

平成 30 年 5 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26250003

研究課題名(和文) 神経線維イメージングを用いた脳回路原理の探究

研究課題名(英文) Exploring the brain circuit principles using nerve fiber imaging

研究代表者

池谷 裕二 (Ikegaya, Yuji)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・教授

研究者番号：10302613

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 30,700,000円

研究成果の概要(和文)：光学測定系を工夫・改善し、300個以上のシナプスから100 Hzという高速での撮影を可能にした。この革新的な新技術を用いて、
i) 海馬CA3野樹状突起の回路演算様式を解析した結果、興奮性入力と抑制性入力のバランスが線維の局所では崩れていることを見出した。この結果はCell Report誌で発表した。
ii) 経験によって一度活動したCA1野神経細胞は、上流のCA3野からの精密な軸索回路による特異的な入力によって再活性化すること、また樹状突起イメージングを行うことで、この再活動そのものを繰り返すことによって再活性化する細胞セットの精度が高まることを発見した。この結果はScience誌に報告した。

研究成果の概要(英文)：We devised and improved the optical system, which now allows us to image over 300 spines at a high speed of 100 Hz. Using this new technology:
i) we captured dendritic computations of pyramidal cells of the Hippocampal CA3 field. Large-scale analyses of the dendritic computations in terms of the circuit operation principle revealed that the balance between excitatory and inhibitory inputs collapsed locally. We published these results in Cell Reports.
ii) Hippocampal CA1 neurons that had been activated by environmental exploration were reactivated by specific synchronous inputs from precisely woven neuronal circuits in the upstream CA3 field. Using optical time-lapse imaging of dendrites, we discovered that the precision of cells to be activated gradually increases by repeating the synchronous activity itself. We published these results in Science.

研究分野：神経科学

キーワード：神経線維 樹状突起 軸索 カルシウム

1. 研究開始当初の背景

神経細胞はシナプス入力を受容し、出力へと変換する回路素子である。神経細胞が伸ばす線維（樹状突起と軸索）は神経情報処理の主要な場である。しかし神経線維は微小構造であるため物理的なアクセスが難しく、線維演算の実態は未解明である。入力情報の大半は樹状突起で受け取られ、細胞体へと伝えられる。この過程は非線形である。すなわち、シナプス入力は、そのまま単純加算的に細胞体の脱分極を引き起こすわけではなく、複雑な形をした樹状突起のどこで、いつ、どのように生じるかによって細胞体に及ぼす影響が異なる。したがって、神経回路の動作原理を解明するには、i)人工的な刺激で誘導したシナプス活動でなく、自然に生じる入力パターンで実験する必要がある、ii)多数のシナプスから同時に記録する必要がある。この2つの要請に沿った研究の流れは、Arthur Konnerth らの研究グループの技術開発により、先陣が切られた (Nature 464:1307, 2010; Nature. 475:501, 2011)。彼らは複数のスパイン（シナプス後部構造）のカルシウム動態を通じてシナプス入力を可視化し、自然なシナプス活動の *in situ* パターンを初めて明らかにした。しかし、同時に記録できるシナプス数は 20 個程度であり、撮影速度も遅く、より精細かつ大規模な記録法の出現が待たれていた。私たちは光学系を工夫・改善することで、300 個以上のスパインから、しかも 100 Hz という高速での同時撮影が可能となった。この技術は世界を完全にリードしており、ここに至ることで、ようやく「樹状突起演算」を本格的に研究できる段階に到達した。

2. 研究の目的

上記で記載した新技術を用い、CA3 野樹状突起演算 (dendritic computation) の実体を、大規模に捉え、その回路演算様式を確認する。この結果はのさらに回路下流の CA1 野において、軸索の正確な投射によってどのような神経活動が再現されるのか、それが経時的にどのように変化するかを追究した。なお、前者の解析の結果、興奮性入力と抑制性入力のバランスが局所では崩れていることを見出し、Cell Report 誌で発表し、さらに続報を Nat Neurosci 誌に投稿中である。また後者の実験の結果、経験によって活動した CA1 野の神経細胞はその上流の CA3 野からの精密な神経線維回路による特異的な同期入力によって再活性化すること、また樹状突起イメージングを行うことで、この同期再活動そのものを繰り返すことによって活性化する細胞の精度が次第に高まることを発見した。この結果は Science 誌に報告した。

3. 研究の方法

記録は、32-33 °C で、海馬 CA3 錐体細胞より行った。記録は、MultiClamp 700B amplifier と Digidata 1550 digitizer で行い、pCLAMP10.5

software (Molecular Devices) で制御した。ガラス電極 (3-6 M Ω) は、細胞内液を充填して使用した。細胞内液の組成は (mM)、47.7 CsMeSO₄, 92.3 CsCl, 10 HEPES, 10 phosphocreatine, 4 MgATP, 0.3 NaGTP, 10 QX-314, 0.2 fluo-4 とした。一部の実験では、電極には picrotoxin (200 μ M) を含む細胞内液を充填した。記録は、NMDA 受容体を介した Ca²⁺流入を増強するため、-30mV に細胞を固定して行った (Takahashi et al., 2012)。固定電位-30mV で EPSC を記録するために、細胞内液の塩化物イオン濃度を $E_{Cl^-} = -10$ mV となるように調整した。シグナルはノイズを最小限に抑えるために、5-10 倍増幅し、1 kHz の low-pass フィルターにかけ、20 kHz で取得した。撮影は、一秒当たり 100-333 frame/s で、ニポウ型共焦点顕微鏡 (CSUX-1, Yokogawa Electric)、CMOS カメラ (ORCA-Flash4.0 V2, Hamamatsu Photonics)、水浸レンズ (60 \times , 1.0 numerical aperture, Nikon) で行った。画像取得には、専用のソフト (HSR, Hamamatsu Photonic) を使用した。蛍光色素は、argon-krypton laser (641-YB-A01; Melles Griot) を用いて、488 nm (0.2-0.4 mW) で励起し、500 nm long-pass emission フィルターで可視化した。蛍光変化率 $\Delta F/F$ は、 $(F_t - F_0)/F_0$ として計算した。 F_t は、時間 t における蛍光強度を、 F_0 はベースの蛍光強度を意味している。スパインの蛍光強度上昇の onset は半自動的に検出した (Szymanska et al., 2015)。

Arc-dVenus トランスジェニックマウスは岐阜大学医学系研究科山口瞬先生にご提供いただいた (Eguchi and Yamaguchi, 2009)。このマウスのトランスジェニックコンストラクトは、マウスのゲノム DNA から得られた 7.1 kbp の *Arc* プロモーター領域と、改変型 GFP である Venus (Nagai et al., 2002) に不安定領域を付加した destabilized Venus を結合させた DNA 配列である。dVenus は Venus 遺伝子に、タンパク質の分解シグナルである CL1 と PEST を含む pGL3 と、mRNA の分解シグナルである AU-rich 配列を付加している。Venus の mRNA、タンパク質の分解性を高めることで、Venus タンパク質の発現時間の特異性を高めている。このマウスは C57BL/6 と DBA/2 の血統の交配により作成されたが、その後 8 代以上日本 SLC より購入した C57BL/6 と交配させた後、遺伝的に *Arc-dVenus* 遺伝子をホモに持つマウスを作成した。実験には、作成されたホモ、もしくは WT との交配によって生まれたヘテロトランスジェニックマウスを用いた。

海馬スライス標本から SW を記録しながら、FV1000 二光子レーザー顕微鏡 (Olympus) を用いて Thy1-GFP マウス (Feng et al., 2000) の樹状突起層を 20 分おきに撮影した。二光子レーザー顕微鏡は光源として、100 fs のパルス幅、80 MHz の周波数でモード同期発振するチタンサファイアレーザー (Maitai, Spectra Physics, Mountain View, CA) を搭載し

ている。900 nm で励起し、水浸対物レンズ(25 ×, 1.05 NA, Olympus)を用いて Z 軸に沿って 2 μm ごとに画像を取得した。スパインの体積は撮影したスパインの面積から半径を計算し、スパインを球と仮定して算出した。解析には、NIH ImageJ (US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いた。

4. 研究成果

本研究では自然なシナプス入力に注目するため、多数の自発的な神経活動が観察されるラット海馬切片培養を用いていた。シナプスの後部構造であるスパインがシナプス入力を受け取ると、スパイン内へ Ca²⁺が流入する。そこで、Ca²⁺イメージング法を用いて CA3 錐体細胞樹状突起へのシナプス入力を蛍光強度変化として捉えた。同時に、細胞体よりパッチクランプ法を用いて興奮性シナプス後電流 (EPSC) を記録した。

シナプス入力と EPSC のタイミングを比較することで、一部のシナプス入力は EPSC と同時に記録されないことを発見した。このことから私たちは、一部のシナプス入力は細胞体に伝わらず、EPSC を発生させていないと推察した。また、各スパインへのシナプス入力が EPSC と同時に記録された確率 (EPSC probability) を算出したところ、EPSC probability はスパインごとに異なることを見出した。

次に、スパインの形態と EPSC probability との関係を調べた。スパインは形態によって電気的性質や受容体の発現量が異なる。そこで、Ca²⁺イメージングを行った後、超解像顕微鏡を用いてスパイン形態を観察した。しかし、スパインの体積や長さには EPSC probability との相関はなかった。このことは、スパインの電気特性や受容体の発現量ではシナプス入力が細胞体へ到達することの成否を説明できないことを意味している。

最後に、EPSC が記録されるシナプス入力 (有効なシナプス入力) と EPSC が記録されないシナプス入力 (無効なシナプス入力) で Ca²⁺蛍光強度変化率 (% F/F) を比較したところ、有効なシナプス入力の方が大きいことを見出した。これまでに、抑制性シナプス入力が個々のスパインへの Ca²⁺流入を調節していることが示唆されている。そのためには、本現象が抑制性シナプス入力によって引き起こされていると考えた。

本現象への抑制性シナプス入力の関与の可能性を検証するために、GABA_A 受容体阻害薬 picrotoxin を細胞内適用した。その結果、EPSC probability の分布は高確率側にシフトすることがわかった。また、抑制性シナプス入力によって一部の興奮性シナプス入力が細胞体へ到達できていないとすれば、picrotoxin の細胞内適用により EPSC 頻度が増加すると考えた。そこで、2 細胞から同時パッチクランプ記録を行い、一方にのみ picrotoxin を細胞内適用したところ、

picrotoxin を適用した細胞は EPSC 頻度が高かった。これらの結果から、抑制性シナプス入力により、一部の興奮性シナプス入力は細胞体へ伝わらず、無効化されていると推察した。

同期シナプス入力数の増加に伴い EPSC probability は高くなる一方で、80%付近で一定に達した。この結果から、同期シナプス入力には細胞体で EPSC が発生しやすい組み合わせと、発生しにくい組み合わせがあると考えた。この可能性を検証するために、まずスパインを同期シナプス入力数に基づいて分類した。そして、logistic regression を用いて、シナプス入力の EPSC 発生確率に対する線形項の係数を各スパイン集団に推定した。推定された β は一方が 0 付近にある二峰性の分布を示していた。 β が 0 であるシナプス集団への同期シナプス入力は EPSC の発生確率に寄与しない。すなわち、一部のスパイン集団への情報だけが細胞体に伝わると考察した。

本研究により、樹状突起は抑制性シナプス入力によって一部の興奮性シナプス入力のみを細胞体に伝えていることがわかった。また、抑制性シナプス入力の効果は、特定の同期シナプス入力だけを細胞体へ伝えるために働いていることも示唆された。ニューロンは複数の情報を受け取る一方で、その出力応答は選択的である。樹状突起は、受け取った情報を抑制性シナプス入力によってフィルタリングすることで、ニューロンの選択的な発火活動を実現していると考えられる。

過去の研究では、シナプス入力を人工的に惹起し、また、GABA 受容体などの多くの受容体を阻害した状態で行われてきた。本現象はそうした人為的な操作を施さず、自然なシナプス入力に注目することで初めて発見されたものである。

なお実験系は、別のタイプの神経線維である軸索にも応用で可能であり、現在データを取り終え、同様な高次線維演算が見られるか否かを解析中である。

次に、リップルが LTD を誘導する可能性を検証するために in vivo リップルの Inter-event Interval (IEI) で海馬スライス標本のシャッファー側枝を電気刺激し、興奮性シナプス後場電位 (fEPSP) を記録した。まず、新奇環境探索直後の徐波睡眠中のリップルの IEI で 15 分間シナプスを刺激したところ、fEPSP の頻度、強度ともにベースラインよりも大きく低下し、LTD が誘導された。この変化は NMDA 受容体の拮抗薬である D-AP5 により阻害された。同様の検討を、探索させる前に記録したリップルの IEI を用いて行ったところ、LTD は誘導されなかった。以上の結果から、新奇環境探索により上方調節を受けたリップルの発生タイミングは LTD を誘導するのに十分であることが示唆された。

さらに、リップルが LTD を誘導するかど

うかを直接的に検証した。先行研究から、LTD が誘導されるとスパインが退縮することが報告されている。そこで、リップルを発生する状態においてスパインの体積がどのように変化するかを観察した。新奇環境を探索させた Thy1-GFP マウスからスライス標本を作成し、リップルを記録しながら CA1 近位樹状突起を撮影した。退縮するスパイン、増大するスパインの両方がそれぞれ存在したが、平均すると有意な退縮が認められた。また、この現象は D-AP5 の適用によって阻害されたことから、この体積の減少にはシナプス抑圧が関与していることが示唆された。

シナプス抑圧が誘導されることにより、海馬の情報処理にどのような利点が生まれるのであろうか。海馬の重要な役割の一つに、リップルによる大脳皮質への情報の転写がある。そこで、LTD が誘導されることによって大脳皮質に送る必要のない不要な神経の発火が優先的に抑制される、すなわち「ノイズ除去」が起こるのではないかと仮説を立てた。それを検証するために、リップル中で発火するニューロン集団に着目した。Arc-dVenus マウスを用いて行動時に活動レベルの高かったニューロンを蛍光タンパク質 dVenus でラベルした(dVenus(+)) 群)、それらと dVenus(-) ニューロンのうち何% がリップル中で発火するか(参加率)を求め、それが時間とともにどう遷移するかを検証した。dVenus(+)) 群の参加率は 0 分、40 分の間で差が認められなかったのに対し、dVenus(-) 群は両タイムポイントの間で有意な低下が確認された。この現象は D-AP5 の適用によりブロックされたことからシナプス可塑性によって誘導されたものであると考えられる。以上の結果から、シナプス抑圧により、行動時に活動しなかったニューロンのリップルへの参加が優先的に抑制されることが示唆された。

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 11 件)

1. Norimoto, H., Makino, K., Gao, M., Shikano, Y., Okamoto, K., Ishikawa, T., Sasaki, T., Hioki, H., Fujisawa, S., Ikegaya, Y. Hippocampal ripples down-regulate synapses. *Science*, 359:1524-1527, 2018.
2. Ouchi, A., Matsumoto, N., Ikegaya, Y. Activation of hilar mossy cells and dentate granule cells during sharp wave/ripples.
3. Matsumoto, N. Okamoto, K., Takagi, Y., Ikegaya, Y. 3-Hz subthreshold oscillations of CA2 neurons in vivo. *Hippocampus*, 26:1570-1578, 2016.
4. Funayama, K., Hagura, N., Ban, H., Ikegaya, Y. Functional organization of flash-induced VI

offline reactivation. *J. Neurosci.*, 36:11727-11738, 2016.

5. Nomura, H., Hara, K., Abe, R., Hitora-Imamura, N., Nakayama, R., Sasaki, T., Matsuki, N., Ikegaya, Y. Memory formation and retrieval of neuronal silencing in the auditory cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*,
6. Ujita, S., Sasaki, T., Asada, A., Funayama, K., Gao, M., Mikoshiba, K., Matsuki, N., Ikegaya, Y. cAMP-dependent calcium oscillations of astrocytes: an implication for pathology. *Cereb. Cortex*, 27:1602-1614, 2017.
7. Makino, K., Funayama, K., Ikegaya, Y. Spatial clusters of constitutively active neurons in mouse visual cortex. *Anat. Sci. Int.*, 91:188-195, 2016.
8. Takahashi, N., Kobayashi, C., Ishikawa, T., Ikegaya, Y. Subcellular imbalances in synaptic activity. *Cell Rep.*, 14:1348-1354, 2016.
9. Asada, A., Ujita, S., Nakayama, R., Oba, S., Ishii, S., Matsuki, N., Ikegaya, Y. Subtle modulation of ongoing calcium dynamics in astrocytic microdomains by sensory inputs. *Physiol. Rep.*, 3:e12454, 2015.
10. Abe, R., Sakaguchi, T., Matsumoto, N., Matsuki, N., Ikegaya, Y. Sound-induced hyperpolarization of hippocampal neurons. *Neuroreport*, 25:1013-1017., 2014.
11. Okamoto, K., Ishikawa, T., Abe, R., Ishikawa, D., Kobayashi, C., Mizunuma, M., Norimoto, H., Matsuki, N., Ikegaya, Y. Ex vivo cultured neuronal networks emit in vivo-like spontaneous activity. *J. Physiol. Sci.*, 64:421-431, 2014.

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 石川智愛、池谷裕二、Sharp Wave 発生時における空間的に局在したシナプス入力、第 40 回日本神経科学大会(千葉)、2017 年 7 月 20 日
2. 石川智愛(D2)、小林千晃、池谷裕二、樹状突起で受けるシナプス入力の時空間パターンと細胞体の活動性、第 25 回海馬と高次脳機能学会(京都)、2016 年 10 月 1 日
3. 池谷裕二、シナプス入力の大規模イメージング、シンポジウム：高速・大規模データ取得のための顕微鏡技術、日本顕微鏡学会第 70 回記念学術講演会(幕張)、2014 年 5 月 11-13 日
4. 小林千晃(D2)、松木則夫、池谷裕二、抑制性シナプス入力による興奮性シナプス入力の無効化、第 37 回日本神経科学大会(横浜)、2014 年 9 月 11 日
5. 池谷裕二、小林千晃、高橋直矢、シナプス活動の時空パターン、電気学会 電子・情報・システム部門大会(松江)、2014 年 9 月 5 日
6. Ishikawa, T., Ikegaya, Y. CA1 pyramidal neurons receive spatially clustered synaptic inputs during sharp waves/ripples EX vivo,

Society for Neuroscience 2017 (Washington, D.C.), 13 November 2017, 377.

7. Ishikawa, T. (D2), Kobayashi, C. Ikegaya, Y. Synchronous synaptic activity induces large somatic EPSCs. 10th FENS Forum of Neuroscience (Copenhagen), 4 July 2016.
8. Kobayashi, C. (D2), Ikegaya, Y. Inhibitory inputs invalidate excitatory dendritic inputs. 9th FENS Forum of Neuroscience (Milan), 6 July 2014.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

なし

取得状況(計0件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.yakusaku.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池谷 裕二 (IKEGAYA, Yuji)

東京大学・大学院薬学系研究科・教授

研究者番号：10302613

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし