

令和 5 年 5 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03550

研究課題名（和文）セルアセンブリ形成メカニズムの構成的理解

研究課題名（英文）Elucidation of mechanisms for cell assembly formation

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） 13,880,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、海馬の場所細胞をモデルに、セルアセンブリの発達と形成のメカニズムをイメージングで理解することを目的とした。研究代表者が過去に確立した行動中の動物における深部脳神経回路のカルシウムイメージング技術を、身体が小さく技術的に難しい発達期のマウスのイメージングへと発展させることで、発生期の特定の錐体細胞の集団を蛍光標識したマウス海馬における二光子カルシウムイメージング、幼若期ラット海馬における遺伝子導入と生後発達期ラット用バーチャルリアリティシステムの構築、sCMOSカメラとカスタム顕微鏡をもちいた蛍光膜電位イメージングなどの重要な技術を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの研究において、ある種の自閉スペクトラム症モデルマウスが頭部固定下のバーチャルリアリティ空間で学習異常を示すこと、およびその海馬の場所細胞地図では、ランドマーク地点をコードするセルアセンブリ（協調的に働く複数の細胞の集団）の学習依存的な形成に、特異的な欠損が見られることを明らかにされている。本研究の成果は、このような発達障害に関連した生後発達期マウス海馬の神経回路活動の大規模計測の技術として有用なものである。

研究成果の概要（英文）：This research aimed to understand the mechanisms of cell assembly development and formation by imaging using hippocampal place cells as a model. The study extended a calcium imaging of deep brain neural circuits in behaving animals that the principal investigator of this study had established in the past to imaging of developing mice, which is technically more challenging. We have developed two-photon calcium imaging of the mouse hippocampus with fluorescent-labeled specific pyramidal cell populations during development. We have also succeeded in establishing important fundamental technologies such as gene transfer in the neonatal rat hippocampus, construction of a virtual reality system for postnatal rats and fluorescent membrane voltage imaging using an sCMOS camera and a custom microscope.

研究分野：神経科学

キーワード：海馬 生後発達 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 ナビゲーション

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

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。空間学習に伴って海馬に形成される場所細胞地図の形成のメカニズムを調べるために、研究代表者は、蛍光カルシウムセンサータンパク質を脳に発現するトランスジェニックマウス、深部脳イメージング、マウス用頭部固定バーチャルリアリティ環境を組み合わせた独自のイメージング系を確立し、空間学習訓練にしたがって場所細胞の割合が増加すること、またランドマークや報酬などの行動上重要な特徴をもつ場所は他の場所よりもより安定的に保たれていることなどの原理を明らかにした。(Sato et al., *Cell Rep.*, 2020)

Shank2 はグルタミン酸作動性シナプス後肥厚部のタンパク質複合体に含まれる足場タンパク質のアイソフォームの一つであり、ヒトでは Shank2 の変異をもつ自閉症の家系の存在が報告されている (Berkel et al., *Nat. Genet.*, 2010)。これらの変異の一つを模倣した Shank2 欠損マウスでは、社会行動の異常などヒトの自閉症の特徴によく似た表現型が見られる (Won et al., *Nature*, 2012)。また、このマウスの海馬では、NMDA 型グルタミン酸受容体機能の低下をはじめとする興奮性シナプス伝達と可塑性の異常が報告されている。研究代表者はこれまで、上記のような特徴をもつ Shank2 欠損マウスが、頭部固定下のバーチャルリアリティ (VR) 空間で学習異常を示すこと (Sato et al., *eNeuro*, 2017)、およびその海馬の場所細胞地図では、ランドマーク地点をコードするセルアセンブリ (協調的に働く複数の細胞の集団) の学習依存的な形成に、特異的な欠損が見られることを明らかにした (Sato et al., *Cell Rep.*, 2020; 図 1)。しかしこのような発達障害に関連した神経回路機能の異常を理解するには、成熟個体のみならず、生後発達期の個体の神経回路の活動を大規模に計測し、その発達過程の原理を発見することが必要であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、海馬の場所細胞をモデルに、セルアセンブリの発達と形成のメカニズムを理解することを目的とした。研究代表者は過去に、発達期と成熟期のマウス大脳皮質視覚野の可塑性を光学イメージングで比較し、それぞれの可塑性の特徴を明らかにする研究を行った (Sato and Stryker, *J. Neurosci.*, 2008)。また遺伝性発達障害の一つであるアンジェルマン症候群の原因遺伝子 *Ube3a* が、視覚野の可塑性の成熟に関わっていることを明らかにした (Sato and Stryker, *PNAS*, 2010)。視覚野の生後発達の研究は、Hubel と Wiesel による一連の研究で知られる長い歴史をもつが、海馬の神経回路機能の生後発達を調べた研究は大脳皮質に比べて少ない。本研究は、研究代表者が過去に確立した行動中の動物における深部脳神経回路のカルシウムイメージング技術を、身体が小さく技術的に難しい発達期のマウスのイメージングへと発展させる点で独自の研究となることをめざした。

3. 研究の方法

発達期中枢神経系では、多数の細胞の同期的な自発活動が神経回路の形成に重要な役割を果たすことが知られている。発達期マウスの二光子カルシウムイメージングは以下のように行った。生後間もないマウスあるいはラットの側脳室に神経細胞特異のプロモーター下に蛍光カルシウムセンサータンパク質を発現するアデノ随伴ウイルスベクターを微量注入するか、もし

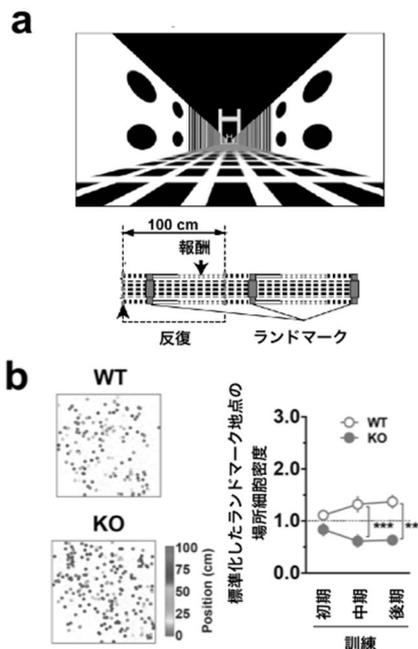


図 1: Shank2 欠損マウスの場所細胞地図におけるランドマーク地点の神経表現の異常。(a) 実験に用いたバーチャル直線路(上)と、その中に設定されたランドマークと報酬地点(下)。(b) 上記の VR 環境で場所細胞地図をイメージングすると、Shank2 欠損マウス(KO)では、ランドマーク地点をコードする場所細胞の特異的な形成異常が見られる。

くは研究代表者らが作製した Thy1-G-CaMP7 トランスジェニックマウスを用いることで CA1 野錐体細胞を蛍光カルシウムセンサータンパク質で標識した。回復の後、ヘッドプレートの接着と海馬へのイメージングウインドウの埋め込みを行った。翌日以降にマウスを二光子レーザー顕微鏡の対物レンズ下に頭部固定し、海馬 CA1 野の自発的な神経回路活動をイメージングした。

4. 研究成果

CA1 野錐体細胞の特定のサブセットを蛍光標識するために、発生期の細胞に特異的に Cre リコンビナーゼを発現する雌マウスと Cre 特異的に赤色蛍光タンパク質 tdTomato を発現する雄のレポーターマウスを交配して、標的とした錐体細胞の集団を tdTomato で標識したマウスを得た (図 2 左)。このマウスの海馬 CA1 野に、神経細胞特異的プロモーター下に緑色蛍光カルシウムセンサータンパク質 GCaMP6f を発現するアデ

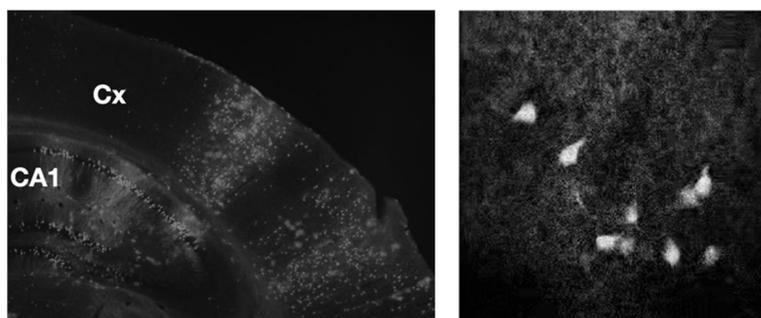


図 2: 発生期に赤色蛍光タンパク質 tdTomato で標識した錐体細胞の海馬 CA1 野および大脳皮質 (Cx) における分布 (左) と、発生期に tdTomato で標識した錐体細胞を含む CA1 錐体細胞集団のカルシウムイメージング (右)

ノ随伴ウイルスベクターを微量注入したところ、成熟マウスにおいて、GCaMP6f と tdTomato で二重標識された錐体細胞を二光子レーザー顕微鏡でイメージングすることに成功した (図 2 右)。これらのマウスをカルシウムイメージング実験に用いた。

生後発達期の海馬 CA1 野の神経回路の活動パターンを明らかにする実験には、Thy1 プロモーター下に高反応性緑色蛍光カルシウムセンサータンパク質 G-CaMP7 を発現する Thy1-G-CaMP7 トランスジェニックマウスを用いた。生後 2-3 週齢のマウスは、成熟マウスとほぼ同様の手法でイメージングすることができたが、それよりも若い幼若マウスをイメージングするために、より小型化したチタン製のヘッドプレートおよびヘッドプレートホルダーを作成した。幼若期のマウスは小さくて扱いにくいので、マウスよりも大きくて扱いやすいラットを用いた実験系を同時に確立することを試みた。生後間もないラットの脳に赤色蛍光カルシウムセンサータンパク質を発現する AAV ベクターを微量注入し、1~2 週間の回復の後に切片を作成して発現を確認したところ、特定のプロモーターのみが、生後ラットの海馬で外来遺伝子の良好な発現を引き起こすことを明らかにした。生後 2-3 週のラットの頭部にヘッドプレートを装着してバーチャルリアリティ環境に置いたところ、トレッドミル上で自発歩行できることが確認できた (図 3)。

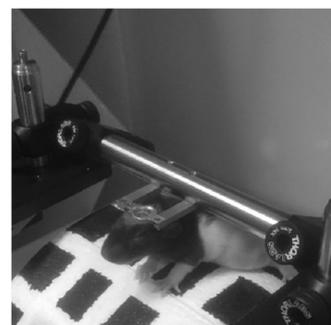


図 3: 頭部固定した生後発達期のラットのためのバーチャルリアリティシステム

生後発達に伴う海馬ニューロンの膜電位変化を明らかにする目的で、海馬 CA1 野の錐体細胞にアデノ随伴ウイルスベクターを用いて蛍光膜電位センサータンパク質を発現させる実験を行った。発現後の固定切片で観察すると、CA1 野の錐体細胞の細胞体と樹状突起に蛍光膜電位センサータンパク質の良好な発現が見られた (図 4)。また膜電位の変化は細胞内カルシウム応答よりも速い現象であるので、高速に蛍光画像を取得できる sCMOS カメラとカスタム顕微鏡をセットアップし実験に用いた。

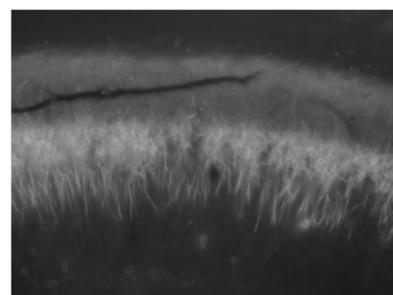


図 4: 海馬 CA1 野における蛍光膜電位センサータンパク質の発現。

上記の実験に加えて、バーチャル環境下で行動するマウスの脳活動を広視野カルシウムイメージングで解析し、領域間の機能的結合が行動の開始と終結に伴ってダイナミックに変化することを明らかにした

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 6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 -
1. 著者名 Takamura Risa, Mizuta Kotaro, Sekine Yukiko, Islam Tanvir, Saito Takashi, Sato Masaaki, Ohkura Masamichi, Nakai Junichi, Ohshima Toshio, Saido Takaomi C., Hayashi Yasunori	4. 巻 41
2. 論文標題 Modality-Specific Impairment of Hippocampal CA1 Neurons of Alzheimer's Disease Model Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 5315 ~ 5329
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.0208-21.2021	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 -
1. 著者名 Cid Elena, Marquez-Galera Angel, Valero Manuel, Gal Beatriz, Medeiros Daniel C., Navarron Carmen M., Ballesteros-Esteban Luis, Reig-Viader Rita, Morales Aixà V., Fernandez-Lamo Ivan, Gomez-Dominguez Daniel, Sato Masaaki, Hayashi Yasunori, Bayes Alex, Barco Angel, Lopez-Atalaya Jose P., de la Prida Liset M.	4. 巻 35
2. 論文標題 Sublayer- and cell-type-specific neurodegenerative transcriptional trajectories in hippocampal sclerosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 109229
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.109229	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 Bouchekioua Youcef, Nebuka Mao, Sasamori Hitomi, Nishitani Naoya, Sugiura Chiaki, Sato Masaaki, Yoshioka Mitsuhiro, Ohmura Yu	4. 巻 12
2. 論文標題 Serotonin 5-HT2C receptor knockout in mice attenuates fear responses in contextual or cued but not compound context-cue fear conditioning	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Translational Psychiatry	6. 最初と最後の頁 58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41398-022-01815-2	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 -

1. 著者名 Sasamori Hitomi, Asakura Toshiaki, Sugiura Chiaki, Bouchekioua Youcef, Nishitani Naoya, Sato Masaaki, Yoshida Takayuki, Yamasaki Miwako, Terao Akira, Watanabe Masahiko, Ohmura Yu, Yoshioka Mitsuhiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Behavioral characteristics of dopamine D5 receptor knockout mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6014
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-10013-5	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 -

1. 著者名 Nakai Nobuhiro, Sato Masaaki, Yamashita Okito, Sekine Yukiko, Fu Xiaochen, Nakai Junichi, Zalesky Andrew, Takumi Toru	4. 巻 42
2. 論文標題 Virtual reality-based real-time imaging reveals abnormal cortical dynamics during behavioral transitions in a mouse model of autism	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 112258
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2023.112258	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 Sato Masaaki, Kimura Miki, Ueda Ai, Miyamoto Yuya	4. 巻 158
2. 論文標題 Imaging brain activity in virtual reality: abnormal hippocampal cognitive maps in autism model mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Folia Pharmacologica Japonica	6. 最初と最後の頁 139 ~ 143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1254/fpj.22115	査読の有無 無
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1件（うち招待講演 1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（招待講演）
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
VR システムによる神経ネットワーク動態の可視化 -行動するときの自閉症脳機能ネットワークは密?- https://www.hokudai.ac.jp/news/pdf/230329_pr.pdf

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			
ドイツ	Max Planck Institute			
スペイン	Instituto Cajal			
オーストラリア	University of Melbourne			
韓国	Yonsei University			