

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830060

研究課題名(和文) マーモセットのIn vivo二光子励起カルシウムイメージング法の確立と応用

研究課題名(英文) Chronic macro- and cellular-imaging of brain activity in awake marmosets

研究代表者

松本 圭史 (Matsumoto, Yoshifumi)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：60513463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：マーモセットは、現在多くの神経疾患モデルが作成中であり、これらの疾患解明にとって今後非常に有用な霊長類であると期待されている。しかしながら脳を解析する手法などは未確立である。そこで我々は、覚醒状態で神経細胞を可視化することが出来る実験技術の開発を行った。覚醒状態でマーモセットを拘束することが出来る固定装置の開発や、固定装置への実験個体の馴化トレーニング法の確立、生きたまま観察するための観察窓の作成方法の確立などにより、2光子顕微鏡にて覚醒状態での神経細胞レベルでの観察が可能になった。その結果、麻酔状態における神経活動は覚醒状態におけるものに比べて著しく弱く、覚醒下での観察の必要性が示された。

研究成果の概要(英文)：The common marmoset is an attractive primate. Currently, transgenic animals relative to brain disorders are under development. To investigate the mechanisms underlying brain diseases, we therefore established an experimental methodology to chronically image brain activity in awake marmosets by combining a novel fixation device and habituation training. After identifying the target brain region in the somatosensory cortex by flavoprotein autofluorescent imaging, we expressed a genetically encoded Ca²⁺ indicator, GCaMP6, by recombinant virus. After acclimation training to the body fixation device, macro-imaging of the GCaMP signal revealed a somatotopic map with a high signal-to-noise ratio that was clearer under the awake compared to the anesthetized state. We next investigated the cellular responses with 2-photon Ca²⁺ imaging, and again found a remarkable difference between the two states: sensory-evoked activity was much higher in the awake than in the anesthetized state.

研究分野：神経科学

キーワード：マーモセット 2光子顕微鏡 カルシウムイメージング

1. 研究開始当初の背景

これまで、大脳皮質神経細胞の刺激に対する応答は、マウスなどの非霊長類を対象に、MRI(magnetic resonance response imaging: 核磁気共鳴画像法)やPET(Positron emission tomography: ポジトロン断層法)、2光子励起イメージングなどの脳画像解析により調べられている。しかしマウスは社会性構築能力、視覚プロセッシングなどの高次脳機能が、霊長類に比べて未発達であるため、マウスの研究結果をもとにヒトの脳機能を議論できるかは疑問であり、ヒトのモデル生物としてのマウスの利用には限界がある。

一方、高等霊長類を用いた脳画像解析の分野では、これまでマカクザルやマーモセットを用いてMRIやPETの脳機能マッピングが行なわれて来た。しかしこれら解析技術の時空間分解能の制約により、マクロな解析(数十秒、数mmオーダーでの観察)に留まり、「複数の神経細胞群がどのような時空間パターンで活動変化を示すか」という神経回路網レベルでのミクロな機能解析はなされていない。一方、2光子励起イメージングは、細胞レベルでの観察ができる手法(数ミリ秒、数 μm オーダーでの観察)であるが、高等霊長類では2010年に発表されたマカクザルを対象にした1例しか報告されていない(Heider et al. 2010 PLoS ONE)。このマカクザルを用いた研究では、使用されていたバイオセンサーの性能が低く神経活動を十分に捉えることができなかつたうえに、マカクザルは体長約50cm、体重約9kgと非常に大きく、マカクザルの頭部の大きさに合わせた専用の顕微鏡を自作する必要があり、市販の顕微鏡は用いることができず汎用性に欠けていた。これらの点が障害となり、それ以降進展が見られておらずマカクザルを用いた2光子励起イメージングの難しさを物語っている。これらのことから、実験に扱いやすい霊長類を用い、高解像度で神経細胞の活動を観察することができる手法が求められていた。

これらの問題点を克服するため、我々は2つの改良点を考案した。1つは実験対象としてマーモセットを使用することであり、もう1つは神経細胞の活動をモニターするためのバイオセンサーとして、遺伝子コード型のカルシウムインジケーターであるGCaMP6を使用することである。マーモセットは近年、霊長類で初めてトランスジェニック技術が確立され非常に注目されている。体長は約30cm、体重約300~400gと小型で、おおよそラットと同じ位の大きさである。そのため、市販の顕微鏡の対物レンズ下に十分入り観察することができる。またヒトの疾患モデル生物としても、パーキンソン病や脊髄損傷などの非トランスジェニック型疾患モデルマーモセットも樹立されている。さらにトランスジェニック技

術が確立されているため、将来的には疾患モデルトランスジェニックマーモセットなどを用いた疾患研究への応用も期待できる。一方、本研究で神経細胞の活動をモニターするために使用するGCaMP6は、時間空間的に高解像度でカルシウムの増減を検出することができる。さらに遺伝子コード型であるため、細胞種特異的発現を誘導するプロモーター配列により神経細胞だけに発現を誘導することができる。これらの利点から、我々は、マーモセットの神経細胞の刺激応答をGCaMP6により検出する手法の確立を目指した。

2. 研究の目的

上記先行研究の状況を踏まえ、本研究は以下のステップで展開することを考えた。まず、2光子励起顕微鏡を用いて、マーモセットの神経細胞応答を観察する技術を確立する。この技術により、マーモセットの脳内で神経細胞がどのように活動しているかに関する基礎的知見の集積を進め、非霊長類の反応性との相違点を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究における上記2つの目的の達成に向けて以下の実験を行った。麻酔状態のマーモセットの神経細胞の感覚刺激応答を、2光子励起顕微鏡にて観察する技術を確立した<実験1>。さらに覚醒下でも神経細胞応答を観察するための実験機器の開発や手法を確立した<実験2>。実験1と2で確立した手法により、麻酔下と覚醒下での神経応答の違いを比較した。<実験3>。

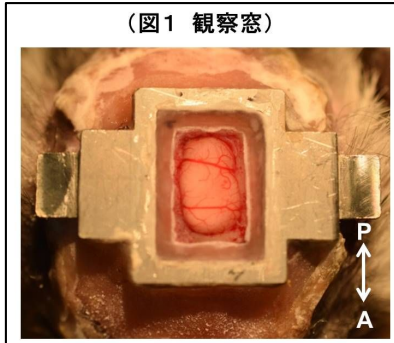
4. 研究成果

麻酔下での神経応答観察技術の確立<実験1>

マーモセットの麻酔下での神経応答を観察するために、我々は、顕微鏡下にマーモセット個体を固定し、吸入麻酔により麻酔状態を維持することができる観察台の開発、観察台に頭部を強固に固定するための器具の開発、頭部に固定器具を装着するための手術方法の確立を行った。

今回、神経細胞応答を観察するターゲットである大脳皮質体性感覚野は頭頂部に位置するが、外部からはどの部分がどの体刺激に対応する領域であるかは判断できない。そこで我々はフラビンイメージングという手法を用いて、マクロ蛍光顕微鏡により、足への電気刺激を与えた時の大まかな脳活動領域を同定した。この方法により同定した脳領域に対して、神経細胞特異的にGCaMP6を発現誘導することができるウイルスベクターを、プレッシャーインジェクター法により注入し、感染させる手法も確立した。また、脳表面を

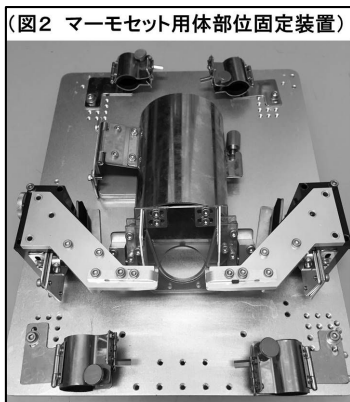
露出させその上にスライドガラスを乗せることにより、2光子顕微鏡で in vivo で観察することができる観察窓の構築方法も確立した(図1)。



これらの手法の確立により、大脳皮質体性感覚野のどの位置が足の感覚刺激に対応しているのかを同定することができ、さらに2光子顕微鏡により神経細胞を生きたまま観察することが可能になった。

覚醒下での神経細胞応答観察技術の確立<実験2>

神経細胞応答は麻酔下と覚醒下とでは反応性が大きく異なることが知られている。その



ため我々は、覚醒下においても神経活動を観察することができる技術の確立を目指した。そのために、マーモセット個体を覚醒状態で拘束することができる、固定装置を開発した(図2)。

さらに、この固定装置でのマーモセット個体の動きを減弱させるために、個体を固定装置に馴化させるためのトレーニングプロトコルも確立した。

これらの手法の確立により、麻酔状態だけでなく、覚醒状態においてもマーモセットの神経細胞応答を観察することに成功した。

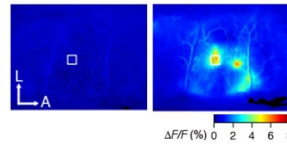
麻酔状態と覚醒状態における神経細胞応答の違い<実験3>

上記実験1と2の結果により、麻酔下と覚醒下における神経細胞応答の違いを比較した。その結果、マクロ蛍光顕微鏡と2光子顕微鏡による観察ともに、麻酔下での神経細胞応答は覚醒下に比べて著しく低いことを明らかにした。(図3)

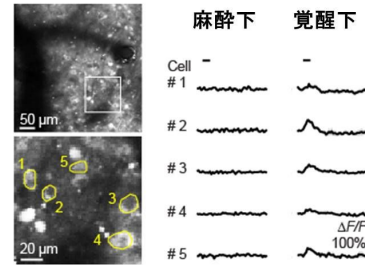
(図3 麻酔下と覚醒下との比較)

マクロイメージング

左図:麻酔下、右図:覚醒下



2光子イメージング



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)

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 1件)

Yoshifumi Matsumoto, Yoshiyuki Yamada, Katsuhiko Mikoshiba

Title: In vivo chronic macroimaging of sensory representation in marmosets

Society for Neuroscience

2015年10月18日~23日 シカゴ

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 圭史 (MATSUMOTO, Yoshifumi)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合

研究センター・研究員

研究者番号：26830060

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：