

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20683

研究課題名（和文）学習に伴う脳深部スパイン増大の可視化・機能探索

研究課題名（英文）Visualization and functional exploration of deep brain spine enlargement associated with learning

研究代表者

澤田 健（Sawada, Takeshi）

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・助教

研究者番号：40908563

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000 円

研究成果の概要（和文）：シナプスの構造的基盤である樹状突起スパインの形態変化は、記憶の基盤となると考えられてきた。しかし、光学的な限界から、表層を除く殆どの脳領域では、生体におけるスパイン形態変化の実態は観察困難である。本研究では、従来の10倍程度の特異性で直近で増大したスパインを標識するプローブの開発に成功して、これを活用して、深部領域を含む脳広範囲で、生体におけるスパイン増大をマッピングする方法の構築を進めてきた。さらにこれら増大スパインの機能を探索するため、化学的手法を用いたスパイン操作法を開発し、in vivoにおける応用を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
増大スパインの機能を脳広範囲で調べる本研究の手法は、スパイン増大を伴うあらゆる学習行動に適用することができる。これにより、様々な学習・記憶の基盤となるシナプス・回路構造を明らかにできれば、新しい学習理論の構築や、機械学習研究にも影響を与えうる。

研究成果の概要（英文）：Morphological changes in dendritic spines have long been thought to be the foundation of memory. However, due to optical limitations, it is difficult to observe the actual changes in spine morphology in most brain areas, excluding the surface. The objective of this research was to map the enlargement of spines in a wide range of brain areas, including deep regions, in living organisms through the observation of probes that specifically label recently enlarged spines. Furthermore, the study aimed to develop a new method for manipulating spines in order to explore the functions of these enlarged spines.

During the research period, we have successfully developed a probe that labels increased spines with about 10 times the specificity of conventional methods using an isolated culture system. Furthermore, we have newly developed a method for the enlargement and shrinkage of the spines using chemical techniques, and are advancing its application in vivo.

研究分野：神経科学

キーワード：シナプス

## 1. 研究開始当初の背景

シナプスの構造的基盤である樹状突起スパインの形態変化は、記憶の基盤となると考えられてきた。しかし、光学的な限界から、表層を除く殆どの脳領域では、生体におけるスパイン形態変化の実態は観察困難である。

## 2. 研究の目的

本研究は、新しいプローブにより、生体で直近数時間に増大したスパインを標識した上で、透明化脳または脳切片を観察することで、これまで未知であった脳深部の「スパイン形態変化」をマッピングする。さらに、広範にわたるこれらの増大スパインの機能を探索するため、新しい薬剤依存的スパイン形態操作法を確立することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 特異性の高い増大スパイン標識プローブの開発

遺伝子導入や経時観察が容易な分散培養を用いて、背景染色の少ない新規プローブを探索する。具体的には、タンパク分解を促進する PEST 配列の挿入やユビキチン融合による分解促進を活用して、数時間の学習課題中のスパイン増大を特異的に標識するように改変する。

### (2) 薬剤依存的スパイン形態操作法の開発

記憶関連回路への侵襲を最小限に、脳深部でスパイン形態操作を行うため、薬剤依存的な新規スパイン操作法を考案した。既に単離培養においては、薬剤依存的なスパイン増大・縮小の誘発に成功しているため、本研究では、形態変化に伴い、シナプス強度も変化しているかを、グルタミン酸の二光子アンケーシングによる単一スパイン刺激法を用いて検証する。さらに、脳表層の In vivo イメージングを活用して、生体脳における応用や形態変化の特徴づけを行う。

### (3) 個体学習行動に伴うスパイン増大のマッピング・操作

上記の技術を活用し、個体学習における脳深部のスパイン増大を調査する。学習課題には、構築済みのマウス古典的条件づけ系を用いる。1時間以内に成立するこの学習には、側坐核を中心に、大脳感覚野・運動野・前頭前皮質・海馬・小脳など多領域の関与が示唆されるが、各領域のスパイン可塑性が学習のどの要素の基盤となるかは不明である。そこでまず、血液脳関門透過型アデノ随伴ウイルスベクターAAV-PHP.eBの静脈注入により、全脳に新規プローブおよび細胞形態描出蛍光タンパクを導入する。このとき、Cre/loxシステムを用いて細胞形態描出が可能な染色密度に調整する。条件づけ学習後、脳を透明化し、ライトシート顕微鏡により観察する。解像度の観点からプローブ検出が困難な場合は、脳切片を作成し、コンフォーカル顕微鏡で各領域を観察する。ここで、機械学習によるスパイン自動検出技術を活用して、プローブ発現スパインと、その属する細胞をマッピングする。さらに、免疫染色や逆行性トレーサーと組み合わせ、細胞種・投射先特性を探索する。次に、別の個体に対し、全脳、または上記で検出された各領域局所にプローブを導入する。ここで、薬剤投与により標識スパインの増大・縮小を誘導し、個体行動への効果を解析することで、各領域のスパイン可塑性の機能を明らかにする。

## 4. 研究成果

本研究では、従来の10倍程度の特異性で直近で増大したスパインを標識するプローブの開発に成功して、これを活用して、深部領域を含む脳広範囲で、生体におけるスパイン増大をマッピングする方法の構築を進めてきた。さらにこれら増大スパインの機能を探索する

ため、化学的手法を用いたスパイン操作法を開発し、in vivo における応用を進めている。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1．発表者名 Takeshi Sawada
2．発表標題 Effects of synaptic changes on sleep regulation
3．学会等名 11th IBRO World Congress of Neuroscience（国際学会）
4．発表年 2023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
---------	---------