

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：16K13116

研究課題名(和文) 生体大脳皮質ニューロピルからのシナプスとグリアのカルシウム信号抽出と解析

研究課題名(英文) Extraction of neurite signals from neuropil calcium signaling

研究代表者

平瀬 肇 (Hirsae, Hajime)

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・チームリーダー

研究者番号：90392084

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：G-CaMP7を神経細胞とアストロサイトに発現するマウス(G7NG817)および、G7NG817マウスとアルツハイマー病モデルマウスを掛け合わせたマウスの大脳皮質視覚野のニューロピルより二光子イメージングを行なった。ニューロピルのデータは負値行列因子分解を利用したアルゴリズムにより解析され、カルシウム活動がある領域を自動的に抽出した。抽出された領域のカルシウム信号を調べると、短い時定数のカルシウム動態が含まれるパターンと、長い時定数のカルシウム動態が含まれるパターンがあり、それぞれシナプスとアストロサイトの微小突起からのシグナルであることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Neuropil Ca²⁺ dynamics has been imaged using in vivo two-photon microscopy from the visual cortex of the G7NG817 transgenic mouse, in which astrocytes and a subpopulation of neurons express the Ca²⁺ sensor G-CaMP7. G7NG817 mice has been crossed with an Alzheimer's disease model mouse line, from which similar neuropil imaging has been performed. The data were analyzed with a non-negative matrix factorization-assisted algorithm that automatically extracted individual Ca²⁺ active regions. Post-hoc examination of these regions showed that some regions contained fast transients and some other regions exhibited slow transients. These are postulated to correspond to synaptopil and gliopil, respectively.

研究分野：神経科学

キーワード：ニューロピル GCaMP イメージング

1. 研究開始当初の背景

脳は、神経細胞とグリア細胞と血管により構成されている。神経細胞は、膜電位が閾値を越えると活動電位(スパイク)を発生してシナプスで接続されている他の神経細胞に電位変化を与え、情報処理を行っている。記憶と学習は、シナプスの伝達効率の調節によりもたらされていると考えられている。グリア細胞の一種であるアストロサイトは、シナプス機能を調節することが見出されつつあるが、生体マウス脳における神経細胞 - アストロサイトの相互作用は不明な点が多い。神経細胞とアストロサイトの活動は、細胞内カルシウム(Ca^{2+})上昇に反映される。細胞内 Ca^{2+} 上昇は、 Ca^{2+} センサーを利用した蛍光観察で観測することが出来る。近年では蛍光タンパク質を利用した感度の高い Ca^{2+} センサーが開発され、個々の脳細胞の活動を観測することが可能となった。我々は、G-CaMP7 蛍光 Ca^{2+} センサーを神経細胞とアストロサイトに発現するトランスジェニックマウス(G7NG817)を作製した(Monai et al. Nature Communications)。予備実験から G7NG817 マウスの大脳皮質の二光子蛍光イメージングは G-CaMP7 を発現する細胞体からの Ca^{2+} 信号のみならず、神経細胞とアストロサイトの微小突起(神経細胞の場合はシナプス)からの信号を記録できることが確認され、神経網 = ニューロピルのイメージングが可能となった。しかし、ニューロピルの信号解析法は確立されていなかった。

2. 研究の目的

個々の微小突起の Ca^{2+} 信号は空間的には、 μm の単位であるが、我々が利用している二光子顕微鏡では数百 μm 四方のイメージングが可能である。本提案では、このような大規模画像データからシナプス信号などの微小データを解析できるかを検証したい。自動化されたイメージ解析手法の開発に取り組む。特に、平成 26 年度から Dr. Michael Graber 氏(チューリッヒ大学・理研訪問研究員)と取り組んだ予備実験により、非負値行列因子分解(Non-negative Matrix Factorization = NMF)を画像データに適用し、ニューロピルのデータ解析を網羅的に進めること可能性が見出された。NMF を取り入れたデータ解析に注力する。また、G7NG817 マウスを用いて、ニューロピル解析の対象となる二光子イメージングのデータを無麻酔動物より記録する。可能であれば、病態モデルマウスより同様のデータを記録し、NMF 解析を用いて比較する。

3. 研究の方法

二光子イメージング: G-CaMP7 を神経細胞とアストロサイトに発現する G7NG817 マウスを利用した。麻酔下にて大脳皮質一次視覚野に位置する頭蓋骨に窓開手術を施し、ヘッドフレームを装着後、マウスの回復を(2週間

以上)待った。マウスは、飲み水を報酬として、頭部をヘッドフレームにより固定される時に安静状態になるように訓練した。二光子励起蛍光イメージングには、Bergamo 顕微鏡(Thorlabs 社)を用いる。光源は Chameleon Vision 2 (コヒーレント社) モードロックレーザーを用いた(中心波長 920nm)。画像は 15Hz のフレームレートで、約 $250 \mu m \times 250 \mu m$ の領域を 1M ピクセルの精度で取得した。画像解析:

動物の微小な動き(あるいは顕微鏡によるぶれ)を修正するために、ImageJ 画像処理プログラム上で起動する、TurboReg 拡張機能を利用した。修正された画像データは、Pnevmatikakis らによって発表された NMF アルゴリズム(Pnevmatikakis et al. Neuron 2016)を基に適用した: 経時的に連続撮影される画像データの各々の 2 次元配列を 1 次元の縦ベクトルに置換する。即ち、3 次元画像配列(x 軸, y 軸, 時間)を 2 次元配列(空間, 時間)に置換するこの行列を Y とすると、 $Y = AC + bf + E$ に分解する。(この時、Y は 0 か正の実数のみを含む非負値行列である)。A, C, b, f = 0 という制約の下、 $\|Y - AC - bf\|$ が最小となる A, C, b, f を算出する(=NMF)。リナックスサーバーを用いて、複数のデータを連続的にバッチ処理した。

4. 研究成果

G7NG817 マウス 7 匹、NL-G-F(ヘテロ)/G7NG817(ヘテロ)マウス 8 匹の大脳皮質視覚野より、1 セッションあたり、15Hz で 200 秒間の二光子励起ニューロピルイメージングを行った。XY 方向のずれを補償した後、各実験より任意に二カ所 256×256 の領域を選択し、NMF 解析を行った。領域範囲などの調節により、NMF 解析結果から近隣領域で信号成分が類似している領域の統合を行った結果、1 イメージあたり 10~90 程度の Ca^{2+} 活動がある領域が検出された(例、図 1)。

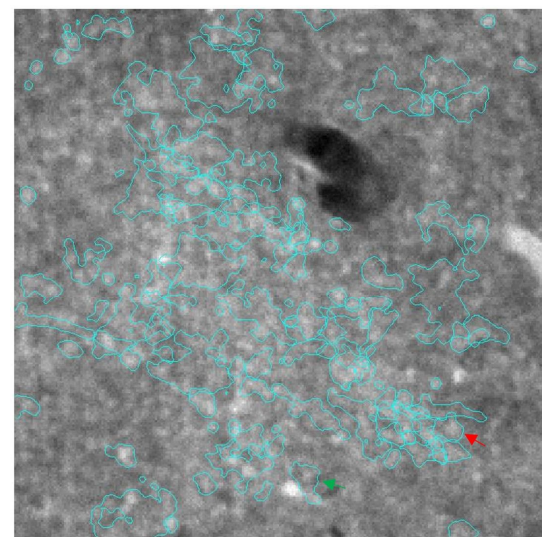


図 1: NMF を利用したプログラムが検出した

Ca²⁺活動領域を水色で示した。緑矢印と赤矢印で示した領域の Ca²⁺活動を図 2 で示す。(WN1702200M421-2)。

自動抽出された領域の時間軸の信号成分をみると、時定数の短いシナプス様シグナルや、時定数の長いアストロサイト様シグナルが自動的に抽出できた(図 2)。

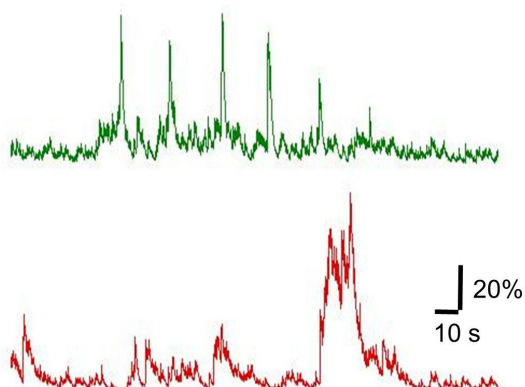


図 2 : 抽出された領域の Ca²⁺信号の例。緑データと赤データは、それぞれ図 1 の矢印で示した領域の Ca²⁺信号を表す。縦軸の単位は、F/F である。緑データは時定数の短いシナプス様シグナル、赤データは時定数の長いアストロサイト様のシグナルが認められる。

しかし、検出しきれていないシグナルも多いこと確認された。また、自動抽出された成分は、シナプス様シグナルとアストロサイト様シグナルが混在した信号が、多く見受けられた。これは、光学顕微鏡での解像度限界によるものである。イメージング深度により球面収差補正管を適宜に利用すれば空間解像度が上がり効率的なイメージングができることが確認された。が、アストロサイトの微小突起は、顕微鏡の光学解像度よりも小さいので、シグナルの混在は避けられない。しかしながら、これらの信号パターンは、アストロサイトの微小突起カルシウム信号は、シナプス伝達のタイミングと同じ時期に起こることを示唆すると思われる(当初は、シグナルがこれほどまで被るとは想定していなかった)。この推論を決定的に裏付ける為には、アストロサイトとニューロンを別の色の Ca²⁺センサーの導入が必要である。したがって、現在は、アデノ随伴型組替ウィルスを用いて、赤色蛍光カルシウムセンサーと緑色カルシウムセンサーを神経細胞とグリア細胞(アストロサイト)にそれぞれ発現させ、シグナル抽出の向上を試みている。

バッチ処理の後、動物群間のシグナルの比較をするために、抽出された抽出された個々の領域のシグナル間の相関マトリックスを計算した(図 3)。しかし、個体間のバラツキとノイズが多く、NL-G-F(ヘテロ)/G7NG817(ヘテロ)マウス間に有意な信号の差を見出すには至らなかった。

今後の改善点として、前処理のブレ補正を

サブイメージ単位で行うことが挙げられる。また、前述にもあるが、細胞種別に色の Ca²⁺プローブを発現させることによりシグナルのコンタミを防ぐことになり、信頼性の高い情報の抽出に繋がる。これらの点については、現在取り組み中であり、今後の解析が見込まれる。

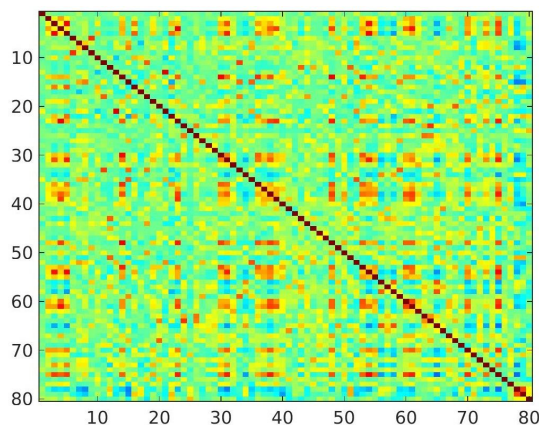


図 3 : 自動抽出された 80 領域間の Ca²⁺信号の相関マトリックスの例。赤から青までの色表示レンジは相関係数 1 から -1 に相当する。(AN1509090M306-1)。

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 4 件)

Ue Y, Monai H, Higuchi K, Nishiwaki D, Tajima T, Okazaki K, Hama H, Hirase H, Miyawaki A. A spherical aberration-free microscopy system for live brain imaging. *Biochem Biophys Res Commun* (2018) 500:236-241. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.04.049 (査読有り)

Monai H, Hirase H. Astrocytes as a target of transcranial direct current stimulation (tDCS) to treat depression. *Neuroscience Research* (2018) 126:15-21. DOI: 10.1016/j.neures.2017.08.012 (査読有り)

Monai H, Hirase H. Astrocytic calcium activation in a mouse model of tDCS - extended discussion. *Neurogenesis*. (2016). e1240055 DOI: 10.1080/23262133.2016.1240055 (査読有り)

Oe Y, Baba O, Ashida H, Nakamura KC, Hirase H. Glycogen distribution in the microwave-fixed mouse brain reveals heterogeneous astrocytic patterns. *Glia*. (2016) 64:1532-1545. DOI: 10.1002/glia.23020 (査読有り)

〔学会発表〕(計 6件)

Hirase H, Brain glycogen distribution by glycogen immunohistochemistry in the mouse. 13th International Conference on Brain Energy Metabolism, Valdivia, March 2018.

Hirase H Transcranial direct current stimulation triggers cortical metaplasticity via glial calcium elevation. International Symposium on Calcium Binding Proteins and Calcium Function in Health and Disease (CaBP20), 淡路, October 2017

Hirase H Imaging of neural activity during transcranial DC stimulation. Two-photon Imaging Course, Chongqing 重慶, 中国, October, 2017

岩井陽一, 小澤克也, 矢作和子, 佐藤駿介, 平瀬肇 アストロサイト Gq GPCR の光遺伝学的活性化による神経活動の制御, 第 40 回日本神経科学大会, 幕張, 2017 年 7 月.
毛内拓, 岩井陽一, 平瀬肇 アドレナリン受容体阻害による皮質拡延性抑制(CSD)からの回復促進, 第 40 回日本神経科学大会, 幕張, 2017 年 7 月.

Hirase H tDCS metaplasticity and astrocytic calcium in mice. NYC Neuromodulation 2017, New York, January 2017.

平瀬 肇 (HIRASE, Hajime)
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・チームリーダー
研究者番号：90392084

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：

(4)研究協力者 ()

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者