

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19498

研究課題名（和文）高精細全脳イメージングによる一細胞レベルの四次元活動マッピング法の確立

研究課題名（英文）Development of whole-brain imaging system for spatial and temporal activation mapping

研究代表者

勢力 薫（Kaoru, Seiriki）

大阪大学・薬学研究科・招へい教員

研究者番号：90802918

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：環境刺激により活動した神経細胞を多色の蛍光タンパク質で標識し、その全脳イメージング解析方法の確立を目指した。本研究により、これまでに構築してきたイメージング技術FAST (block-FACE Serial microscopy Tomography)を改良し、多色イメージングの実装と像処理等も含む詳細なプロトコル論文を発表した。また、神経活動依存的に転写が促進されるFosプロモーターの制御下に、薬物誘導型の遺伝子発現系を組み込んだ遺伝子改変マウスを作製し、アデノ随伴ウイルスベクターを用いた遺伝子導入と組み合わせることにより、神経細胞を活動依存的かつ薬物依存的に多色標識できる実験系を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ストレス等の経験による脳機能の適応、機能変調の機序をより詳細に理解するためには、広範な脳領域を対象として領域間の神経活動の相関性を解析し、その経験依存的な変化を細胞レベルで検出する必要があると考えられる。しかし、同時に解析可能な脳領域の範囲と時間の分解能に限られる等の技術的制限等があり、現時点では複数のタイムポイントにおいて活動した細胞の脳内分布や軸索投射の違いを解析することは容易ではない。そのイメージング解析法の確立を目指した本研究は、経験依存的な脳機能の制御機構や脳神経疾患モデルにおける脳機能の変調過程を細胞レベルで解析する研究に貢献可能であり、学術的・社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to establish a method for whole-brain imaging analysis of neurons activated by environmental stimuli and labeled with multicolor fluorescent proteins. We modified the imaging system FAST (block-FACE Serial microscopy Tomography) for multicolor imaging and published a detailed protocol paper including the implementation of multicolor imaging and image processing. We also generated transgenic mice with a drug-inducible gene expression system under the control of the Fos promoter. By combination with adeno-associated virus vector-mediated gene transfer, we achieved activity- and drug-dependent labeling of neurons.

研究分野：薬理学

キーワード：共焦点顕微鏡 イメージング 脳 神経細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳は、視覚や聴覚など様々な知覚情報を処理・統合して意思決定・行動選択を行い、その制御は学習やストレス等の経験により変化する。このような脳機能の制御機構を理解するためには、複数領域の活動の連関と個々の細胞の活動の時間変化を捉えることが必要と考えられるが、多くの実験手法では同時に解析可能な脳領域の範囲と時間の分解能に限られており、複数脳領域間の神経活動の相関性について、その経験依存的な変化を細胞レベルで検出することは容易ではない。研究代表者は、これまでにマウス全脳を細胞レベルの分解能で観察する顕微鏡全脳イメージングシステム FAST (block-FACE Serial microscopy Tomography; Seiriki et al., Neuron, 2017)を開発に携わり、脳内の細胞分布の解析などに取り組んできた。細胞レベルの神経活動を脳全体で解析するために、最初期遺伝子のプロモーター制御下に蛍光タンパク質を発現するマウスの全脳イメージング等も実施し、慢性的なストレス暴露による全脳レベルの活動変化を明らかにしてきたが、特定の時間枠に活動した細胞の分布解析に限られ、同一個体内で個々の細胞の経時的な活動変化を捉えることは現状では不可能であった。そこで、複数時点における神経活動の多色標識法を開発し、全脳イメージング技術 FAST と組み合わせることで解析の対象範囲と時間分解能を向上させることで、全ての脳領域で細胞レベルの複数時間枠における神経活動の変化を捉えることが可能になると考え、時期特異的な標識を可能にする遺伝子改変マウスの作製、当該マウスに適したイメージング技術および解析技術の確立、ウイルスベクターを用いた標識系の確立を含む本研究の構想に至った。

2. 研究の目的

複数の時間枠において活動した神経細胞の分布を複数脳領域で解析するための手法の一つとして、神経活動依存的なプロモーター制御と薬物誘導型の遺伝子発現誘導系を組み合わせることで薬物投与時に活動した細胞を標識する方法が考えられる。そこで本課題では、全脳イメージング技術 FAST の装置構成および画像処理系の改良を実施しつつ、遺伝子改変マウスを用いた神経活動依存的な多色細胞標識法を確立し、マウス全脳を対象として複数時間枠における神経活動変化や、活動した神経細胞の軸索投射などの解析法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

活動依存的に複数時間枠の神経細胞を多色で標識するために、内因性 c-Fos の遺伝子座に、時間分解能を高めた蛍光タンパク質 Venus、タモキシフェン誘導型 Cre 組換え酵素、テトラサイクリン制御性トランス活性化因子 rtTA をノックインした遺伝子改変マウス、Cre 依存的に細胞核局在型 tdTomato を発現し、rtTA 依存的に細胞核局在型の mTagBFP を発現する遺伝子改変マウスの二種類を作製し、これらの交配により得られたマウスを用いて、神経活動かつ薬物依存的な細胞標識を構築する。また、(1)のマウスにアデノ随伴ウイルスベクターを用いて、Cre および rtTA 依存的に蛍光タンパク質を発現する遺伝子配列を導入することにより、細胞体や軸索などを標識し、軸索投射の多色イメージング方法を構築する。また、全脳イメージング技術の多色化を促進するため、独自に Python をベースとした画像処理プログラムを作製し、マウス脳あたり約 1TB/color のデータ処理や、細胞の検出、脳領域の分類方法などを構築する。

4. 研究成果

(1)新規神経活動レポーターマウスの作製

内因性 c-Fos の遺伝子の終始コドンに自己切断 2A ペプチド配列に置換し、さらに時間分解能を高めた蛍光タンパク質 Venus、タモキシフェン誘導型 Cre 組換え酵素、テトラサイクリン制御性トランス活性化因子 rtTA を 2A ペプチド配列で連結した遺伝子のノックインマウスを作製した(筑波大学生命科学動物資源センターにて委託作製)。本マウスに、拘束ストレス負荷の 2 時間後の組織切片を用いて Venus の発現解析を実施したところ、現行の FAST の構成では Venus の蛍光は検出限界以下であり、免疫染色等によるシグナル増強が必要であることが明らかになった。一方で、Cre 依存的に赤色蛍光タンパク質を発現する AAV-hSyn-DIO-mCherry を内側前頭前皮質や海馬に注入し、タモキシフェンの代謝活性化体である 4-ヒドロキシタモキシフェンを腹腔内投与した結果、薬物投与かつ神経活動依存的な Cre-loxP 組換えを介した細胞標識が可能であることが明らかになった。また rtTA についても同様に TRE プロモーター制御下に蛍光タンパク質を発現する AAV を局所注入し、拘束ストレスとドキシサイクリンの腹腔内投与を行うことで、蛍光標識された細胞を観察することに成功した。これらのことから、本マウスは Venus の検出には蛍光免疫染色等のシグナル増強等が必要と考えられるものの、タモキシフェン又はドキシサイクリンの投与により、各薬物の投与時に活動した神経細胞を識別して標識可能であると考えられる。

また、本 c-Fos ノックインマウスと交配して Cre または rtTA 依存的に細胞標識するためのマウスとして、遺伝子座 TIGRE (Neuron, 2016; Cell, 2018)に CAG-loxP-STOP-loxP-H2B-tdTomato, TRE-H2B-mTagBFP を insulator 配列とともにノックインしたレポーターマウスを作製した。TIGRE

遺伝子座は、TRE プロモーターを染色体上に組み込んだ際に生じるサイレンシングを回避できる可能性がある遺伝子座であり、既に Allen 脳科学研究所が作製した複数種のノックインマウスで成功例が報告されている。本研究で得られたレポーターマウスの定常状態における蛍光タンパク質の発現を解析したところ、LoxP 組換えが生じていない条件下でもわずかに細胞核に集積した tdTomato の蛍光が認められ、また、H2B-mTagBFP についても数は少ないものの、rtTA 非依存的に発現している細胞が認められた。tdTomato についてはほぼ脳の全脳領域に、mTagBFP については、特に小脳の顆粒細胞層に非特異的に標識された細胞が認められた。本マウスに、CaMKII プロモーター制御下に Cre を発現する AAV、ヒトのシナプシンプロモーター制御下に tTA を発現する AAV を注入したところ、ウイルス注入部位において tdTomato 蛍光強度が5倍以上に増大し、Cre 依存的な標識が認められた。他方で、tTA を過剰発現させても mTagBFP 陽性細胞数の増加は認められなかった。サイレンシングの抑制効果を有する insulator 配列とともに TIGRE 遺伝子座に導入したものの、今回用いた遺伝子発現配列においては脳内の多くの細胞がサイレンシングを受け、一部の細胞のみサイレンシングを回避して遺伝子発現誘導が生じたと考えられる。これは AAV を用いた導入に限らず、上記の c-Fos 遺伝子座へのノックインマウスと交配したダブルノックインマウスでも同様の結果であった。これらのことから、本レポーターマウスは rtTA を介した標識は難しいものの、Cre を介した細胞核の標識には利用可能であると考えられる。Cre 依存的に遊離体の tdTomato を発現する Ai9 マウス (Jackson Laboratory # 007909) では、樹状突起や軸索線維も標識されるため、歯状回等の細胞が高密度に局在する脳領域では細胞の計数等が容易ではないが、本マウスでは細胞核に tdTomato が局在するため、Cre 依存的に標識された細胞数の定量化等の解析や自動検出等に適すると期待できる。

(2) 多色の全脳イメージング解析に向けた FAST 画像処理系の確立

これまでの画像処理や解析では、単色イメージングによるデータ解析に適したプログラムを用いていたため、本研究では新たに多色でイメージングした再のデータ解析・処理プログラムの構築を行った。また、イメージング時の照明の均一性や対物レンズ収差などの要因により、各視野の中心部と四隅の輝度値に差が生じ、複数視野を連結した際に格子状の影が生じ、多色撮影時では各チャンネルの補正が必要であることが明らかになったため、そのフラットフィールド補正モジュールの実装も試みた。その結果、低輝度値の撮像設定で取得したフラットフィールド画像を用いることで、格子状の影をほとんど除去することに成功した。また、多色イメージング設定で取得した際にチャンネルごとに組織切片画像の再構築とフラットフィールド補正を実施する画像処理プログラムを構築した。本画像処理系を用いて AAV(PHP.eB) (Nat Neurosci, 2017) により脳全体に遺伝子導入を実施し、CaMKII プロモーター制御下に赤色蛍光タンパク質、mDLX エンハンサー制御下に緑色蛍光タンパク質を発現させて多色標識した脳画像データに適用した結果、各色で標識された細胞分布を解析可能な再構築画像を得ることができた。これらの成果の一部は、FAST イメージング技術の詳細なプロトコルと合わせて発表した (Seiriki et al., 2019)。

これらの研究により、FAST の画像処理および解析プログラムを構築し、複数時間枠において活動した細胞を識別して標識可能なマウスを構築した。一部の観察条件においては、蛍光タンパク質の発現量が十分ではなく、現行の FAST では検出限界以下である等、当初の予定から変更を要した部分もあるが、今後は脳組織ブロックを三次元的に免疫染色する技術等と併用することにより、蛍光強度の増強や c-Fos タンパク質の可視化などを実施し、本イメージング解析系に導入することで改善可能であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Seiriki Kaoru, Kasai Atsushi, Nakazawa Takanobu, Niu Misaki, Naka Yuichiro, Tanuma Masato, Igarashi Hisato, Yamaura Kosei, Hayata-Takano Atsuko, Ago Yukio, Hashimoto Hitoshi	4. 巻 14
2. 論文標題 Whole-brain block-face serial microscopy tomography at subcellular resolution using FAST	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Protocols	6. 最初と最後の頁 1509 ~ 1529
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41596-019-0148-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kaoru Seiriki, Atsushi Kasai, Takanobu Nakazawa, Hitoshi Hashimoto
2. 発表標題 High-speed and scalable whole-brain imaging for finding singularity in the brain
3. 学会等名 Neuro 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 勢力薫、笠井淳司、丹生光咲、田沼将人、五十嵐久人、中澤敬信、山口瞬、井上謙一、高田昌彦、橋本均
2. 発表標題 高精細全脳イメージング技術FASTの開発と精神疾患モデルマウスの病態解析
3. 学会等名 第68回日本薬学会近畿支部総会・大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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