

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06885

研究課題名(和文) マウス全脳の機能的コネクトーム解析による睡眠覚醒の責任細胞の同定

研究課題名(英文) Identification of core cells for sleep-wake by functional connectome analysis

研究代表者

松本 桂彦 (Matsumoto, Katsuhiko)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・客員研究員

研究者番号：60632859

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)：組織透明化技術CUBICを用いてマウス全脳のc-Fos染色方法、c-Fos陽性細胞の検出アルゴリズムの開発を行い、これらの技術を用いてマウスの時系列による全脳での神経活動の変化の定量を実施した。マウス全脳をCUBICとc-Fos抗体による3D免疫染色を行い、高解像光シート顕微鏡を用いて3D画像を得た。これから、マウス全脳の全c-Fos陽性細胞を検出することに成功した。さらに、時間によって脳のどの領域の神経活動がどのように変化するかを定量することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

概日リズムによって薬剤の効果がかわることが既に知られており、効果的な投与には投与する時間を決定する必要がある。これは、創薬段階からも考慮すべき課題であり、効果的なタイミングで薬剤の効果を判定する必要があるが、現在はどのような薬剤をいつ投与すると効果的かどうか予測できないため、経験によって決めることしかできなかった。全脳の全神経細胞の1日の活動の変化を定量することで、いつどの領域のどの細胞が活性化するかを知ることができ、中枢神経系の薬剤の効果的な投与時間の推定や、実際の効果を正確に判断することにも利用できる。

研究成果の概要(英文)：Using the tissue clearing technique CUBIC, we developed a method for c-Fos protein staining of mouse whole brains and an algorithm for detecting c-Fos positive cells, and used these techniques to quantify changes in neural activity in the whole brain of mice over time. Whole mouse brains were subjected to 3D immunostaining with CUBIC and c-Fos antibodies, and 3D images were obtained using a high-resolution light sheet microscope. From this, we succeeded in detecting all c-Fos positive cells in the whole mouse brain. Furthermore, we succeeded in quantifying how neural activity in which regions of the brain changes with time.

研究分野：神経科学

キーワード：組織透明化 顕微鏡 マウス脳

1. 研究開始当初の背景

脳はおおくの生命で最も重要な臓器であり、これまで最も盛んに研究が行われてきた臓器でもある。fMRI などによるマクロな研究から、神経細胞内のメカニズムまで様々なスケールでの研究が行われてきたが、近年のコンピュータの発達により、詳細かつ広域の研究を行うことは不可能ではなくなってきたはずである。この、詳細かつ広域の次世代の研究を実際に可能にするためには、技術面と基礎データの2つのハードルがあった。技術面においては、臓器の切断による切断面での情報の消失や実験の手間などの面から、組織透明化が適しており、マウス全脳は高度に透明化することが既に可能である。また、全臓器レベルの染色技術も発展してきており、マウス全脳の免疫染色も多くの抗体で可能となってきた。しかし、これまでは3次元イメージング速度の遅さ(2-4fps程度)から、高倍率(10倍~)でマウス全脳をイメージングするには数日が必要であり、実用的な技術ではなかった。また、数テラバイトにおよぶ3次元画像データからマウス全細胞の高精度な検出は時間と精度の両面で実用までではなかった。そこで、申請者は高速3次元イメージング技術(MOVIE技術)を開発し、解像度を落とさずに20fps以上で3次元撮像を可能にした(詳細は“これまでの研究活動”に記載)。これに、高NA(0.6)かつ長作動距離(8mm)の対物レンズを用いた高解像観察系と組み合わせ、高速高解像3次元イメージングを可能な光シート顕微鏡を作製した。さらにGPUを用いた高速細胞検出プログラムを開発した。これらを用いることで、マウス全脳を5時間以内に撮像し、全細胞を2時間以内に検出、領域情報などをアノテーションできるようになった。この新規の撮像技術と解析手法により、透明化、染色、撮像、解析のすべての要素が揃い、詳細かつ広域の次世代の研究を実際に可能にする技術面は解決された。しかし、現在のマウス全脳の全細胞アトラス(CUBIC-Atlas)はおよそ1億個の細胞の座標とその細胞の属する領域名しか登録されておらず、新たなステージの研究のためのアトラスとしては情報量が不足しており、基礎データの蓄積が必要である。

2. 研究の目的

全細胞解析を行う時、多数の個性あるサンプル間の比較が必須となる。マウス全脳の全細胞アトラス(CUBIC-Atlas)は既に作製され、公開されており、だれでも利用できるようになっているが、ここには標準脳の細胞の座標と領域がアノテーションされているだけであり、それがどのような細胞なのか、いつどのようなときに活性化するかなどの情報はまだない。そこで、本研究ではマウス全脳の全細胞のc-fos活性を継時的に定量し、すべての神経細胞の概日リズムなど日内変動での活性の変化をすべてCUBIC-Atlas上にマップし、その情報を公開する。さらに、薬剤や刺激(断眠や拘束など)で脳のどの細胞がどの程度活性化するか、バイオロジー研究に必要な基礎データを作製する。本申請研究の後、それぞれの細胞がどのような細胞種(ドーパミン作動性、グルタミン作動性など)を同様に特定し、その情報をより深いものにしていく予定である。

3. 研究の方法

概日リズムによる神経細胞の活動がもっとも基準の神経活動になると考えられる。そのため、マウスを暗室下(Dark-Dark(DD))で飼育し、4時間おきに48時間サンプリングを行い、全脳のc-fos免疫染色、透明化、全細胞解析を行い、マウス全脳の全神経細胞の活性ベースラインを作製する。つぎに、実際の実験条件に近いLight-Dark(LD)条件下で同様に時系列アトラスを作

製する。これにより、光によって活性化した神経細胞、それに付随して起きた神経細胞の活性状態の変化を網羅的に特定することができる。本申請研究では、c-fos の細胞検出の精度の検証およびパラメータの調整を行い、個体差の影響を抑えるため、各タイムポイントで3匹以上の解析を行う。

4. 研究成果

本研究では、48時間、4時間おきにマウス脳を6匹ずつサンプリングを実施した。マウスは体内時計を合わせるために、1週間LD(Light-Dark)条件下で飼育を行った後、DD(Dark-Dark)条件下で光刺激がない状態で概日リズムのみで飼育を行い、サンプリングを実施した。マウスは当研究室で開発した非侵襲睡眠測定チャンパーSSSの中で飼育され、睡眠覚醒情報を継続的に得た。これにより、DD条件下で概日リズムのずれもそれぞれのマウスごとに補正することが可能である(図1)。

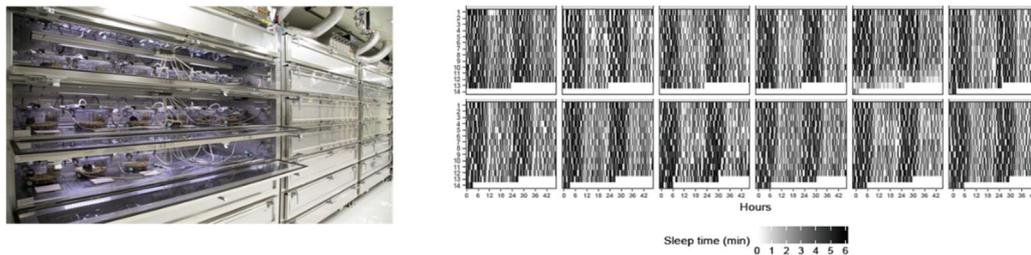


図1. SSSによる概日リズムの計測

このように時系列サンプリングしたマウス脳をCUBICを用いて透明化し、当研究室で開発した3D免疫染色手法であるCUBIC-HVを用いてマウス全脳のc-Fosを染色した。さらに、脳のいくつかの部位と概日リズムの中核として知られている視交叉上核の染色性と細胞検出可能なシグナルが得られているのかを確認した。その結果、脳の深部まで染色されており、c-Fos陽性細胞を検出することが可能であることを確認した。

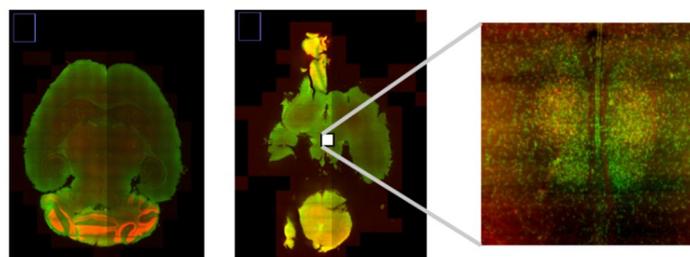


図2. マウス全脳のc-Fos染色、3DイメージングとSCNのシグナル

その後、それぞれのサンプルのc-Fos染色を行い、高解像光シート顕微鏡で撮影を実施した。得られた画像からc-Fos細胞を検出し、座標情報にしたものを、マウス全脳の全細胞アトラスであるCUBIC-Atlasを用いて簡便に全細胞解析が可能なCUBIC-Cloudを使って各脳領域の時間変化を解析した(図3)。

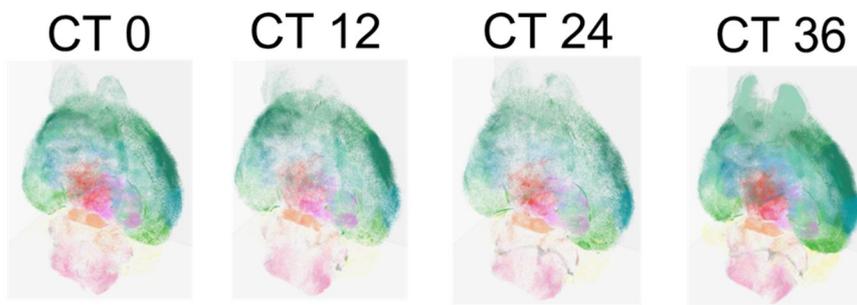


図 3. マウス全脳の神経活動の CUBIC-Cloud を用いた解析

その結果、時間ごとに各領域の c-Fos の陽性細胞数の変化を定量することに成功した。しかし、個体間の違いが比較的大きいことから概日リズム以外の刺激による c-Fos 発現の細胞も含まれる可能性が高いことが示唆されたが、個体間の共通の要素を抽出することで 48 時間の神経活動の日内変動を定量することに成功した。さらに、本プロジェクトにおいて、各社の c-Fos 抗体 (Abcam 2H2, サンタクルーズ C-10, E-11, CST 9F6) について、スクリーニングを行い、3D染色が可能でありホルマリン固定による抗原性の低下などの影響を比較的受けにくいクローン 2H2 を用いることとした。これを用いて CUBIC-HV の条件を決定し、同時に 46 脳の免疫染色を可能なプロトコール作製に成功した。また、c-Fos の免疫染色のシグナルは弱く、非特異結合や自家蛍光によるバックグラウンドノイズとの区別が困難であったが、3次元的にシグナルの形状を計算し、形状の特徴量によって c-Fos のシグナルかノイズかを高精度に判定するアルゴリズムの開発に成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Richardson Douglas S., Guan Webster, Matsumoto Katsuhiko, Pan Chenchen, Chung Kwanghun, Erturk Ali, Ueda Hiroki R., Lichtman Jeff W.	4. 巻 1
2. 論文標題 Tissue clearing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Reviews Methods Primers	6. 最初と最後の頁 1-24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s43586-021-00080-9	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 該当する
1. 著者名 Nojima Satoshi, Ishida Shoichi, Terayama Kei, Matsumoto Katsuhiko, Matsui Takahiro, Tahara Shinichiro, Ohshima Kenji, Kiyokawa Hiroki, Kido Kansuke, Ukon Koto, Yoshida Shota Y., Mitani Tomoki T., Doki Yuichiro, Mizushima Tsunekazu, Okuno Yasushi, Susaki Etsuo A., Ueda Hiroki R., Morii Eiichi	4. 巻 14
2. 論文標題 A Novel Three-Dimensional Imaging System Based on Polysaccharide Staining for Accurate Histopathological Diagnosis of Inflammatory Bowel Diseases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 905 ~ 924
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcmgh.2022.07.001	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 Tone Daisuke, Ode Koji L., Zhang Qianhui, Fujishima Hiroshi, Yamada Rikuhiro G., Nagashima Yoshiki, Matsumoto Katsuhiko, Wen Zhiqing, Yoshida Shota Y., Mitani Tomoki T., Arisato Yuki, Ohno Rei-ichiro, Ukai-Tadenuma Maki, Yoshida Garcon Junko, Kaneko Mari, et., al.	4. 巻 20
2. 論文標題 Distinct phosphorylation states of mammalian CaMKII control the induction and maintenance of sleep	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS Biology	6. 最初と最後の頁 3001813 ~ 3001813
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pbio.3001813	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 該当する
1. 著者名 Kubota Shimpei I., Takahashi Kei, Mano Tomoyuki, Matsumoto Katsuhiko, Katsumata Takahiro, Shi Shoi, Tainaka Kazuki, Ueda Hiroki R., Ehata Shogo, Miyazono Kohei	4. 巻 4
2. 論文標題 Whole-organ analysis of TGF- β -mediated remodelling of the tumour microenvironment by tissue clearing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-01786-y	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5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 松本桂彦
2. 発表標題 組織透明化技術CUBICを用いた全細胞解析
3. 学会等名 日本顕微鏡学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松本桂彦 秋山郁人 上田泰己
2. 発表標題 脳の透明化と機能解析
3. 学会等名 日本臨床分子形態学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fukuaki Kinoshita, Rikuhiro Yamada, Katsuhiko Matsumoto, Hiroki.R.Ueda
2. 発表標題 Theoretical study of synaptic plasticity during the sleep-wake cycle
3. 学会等名 Society for neuroscience（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 T. T. MITANI, S. Y. YOSHIDA, K. YAMAURA, K. MATSUMOTO, E. A. SUSAKI, H. R. UEDA
2. 発表標題 Whole-brain neuron profiling identifies biological alterations in three-dimensional structure and function at a single-neuron level
3. 学会等名 Society for neuroscience（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 S. Y. YOSHIDA, T. T. MITANI, K. MATSUMOTO, H. R. UEDA
2. 発表標題 Whole organ/body atlas of mouse with a single-cell resolution
3. 学会等名 Society for neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2022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