

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06884

研究課題名(和文)革新的イメージング技術による報酬学習における神経回路制御機構の解明

研究課題名(英文)Optical imaging of neural plasticity during cognitive behavioral tasks

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) 3,300,000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。本研究では、これまで開発を続けてきた内視顕微鏡を用い、自由行動中動物の線条体より可塑性関連分子であるERKの活性の計測を行い、生体におけるERK活性の動態について解析を行った。線条体の2種類の出力細胞である、直接路細胞および間接路細胞を選択的に観察したところ、どちらの細胞群も非常に短時間の活性を繰り返していることが分かった。また、薬理学的手法および電極刺激を組み合わせることにより、これらの反応が、グルタミン酸性入力とドーパミン性入力の組み合わせにより誘導されていることが明らかになった。

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」をイメージングできる新しい計測技術の開発を進めた。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 used novel optical imaging system for FRET biosensor to visualize “neural plasticity” from a “deep brain area” of “freely-moving animal” with “single cellular resolution”. I observed ERK activity from medium spiny neurons in dorsal striatum during free moving and visual discrimination task.

研究分野：神経科学

キーワード：イメージング 可塑性 線条体

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### (1) 新規蛍光観察システムによる神経情報の計測

脳の情報処理機構は、非常に緻密でありながら、その性質を適宜調整できるしなやかさを持つ。そのため認知機能にかかわる脳の動作原理を解明するためには、実際に認知課題中の動物から神経情報を読み取る必要がある。

遺伝学的に発現させた蛍光バイオセンサーによるイメージングが、細胞種選択的な計測を可能にし、神経情報の解読技術は大幅に進展した。それにともない計測手法もさまざまな方法が開発されている。しかしこれまでの計測技術には解決すべき課題も多く残されていた。神経回路研究には、各々の細胞を分離して計測できる空間解像度で、自由行動下の動物からの計測、また深部脳組織からの計測が重要であり、さらには各神経細胞に作用する可塑性シグナルのダイナミクスとそれに伴う神経情報の推移を同時に計測できる多色観察が必要である。

既存の技術には長所と短所があり、目的により使い分ける必要がある。多光子顕微鏡は、高い空間解像度を持つが、動物の行動が制限され、また脳深部の計測には向かない。頭部搭載型カメラは、自由行動中の動物の脳深部からの計測が可能であるが、拡張性に乏しく、多色イメージングや高感度の計測が難しい。ファイバーフォトメトリーは、ファイバーで信号を外部計測装置に転送するため拡張性が高いが、空間解像度が低く、細胞ごとの計測ができない。私が開発を行ってきた内視顕微鏡は、これらの問題点を解決できる計測法であり、自由行動下のマウスの深部脳組織より、複数の蛍光プローブを長期にわたり計測を行うことができる。

#### (2) 生体マウスからのシナプス可塑性の関わる分子の活性計測

ERK (extracellular signal-regulated kinase) は、シナプス可塑性に関わる重要な分子として、これまで *in vitro* の実験系や、薬理的、生化学的アプローチにより解析がなされてきた。しかしながら、生体の脳においてどのように働いているのかは、ほとんど分かっていない。本研究では、ERK の活性を測定可能な FRET (Forster resonance energy transfer) プローブを用いることで、行動中マウスの脳より ERK 活性の動態の計測を行った。

### 2. 研究の目的

脳は、複雑かつ緻密な神経回路で情報処理を行い、かつ必要に応じてその性質を変化させるしなやかさを持つ。そのため、状態をスナップショットで捉えるだけでは、その制御機構の解明は難しい。本研究では、可塑性関連分子の活性と神経活動の測定を、単一細胞の解像度で長期にわたり追跡を行うことで、「どの神経細胞にどのタイミングで可塑性関連シグナルが誘導されるか」という脳の情報処理の解明を目的とし、「可塑性による神経情報の更新」という、神経回路における情報処理の最も重要な問題の解明を目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 内視顕微鏡による複数の蛍光プローブの観察

我々が開発した内視顕微鏡は、イメージファイバーバンドルにより、画像を外部に設置したカメラへ転送することで観察を行う。単一細胞の空間解像度で脳内を観察することができ、柔軟性を持つファイバーバンドルを使用することで、動物の行動を妨げることなく計測を行うことが可能である。本研究では、この内視顕微鏡システムを発展させ、同一視野からの多色蛍光観察を行うことで、複数の神経情報の計測を行った。

ERK の活性を測定可能な FRET バイオセンサーと、赤色カルシウム指示タンパク質である RCaMP の観察を行った。用いる ERK FRET バイオセンサーには、核移行シグナルを付加することで、核内の ERK 活性を測定する。RCaMP を発現するウイルスベクターにより、核移行シグナルを付けた近赤外線蛍光タンパク質 mCardinal を同時に発現させることで、FRET バイオセンサーと RCaMP を発現する細胞の識別精度を向上させた。励起光には、2 種、すなわち FRET センサーを励起する青色光と、RCaMP および mCardinal を励起する橙色光を用いた。観察には、2 台の CMOS カメラと、それぞれにイメージングスプリット光学系を用い、2 色励起 4 色計測を行った。

#### (2) 線条体細胞種特異的な神経情報の解析

線条体では、感覚情報や行動の情報が、ドーパミンにより「好ましい」か「好ましくない」という修飾を受け、その後の意思決定に用いられると考えられる。線条体からの出力細胞である中型有棘細胞は、その投射先と遺伝子発現プロファイルの異なる 2 種類に分類することができる。ドーパミン D1 受容体を発現し黒質網様部へ直接投射する細胞 (直接路細胞) と、D2 受容体を発現し淡蒼球を介し黒質網様部へと情報を送る細胞 (間接路細胞) である。基底核回路においてこれらの細胞群は拮抗的に作用し、またドーパミンにより対照的な制御を受けると考えられる。これら 2 種類の神経細胞に対し選択的な遺伝子発現を誘導可能なマウス (Drd1-cre および A2a-cre) を用い、細胞種選択的に神経活動と可塑性シグナル動態の計測を行った。

### (3) 自由行動中および認知課題遂行中動物からの計測

計測は柔軟性をもつファイバーを介して行うため、ホームケージにおいて自由行動を行っている動物や、認知行動課題を行っている動物からの計測が可能である。動物の行動を制限しないため、長期間にわたる計測が可能であり、睡眠と覚醒期の計測が可能である。認知課題としてタッチパネル式オペラント学習装置を用い、行動（正解パネルへのタッチ）と報酬を関連付ける学習を行った。また、学習後に正解のパネルを逆にする逆転学習を行うことにより、環境の変化に対応するために脳内でどのような神経情報の更新が行われているのかを解析することができる。

### (4) 薬理学および刺激実験による ERK 活性を誘導する神経入力への解析

ERK 活性に関わる神経入力を明らかにするために、ドーパミン受容体に対するアゴニスト、アンタゴニスト、また NMDA 受容体の阻害剤の投与実験を行った。刺激実験では、大脳皮質または内側前頭束に対して刺激電極を留置し、それぞれグルタミン酸性およびドーパミン性の神経入力を誘導した。

## 4. 研究成果

### (1) 自由行動中のマウス線条体中型有棘細胞における ERK 活性の動態

ERK はシナプス可塑性にかかわる分子であることから、報酬行動を制御する線条体において、学習期において活性上昇が見られると予測していた。しかし、ホームケージにて安静にしているマウスの線条体の直接路細胞 (D1 陽性細胞) において、ERK は一過的な活性化を繰り返していることが観察された。この活性化の動態は、これまでに培養細胞で報告されている ERK の変化に比べ、非常に速いものであり、in vivo FRET イメージングによって初めて捉えることのできた反応である。睡眠時と覚醒時を比較すると、覚醒時に有意にその頻度が上昇するが、活性化の大きさ、変化の速度には差がなかった。

内視顕微鏡では、視野内に 30-50 細胞を同時に観察することができる。視野内の観察細胞間の活性化のタイミングを解析すると、複数の神経細胞が同期して活性化する場合と、ランダムに活性化する場合とが見られた。ERK の活性化を誘導する因子の一つと考えられる中脳からのドーパミン入力は、単一のドーパミン細胞からの投射が線条体の広い領域に及んでいることが知られている。一方、ERK の活性化にはグルタミン酸性入力も必要であることが知られている。この同期および非同期の ERK 活性は、ドーパミン入力とグルタミン酸性入力の組み合わせにより誘導されていると考えられる。さらに、ERK を活性化するシグナルを調べるために、薬理学実験との組み合わせ、および大脳皮質または内側前頭束への刺激実験を行った。その結果、ERK の活性には、ドーパミン依存的な応答と、グルタミン酸依存的な応答が関与していることが確認できた。

### (2) 間接路中型有棘細胞における ERK 活性の動態

間接路中型有棘細胞では、ドーパミン D2 受容体が発現している。D2 受容体は、Gi/o 共役型の受容体であり、D1 受容体とは反対の作用を持つため、間接路細胞では、直接路細胞と異なる ERK 活性化を示すと予想された。しかしながら、間接路細胞においても、自由行動中に見られる活性化は、直接路細胞と同様の一過的な活性上昇が観察された。その動態や頻度は直接路細胞のそれらと非常に類似していることが分かった。一方で、コカイン投与による ERK の応答を解析したところ、直接路細胞では、大きく長時間にわたる ERK 活性化上昇が見られたが、間接路細胞では、逆に活性の減少が観察された。

### (3) 認知課題遂行中の ERK 活性

学習期における ERK 活性を解析するために、学習前後のホームケージにおける活性変化と認知課題遂行中の活性変化を比較した。その結果、学習期において ERK の活性が特徴的な変化を示すことが明らかになり、ERK の活性が学習獲得に関与していることが示唆された。直接路および間接路細胞における特徴的な活性上昇は、視覚弁別課題の学習において、それぞれ特定のタイミングで引き起こされていた。また、各々の神経細胞が担う情報が、学習獲得に伴い変化し、学習獲得により固定化することも観察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nishioka Tadaaki, Hamaguchi Kosuke, Yawata Satoshi, Hikida Takatoshi, Watanabe Dai	4. 巻 14
2. 論文標題 Chemogenetic Suppression of the Subthalamic Nucleus Induces Attentional Deficits and Impulsive Action in a Five-Choice Serial Reaction Time Task in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Systems 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/fnsys.2020.00038	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 Okunomiya Taro, Hioki Hiroyuki, Nishimura Chika, Yawata Satoshi, Imayoshi Itaru, Kageyama Ryoichiro, Takahashi Ryosuke, Watanabe Dai	4. 巻 58
2. 論文標題 Generation of a MOR CreER knock in mouse line to study cells and neural circuits involved in mu opioid receptor signaling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 genesis	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/dvg.23341	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 Lee Seohyun, Hayakawa Tomohiko, Nishimura Chika, Yawata Satoshi, Yagi Hiroki, Watanabe Dai, Ishikawa Masatoshi	4. 巻 19
2. 論文標題 Comparison of Deep Learning and Image Processing for Tracking the Cognitive Motion of a Laboratory Mouse	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 2019 IEEE Biomedical Circuits and Systems Conference (BioCAS)	6. 最初と最後の頁 8919239
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1109/biocas.2019.8919239	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Tadaaki Nishioka, Kosuke Hamaguchi, Satoshi Yawata, Takatoshi Hikida, Dai Watanabe
2. 発表標題 Causal role of the subthalamic nucleus in executive functions
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥宮太郎, 今吉格, 日置寛之, 西村知華, 矢和多智, 影山龍一郎, 高橋良輔, 渡邊大
2. 発表標題 新規に作成したノックインマウスMOR-CreERによる $\mu$ オピオイド受容体陽性神経回路の可視化
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019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

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