

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：17601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650209

研究課題名(和文)自由行動下、細胞レベルでの in vivo イメージング装置の開発と場所細胞への適用

研究課題名(英文)Development of a novel in vivo imaging system and its application to place cells

研究代表者

若園 佳彦 (Wakazono, Yoshihiko)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：90377755

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000 円、(間接経費) 870,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究では脳の高次機能解明のため、自由行動下において、行動と神経活動を同時に長期間記録するための in vivo イメージングシステムの開発を試みた。緑色蛍光タンパク質(GFP)発現ウイルスベクターの作製し、マウスの海馬へ注入後、スライス標本により蛍光顕微鏡観察したところ、ウイルス感染に伴う電気生理学的特性を損なうことなく、GFPの明るい蛍光と持続的な発現が認められた。同標本に対し、屈折率分布型(GRIN)レンズを介して蛍光像を取得したところ、像が暗く不鮮明であったことから、システムの基本的な光学系には問題はないが、像の最適化のためには更なるシステム改良が必要であることが今後の課題として残った。

研究成果の概要(英文)：In the present work, we tried to develop a novel in vivo imaging system, which can be equipped with a freely moving animal for a long period, to understand higher brain functions. We first made green fluorescence protein (GFP)-expressing lentivirus vector, and then injected it to mouse hippocampus CA1 region. A few weeks later, strong GFP signals were observed in the region of the acute slice under a fluorescence microscope. In addition, the lentivirus infection had no influence on electrophysiological properties, including long-term potentiation (LTP) expression, of GFP-expressed neurons. Next, we tried to observed fluorescence images of the similar slice via gradient index (GRIN) lens, however, the images were faint. GRIN lens is thought to play a key role in in vivo imaging system because it transfer the images from the inside of the brain to the outside. In the future, therefore, it is necessary to improve the system by increasing signal-to-noise ratio.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学 神経・筋肉生理学

キーワード：in vivo イメージング 自由行動 海馬 神経活動

### 1. 研究開始当初の背景

行動と神経活動の同時記録は、記憶や学習など脳の高次機能の理解に有益な情報を与える。これまでこの同時記録法は、記録電極を脳内に留置する細胞外記録法により行われることが主流であったが、記録細胞の同定や特徴付けなどに限界があった。近年、生体機能分子の可視化技術が急速に進み、細胞内の分子動態を高い時・空間分解能で観察可能となり、この技術の *in vivo* への適用も試みられるようになった。特に、近赤外光を用いる多光子顕微鏡は、非侵襲的に脳内機能分子の動態観察を可能にしたが、光の散乱や吸収などにより、観察可能領域は表面から 600  $\mu\text{m}$  以内に限られた。そこで、脳内深部の機能分子を細胞レベルで観察するための *in vivo* イメージングシステムの開発が待望され、これまで様々なアイデアが提案されてきたが、コンベンショナルな手法は未だ確立されておらず、特に、自由行動下、長期間の観察例の報告はない。

### 2. 研究の目的

本研究では自由行動下、長期間、細胞レベルでの分子動態が蛍光観察できる *in vivo* イメージングシステムの開発を試みる。

脳内深部の機能分子の蛍光イメージの伝搬手段としては直径 1 mm 以下のバンドルファイバーや屈折率分布型 (GRIN) レンズを脳内に刺入することにより、低侵襲的に行う。

バンドルファイバーは、それを構成する個々の単一ファイバーの径が 1 画素に相当し、近年の目覚ましい光通信システムの発展によりその直径が数  $\mu\text{m}$  程度のもまで開発されていることから細胞レベルでの観察は十分に可能であると考えられる。軟性ファイバーの利用は被験体の自由行動を実現するが、蛍光シグナルの伝搬時における大きな損失が見込まれるため、GRIN レンズの利用の可能性についても検討する。

### 3. 研究の方法

(1) *in vivo* イメージングシステムの開発  
イメージングシステムの基本構成を図 1 に示す。

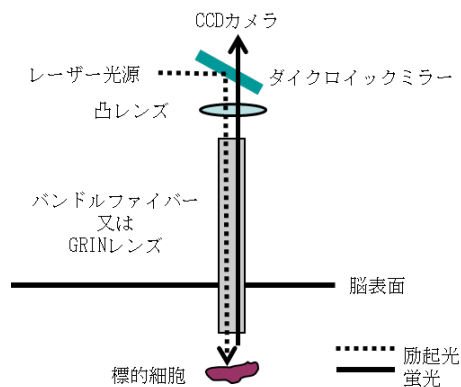


図1 基本光学系

光源からの励起光は、ダイクロイックミラーを介してバンドルファイバー又は GRIN レンズに導入され、末端直下に存在する蛍光タンパク質を発現した神経細胞内の蛍光物質を励起し、蛍光を発する。得られた蛍光は、励起光と同じ光路を逆行し、ダイクロイックミラーにより分離され CCD カメラによって撮像される。

システム開発の初期では、システムの最適化を検討するため、比較的蛍光シグナルの損失が少ないと考えられる GRIN レンズを使用した。

### (2) 遺伝子発現ベクターの作製と脳内注入

外来遺伝子の導入法には、感染効率は若干劣るが、比較的神経毒性が少なく、長期間安定して外来遺伝子を発現すると報告されているレンチウイルスを用いたウイルス感染法を採用した。

はじめに、*in vivo* イメージングシステムの性能を評価するため、比較的発現が安定し、蛍光強度が強い緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現するレンチウイルスベクターを作製した。その際、レンチウイルスベクターの外来遺伝子の導入効率や神経毒性、発現の継続性などについて *in vitro* 系を用いて検討した。

ウイルスベクターの脳内への注入は、4 ~ 6 週齢マウス (C57BL/6J) をケタミン/キシラジン麻酔下、脳定位固定装置を用いて微量注入した。本研究室では、最近、海馬の CA1 錐体細胞層に特異的に現れるシータ波をモニターすることにより、海馬の CA1 錐体細胞層に効率的にウイルスベクターを含む物質を注入することができるシステムを開発しており、このシステムを用いて GFP 発現ベクターを海馬 CA1 領域の神経細胞に局所的に導入した。

### (3) *in vitro* 系による GFP 遺伝子の発現評価

GFP 遺伝子を導入した 2 ~ 3 週間後、海馬の急性スライス標本作製し、蛍光顕微鏡下、遺伝子の導入効率および発現量 (GFP 蛍光強度) を評価した。

また、ウイルス感染に伴う細胞毒性などによる形質転換などについて検討するため、上記のスライス標本において、ホールセルパッチクランプ法を用いて、ウイルス感染の有無による電気生理学的特性の変化についての検討も行った。

### (4) イメージングシステムの *in vivo* 系への適用

本イメージングシステムにおける最重要事項の一つは、脳内の蛍光物質に対し十分な励起光強度を照射することが可能であるか否か、さらに得られた蛍光を如何に効率よく伝搬できるかであると考えられる。そこではじめに、GRIN レンズを介して、脳内の蛍光物

質が観察可能であるか否かを蛍光顕微鏡を利用して検討した。

GFP 遺伝子を導入した 2 ~ 3 週間後、ケタミン/キシラジン麻酔下、蛍光顕微鏡ステージ上において頭部を固定し、脳表を露出させ、GRIN レンズ (直径 1.8mm 又は 0.5mm、Edmund Optics) を脳内部へ刺入し、正立型蛍光顕微鏡により蛍光シグナルを探索、蛍光像の観察を試みた。

#### 4. 研究成果

##### (1) 遺伝子発現ベクターの検討

GFP を発現するレンチウイルスベクターを作製し、シータ波を利用したインジェクションシステムを用いて、マウスの海馬 CA1 領域に注入したところ、2 ~ 3 週間後、海馬の急性スライス標本において、蛍光顕微鏡による観察下、錐体細胞層において強い GFP シグナルが観察された (図 2)。

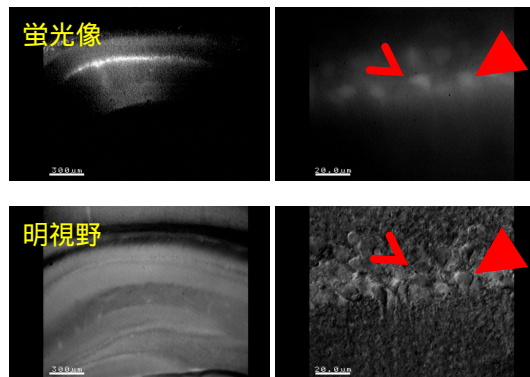


図 2 GFP 遺伝子導入 8 日後の海馬スライス標本

さらにホールセルパッチクランプ法による微小興奮性シナプス後電流 (mEPSC) 解析の結果、ウイルス感染錐体細胞と非感染錐体細胞との間に有意差は認められず、さらに、シェーファー側枝のシータ・パースト刺激による長期増強 (LTP) は共に誘導された (図 3)。

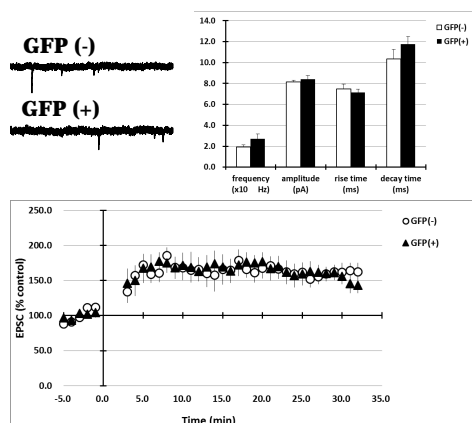


図 3 電気生理学的解析 上段: mEPSC 解析 下段: LTP 誘導

以上の結果から、このウイルスベクターにおいて、ウイルス感染細胞の長期間 (少なくとも 3 週間以上) の生存と外来遺伝子の持続

的発現が確認できた。さらに電気生理学的解析の結果、このウイルスベクターの感染に伴うシナプスの伝達特性や LTP 発現への影響は認められなかった。

##### (2) GRIN レンズを介した蛍光像の取得

GFP 発現ベクターをマウスの海馬 CA1 領域に注入し 2 ~ 3 週間後、麻酔下、頭部を固定した状態で GRIN レンズを脳内に刺入し、このレンズを介した脳内の GFP シグナルの取得を蛍光顕微鏡を利用して試みたところ、蛍光シグナルを得ることはできなかった。

上記の原因が光学系に起因するものか否かを検討するため、急性海馬スライス標本作製し、GRIN レンズを介して同様に蛍光像の取得を試みたところ、蛍光像を得ることはできた (図 4)。しかしながら、その像は暗く、また最適な像を得るためには焦点の微調整などが必要であった。

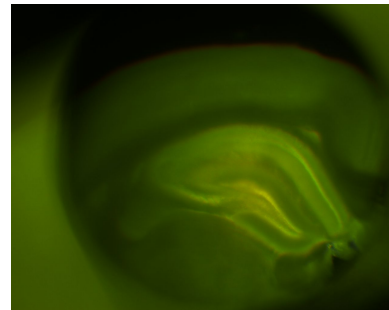


図 4 海馬スライス標本からの GRIN レンズを介した蛍光像。微弱な蛍光シグナルを増幅したため、背景光も大きくなっている。

以上の結果から、イメージングシステムの基本的な光学系には問題はないことが明らかとなったが、像の最適化のためには更なるシステム改良が必要であることが今後の課題として残った。

##### (3) 総括および今後の展望

本研究では、脳の高次機能解明のため、自由行動下において、行動と脳神経活動を同時に長期間記録するための *in vivo* イメージングシステムの開発を試みた。

*in vivo* イメージングシステムの開発において、そのシステムの性能評価は、システム開発を推進する上で非常に重要であると考える。これまでの *in vivo* イメージングシステムの開発では、脳内への蛍光色素の注入やヘルペスウイルスベクターなどによる GFP 遺伝子の導入によりその性能評価が行われてきたが、色素の拡散や細胞毒性などのため蛍光観察が可能な期間が短く、しかもそのシグナルは非常に微弱なことから、システムの性能を十分に評価することは困難であった。しかしながら、今回の成果の一つとして作製された GFP を発現するレンチウイルスベクターは、感染効率及び発現効率が非常に高く、長期間安定して発現し続けることから、今後のイメージングシステムの開発において、その

性能評価を効率良く遂行できるものと期待できる。

次に現時点におけるイメージングシステムの問題点としては、上述した通り、基本的な光学系には問題はないことが明らかとなったが、得られた蛍光像は不鮮明なものであったことから、今後はバンドパスフィルターなどを用いることにより S/N(蛍光シグナル/背景光)比の向上に努める必要がある。また計画当初においては、被験体の自由行動を実現するため軟性バンドルファイバーを用いることにより脳内蛍光イメージを有線的に伝送する予定であったが、伝送時のイメージの損失や近年の CMOS カメラなどの撮像デバイスの小型化や高性能化を考慮すると、撮像デバイスを被験体の頭部に固定し、無線による蛍光イメージを伝送することも被験体の自由行動を実現するための方法の一つであると思われる。そして、その際脳内蛍光物質と頭部撮像デバイスの距離は短いため、その間を繋ぐ光学系として今回検討した GRIN レンズは有効な選択肢の一つとなりえる。

最後に神経活動をモニターするための蛍光タンパク質については、今回作製した GFP 発現ベクターを検討した結果、感染効率や発現効率、発現の継続性などにおいて、発現ベクターとしてレンチウイルスを使用することは極めて有用であることが示された。計画当初においては、膜電位感受性蛍光タンパク質 (VSFP) やカルシウムセンサーなど蛍光強度の変化によって神経活動をモニターする予定であったが、これらの蛍光タンパク質を使用した知見の多くが共焦点顕微鏡などの最適化された条件下において数%の蛍光強度変化をモニターしていることから、現時点で S/N 比で劣る *in vivo* イメージングシステムに適用することは困難であると考えられる。そこで神経活動をモニターするための蛍光タンパク質については、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) などの蛍光色の変化や蛍光の分布変化 (例えば、PKC は神経活動に伴い細胞質から細胞膜へ移行することが報告されている) を利用することがより最善であると考えられる。

自由行動下、行動と脳神経活動を同時に長期間記録するための *in vivo* イメージングシステムは、近い将来実現可能なレベルにまで達しているものと考えられる。

## 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)

[学会発表](計3件)

若園 佳彦、蔦島 譲治、高宮 考悟、  
Development and application examples of selective injection system into hippocampus CA1 via monitored theta oscillation、第91回日本生理学会大会、2014年3月16日~18日、鹿児島

市

若園 佳彦、蔦島 譲治、國武 孝人、高宮 考悟、An application of selective injection system into hippocampus CA1 under monitoring of theta oscillation for analyzing LTP expression、第36回日本神経科学大会 (Neuro2013)、2013年6月20日~23日、京都市

若園 佳彦、蔦島 譲治、スワチャングダ ソングメン、國武 孝人、高宮 考悟、Application of hippocampus CA1-selective gene transfer system for analyzing LTP expression mechanisms、第35回日本神経科学大会、2012年9月18日~21日、名古屋

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

若園 佳彦 (WAKAZONO, Yoshihiko)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：90377755

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

國武 孝人 (KUNITAKE, Takato)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：20234461