

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K13109

研究課題名(和文) マウス海馬三シナプス回路を介する神経情報処理のin vivoイメージング

研究課題名(英文) In vivo imaging of hippocampal trisynaptic circuits in mice

研究代表者

佐藤 正晃 (Sato, Masaaki)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・客員研究員

研究者番号：90518325

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：海馬の「三シナプス回路」を構成する歯状回(DG)、CA3野およびCA1野の各領野は、それぞれ異なる解剖学的・生理学的特徴をもつにも関わらず、CA1野以外の海馬のより深い領野を生きた動物でイメージングするには技術的な困難が伴っている。本研究は、マウス海馬のCA1野、CA3野とDGの活動を生体内でイメージングする手法の開発を通し、新たな深部脳イメージング技術を確立することを目指した。マイクロプリズムの利用、ウインドウ埋め込みによる直接イメージング、電気可変焦点レンズと屈折率勾配レンズの組み合わせ等の異なるアプローチにより、海馬深部のin vivoイメージングを行った。

研究成果の概要(英文)：The trisynaptic circuit of the hippocampus consists of dentate gyrus, CA3 subregion and CA1 subregion, each of which has different anatomical and functional characteristics. However, it is technically more challenging to image hippocampal areas deeper than CA1 in living animals, hampering the understanding of the operation of this circuit in vivo. This study aimed to develop a new method for imaging neuronal circuit activity of CA1, CA3 and DG in living animals. To this end, we employed multiple approaches, including the use of microprisms, hippocampal windows for direct imaging, and combination of a gradient refractive index lens and an electrically tunable lens.

研究分野：神経科学

キーワード：脳イメージング 二光子レーザー顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の脳で記憶の形成をつかさどる海馬では、嗅内皮質(EC)第2層からの入力(DG-CA3野-CA1野)を経て嗅内皮質第5/6層へと戻るループ状の三シナプス(trisynaptic)回路と、嗅内皮質第3層からCA1野への直接経路が存在することが知られている(図1)。記憶の情報処理において、CA1野、CA3野とDGは異なる機能を持つと考えられている。すなわちCA1野は三シナプス回路と直接経路の2つの入力と比較・統合する機能をもつと考えられており、CA3野とDGは、それぞれパターン補完(一部の情報から全体の情報を復元すること)およびパターン分離(小さな差異を異なるものとして識別すること)と呼ばれる機能を担うと考えられている。解剖学的には、CA1野では錐体細胞相互のシナプス結合がほとんど見られないのに対し、CA3野の錐体細胞同士は互いに密にシナプス結合し、情報の連合に適した回路を形成する。またDGはCA1野やCA3野とは大きく異なり、成熟個体でも神経新生による絶え間ない神経回路の再編が起こることが知られている。このような海馬三シナプス回路の各領域の生理学的性質については、これまで *in vitro* スライス標本を用いた細胞生理学的研究で多くの知見が得られてきたが、これらの知見が生きた動物の脳内にも当てはまるかどうかは明らかではない。申請者はこれまで二光子レーザー顕微鏡を用いた海馬の *in vivo* イメージングを行ってきたが(引用文献)現在の観察対象は、主に海馬の表面に近い背側CA1野に限られている(図1)。従って、もし生きた動物で海馬のより深い領域を同時にイメージングすることができれば、上述のような興味深い特徴をもつ海馬の各領

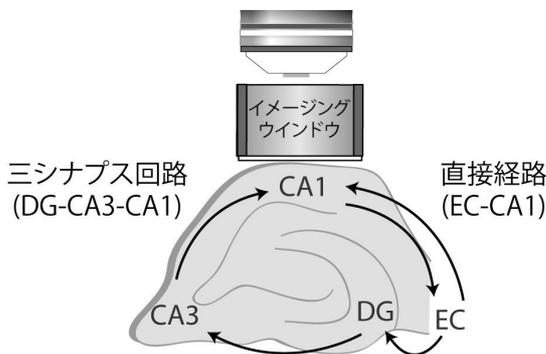


図1: 海馬における三シナプス回路と直接経路。嗅内皮質(EC)第2層からの入力がDG-CA3野-CA1野を経て嗅内皮質第5/6層へと戻るループ状の三シナプス回路と、嗅内皮質第3層からCA1野への直接経路が存在する。

野の機能の解明が飛躍的に進むと考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、マウス海馬のCA1野、CA3野とDGの活動を生体内でイメージングするための新たな深部脳イメージング技術を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

海馬に高反応性蛍光カルシウムセンサータンパク質G-CaMP7を発現するThy1-G-CaMP7トランスジェニックマウスをイソフルラン麻酔し、マイクロプリズムの埋め込み手術を行った。Thy1-G-CaMP7マウスはCA1錐体細胞とDG顆粒細胞の多くにG-CaMP7の強い発現が見られる他、CA3錐体細胞にも中程度の発現が見られる。このような海馬において特徴的な発現パターンをもつマウスを用いることで、実験の効率化と再現性の向上を図った。イメージングウインドウとマイクロプリズムの組み立てについては、直径2.5mm、高さ1.0mmのステンレス製リングからなるウインドウの底面に貼り付けたカバーガラスのほぼ中央に、光学部品接着用の接着剤でマイクロプリズムを接着した。これを通常の実験の *in vivo* 二光子イメージングにおける手技と同様に、大脳皮質組織を吸引除去した後の海馬に埋め込んだ。ウインドウに接着されたマイクロプリズムは、マニピュレータに接続されたホルダーに保持し、前もってメスで切れ目を入れた海馬表面へとゆっくりと下降させ、プリズムの先端が組織の切れ目に合うように挿入した。手術の成否は(1)マイクロプリズムの大きさ(2)マイクロプリズム埋め込みの向き、に依存すると予想された。マイクロプリズムの大きさは、はじめに底面長が長いものと短いものを試し、海馬組織に与える侵襲と得られる画像の質を比較した。埋め込みの向きについては、海馬背側部では吻側尾側方向に対してやや斜めの角度に三シナプス回路を結ぶ線維が走っているため、埋め込んだプリズムの断面が、それらと平行になる角度を検討した。手術後の動物は2-4週間程度の回復期間の後に再び麻酔して二光子レーザー顕微鏡下に頭部固定し、三シナプス回路を結ぶDG、CA3野およびCA1野の断面の自発活動がイメージングできるかどうかを検討した。

電気可変焦点レンズ(electrically tunable lens, ETL)と屈折率勾配(refractive index gradient, GRIN)レンズの組み合わせによる可変焦点機能付き内視鏡の作成には、ETLとしてOptotune社の

EL-16-40-TC-VIS-5D を用い、GRIN レンズとして GoFoton 社の SLV(1.8 mm diameter, 16.9 mm lengths) を用いた。ETL のコントロールに用いる定電流回路として、Thorlabs 社の LD1255R を用いた。

4 . 研究成果

はじめに、蛍光カルシウムセンサータンパク質を海馬に発現するトランスジェニックマウスを用いてマイクロプリズムの埋め込み条件を検討した。従来のプリズムを用いた場合、CA1 野の断面からみた錐体細胞をイメージングすることはできたが、プリズム面が狭く CA3 と DG まで届かなかったため、より大きなプリズムを使用するように実験条件を変更した。この大きなプリズムを用いると、CA1 および DG と思われる領野の断面のニューロンの形態を同時にイメージングすることはできたが、神経活動に伴う蛍光変化は見られなかった。その原因として、プリズム埋め込みによる海馬への侵襲が考えられた。また CA3 を含んだ条件でイメージングするには、海馬の剖出位置を従来の場所から少しずつ必要があることもわかった。プリズムの大型化に伴い、二光子レーザー顕微鏡の対物レンズを、これまでのレンズよりも視野が広く焦点距離も長いものに変えてイメージングしたが、このレンズは従来のものに比べて解像度が劣るため、場合による対物レンズの使い分けが必要であると考えられた。プリズムを脳に長期間埋め込むとコーティングが劣化して実験の継続が困難になってしまうため、コーティング面に保護剤を塗布したところ、良好な結果が得られた。プリズムは少なくとも短期の使用であれば再利用が可能であることがわかった。

マイクロプリズムを埋め込む手法は海馬組織に対する侵襲が大きく、神経細胞の活動に伴う蛍光強度変化を観察することが難しかったため、これと並行して、イメージングウインドウの埋め込みによる直接的な二光子イメージングと、GRIN レンズによる内視鏡イメージングを進めた。蛍光カルシウムセンサータンパク質を海馬の錐体細胞に発現するマウスへのイメージングウインドウの埋め込みでは、海馬表面の剖出位置を少しずつすることにより、海馬深部の錐体細胞を観察できた。そこから焦点をさらに下げること、DG の顆粒細胞層をイメージングすることを試みたが、焦点面が約 500-700 マイクロメートル以上の深さになるために、鮮明な画像を得ることは難しかった。GRIN レンズを用いた通常の内視鏡イメージングでは、GRIN レンズ先端から焦点までの作動距離が固定されており、海馬 CA1 野の薄い層だけを外科的に除

去して DG の顆粒細胞層を直接イメージングすることは技術的に難しかった。そこで ETL を用いて GRIN レンズの焦点距離を伸ばすことにより、海馬深部をイメージングしようと試みた。本研究で用いたイメージングウインドウの埋め込みによる皮質下脳部位の直接的な二光子イメージングと、GRIN レンズと ETL の組み合わせによる可変焦点内視鏡の開発は、論文として発表した(5.主な発表論文等〔雑誌論文〕、)。

< 引用文献 >

Generation and imaging of transgenic mice that express G-CaMP7 under a tetracycline response element
Masaaki Sato, Masako Kawano, Masamichi Ohkura, Keiko Gengyo-Ando, Junichi Nakai and Yasunori Hayashi
PLoS ONE, 10(5), e0125354, 2015

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Fast varifocal two-photon micro-endoscope for imaging neuronal activity in the deep brain.
Masaaki Sato, Yuki Motegi, Shogo Yagi, Keiko Gengyo-Ando, Masamichi Ohkura and Junichi Nakai
Biomed. Opt. Express, 8(9), 4049-4060, 2017.
DOI:https://doi.org/10.1364/B0E.8.004049 (査読有)

Hippocampus-dependent goal localization by head-fixed mice in virtual reality.
Masaaki Sato, Masako Kawano, Kotaro Mizuta, Tanvir Islam, Min Goo Lee and Yasunori Hayashi
eNeuro, 4 (3) e0369-16.2017, 2017.
DOI:https://doi.org/10.1523/ENEURO.0369-16.2017 (査読有)

In vivo two-photon imaging of striatal neuronal circuits in mice.
Masaaki Sato, Masako Kawano, Yuchio Yanagawa and Yasunori Hayashi
Neurobiology of Learning and Memory, 135, 146-151, 2016.
DOI:https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.07.006 (査読有)

〔学会発表〕(計 5 件)

Cellular mechanisms for the formation and plasticity of hippocampal cognitive maps

Masaaki Sato, Kotaro Mizuta, Tanvir Islam, Masako Kawano, Takashi Takekawa, Daniel Gomez-Dominguez, Hiroshi Yamakawa, Masamichi Ohkura, Tomoki Fukai, Junichi Nakai, Yasunori Hayashi.

Society for Neuroscience 47th annual meeting、2017年11月、米国ワシントンDC

海馬認知地図形成の神経細胞ダイナミクス

佐藤正晃、水田恒太郎、イスラム・タンビル、河野真子、竹川高志、ゴメス・ドミンゲス・ダニエル、山川宏、大倉正道、深井朋樹、中井淳一、林康紀

第40回日本神経科学大会、2017年7月、千葉

高速可変焦点機能を備えた新規内視鏡による超深部脳二光子イメージング

佐藤正晃、茂木優貴、安藤恵子、大倉正道、中井淳一

第90回日本薬理学会年会、2017年3月、長崎

Preferential stabilization of behaviorally relevant spatial representations in the hippocampal place map

Masaaki Sato, Kotaro Mizuta, Tanvir Islam, Masako Kawano, Takashi Takekawa, Daniel Gomez-Dominguez, Hiroshi Yamakawa, Masamichi Ohkura, Tomoki Fukai, Junichi Nakai, Yasunori Hayashi.

Society for Neuroscience 46th annual meeting、2016年11月、米国サンディエゴ

行動上重要な場所の表象は海馬 CA1 場所地図において優先的に安定化される

佐藤正晃、水田恒太郎、イスラム・タンビル、河野真子、竹川高志、ゴメス・ドミンゲス・ダニエル、山川宏、大倉正道、深井朋樹、中井淳一、林康紀

第39回日本神経科学大会、2016年7月、横浜

〔図書〕(計 1 件)

Neural mechanisms of animal navigation
Koutarou D. Kimura, Masaaki Sato, Midori

Sakura

N. Streiz and S. Konomi (Eds.): DAPI 2018, Lecture Notes in Computer Science, (Springer), 10922, 1-17, 2018 (in press)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 正晃 (Sato, Masaaki)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・客員研究員

研究者番号 : 90518325