

平成 30 年 4 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14554

研究課題名(和文)大規模計測と光操作の融合による海馬ニューロンの神経相関と投射構造の解明

研究課題名(英文)Combining a multiunit recording technique with optogenetics to analyze firing dynamics of hippocampal neurons

研究代表者

佐々木 拓哉(Sasaki, Takuya)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・助教

研究者番号：70741031

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文):本研究開始時には、必要な装置が整っていなかったため、まずは電気生理計測法と光操作法が確立を行った。ラット脳の光に応答する脳領域に光ファイバーを介して光を照射し、照射領域から直接、電気生理信号を得るための電極の開発を試みた。本ツールの作動を確認するため、簡易的な動物モデルとして、光感受性分子を血管内に注入し検討を行った。この条件下では脳血管へ光感受性分子ローズベンガルを注入すると、その部位の脳血管が閉塞し、神経活動が著しく変動することを確認した。本研究成果の一部は、Neuroscience Research誌に掲載された。光刺激に対応した神経応答が見られたことから、必要な技術確立が確認できた。

研究成果の概要(英文):When we started this project, there are no main experimental setups. We thus first addressed to establish an in vivo electrophysiological recording method and a technique to optically manipulate targeted cell populations in the brain. To confirm whether our method is effective for proceeding this project, we utilized an ischemia animal model with photothrombosis, a model of ischemia. In this model, the formation of a clot in brainblood vessels was produced by applying photostimulation to the photosensitive dye rose bengal injected into the circular system. An optical fiber with was inserted above the recording sites of the hippocampus, and the site was photostimulated. Hippocampal activity showed an immediate change in response to photothrombosis. This result confirms our method is established to further address the project to define projection neurons with an optotag method.

研究分野：神経生理学

キーワード：海馬 光操作 テトロード電極 光遺伝学 虚血

### 1. 研究開始当初の背景

空間情報の処理を司る脳領域である海馬には「場所細胞」と呼ばれる神経細胞が存在する。場所細胞は動物が環境内の特定の場所を通過するときに選択的に発火活動を示す細胞である。海馬には、場所細胞をはじめ、行動と明瞭な相関を示すニューロンが多数存在するが、これらの情報が、どのように他の皮質領域に出力されているかは完全には明らかになっていない。この課題に挑むため、マルチユニット計測法と光操作法を構築し、両者の融合を目指す。本技術では、光感受性分子によってラベルされた海馬の錐体細胞の活動を計測し、その分子発現を、青色光の照射による光応答性によって確認する。本研究により、最終的には、個々の海馬ニューロンが担う情報処理パターンと領野外への投射構造を比較し、領野間結合の機能-構造連関について、定量的な解剖学的知見を提示することを目的とする。

### 2. 研究の目的

海馬の場所細胞を記録するには、マルチユニット記録法を用いるのが世界的な標準となっている。そこで、まずはすべての実験装置を揃え、自由行動中の動物から *in vivo* マルチユニット記録法が確立することを目指した。併行して、光感受性分子のチャネルロドプシン2を海馬細胞に発現するウイルスベクターの注入を検討した。さらに、両者を融合するために、マルチユニット記録法に用いるテトロード電極と、光刺激に用いる光ファイバーを同部位に脳に刺入するための技術を構築した。

### 3. 研究の方法

すべての実験は、東京大学動物倫理委員会の承認を得ており、NIHの動物実験ガイドラインに準拠している。実験には雄性 Long Evans ラット (3-6ヶ月齢; 体重 300-450g) を用いた。

イソフルラン吸入麻酔下 (1-3%) でラットにマイクロドライブ埋め込みの手術を行った。三点固定装置に頭部を固定して頭皮を切開したのち、頭蓋骨にドリルで直径 0.9-1.6 mm の穴をあけた。2本のステンレスビスを前頭皮質上部の頭蓋骨に埋め込み、参照電極とした。マイクロドライブは、独立に下ろす深さを調節できる 8-16本のテトロードからなり、3Dプリンタを用いて製作を行った。マイクロドライブは、右側海馬 (bregma から 3.8-4.0 mm 後側、2.8-3.0 mm 外側) に硬膜を除去した後に埋め込んだ。マイクロドライブの先端は皮質表面まで下ろし、ビスと歯科用セメントで固定した。テトロード電極には、ポリイミドコートされた白金イリジウム合金 (90 / 10%) のワイヤー (直径 17  $\mu\text{m}$ ) を燃ることで製作した。テトロードの先端は白金メッキを行い、1 kHz におけるインピーダンスを 150-300 k に下

げた。

ラットの頭上のマイクロドライブは、アナログ-デジタル変換器、コンピュータを介して、データ取り込み装置に接続した。電極位置の調整は、ラットがレストボックスでおとなしくしているときに行った。術後、それぞれのテトロードを1日あたり 25-100  $\mu\text{m}$  ずつ、2-3週間に渡って海馬 CA1 野の細胞層に到達するまで下ろした。海馬の細胞層への到達は、局所場電位と単一の細胞の発火パターンから推定した。テトロードが細胞層に近づいたら、テトロードを細胞層に留め、数日間にわたり記録を行った。

神経活動の記録は、海馬のマルチユニット活動が安定してよく分離できるようになってから始めた。局所場電位信号の記録は 2 kHz のサンプリングレートで行い、500 Hz のローパスフィルタをかけた。細胞のスパイクの記録は、750 Hz のハイパスフィルタをかけた LFP からスパイクの波形を抽出した。スパイクの波形が -63  $\mu\text{V}$  の閾値を下回った時点トリガーとし、30 kHz で 1.6 ms 記録した。

ラットに過剰量のウレタン麻酔を腹腔内投与した後に開胸し、心臓内から 4% パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝生理食塩水 (PFA; pH 7.4) を灌流した。電極の痕を残すために灌流固定後すぐに電極は抜かず、首を切断して 3-4 時間静置した。脳を摘出し、4% PFA に一晩浸して固定した。その後、20% スクロース・リン酸緩衝生理食塩水、30% スクロース・リン酸緩衝生理食塩水の順に浸し、スクロース置換を行った。脳を凍結し、マイクロトームを用いて 40  $\mu\text{m}$  の厚さの coronal 切片を作成した。スライドガラスに脳切片を載せ、cresyl violet 染色を行った。テトロード電極の位置は、対応する脳切片に残った電極痕と照らし合わせて確認した。

### 4. 研究成果

(1) 海馬場所細胞のマルチユニット計測法の構築

計測法を、現在の研究機関でセットアップした。まずはすべての実験装置の購入から開始し、また 3D プリンタを用いて、ラットの頭部に埋め込む電極フォルダー装置の形状を検討した。ここでは、おおよそ 20 グラム程度の装置で、個々の埋め込み脳波測定用電極の深さを独立に動かすことが可能になるような特殊ネジを装着した。様々な形状の試行錯誤を重ねた結果、これまでに最大 24本のテトロード電極を格納する装置の作製に成功した。1本のテトロード電極は4本の微小ワイヤー電極から形成されているため、全部で 96 個の記録点を有する装置ということになる。1本のテトロード電極では、先端部の数百マイクロメートルの範囲に存在する 5 - 10 個程度の細胞の信号を同時に得られる。各テトロード電極が細胞層に到達し、うまく記録が実行できれば、理論上は 100 細胞

程度の同時記録が可能である。この技術を確認できたことで、世界最先端の計測技術の水準に追いついたといえる。

実際に自由行動中のラットに本計測法を適用し、1メートル四方のオープンフィールド内にて、海馬の錐体細胞が特定の場所で選択的に発火する場所細胞の活動が確認できた。

(2) マルチユニット計測と光遺伝学の融合

次に、光遺伝学的手法との融合を目指した。まずは、本マルチユニット計測装置に光ファイバーの取り付けを試みた。既存の装置にて穿孔位置を検討し、電極と同様に光ファイバーも特殊ネジに装着して深さを可変となるように工作した。ここで光ファイバーの直径は、250マイクロメートルである。電極と同時に脳内へ挿入していくことで、記録部位の直上に光ファイバーを設置することが可能となった。

まずは本システムが想定通りに作動するか確認するために、光遺伝学的手法の導入前に、簡易的な検討を行った。ここでは、マウスにローズベンガル色素を腹腔内投与し、その後、海馬に光照射を行った。この色素は全身の血流に乗り、脳血管内にも還流される。この状態で、血管を流れる色素に青色光を照射すると、色素の変性、硬化が起こることにより、その部位の血管が梗塞される。これにより、周辺の脳組織で虚血性細胞死が誘発されることになる。この部位で脳波を記録すると、細胞の活動が減少していくため、その波形の大きさが顕著に減弱することになる。実際に、光照射の後には、記録部位の脳波の大きさが顕著に減少することが確認できた。このことから、本システムが想定通りに作動していたと言える。また、本研究目的とは異なるが、本実験の結果より、脳虚血の新たな生理機構の解明につなげることができたため、Neuroscience Research 誌に発表した。

また、これまでのところ、16本のテトラード電極と光ファイバーの併用法を確立している。電極を3週間程度かけて徐々に海馬の錐体細胞層まで到達させ、ChR2を発現した領域に光照射を行ったところ、光刺激のタイミングにロックした神経応答が見られた。ここで応答しているユニット(細胞)は、ChR2を発現した細胞であると推測される。今後は、自由行動中野ラットから場所細胞の計測と組み合わせ、場所細胞のさらに詳細な出力形式を調べていく予定である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計15件)

S. Yagi, H. Igata, Y. Shikano, Y. Aoki, T. Sasaki\*, Y. Ikegaya. Time-varying synchronous cell ensembles during consummatory periods correlate with variable numbers of place cell spikes. Hippocampus, in press.

T. Okonogi, R. Nakayama, T. Sasaki\*, Y. Ikegaya. Characterization of peripheral activity states and cortical local field potentials of mice in an elevated plus maze test. Frontiers in Behavioral Neuroscience, in press.

Y. Shikano, Y. Ikegaya, T. Sasaki\*. Monitoring brain neuronal activity with manipulation of cardiac events in a freely moving rat. Neuroscience Research, in press.

H. Norimoto, K. Makino, M. Gao, Y. Shikano, K. Okamoto, T. Ishikawa, T. Sasaki, H. Hioki, S. Fujisawa\*, Y. Ikegaya\*. Hippocampal ripples down-regulate synapses. Science, in press.

Y. Shikano, T. Sasaki\*, Y. Ikegaya. Simultaneous recordings of cortical local field potentials, electrocardiogram, electromyogram, and breathing rhythm from a freely moving rat. Journal of Visualized Experiments, in press.

T. Sasaki+, VC. Piatti+, E. Hwaun, S. Ahmadi, JE. Lisman, S. Leutgeb, JK. Leutgeb\*. Dentate network activity is necessary for spatial working memory by supporting CA3 sharp-wave ripple generation and prospective firing of CA3 neurons. Nature Neuroscience, 21: 258-269, 2018.

T. Kayama, I. Suzuki\*, A. Odawara, T. Sasaki\*, Y. Ikegaya. Temporally coordinated spiking activity of human induced pluripotent stem cell-derived neurons co-cultured with astrocytes. Biochemical and Biophysical Research Communications, 495: 1028-1033, 2018.

S. Okada, H. Igata, T. Sasaki\*, Y. Ikegaya. Spatial representation of hippocampal place cells in a T-maze with an aversive stimulation. Frontiers in Neural Circuits, 11: 101, 2017

T. Sasaki\*, Y. Nishimura, Y. Ikegaya. Simultaneous recordings of central and peripheral bioelectrical signals in a freely moving rodent. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 40: 711-715, 2017.

Y. Aoki, Y. Nishimura, T. Hondrich, R. Nakayama, H. Igata, T. Sasaki\*, Y. Ikegaya\*. Selective attenuation of electrophysiological activity of the dentate gyrus in a social defeat mouse model. *Journal of Physiological Sciences*, 67: 507-513, 2017.

S. Ujita, T. Sasaki, A. Asada, K. Funayama, M. Gao, K. Mikoshiba, N. Matsuki, Y. Ikegaya\*. cAMP-dependent Calcium Oscillations of Astrocytes: An Implication for Pathology. *Cerebral Cortex*, 27: 1602-1614, 2017.

S. Okada, H. Igata, T. Sakaguchi, T. Sasaki\*, Y. Ikegaya. A new device for the simultaneous recording of cerebral, cardiac, and muscular electrical activity in freely moving rodents. *Journal of Pharmacological Sciences*, 132: 105-108, 2016.

Y. Nishimura, R. Abe, T. Sasaki\*, Y. Ikegaya\*. Homeostatic changes in neuronal network oscillations in response to continuous hypoperfusion in the mouse forebrain. *Neuroscience Research*, 109:28-34, 2016.

R. Nakayama, T. Sasaki\*, KF. Tanaka, Y. Ikegaya\*. Subcellular calcium dynamics during juvenile development in mouse hippocampal astrocytes. *European Journal of Neuroscience*, 43: 923-932, 2016.

H. Igata, T. Sasaki\*, Y. Ikegaya\*. Early failures benefit subsequent task performance. *Scientific Reports*, 6: 21293, 2016.

[学会発表](計16件)

第50回神経解剖懇話会、2018年3月27日

次世代薬理学セミナー2018、2018年3月10日

The 4th CiNet Conference "Neural oscillation and functional connectivity: from anatomy to perception"、2018年2月28日

公開シンポジウム「ヒトiPS分化細胞を用いた医薬品の評価法開発と国際協調」、2018年2月8日

Nepal-Japan symposium on Neuroscience and Medicine、3 May 2017

平成29年度記憶研究会、2017年10月11日

動物心理学会、動物行動学会合同学会若手シンポジウム、2017年9月1日

第4回包括的緩和医療科学学術研究会/第5回Tokyo疼痛緩和次世代研究会合同研究会、2017年8月26日

第1回感覚免疫研究会、2017年7月4日

日本薬学会第137年会、2017年3月25日

第90回日本薬理学会年會、2017年3月16日

7th International neural microcircuit conference、9 Dec 2016

2nd UK-Japan FoS symposium、7 Nov 2016

Modeling Neural Activity (MONA)2 conference、23 Jun 2016

次世代脳冬のシンポジウム3領域合同若手シンポジウム、2016年12月16日

第39回日本神経科学大会、2016年7月20日

[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]

ホームページ等

<http://sasaki-brain.net>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 拓哉 (SASAKI, Takuya)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号: 70741031

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし