

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21561

研究課題名(和文)脳深部錐体細胞の反応特異性を決定する樹状突起スパイン活動の機能イメージング

研究課題名(英文)Functional imaging of dendritic spine activity that determines the response specificity of deep brain pyramidal neurons

研究代表者

佐藤 正晃(Sato, Masaaki)

北海道大学・医学研究院・講師

研究者番号：90518325

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：記憶の形成に重要な役割を果たす海馬の錐体細胞は、動物の場所に特異的に活動する「場所細胞」としての性質をもつ。しかし、このような細胞反応の場所特異性がどのようなシナプス活動によって形成されるのかは明らかでない。本研究は、海馬錐体細胞の樹状突起スパインレベルのカルシウムイメージングの手法を確立するために、アデノ随伴ウイルスベクターまたはトランスジェニックマウスにより背側海馬CA1野の錐体細胞にスパイン特異的蛍光カルシウムセンサータンパク質を発現させ、そのin vivoイメージングにおける有用性を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題では、特定のアデノ随伴ウイルスベクターを用いた遺伝子導入により、in vivoイメージングに必要な低密度での細胞標識が可能であることを示す結果が得られた。この成果をふまえ、今後はスパイン特異的蛍光カルシウムセンサータンパク質の発現によって樹状突起スパインの形態や密度が変化しないことを確認し、もしこれらに影響しなければ、マウスがバーチャル環境で空間学習するときの樹状突起スパイン活動の慢性イメージングへと進む計画である。このように、本研究課題の成果は、海馬の錐体細胞が行う情報処理の原理を理解する上で重要なステップとなるものである。

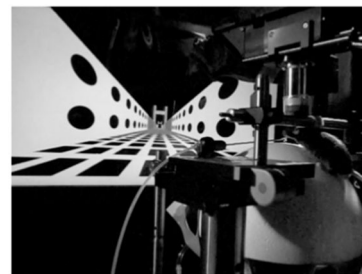
研究成果の概要(英文)：Hippocampal pyramidal cells play an essential role in memory formation and have the property of "place cells" that exhibit location-specific activity. However, it is unclear by what synaptic activity the location specificity of their responses emerges. To establish a method for calcium imaging of the dendritic spine activity of hippocampal pyramidal cells, a spine-specific fluorescent calcium sensor protein was expressed in the pyramidal cells in the dorsal hippocampal CA1 area using adeno-associated viral vectors and transgenic mice, and its usefulness in in vivo imaging was investigated.

研究分野：神経科学

キーワード：二光子レーザー顕微鏡 カルシウムイメージング 樹状突起スパイン

1. 研究開始当初の背景

記憶の形成に重要な役割を果たす海馬の錐体細胞は、動物の場所に特異的に活動する「場所細胞」としての性質をもつ。われわれはこれまで、頭部固定下のバーチャルリアリティ空間で訓練したマウスの海馬 CA1 野では、学習が進むに従って、場所細胞が次第に増加しその反応が安定化すること、また報酬地点とランドマーク地点の場所細胞の増加が異なる分子メカニズムによって起こることなどを明らかにした (Sato et al., Cell Rep., 2020)。さらに、自閉スペクトラム症 (ASD) モデルマウスの一つである Shank2 欠損マウスの海馬の場所細胞地図では、報酬地点で活動する場所細胞が過剰に増加している一方で、ランドマーク地点で活動する場所細胞の増加が起こらないことを明らかにした (Sato et al., Cell Rep., 2020)。しかし、このような海馬の錐体細胞の反応の場所特異性 (場所受容野) の形成とその可塑的变化が、どのようなシナプス活動によって起こるのかは明らかでない (図 1)。樹状突起スパインは微細な構造であり、その活動を光学的に記録するには、近年多用される一光子励起のヘッドマウント型小型蛍光顕微鏡の解像度では不十分である。従って現在のところ、二光子レーザー顕微鏡による高解像度のカルシウムイメージングが最も適した手法であると考えられる。他の脳領域については、例えば大脳皮質の錐体細胞の樹状突起スパインのカルシウムイメージングはすでに行われている。しかし、海馬錐体細胞のスパイン密度は大脳皮質錐体細胞に比べて高く、またスパインネックも短いために、個々のスパインを十分に分離してイメージングすることは、大脳皮質の場合よりもはるかに技術的に困難である (図 2)。



細胞が特定の場所で活動するとき
個々のシナプスはどこで活動するか？

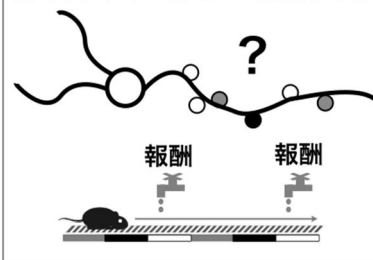


図 1: 頭部固定下のバーチャルリアリティ環境をナビゲーションするマウス (上)。細胞体の反応特異性とシナプスの反応特異性の関係を示す概念図 (下)。

2. 研究の目的

本研究は、スパイン特異的蛍光カルシウムセンサータンパク質の *in vivo* イメージングにおける有用性を検討することにより、海馬錐体細胞のスパインレベルのカルシウムイメージングの手法を確立することを目的とした。

蛍光カルシウムセンサータンパク質は、細胞内のカルシウムイオンと結合することによりその蛍光強度が変化するタンパク質である。通常よく用いられる G-CaMP 型センサーを単体として錐体細胞に発現させる代わりに、細胞骨格タンパク質であるアクチンと融合させた G-CaMP6-actin (Ohkura et al., PLOS ONE, 2012) を発現させることにより、樹状突起上に密集して存在する海馬錐体細胞の個々のスパインを、より明瞭に分離してイメージング可能になることが期待できる。

3. 研究の方法

マウスの背側海馬 CA1 野の錐体細胞に G-CaMP6-actin を発現させる方法を検討した。樹状突起スパインにおける錐体細胞の情報処理メカニズムを明らかにするには、イメージングした樹状突起をもつ細胞体を同定できなければならない。そのためには蛍光カルシウムセンサータンパク質で標識した細胞の密度が十分低い必要がある。そこで、第一の方法として、力価を低めに希釈したアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを C57BL/6 マウスの CA1 野に微量注入した。プロモーターは神経細胞特異的に外来遺伝子を発現することが知られているプロモーターを複数用いて比較検討した。

また第二の方法として、G-CaMP6-actin を脳に安定的に発現する Thy1-G-CaMP6-actin-mCherry トランスジェニックマウス (理化学研究所パイオリソースセンターから入手可能) を用いたアプローチを試みた。

上記の方法で G-CaMP6-actin で標識されたマウスの海馬 CA1 錐体細胞を、背側海馬の上に位置

海馬スパインのイメージングがなぜ難しいか？

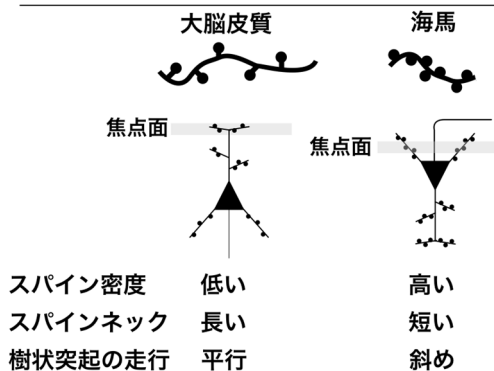


図 2: *in vivo* イメージングする上で問題となる海馬のスパインの特徴

ないスパイン活動をスパイン特異的な活動とし、麻酔下の自発的スパイン活動をイメージングした。*in vivo* イメージング後は固定脳切片における G-CaMP6-actin 発現細胞を蛍光顕微鏡で観察し、その発現強度と細胞分布を評価した。

4. 研究成果

はじめに、海馬 CA1 野錐体細胞の樹状突起スパインの標識方法について検討した。まずスパインに優先的に局在する蛍光カルシウムセンサータンパク質 G-CaMP6-actin を神経細胞特異的な Thy1 プロモーター下に発現するトランスジェニックマウスを用いて実験を行った。このマウスの脳にイメージングウインドウを埋め込み、海馬の錐体細胞を二光子レーザー顕微鏡でイメージングしたところ、stratum oriens 層の樹状突起の 1 本 1 本を明確に分離して観察することが難しかった。固定した脳を摘出し切片を作成して蛍光顕微鏡で確認したところ、これは標識される細胞の密度が高すぎるのが原因であると考えられた。

そこで次に、標識細胞の密度を下げるために、この蛍光カルシウムセンサータンパク質を神経細胞特異的なプロモーター下に発現する AAV ベクターを作成して海馬に注入し、二光子レーザー顕微鏡で観察したところ、より少ない数の細胞が標識されているのが確認できた。標識された細胞の樹状突起の領域を拡大してイメージングすると、スパインが存在すると考えられる箇所により強い点状の蛍光シグナルが認められ、タイムラプスイメージングによって、スパイン活動に伴う蛍光強度の変化が観察できた。しかし、その後、アデノ随伴ウイルスベクターの力価を下げて、再現性の良い *in vivo* イメージングに十分な低い密度（視野内に数個程度）で細胞を標識することができなかった。そこで、神経細胞特異的なプロモーター下に Cre 組み換え酵素を発現する AAV ベクターと、Cre による組み換え依存的に蛍光カルシウムセンサータンパク質を発現する AAV ベクターを混合して注入する方法を試みた。異なる Cre 発現 AAV ベクターを用いて数種類の組み合わせを試したところ、特定のベクターの組み合わせによって、二光子レーザー顕微鏡の視野内に数個程度の細胞だけを標識できることが確認できた。

本研究課題で得られた知見と実験ノウハウの蓄積は、海馬の錐体細胞の樹状突起スパイン活動のイメージングに向けた技術的基礎の確立のために有用なものであると考えられる。今後の計画としては、G-CaMP6-actin の発現によって樹状突起スパインの形態や密度が変化しないことを、微細な細胞構造を染色することのできるゴルジ染色などを用いた手法で確認する。その結果、G-CaMP6-actin の発現がこれらに影響しなければ、マウスがバーチャル環境で空間学習するときの樹状突起スパイン活動のイメージング実験へと発展させる予定である。特にわれわれは、これまでの研究でバーチャル空間内で報酬やランドマークの存在する地点をコードする場所細胞が CA1 野で増加することを見出していることから、このような行動上重要な意味をもつ場所をコードする錐体細胞のスパイン活動について、場所受容野の可塑性に伴うその変化を明らかにしていく計画である。

する大脳皮質を一部吸引除去して埋め込んだウインドウ（直径 2.5mm、高さ 1.0 のステンレス製リングの底面にカバーガラスを接着したもの）越しに、1%イソフルラン麻酔下でイメージングした (Sato et al., PLOS ONE, 2015)。イメージングは 16 倍の対物レンズを装着した二光子レーザー顕微鏡を用いて、8~20 倍程度のズームをかけた条件で行い、樹状突起に光傷害を起こさない程度のパワーのレーザーで、7.5 フレーム/秒以上のスキャン速度でイメージングできる条件を探索した。G-CaMP6-actin の励起波長は 910nm で行った。活動電位の逆行性伝搬由来のカルシウム反応を除外するために、樹状突起シャフトと同期し

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 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sato Masaaki, Mizuta Kotaro, Islam Tanvir, Kawano Masako, Sekine Yukiko, Takekawa Takashi, Gomez-Dominguez Daniel, Schmidt Alexander, Wolf Fred, Kim Karam, Yamakawa Hiroshi, Ohkura Masamichi, Lee Min Goo, Fukai Tomoki, Nakai Junichi, Hayashi Yasunori	4. 巻 32
2. 論文標題 Distinct mechanisms of over-representation of landmarks and rewards in the hippocampus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 107864
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2020.107864	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 Mizuta Kotaro, Nakai Junichi, Hayashi Yasunori, Sato Masaaki	4. 巻 31
2. 論文標題 Multiple coordinated cellular dynamics mediate CA1 map plasticity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hippocampus	6. 最初と最後の頁 235 ~ 243
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/hipo.23300	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤正晃
2. 発表標題 バーチャル環境下での脳活動イメージング：脳の動作原理の解明と疾患研究への応用
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

脳内地図を細胞レベルで観察 - 自閉症関連遺伝子Shank2はランドマーク情報に必須 -
https://www.riken.jp/press/2020/20200708_1/index.html

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