性および精度の改善を行った。

#### 認知行動課題遂行中のマウス線条体より可塑性イメージング

タッチパネル式オペラント学習装置を用い、行動(画面へのタッチ)と報酬を関連付ける学習を行わせる。このとき線条体でどのような細胞内シグナル活性の変化が生じているか観察を行った。その後、異なる画面へのタッチと報酬を関連付けた場合、どのような細胞内シグナル活性の変化が見られるか観察を行った。

### 4. 研究成果

#### 蛍光プローブの選定と遺伝子組換えマウスの作製

脳深部からのイメージングを行うためには、輝度の高いプローブが必要になる。神経可塑性に重要な役割を担っている ERK の活性を測定するためにシアン蛍光タンパク質とイエロー蛍光タンパク質からなる ERK-FRET バイオプローブを用いた。高輝度を得るために、それぞれ Turquoise と YPet を用いた。

またこの ERK-FRET バイオプローブを発現するノックインマウスの作製を行った。安定した高発現を可能にするため、Rosa26 領域へのノックインを行った。プロモーターとして、CAG プロモーターを用いた。また、細胞種特異的な発現誘導を可能にするため、Cre および Flp 依存的な発現誘導系を用いた。C57B6 マウス由来 ES 細胞を用いて遺伝子組換えマウスの作製に成功した。

### 内視顕微鏡技術の開発

用いる光学フィルターの最適化および光学系の安定化・精度の改善を行い、計測精度の向上および長期間にわたる観察が可能になった。その結果、オペラント課題中（タッチパネルを用いた視覚弁別課題およびその逆転学習課題）マウスからの計測が可能になった。数週間以上にわたり、同一の視野からの計測が可能であり、学習の獲得過程においてどのように神経情報が変化していくかを観察することができる。

さらに、「可塑性」および「神経活動」の同時イメージングを行うために、2色励起3色蛍光観察が可能なイメージング技術を確立した（図1）。神経活動を赤色カルシウムセンサーであるRCaMPを用いて計測することで、可塑性と同時にイメージングすることができる。この技術により、それぞれの神経細胞が担う情報を読み取ることが可能になり、神経活動の変化と可塑性の動態を解析することが可能になった。

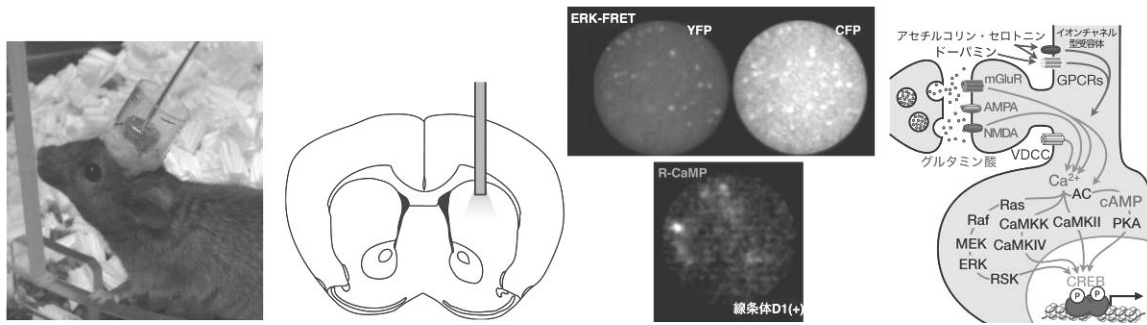


図1 単一細胞レベルの空間解像度を有する内視顕微鏡

開発した内視顕微鏡は、自由行動中動物の、脳深部からの、多色蛍光計測が可能な技術である。Ca<sup>2+</sup>イメージングによる神経活動計測だけでなく、FRET バイオセンサーによる様々な神経可塑性シグナル分子動態の同時測定を行うことで、可塑性と神経情報の関連を解析することが可能となった。

### 認知行動課題遂行中のマウス線条体より可塑性イメージング

オペラント課題中（タッチパネルを用いた視覚弁別課題およびその逆転学習課題）マウスからの計測を行った。線条体出力細胞である中型有棘細胞には、その投射先と遺伝子発現パターンから大きく分けて2種類の細胞が存在していることが知られている（直接路および間接路細胞）。本研究ではドーパミン1型受容体（直接路）またはアデノシン A2a 受容体発現細胞（間接路）選択的な遺伝子発現を行うことで、これらの神経細胞種を弁別して計測を行った。いずれの系統においても1匹あたり40～80個の神経細胞から、神経活動及び可塑性関連分子の活性を同時計測することができた。また、報酬に関わる視覚刺激や報酬自体に関わっている細胞が多数存在していることがわかった。一部の細胞群において、課題遂行中に可塑性関連分子の活性が大きく変動していることが分かった。（図2）

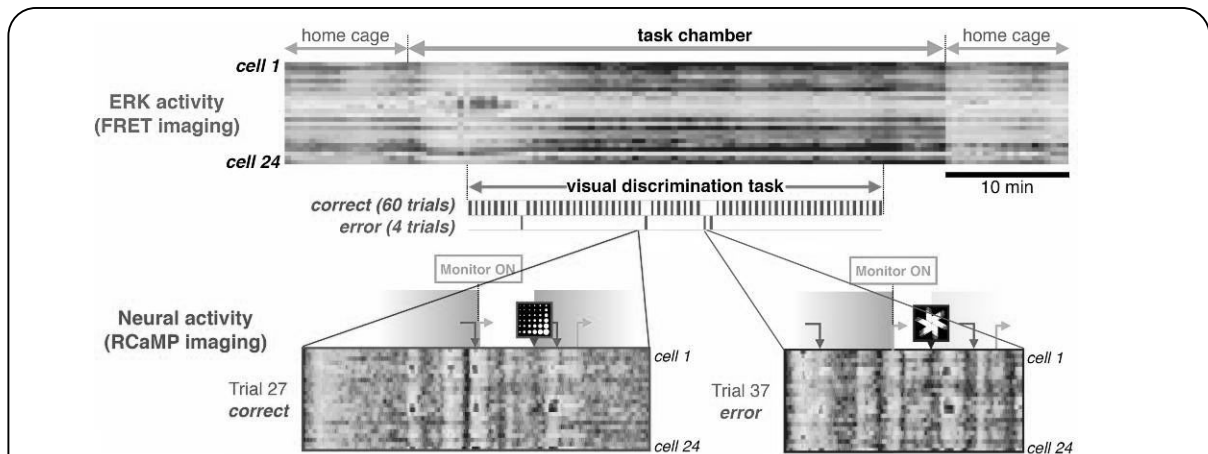


図2 課題遂行中動物の線条体より2波長励起・3波長蛍光観察を行うことで、可塑性シグナル分子の活性動態と神経活動の同時計測が可能になった。課題の推移に伴って可塑性シグナルの活性が変化している。また、タッチパネル式オペラント課題において視覚刺激やタッチ、報酬に関連した神経活動が観察できた。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Keiko Imamura, Naruhiko Sahara, Nicholas M. Kanaan, Kayoko Tsukita, Takayuki Kondo, Yumiko Kutoku, Yutaka Ohsawa, Yoshihide Sunada, Koichi Kawakami, Akitsu Hotta, Satoshi Yawata, Dai Watanabe, Masato Hasegawa, John Q. Trojanowski, Virginia M.-Y. Lee, Tetsuya Suhara, Makoto Higuchi & Haruhisa Inoue  
Calcium dysregulation contributes to neurodegeneration in FTLD patient iPSCderived Neurons  
*Scientific Reports*, 6, 34904, 1-10 (2016)
2. Hayashi Yuichiro, Yawata Satoshi, Funabiki Kazuo, Hikida Takatoshi  
In vivo calcium imaging from dentate granule cells with wide-field fluorescence microscopy  
*PLOS ONE*, 12, e0180452 (2017)
3. Higashida Shu, Nagai Hirotaka, Nakayama Kazuki, Shinohara Ryota, Taniguchi Masayuki, Nagai Midori, Hikida Takatoshi, Yawata Satoshi, Ago Yukio, Kitaoka Shiho, Narumiya Shuh, Furuyashiki Tomoyuki  
Repeated social defeat stress impairs attentional set shifting irrespective of social avoidance and increases female preference associated with heightened anxiety  
*Scientific Reports*, 8, 10454, 1-11 (2018)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者  
該当なし

(2)研究協力者

該当なし

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、研究者個人に帰属されます。