

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430011

研究課題名(和文) 背側海馬と腹側海馬の活性化に应答する脳領域の特定とその活動解析

研究課題名(英文) Investigation of brain-wide responses evoked by optogenetic activation of the dorsal or ventral hippocampus

研究代表者

高田 則雄 (takata, norio)

慶應義塾大学・医学部・特任講師

研究者番号：50415212

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、背側海馬と腹側海馬の機能の違いが、海馬から他の脳領域への活動伝播の違いに反映されているか検証した。海馬CA1錐体神経細胞に光感受性陽イオンチャネル(ChR2)が発現している遺伝子改変マウスを用いて、全脳活動を機能的MRI(fMRI)装置で計測している最中に、海馬の背側あるいは腹側へ光照射することで海馬神経細胞を活性化し、これに应答する脳領域を特定した。この結果、海馬の背側と腹側とを活性化した時に应答する脳領域群が異なることを見出した。さらに、海馬の遠心性軸索線維の多寡と、海馬活動への应答の大きさは必ずしも対応しないことを見つけた。

研究成果の概要(英文)：The dorsal and ventral hippocampal regions (dHP and vHP) are proposed to have distinct functions. Nevertheless, the extra-hippocampal influences of dHP and vHP activities remain unclear. In this study, we compared the spatial distribution of brain-wide responses upon dHP or vHP activation. To achieve this, we performed optogenetic fMRI using an anesthetized transgenic mouse, whose CA1 pyramidal neurons expressed a step-function opsin variant of channelrhodopsin-2 (ChR2). Activation at the dHP, but not the vHP, evoked BOLD responses at the retrosplenial cortex (RSP), which is in line with anatomical evidence. In contrast, BOLD responses at the lateral septum (LS) were induced only upon vHP activation, even though both dHP and vHP send axonal fibers to the LS. Our findings suggest that the primary targets of dHP and vHP activation are distinct, which concurs with attributed functions of the dHP and RSP in spatial memory, as well as of the vHP and LS in emotional responses.

研究分野：総合領域

キーワード：光遺伝学 fMRI ChR2 遺伝子改変マウス マウス

1. 研究開始当初の背景

ごく最近、光感受性蛋白質(チャンネルロドプシン)を発現している遺伝子改変マウス(Tgマウス)の背側海馬を光照射によって活性化すると、Tgマウスが駆け回り始めることが判明した [1]。この結果は従来知見では理解困難である。なぜならば解剖学的に背側海馬が前頭前野などへ投射することは知られているが、背側海馬がそれらの領域をどのように活性化するのか、また、それらの活動がどこへ伝播して行動へ繋がるのか不明だからである。脳活動と行動との関係を理解するには、それぞれの脳領域に関する詳細な知識だけでなく、脳領域間の相互作用を知る必要がある。この目的のために海馬は最適である。なぜならば海馬自身について膨大な知識が蓄積されており、また光照射によって海馬だけを特異的に活性化できるマウスが存在するからである。空間的認知機能を担うとされている背側海馬に対して、腹側海馬は情動機能に関与する可能性がある [2]。異なる機能に対応する背側と腹側の海馬神経活動が、脳の他の領域へそれぞれどのように伝播して行くのか、その様式に違いがあるのかなど不明である。

脳領域間の相互作用については fMRI を用いた研究が盛んである。しかし fMRI は神経活動を直接には検出しておらず、脳の血流動態を計測している。また fMRI の時間分解能は 1 秒程度であり、ミリ秒単位で生じる神経細胞の電気的活動を捉えられない欠点がある。神経細胞の電気的活動を計測する方法として多点細胞外電気生理(以下、電気生理)計測がある。この計測を複数の脳領域から同時に行って、脳領域間の神経活動の相関関係が研究されている。しかし電極を刺入する必要があるために、同時に計測できる脳領域は実際上数か所に制限されており、それ以外の脳領域で何が生じているかは全く分からない。またこれら二つの計測法(fMRI、電気生理)をそれぞれ単独で用いていた従来研究では、脳活動を受動的に観察していた。そのため活動を検出した脳領域間に相互作用が存在するのか、それとも単に活動が同期しているだけなのか決定できなかった。

	長所	短所
fMRI	神経活動の全脳探索が可能	低い時間分解能・血流応答を計測
電気生理	ミリ秒の神経活動を計測可能	計測場所は電極刺入部位のみ

参考文献

- [1] Tanaka et al., 2012 Cell Rep
- [2] Fanselow and Dong, 2010 Neuron

2. 研究の目的

背側海馬と腹側海馬の機能の違いが、海馬から他の脳領域への活動伝播の違いに反映されているか検証することを目的とした。

3. 研究の方法

そのために本研究課題では、海馬神経細胞に光感受性蛋白質を発現している遺伝子改変マウスを用いて、(1)機能的 fMRI (fMRI) 装置による計測の最中に、海馬の腹側あるいは背側へ光照射することで海馬神経細胞を活性化し、これに応答する脳領域(場所)を特定した、また(2)特定した脳領域から多点細胞外電気生理計測を行い、海馬活性化に応答する脳領域の順序(時間)を決定した。

4. 研究成果

本研究では、脳領域間の機能的結合と構造的結合とを全脳比較することを試みた。具体的には、背側海馬と腹側海馬を光活性化した時に、異なる脳領域群が応答することを示した。本研究は、マウスに対する光遺伝学的 fMRI (opto-fMRI) として最初の報告となった (Takata et al., PLoS One 2015, PMID:25793741)。遺伝子改変動物が豊富に存在するマウスを用いた opto-fMRI が実現したことで、さまざまな応用研究を期待できる。以下成果を詳述する。

本課題では初年度に、光遺伝学的 fMRI (opto-fMRI) の計測系を確立した。マウス専用的高感度 MRI 検出器 (CryoProbe) を用いた opto-fMRI としては初めての試みである。

翌年度にはこの opto-fMRI 計測系と、海馬神経細胞に光感受性蛋白質 (ChR2) を発現している遺伝子改変マウス (Tg マウス) とを組み合わせた。fMRI 装置による計測の最中に、麻酔下 Tg マウスの海馬腹側あるいは背側へ光照射して海馬神経細胞を活性化し、これに応答する脳領域(場所)を全脳計測した。この結果、背側海馬と腹側海馬を活性化した時に応答する脳領域群が異なることを見出した。

また興味深いことに、海馬の遠心性軸索線維の多寡と、海馬活動に反応する脳領域とは必ずしも対応していなかった。具体的には、対応が見られた脳部位は海馬台や嗅内皮質であった。つまり海馬からの神経線維を強く受け取る脳領域であるそれらの脳領域は、海馬活性化に対して強く応答(BOLD 信号)した。この一方で海馬歯状回や CA3 領域は、海馬 CA1 錐体神経細胞から直接の神経線維投射を受けないにも関わらず強い BOLD 応答を示した。さらに、外側中核は背側海馬と腹側海馬の両方から同程度の神経線維を受け取るにも関わらず、腹側海馬の活性化に対してだけ BOLD 応答を示した。

以上の結果は、脳のある部位が活性化した時に、大きな影響を受ける脳部位を予測するには神経線維投射の知識だけでは十分でないことを示唆する。なお BOLD 応答を示した

脳部位から電気生理計測も行った。例えば海馬を光活性化したところ、背側海馬および腹側海馬において波が増大した。一方で、シータ波は背側海馬だけで増大した。BOLD 信号（計測間隔 1.5 秒）で計測すると、海馬の CA1 領域と DG 領域は同時に応答した。電気生理計測を行ったところ、LFP 応答は CA1 領域の方が DG よりも数十ミリ秒早かった。以上の結果は論文として発表済みである (PMID:25793741)。

最終年度には CryoProbe を用いた fMRI 計測を覚醒状態のマウスから行うための手法を確立した。この結果をまとめた論文は査読中である。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

- 1) 高田則雄, 2016. 海馬神経細胞 ~ 光遺伝学的 fMRI を用いた全脳活動解析. 分子精神医学 16, 11-17. 査読なし
- 2) Yoshida, K., Xu, M., Natsubori, A., Mimura, M., Takata, N., Tanaka, K.F., 2015. Identification of the extent of cortical spreading depression propagation by Npas4 mRNA expression. *Neurosci. Res.* 98, 1-8. DOI:10.1016/j.neures.2015.04.003 査読有り
- 3) Takata, N., Yoshida, K., Komaki, Y., Xu, M., Sakai, Y., Hikishima, K., Mimura, M., Okano, H., Tanaka, K.F., 2015. Optogenetic activation of CA1 pyramidal neurons at the dorsal and ventral hippocampus evokes distinct brain-wide responses revealed by mouse fMRI. *PLoS ONE* 10, e0121417. DOI:10.1371/journal.pone.0121417 査読有り
- 4) Natsubori, A., Takata, N., Tanaka, K.F., 2015. Observation and manipulation of glial cell function by virtue of sufficient probe expression. *Front Cell Neurosci.* 176, 1 - 7. DOI:10.3389/fncel.2015.00176 査読有り
- 5) Aida, T., Yoshida, J., Nomura, M., Tanimura, A., Iino, Y., Soma, M., Bai, N., Ito, Y., Cui, W., Aizawa, H., Yanagisawa, M., Nagai, T., Takata, N., Tanaka, K.F., Takayanagi, R., Kano, M., Götz, M., Hirase, H., Tanaka, K., 2015. Astroglial Glutamate Transporter Deficiency Increases Synaptic Excitability and Leads to Pathological Repetitive Behaviors in Mice. *Neuropsychopharmacology* 40, 1569 - 1579. DOI:10.1038/npp.2015.26 査読有り
- 6) Ishii, K., Kubo, K.-I., Endo, T., Yoshida, K., Benner, S., Ito, Y., Aizawa, H., Aramaki, M., Yamanaka, A., Tanaka, K., Takata, N., Tanaka, K.F., Mimura, M., Tohyama, C., Takeyama, M., Nakajima, K., 2015. Neuronal Heterotopias Affect the Activities of Distant Brain Areas and Lead

to Behavioral Deficits. *J. Neurosci.* 35, 12432 - 12445. DOI:10.1523/JNEUROSCI.3648-14.2015 査読有り

7) Takata, N., Shinohara, Y., Ohkura, M., Mishima, T., Nakai, J., Hirase, H., 2014. Imaging of Astrocytic Activity in Living Rodents. *NeuroMethods, Neuromethods* 85, 191-207. 査読有り

8) Hirase, H., Iwai, Y., Takata, N., Shinohara, Y., Mishima, T., 2014. Volume transmission signalling via astrocytes. *Phil. Trans. R. Soc. B* 369, 20130604. DOI:10.1098/rstb.2013.0604 査読有り

9) 高田則雄, 2014. 光遺伝学とマウス fMRI を融合させた脳領域間作用の解析. 細胞工学 33, 281-285. 査読なし

10) Takata, N., Nagai, T., Ozawa, K., Oe, Y., Mikoshiba, K., Hirase, H., 2013. Cerebral blood flow modulation by Basal forebrain or whisker stimulation can occur independently of large cytosolic Ca<sup>2+</sup> signaling in astrocytes. *PLoS ONE* 8, e66525. DOI:10.1371/journal.pone.0066525 査読有り

11) 田中謙二, 高田則雄, 三村将, 2013. in vivo でグリアを見る・操作するための機能遺伝子発現方法. 実験医学 31, 1736-1741. 査読なし

12) 田中謙二, 高田則雄, 三村将, 2013. オプトジェネティクスと精神医学. 精神神経学雑誌 115, 1211-1215. 査読なし

13) 田中謙二, 高田則雄, 三村将, 2013. 精神疾患の解明に貢献する脳科学技術の進歩 オプトジェネティクスと精神医学. 精神神経学雑誌 115, 1211-5. 査読なし

14) 高田則雄, 岡野栄之, 田中謙二, 2013. 光遺伝学と機能的 MRI とを用いたグリア細胞研究. 応用薬理 85, 48. 査読なし

〔学会発表〕(計 14 件)

1) 高田則雄 Optogenetic fMRI for the study of BOLD signal induction by astrocytes 第 89 回日本薬理学会 2016.3.9 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

2) 高田則雄 光遺伝学的 fMRI を用いたアストロサイトによる BOLD 信号発生の研究 Neurovascular Unit 研究会 2016.1.23 慶應義塾大学医学部(東京都新宿区)

3) 高田則雄 Optogenetic-fMRI for investigation of neuronal and glial contribution to BOLD signal 第 38 回日本神経科学会 2015.7.29 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

4) 高田則雄 Optogenetic-fMRI for investigation of astrocytic contribution to BOLD signal The 9th International Conference on Complex Medical Engineering

(CME2015) 2015.6.20 岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)

5) 高田則雄 光遺伝学的 fMRI の現状と展望 第一回マウス精神疾患モデル MRI 研究会 2015.1.10 慶應義塾大学医学部(東京都新宿区)

6) 高田則雄 光遺伝学とマウス fMRI を融合させた海馬活動伝播形式の全脳解析 慶應義塾大学医学部第 95 回 Brain Club 2014.11.7 慶應義塾大学医学部(東京都新宿区)

7) 高田則雄 光遺伝学とマウス fMRI とを融合させた脳領域間の活動伝播様式の解明 京都大学非線形動力学セミナー 2014.11.5 京都大学(京都府京都市)

8) 高田則雄 光遺伝学とマウス fMRI を融合させた脳領域間相互作用の解析 第 6 回光操作研究会 2014.8.22 東北大学医学部(宮城県仙台市)

9) 高田則雄 光遺伝学とマウス fMRI を用いた脳領域間の結合特性の解析 東京工業大学脳研究会講演会 2013.12.12 東京工業大学すずかけ台キャンパス(神奈川県横浜市)

10) Norio Takata, Yuji Komaki, Yuki Sakai, Keitaro Yoshida, Ming Xu, Keigo Hikishima, Hideyuki Okano, Masaru Mimura, Kenji Tanaka Dorsal and ventral hippocampal CA1 pyramidal neurons activate distinct brain area: optogenetic investigation using mouse fMRI Society for Neuroscience 43rd annual meeting 2013.11.9 サンディエゴ(米国)

11) 高田則雄 光遺伝学と機能的 MRI とを用いたグリア細胞研究 第 15 回応用薬理シンポジウム Annual Symposium on Pharmacometrics 2013.9.28 品川コクヨホール(東京都品川区)

12) Norio Takata, Keitaro Yoshida, Yuji Komaki, Ming Xu, Yuki Sakai, Keigo Hikishima, Hideyuki Okano, Masaru Mimura, Kenji Tanaka Quantifying efferent connectivity of dorsal and ventral hippocampus with opto-fMRI. 第 5 回光操作研究会 International symposium on optogenetics 2013.9.26 慶應義塾大学北館(東京都港区)

13) 吉田慶多朗、小牧裕司、徐明、疋島啓吾、岡野栄之、三村將、田中謙二、高田則雄 マウス fMRI と光遺伝学とを組み合わせた脳活動伝播計測系の構築 Combination of mouse fMRI and optogenetics for measurement of brain activity propagation 第 36 回日本神経科学会・第 56 回日本神経化学会・第 23 回日本神経回路学会 2013.6.22 京都国際会館(京都府京都市)

14) 高田則雄、永井てるみ、小澤克也、御子柴克彦、平瀬肇 前脳基底部刺激および感覚刺激はアストロサイト Ca<sup>2+</sup>シグナルとは独立に脳血流変化を起こす Cerebral blood flow modulation by basal forebrain or whisker stimulation occurs independent of astrocytic Ca<sup>2+</sup> signaling 第 36 回日本神経科学会・第 56 回日本神経化学会・第 23 回日本神経回路学会 2013.6.21 京都国際会館(京都府京都市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高田則雄(takata norio)  
慶應義塾大学・医学部・特任講師  
研究者番号: 50415212

### (2) 研究分担者

#### (3) 連携研究者

田中 謙二(tanaka f. kenji)  
慶應義塾大学・医学部・准教授  
研究者番号: 30329700

疋島 啓吾(hikishima keigo)  
公益財団法人実験動物中央研究所・病理病態研究部・研究員  
研究者番号: 30420219

小牧 裕司(komaki yuji)  
公益財団法人実験動物中央研究所・病理病態研究部・研究員  
研究者番号: 10548499