

平成21年 6月 8日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19500345

研究課題名(和文) *in vivo*神経回路網可塑性解析法の開発研究課題名(英文) Development of *in vivo* methods for studying neural circuit plasticity

研究代表者

野口 潤 (NOGUCHI JUN)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40421367

研究成果の概要：

ケイジドグルタミン酸を2光子励起分解する手法により、神経伝達物質であるグルタミン酸を任意のシナプスに投与する方法論は脳スライスを用いた研究においてシナプス機能を解析する上で大きな効果をあげている。本研究ではその方法を“生きた個体に”応用する方法を開発した。すなわち、そのために必要な動物維持固定装置、低侵襲的な手術・麻酔方法等の開発を行い、生体におけるシナプス機能の解析に実際に適用した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：ニューロン・シナプス機能

1. 研究開始当初の背景

(1) 樹状突起スパイン形態解析の意義

海馬、大脳皮質等の錐体細胞の樹状突起にはスパインと呼ばれる長さ約1ミクロンのトゲ状の突起が無数に出ている。スパインは形

態的に非常に大きな多様性を有しており、海馬錐体細胞においてはグルタミン酸作動性の興奮性の神経終末は90%以上がこのスパイン上に接続している。

最近、スパインの「形態」とその電気生

理的な「機能」との間に相関があることが報告され、このことからシナプスの重みが増加するとスパインの体積も記憶等の神経機能に密接に関連して変化すると考えられた。そこで、神経回路機能とスパインの形態変化の関係を生体 (in vivo) で解析することを試みた。

(2) 2光子励起法による観察と局所グルタミン酸刺激

本研究開始5年前に2つのグループから、生きているマウス個体のスパインの2光子励起顕微鏡による慢性的観察が初めて報告された (Trachtenberg JT. et al., (2002) Nature 420(6917):788-94.) (Grutzendler J. et al., (2002) Nature 420 (6917:812-816.)). これ以降視覚といった生体のマクロな機能を、1つ1つの細胞の反応に還元するような研究が2光子励起顕微鏡を用いた in vivo イメージングによって可能となりつつあった。

一方、本研究代表者らが所属する研究室では2001年以前から、ラット脳スライスを用いて2光子励起顕微鏡を用いたケイジド化合物の光による分解 (uncage) を用いたシナプス後部の局所グルタミン酸刺激法を開発していた (Matsuzaki M. et al., (2001)). すなわち、2光子励起を用いると uncage されるのは約 $1\mu\text{m}^3$ 以下の非常に限られた範囲となり、単一シナプスとほぼ同じレベルの大きさである。この性質を利用して、局所的かつ極めて低浸襲的にグルタミン酸を任意の位置に投与する=任意の単一シナプスを刺激することが脳スライスにおいては可能となっていた。

2. 研究の目的

本研究代表者は上記の背景のもとで個体の中でシナプスの重みの変化が、神経回路網あ

るいは個体全体の反応にどのような影響を及ぼすかを解析する技術を開発したいと考えた。

上記を達成する手段として、前述の2光子励起法を用いる局所グルタミン酸刺激を生きている動物個体にて適用して、任意のシナプスを刺激する方法の開発を企画した。具体的には以下の項目を目標に掲げた。

- (1) in vivo imaging 法の確立。
- (2) in vivo uncage による局所グルタミン酸投与方法の開発。
- (3) 成体もしくは臨界期の個体においてシナプス可塑性の誘発条件 (時空間パターン) を調べる。

3. 研究の方法

(1) in vivo imaging 法の確立

In vivo における顕微鏡観察では、血液の脈流および動物の呼吸動作を原因とする画像の乱れが存在することが判明していたので、脳表面固定処理により画像の動きを最小限に抑え込む技術の開発を実施することを企画した。これがうまく効果を発揮しない場合は、心電図信号からトリガー信号を得て、それに同期させて画像を取得することを考えた。さらに、人工呼吸器と組み合わせる呼吸による動きのタイミングを制御することによって、その影響を排除したイメージング法を開発することとした。

(2) in vivo uncage による局所グルタミン酸投与方法の開発

以下の手順で行った。

- ① in vivo imaging/uncaging 用システム開発
 - ・脳内に低分子化合物を拡散させるためのチャンバー等のシステムの開発。
 - ・ケイジド化合物が脳実質内をどの程度の速度で拡散していくか確認。
 - ・個体維持、固定等システムの開発 (図1)。

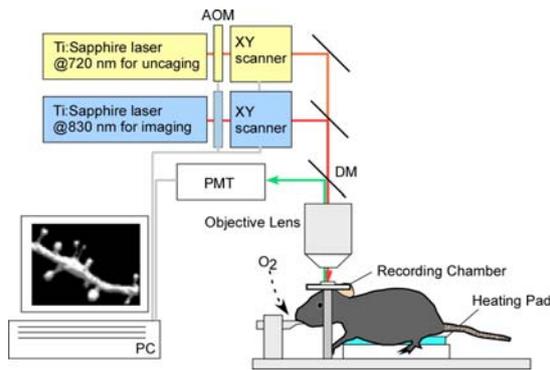


図1 In vivoにおいて、マウス神経細胞のイメージングと uncaging を行うシステム。

②イメージングウィンドウ設置手術に伴う炎症の抑制法の開発。

③ケイジド化合物投与・uncaging・数日以上の長期的観察を可能とするマイクロデバイスの開発（東京大学工学部一木研究室との共同研究）。本研究の代表者が開発するシステムは基本的に開放型であり、無菌的な操作は不可能であるので数日以上観察で確実に個体の感染が生じてしまう。これを克服し、さらに極めて定量的な化合物の投与を可能にするために工学部と共同研究を行った。

(3) in vivo 可塑性条件の探索

上記で開発したシステムを持ちいて、in vivo で長期増強 (LTP)、長期抑制 (LTD) 条件を探索する。探索する条件として、刺激間隔・刺激の大きさ・複数のシナプスの同時刺激等を考えた。

動物の週齢によりシナプス可塑性の性質に差があると思われるので様々な年齢で試験する。シナプスの重みの変化は基本的にスパイン形態の変化で検出するが、電気生理記録でも確認することを考えた。

4. 研究成果

(1) in vivo imaging 法の開発

脳内における動き（拍動）は、手術の巧拙や麻酔深度によって大きく異なることが分

析を進めることで判明した。そこで、低侵襲的な手術方法を開発し、適切な麻酔深度を維持することで可能な限り拍動を低減させる方針とした。

一方、拍動は呼吸に由来するものと血液の圧力の変動に由来するものがあり、毎回定常的な動作をするものではないということが、(株) オリンパス社の協力によりわかってきた。そこで、心臓からのシグナルをトリガーにした画像取得や計算的手法による画像の修正は通常行わないこととした。

(2) in vivo uncage による局所グルタミン酸投与方法の開発

①in vivo imaging/uncaging 用システム開発
上記で記述した方法を実際に開発し、大脳皮質1層の樹状突起スパイン体積と機能的なグルタミン酸受容体の分布との関係を調べたところ（図2, 3）それらの相関は非常に高かった ($r = 0.88$)。この方法により、in vivo 成体大脳皮質においてもシナプスの重みの評価がスパインの形態を調べることによって簡便に予測可能であることを初めて示すことができた。

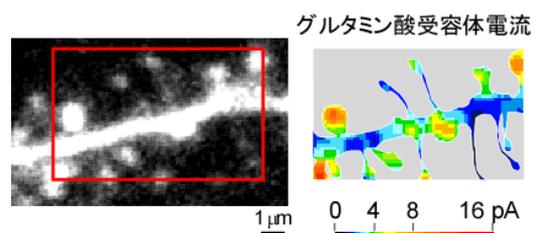


図2 大脳皮質2/3層錐体細胞樹状突起の in vivo における機能的グルタミン酸受容体の分布。頭部体積の大きいスパインには多くのグルタミン酸受容体が存在することがわかった。

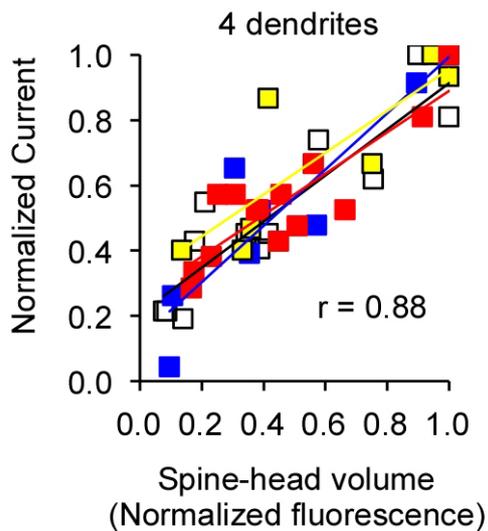


図 3 スパイン頭部体積とシナプス後電流の大きさとの関係。2光子 uncaging により生じた電流の大きさは頭部体積と比例した。

②イメージングウィンドウ設置手術に伴う炎症の抑制法の開発。

脳内に外部から溶液を浸透させるためには硬膜を除去する必要がある。しかし、硬膜を除去する時などには物理的的刺激や感染による炎症（端的にはグリア細胞の活性化）の可能性が飛躍的に高くなる。そこで、硬膜除去前に抗生物質による洗浄を実施し、Sepharose-beads に結合させたコラゲナーゼによって硬膜の張力を減少させ、硬膜を比較的低侵襲的に除去する技術開発を行った。その結果炎症は大幅に低減し、マイクログリア活性化が頭蓋骨除去しない場合と同程度となった（図 4）。シナプスの生成消滅率はマイクログリア活性化が起こった場合は頭蓋骨除去しない場合に比べ有意に高いことが知られていたが、今回開発した技術を用いることにより頭蓋骨を除去しない場合と同程度となった。この知見は brain-machine interface の開発においても重要であると考えている。すなわち、インターフェースを機能的に長期間安定して生体に設置するためには、マイクロ

グリア等による炎症のコントロールが必須であることが今回示唆された。

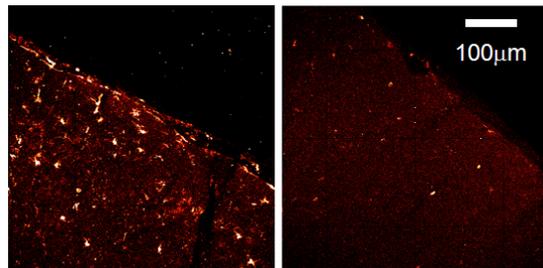


図 4 手術によるマイクログリア細胞活性化の検討。マイクログリアマーカー Iba1 の発現量増大を指標としてマイクログリアの活性化を検討した。左、物理的的刺激を与えてマイクログリアを活性化した大脳皮質。右、今回開発した手術法を用いた後の大脳皮質。手術をしていない場合と同程度にマイクログリア活性化を低減することができた。

③ケイジド化合物投与・uncaging・数日以上
の長期的観察を可能とするマイクロデバイスの開発

東京大学工学部一木研究室と共同で慢性的にマウス頭蓋骨表面に装着可能な直径 2.7 mm のデバイスの開発を行った。動作試験として、2光子励起顕微鏡による観察を行いながら色素を投与することにより、低分子化合物の脳内における拡散係数を算出した。

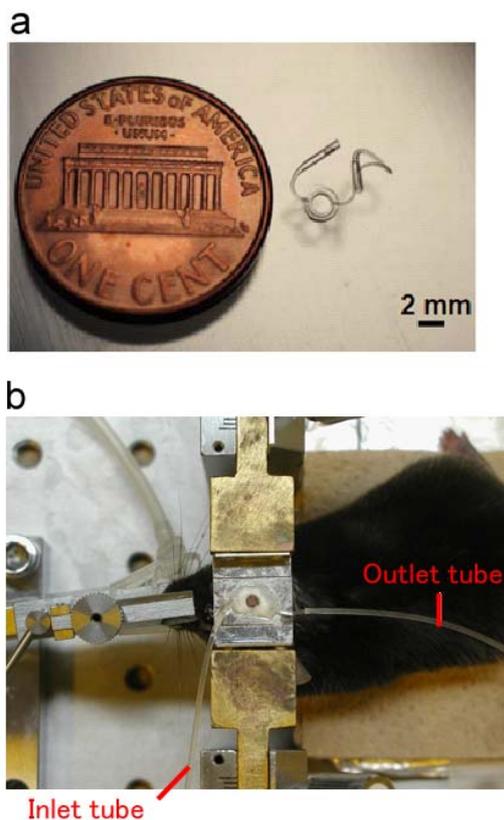


図5 完成した brain interface デバイス。a デバイスの外観。b マウスに装着したデバイス。デンタルセメントでマウス頭蓋骨に固定する。

(3) in vivo 可塑性条件の探索

in vivo 大脳皮質1層のスパインを頻回グルタミン酸刺激することでスパイン体積を大きくすることに成功した。つまり人工的に生体のシナプスの重みを変化させることに成功した。しかし、形態を変化させることができた割合は多く見積もって30%ほどであり幼若海馬脳スライスの錐体細胞よりも小さかった。現在さらに海馬と大脳皮質の錐体細胞の差違について解析を行っている。年齢との相関など詳細な解析は未実施のまま研究期間を終了した。

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)

- (1) Hira R, Honkura N, Noguchi J, Maruyama Y, Augustine GJ, Kasai H, Matsuzaki M (2009) Transcranial optogenetic stimulation for functional mapping of the motor cortex. *J Neurosci Methods* 179:258-263. 査読有。
- (2) Yasumatsu N, Matsuzaki M, Miyazaki T, Noguchi J, Kasai H (2008) Principles of long-term dynamics of dendritic spines. *J Neurosci* 28:13592-13608. 査読有。
- (3) Honkura N, Matsuzaki M, Noguchi J, Ellis-Davies GC, Kasai H (2008) The subspine organization of actin fibers regulates the structure and plasticity of dendritic spines. *Neuron* 57:719-729. 査読有。
- (4) Wang H, Peca J, Matsuzaki M, Matsuzaki K, Noguchi J, Qiu L, Wang D, Zhang F, Boyden E, Deisseroth K, Kasai H, Hall WC, Feng G, Augustine GJ. (2007) High-speed mapping of synaptic connectivity using photostimulation in Channelrhodopsin-2 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:8143-8148. 査読有。

[学会発表] (計3件)

- (1) 竹原宏明、長岡陽、野口潤、赤木貴則、河西春郎、一木隆範 (2009) 2光子励起顕微鏡法による *in vivo* 長期観察のためのブレインインターフェイスデバイス
応用物理学会
平成21年3月27日

茨城県つくば市 筑波大学。

- (2) 竹原宏明、長岡陽、野口潤、赤木貴則、河西春郎、一木隆範 (2008) In vivo 長期観察のためのブレインインターフェイスデバイスの性能評価と実装
応用物理学会
平成20年9月4日
愛知県春日井市 中部大学。

- (3) Noguchi J, Miyazaki T, Nagaoka A, Ellis-Davies GCR, Matsuzaki M, Kasai H (2007) Functional mapping of glutamate receptors in dendrites of mouse neocortical neurons in vivo using two-photon microscope
日本神経科学学会・日本神経化学会・日本神経回路学会 (合同大会)
平成19年9月11日
神奈川県横浜市 パシフィコ横浜。

[図書] (計1件)

- (1) 野口潤、河西春郎 他著 西村善文編
羊土社 生命科学のための機器分析実験
ハンドブック 2007年発行 全305ページ
(P. 230-236)。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野口 潤 (NOGUCHI JUN)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：40421367

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし