

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K15892

研究課題名（和文）超解像イメージングによるスパインシナプスの動態解析

研究課題名（英文）Dynamic analysis of spine synapses by super-resolution imaging

研究代表者

柏木 有太郎（Kashiwari, Yutaro）

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・助教

研究者番号：90840893

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では超解像イメージング技術を用いたスパインシナプスの解析技術を発展させ、シナプス前部構造とシナプス後部構造を対応させて撮像・解析する技術確立すること、またこの超解像イメージング手法をマウス脳組織に適応して生きた動物が記憶・学習した際に起こるシナプスの構造変化をナノスケールで解析する技術基盤を確立することを目的として研究開発を行った。新しく開発した撮像技術を用いることでスパインの凹みに対応した軸索末端の凸型形状とその安定性を観察できた。また脳標本をより高分解能で超解像イメージングする条件を確立してin vivoイメージングで動態を記録したシナプスと対応付けて撮像する技術もできた。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
脳のシナプスを詳細かつ大規模に解析することで、記憶や学習と言ったヒトの高次脳機能のメカニズムの理解が進む。本研究開発により確立された解析技術により記憶・学習をコードする神経細胞のシナプスレベルでの構造的な理解が進む。また、この技術は神経疾患モデル神経への適用が可能であり疾患特異的なシナプスの病理的な変化の解明に貢献することができる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to establish a technique for imaging and analyzing the correspondence between presynaptic and postsynaptic structures, and also applying this super-resolution imaging technique to mouse brain tissue to understand the structural changes in spine synapses that occur during memory acquisition in living animals. Using the newly developed imaging technique, I was able to observe the convex shape of axon terminals corresponding to the concavity of the spine head. I also established conditions for higher resolution super-resolution imaging of brain specimens, and developed a technique to image synapses in relation to the dynamics recorded by in vivo imaging.

研究分野：神経細胞生物学

キーワード：シナプス 神経回路 ライブイメージング 超解像顕微鏡

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

シナプスが脳においてどのように形成され、また外部刺激に応じて可塑的に変化するのか、その分子基盤を明らかにすることはヒトの様々な脳機能を理解する上で重要な課題である。顕微鏡を用いてシナプスの構造と分子を直接的に観察することで個々のシナプスのバラツキやその特性の違いを調べることが可能である。生きたシナプスを詳細に解析し、それと脳機能の結びつきを明らかにすることが脳の全貌解明に向けて必須である。

本研究では超解像顕微鏡によるスパイン（興奮性シナプス後部構造）の微細形態解析技術 (Kashiwagi et al., *Nature Communications* 2019) を基礎として、シナプスの構成要素であるスパインと軸索末端を同時かつ詳細に観察することで、可塑的刺激に伴ったシナプスの形態変化とその分子基盤を検証する。さらにこの技術を脳組織に応用し生きた脳により近い環境でシナプスを精細に観察する基盤技術の確立を目指す。これらの取り組みにより記憶・学習といった脳機能の理解を進めることを目標とする。

### 2. 研究の目的

本研究では、シナプスの可塑性と安定性に関わる分子メカニズムの解明を目指し、興奮性シナプスを構成する樹状突起スパインと軸索末端を従来の光学顕微鏡の限界を超えた分解能で同時にタイムラプス観察する基盤技術の確立を目的とする。さらに、より生体内に近い状態でのシナプスの形態と動態を高い分解能で観察することを目指す。これらにより、記憶・学習の細胞生物学的な構造基盤の理解を進める。

### 3. 研究の方法

#### (1) 樹状突起スパインと軸索末端の動態を高い時空間分解能で観察する基盤技術の確立

これまでスパインを高い時空間分解能で3Dタイムラプス撮影することに成功しているが、その形態変化をより理解するためにはスパインが物理的に接着している軸索末端の構造も同時に撮影する必要があると考えられた。複数の細胞構造を同時に撮像するためには撮像チャンネルが2つに増えるためそれに起因する時間分解能の低下や光毒性の上昇など様々な問題を解決する必要があった。構造化照明顕微鏡 (SIM) または回折限界を超えた共焦点レーザー顕微鏡を用いて撮像条件を最適化して軸索末端とスパインのナノスケールでの形態変化を同時観察に取り組んだ。

#### (2) 組織標本でシナプスの形態情報をナノスケールで取得する技術基盤の確立

研究開始当初は脳組織標本を高屈折率の溶液で屈折率調整をして構造化照明顕微鏡 (SIM) または回折限界を超えた共焦点レーザー顕微鏡を用いて撮像を行っていたが、培養細胞の潮位改造イメージングと比較するとまだ理想的な解像度の撮像が難しかった。標本調整に起因する組織の収縮・膨張を考慮してより高解像イメージングに適した標本調整に取り組み超解像イメージングを実施した。

#### (3) 記憶関連神経細胞のスパイン形態のナノスケール解析技術と神経回路追跡技術の確立

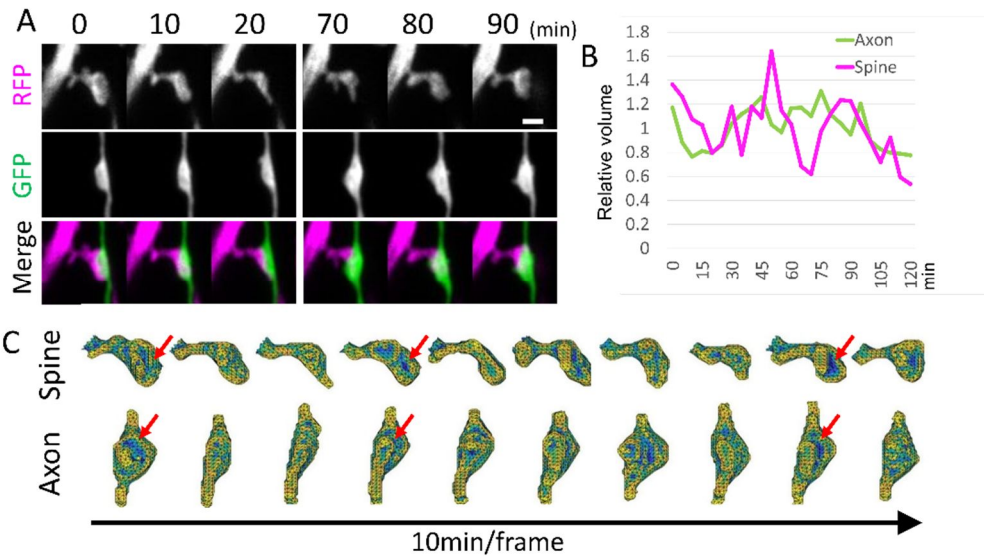
シナプスの動態と微細形態情報を対応して解析するために、(2)で確立するイメージングを *in vivo* 二光子イメージングと組み合わせた相関顕微鏡手法を確立する。またそれにエンGRAM細胞の標識法を組み合わせることで、生きた動物においてシナプス可塑性が起きたシナプスのナノスケールでの形態情報を取得するための技術基盤構築に取り組んだ。

### 4. 研究成果

研究期間全体として3つの大きな目標を達成した。

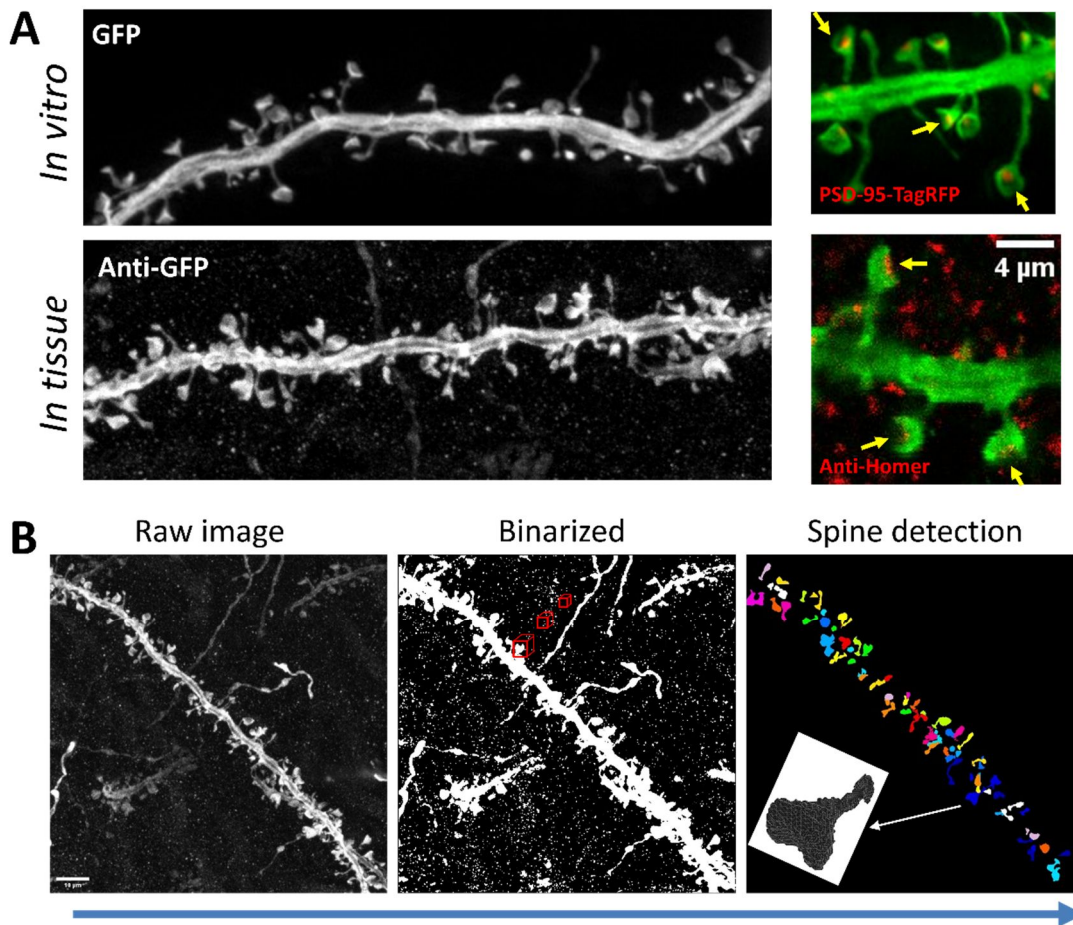
#### (1) 樹状突起スパインと軸索末端の動態を高い時空間分解能で観察する基盤技術の確立

リン酸カルシウム法による遺伝子導入条件を最適化して軸索末端と樹状突起スパインを異なる蛍光タンパク質で標識する手法を確立した。共焦点レーザー顕微鏡の撮影条件、具体的には撮像範囲、走査時間、ピンホール径をそれぞれ最適化することで、回折限界を超えた条件で軸索末端とスパイン形態を同時かつ3次元的にタイムラプス観察できた。軸索末端はスパインの凹みに対応した凸包形状をしており、その形態はタイムラプス観察中に維持され凸包の近傍で凹凸が変化する様子が見られた。この研究開発を通じて同一のスパインを20分毎48時間以上もの長時間にわたって撮像する条件も見出すことが出来た。この撮像技術を用いて複数の神経疾患モデル由来培養神経細胞のシナプス形態と動態を解析した。



(2) 組織標本でシナプスの形態情報をナノスケールで取得する技術基盤の確立

x4~4.5倍程度標本を物理的に膨張させる膨張顕微鏡法を最適化し、高開口数の水浸レンズを用いた共焦点レーザー顕微鏡イメージングにより組織標本中でも生きた培養神経細胞と同様のスパイン形態を撮像・解析することに成功した。さらに水溶性組織透明化手法と高開口数のシリコン対物レンズの組み合わせでも同様の撮像ができることを示した。



これらの撮像技術を用いて自閉症モデルマウスのスパイン形態を神経疾患モデル由来培養神経細胞のシナプス形態ナノスケールで撮像しその形態を解析することに成功した。また、*in vivo* 二光子超解像イメージング相関顕微鏡手法を実施し、生きたマウス脳内で撮像した同一神経細胞のスパインを超解像観察することに成功した。

(3) 記憶関連神経細胞のスパイン形態のナノスケール解析技術と神経回路追跡技術の確立

恐怖記憶で活性化する神経細胞と、その周囲の活性化しない神経細胞のスパイン形態を比較して解析する技術を確立した。具体的には空間刺激と電気ショックを連合して記憶させる行動

実験系と、AAVによる海馬錐体細胞の標識技術、また免疫染色による最初期遺伝子 c-Fos の検出を組み合わせた。GFP が発現した海馬錐体細胞を c-Fos 陽性また陰性で分類し、B) で確立した組織標本の超解像イメージング組み合わせることでそれぞれの神経細胞のスパインを解析することが出来た。シナプスの長期増強はエンGRAM細胞同士のシナプスで起こると考えられているため、これらのシナプスを組織標本中で同定するために海馬錐体細胞の軸索をミリスケールで追跡して神経回路を再構築する実験条件を確立した。

以上の3つの研究開発によりスパインの超解像観察技術を基盤としてシナプス前部-後部構造のライブイメージングから生きた動物の記憶回路研究まで技術発展させることができた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Osamu Nozawa , Muneaki Miyata , Hajime Shiotani , Takeshi Kameyama , Ryouhei Komaki , Tatsuhiro Shimizu , Toshihiko Kuriu , Yutaro Kashiwagi , Yuka Sato , Michinori Koebisu , Atsu Aiba , Shigeo Okabe , Kiyohito Mizutani , Yoshimi Takai	4. 巻 150
2. 論文標題 A novel Necl-2/3-mediated mechanism for tripartite synapse formation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development (Cambridge, England)	6. 最初と最後の頁 dev200931
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.200931	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yutaro Kashiwagi and Shigeo Okabe	4. 巻 ahead of print
2. 論文標題 Imaging of spine synapses using super-resolution microscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anatomical Science International	6. 最初と最後の頁 ahead of print
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12565-021-00603-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 柏木有太郎, 岡部繁男
2. 発表標題 膨張顕微鏡法を用いた軸索とシナプスの大規模イメージング法の開発
3. 学会等名 日本顕微鏡学会 第66回シンポジウム 2023年11月11日
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yutaro Kashiwagi, Shigeo Okabe
2. 発表標題 Three-dimensional analysis of synaptic morphology and dynamics using the super-resolution microscopy
3. 学会等名 IMC20 - 20th International Microscopy Congress (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Lipen Lin, 柏木有太郎, 亀井亮佑, 岡部繁男
2. 発表標題 マウス体性感覚皮質における脳血管ネットワークの三次元構造
3. 学会等名 第46回 日本神経科学大会 2023年8月3日
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤 由佳, 柏木 有太郎, 岡部 繁男
2. 発表標題 マウス第三脳室表面における軸索様構造の電子顕微鏡解析
3. 学会等名 第46回 日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Lipen Lin, 柏木有太郎, 亀井亮佑, 岡部繁男
2. 発表標題 3D imaging analysis of brain vascular network based on two photon microscopy
3. 学会等名 日本顕微鏡学会 第79回学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤 由佳, 柏木 有太郎, 岡部 繁男
2. 発表標題 SEMアレイトモグラフィ法によるマウス第三脳室表面の三次元構造解析
3. 学会等名 日本顕微鏡学会 第79回学術講演
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 柏木 有太郎, 佐藤 由佳, 岡部 繁男
2. 発表標題 膨張顕微鏡法を用いた第三脳室表面構造の解析
3. 学会等名 日本顕微鏡学会 第79回学術講演
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 柏木有太郎, 寺嶋宙, 岡部繁男
2. 発表標題 記憶関連神経回路におけるスパイン形態と軸索投射の膨張顕微鏡法を用いた解析
3. 学会等名 第46回 日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 柏木 有太郎, 遠藤 雅瑛, 寺嶋 宙, 岡部 繁男
2. 発表標題 大脳皮質錐体ニューロン解析のための生体内二光子顕微鏡と膨張顕微鏡を用いた相関顕微鏡手法の開発
3. 学会等名 Neuro2022 (第45回 日本神経科学大会、第65回 日本神経化学会大会、第32回日本神経回路学会大会 合同大会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柏木有太郎, 寺嶋宙, 岡部繁男
2. 発表標題 Three-dimensional structural analysis of dendritic spines of memory-related neurons using the super-resolution technique
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 柏木 有太郎, 遠藤 雅瑛, 岡部 繁男
2. 発表標題 Large-scale tracing of axons in pyramidal neurons using expansion microscopy
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 寺嶋宙, 柏木有太郎, 中澤敬信, 岡部繁男
2. 発表標題 Analysis of the fine structures of dendritic spines in cortical pyramidal neurons in an autism mouse model
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柏木有太郎, 岡部繁男
2. 発表標題 Computational geometry analysis of dendritic spines using the super-resolution technique
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 3D-morphological analysis of dendritic spines of memory-relating neurons using the super-resolution technique
2. 発表標題 柏木有太郎, 湊原圭一郎, 岡部繁男
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年



1. 発表者名	Generation and characterization of a TAP-tag knock-in mouse line to identify the potential ACF7-complex within the neuron
2. 発表標題	鈴木悠里, 柏木有太郎, 岡部繁男
3. 学会等名	第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	柏木有太郎, 寺嶋宙, 遠藤雅瑛, 岡部繁男
2. 発表標題	Correlative two-photon and high-resolution fluorescent microscopy of dendritic spines of cortical pyramidal neurons
3. 学会等名	第126回日本解剖学会総会・学術集会・第98回日本生理学会大会合同大会
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	寺嶋宙, 柏木有太郎, 中澤敬信, 岡部繁男
2. 発表標題	自閉症マウスの皮質錐体神経細胞の形態学的解析
3. 学会等名	第126回日本解剖学会総会・学術集会・第98回日本生理学会大会合同大会
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	柏木有太郎, 岡部繁男
2. 発表標題	超解像顕微鏡技術を用いたスパインの微細形態解析
3. 学会等名	生理学研究所 シナプス研究会
4. 発表年	2020年

1. 発表者名 柏木 有太郎
2. 発表標題 オンライン中継による超解像顕微鏡の観察デモンストレーション
3. 学会等名 先端顕微鏡技術セミナー SIM方式による超解像顕微鏡技術の応用と実践（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 柏木 有太郎, 岡部 繁男 (担当:分担執筆, 範囲:イメージングを駆使したシナプス情報伝達の解明)	4. 発行年 2023年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 192
3. 書名 生体イメージングの最前線 絶え間ない技術革新と生命医科学の新展開	

〔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1件

国際研究集会 最先端顕微鏡法に関する国際若手シンポジウム	開催年 2023年～2024年
---------------------------------	--------------------

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
---------	---------