

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月29日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21500367

研究課題名（和文） シナプス可塑性の *in vivo* 誘導とその応用.研究課題名（英文） Development of an *in vivo* induction method of synaptic plasticity.

研究代表者

野口 潤 (NOGUCHI JUN)

東京大学・大学院医学系研究科・特任助教

研究者番号：40421367

研究成果の概要（和文）：今回神経伝達物質グルタミン酸のプレシナプスからの放出を模倣する“ケイジドグルタミン酸の2光子励起分解法”を生体マウスに応用する方法を開発した。成体マウス大脳皮質2/3層錐体細胞において機能的なAMPA型グルタミン酸受容体の分布は樹状突起スパインの体積に比例することを初めて見出した。次に大脳皮質5/6層錐体細胞の樹状突起スパインに頻回にグルタミン酸を投与することにより、樹状突起スパインの体積の1時間以上にわたる減少、すなわちスパイン体積の長期的可塑性を誘導することに成功した。

研究成果の概要（英文）：We developed a methodology for *in vivo* administration of neurotransmitter glutamate which mimics glutamates that is released from presynaptic terminals. We found that in adult mouse L2/3 pyramidal neurons, distribution of functional AMPA receptors on spines was proportional to the spine volume. Then we found that repetitive stimulation of a dendritic spine of a living adult mouse caused long-term shrinkage of the spine which lasted 1 hour or more. Thus we could successfully induce long-term plasticity of spine volume, in other words, synaptic plasticity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：神経生理学

科研費の分科・細目：神経・筋肉生理学

キーワード：ニューロン・シナプス・神経回路・*in vivo*

## 1. 研究開始当初の背景

シナプスの可塑性の研究は培養細胞あるいは脳スライスを用いてそれまで主に実施されてきていた。しかし2002年にGFPを一部の神経細胞に発現するトランスジェニックマウスラインを用いた樹状突起の*in vivo*観察が報告され(Trachtenberg, J.T. et al.,

(2002) Nature 420:788-794.; Grutzendler, J. et al., (2002) Nature 420:812-816.)、以降2光子励起顕微鏡を用いたマウス大脳皮質の*in vivo*観察が実現可能であることが広く知られ、急速に発展していた。特に*in vivo*の機能(経験)の変化とその機能を担当する神経細胞のシナプスの変化とを対応さ

せて、マクロな機能を担うシナプスの働きを  
探る研究が注目されていた。

一方、本研究代表者が所属する研究室では  
2光子励起法によるケイジドグルタミン酸  
の光分解 (uncaging) によって単一シナプス  
にグルタミン酸を投与する技術を世界で初  
めて脳スライスで実用化した。この技術を利用し、  
樹状突起スパインの体積とそのスパイン上  
に存在する機能的なグルタミン酸受容体イ  
オンチャネルの分布は正に相関することが  
当研究室の松崎・河西ら (AMPA 受容体)  
および本研究代表者の野口・河西ら (NMDA  
受容体) によって示された (Matsuzaki, M.  
et al., (2001) Nat Neurosci. 4(11):1086-1092.;  
Noguchi, J. et al., (2005) Neuron. 46(4):609-622.)。さら  
に松崎・河西らは、uncaging によるグルタ  
ミン酸頻回刺激によって培養海馬 CA1 錐  
体細胞の樹状突起上のスパインの体積の増  
加が生じることを見だし、その際長期増強  
が起こることを報告した (Matsuzaki, M.  
et al., (2004) Nature. 429(6993): 761-766.)。

本研究代表者はこの技術を in vivo に応  
用する試みに既に着手しており、そのため  
の基盤となる手法の開発を行った。本研究  
ではそれをさらに発展させ in vivo のスパ  
インにグルタミン酸頻回刺激を行い、シ  
ナプス可塑性の誘導を行うための技術開  
発を行った。

## 2. 研究の目的

樹状突起スパインの形態可塑性を指標  
として生体においてシナプス可塑性を人  
工的に誘導する条件の検討を行うのが  
目的であった。

### (1) 低分子化合物の脳表面から脳内への 拡散の検討

ケイジドグルタミン酸の代替物質とし  
て、低分子色素が脳表面から脳内への程  
度拡散するのかを検討する。神経細胞や  
グリア細胞、血管への取り込みのほとん  
ど無い蛍光色素を用いて拡散の過程を  
time-lapse imaging することにより、我  
々の実験条件における、その色素の脳  
内の拡散定数を求める。その値からケ  
イジドグルタミン酸の脳内における拡  
散を予測する。

### (2) 機能的なグルタミン酸受容体分布 の in vivo マッピング

(1) で得られた情報に基づき、ケイジ  
ドグルタミン酸を脳内に拡散させ、2  
光子励起して uncaging することで、  
単一シナプスと同等の体積の範囲 (~1  
 $\mu\text{m}^3$ ) にグルタミン酸を脳内の任  
意の地点に投与できる。これを確認す  
る意味も込め、in vivo パッチク  
ランプ記録を行って電流を記録しながら  
樹状突起において網羅的にグルタミン酸  
投与

を行うことで樹状突起のそれぞれのスパ  
インに分布する機能的なグルタミン酸  
受容体の密度を調べる。

### (3) グルタミン酸 uncaging によるシ ナプス可塑性の in vivo 誘導

ケイジドグルタミン酸の uncaging を  
用いて単一シナプスを頻回に刺激しシ  
ナプス可塑性を in vivo で誘導する。  
海馬培養スライスでは、0 mM  $\text{Mg}^{2+}$   
条件で 1Hz, 60 回の刺激を加えること  
により明確なスパイン体積の増加を見  
だした。In vivo でも同じ条件での刺  
激を試みるほか、数種類の誘導法を用  
いることで単一シナプスの人工的な可  
塑性を達成し、それらを比較検討する  
(方法の項参照)。また、Long term  
depression (LTD) 誘導を in vivo に  
おいて試みる。

### (4) 脳インターフェースデバイスを用 いた樹状突起長期観察

東京大学工学部一木研究室と共同開  
発したデバイスを用いることにより、  
数日から数ヶ月にわたってタイムラ  
プスイメージングを行いながら任意の  
タイミングでケイジドグルタミン酸  
を脳内に投与し uncaging することが  
可能である。我々はこれを用いてシ  
ナプス可塑性を誘導し、また、長  
期間にわたって可塑性誘導刺激を断  
続的に加える試みも行う (長期間の  
学習を模倣)。可塑性を誘導したシ  
ナプスを最大数ヶ月にわたって追  
跡観察する。

### (5) 自然刺激によるシナプス可塑性 の観察

1 次視覚野錐体細胞の方位選択性は  
可変であることが報告されている。

視覚刺激による STDP や強い刺激  
によって方位選択性を变化させた神  
経細胞の樹状突起スパインの体積  
変化を刺激前後で網羅的に調べる  
ことにより、体積の変化したスパ  
イン同士の樹状突起上の位置関係  
や樹状突起における枝単位の可塑  
性の有無を検討する。

### (6) 光誘導 in vivo 可塑性を用 いた反応選択性の改変

(5) では、スパイン体積変化の観  
察にとどまるが、テーマ 6 では、  
さらにテーマ 3 で開発するシ  
ナプス可塑性の in vivo 誘導法  
を用いることにより樹状突起の 1  
つの分枝全体あるいは複数の分枝  
の多数のスパインに可塑性を誘  
導し反応選択性の改変を積極的に  
生じさせる。

### (7) in vivo (生体) マウス大脳 新皮質錐体細胞樹状突起スパ インの収縮

幼若海馬スライスなどで検討した  
スパイン収縮条件を参考にして、  
in vivo においてスパイン収縮  
条件を探索する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 低分子化合物の脳表面から脳内への拡散の検討

ケイジドグルタミン酸の拡散を調べるために、ケイジドグルタミン酸に分子量が近い化合物 Alexafluor488 その他の色素を用いる。色素を含む溶液をチャンバーに灌流してマウス脳内に拡散させ、それと同時に2光子励起顕微鏡のXZスキャンなどで色素の深さ方向の拡散を1 Hz程度でイメージングすることにより記録し、脳内拡散定数を算出する。

#### (2) 機能的なグルタミン酸受容体分布の in vivo マッピング

神経細胞に in vivo whole-cell recording (Kitamura, K. et al., (2008) Nat. Method. 5(1):61-67.) を行い電流の計測を行う。ケイジドグルタミン酸をチャンバーに灌流し、2光子励起による uncaging によってグルタミン酸を樹状突起に投与してシナプス後電位 (EPSC) を発生させる。これを ROI (region of interest) の各点において行うことで3次元の機能的なグルタミン酸受容体の分布を調査する (実験方法の概要: 図1 参照)。 アンケイジングもここで示したものとほとんど同様の方法で行う。

#### (3) グルタミン酸 uncaging によるシナプス可塑性の in vivo 誘導

2光子励起 uncaging 法によるグルタミン酸局所投与と同期して以下の各方法で樹状突起を脱分極しNMDA受容体を強く活性化してシナプス可塑性(長期増強)を誘導する。

##### ①チャンバーの $Mg^{2+}$ 濃度をゼロにする

脳 slice では成功している方法であるが、in vivo でうまくいかない場合は血管や脳内の細胞から  $Mg^{2+}$  が供給される可能性を疑う。10% Glycerol を尾静脈から注入し血液浸透圧を高めて間質液から血液へ浸透圧勾配を作りイオンの流入を低減させる。あるいは微小ガラス管を用いて樹状突起付近へ

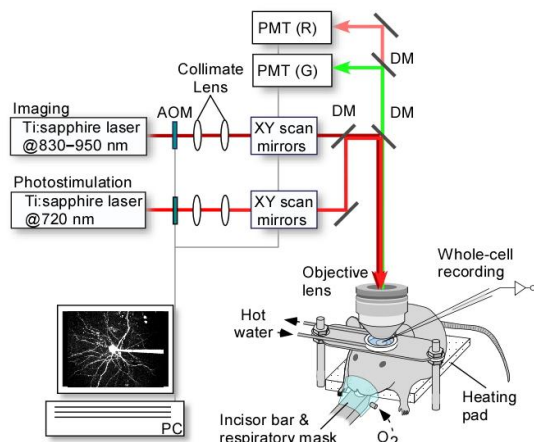


図1 In vivo uncaging 実験のセットアップ。マウスは基本的にウレタン麻酔を施し、ケトプロフェンによって鎮痛を行った。マウス頭蓋骨にチャンバーを接着したのち、頭蓋骨に直径2.7 mmのウインドウを設置した。

直接ゼロ  $Mg^{2+}$  の溶液を吹きかけ確実に溶液置換を図る。

##### ②高頻度 (Tetanus) ・多シナプス刺激

100 Hz, 1 sec 程度の高頻度刺激を加えて脱分極させる。このとき光軸方向に約 10  $\mu$  m 程度までの範囲を刺激できる2光子マイクロアンケイジング法 (Matsuzaki, M. et al., (2008) J. Neurophysiol. 99: 1535-1544.) を用いて焦点面以外に存在するスパインも刺激する。

##### ③In vivo patch clamp 条件で電流を注入して脱分極させる。

##### ④視覚刺激による脱分極。

##### ⑤ChR2 による脱分極。

ChR2 トランスジェニックマウスを用い、uncaging に用いる波長 720 nm とは異なる波長 860nm で樹状突起を脱分極させる。シナプス可塑性誘導の指標としては(2)の結果によっては、スパイン体積を用いる。また、上記と同時に長期抑制 (LTD) を誘導する試みも実施するほか、タンパク合成や BDNF シグナルの依存性の有無等を調べて、上記のそれぞれの誘導法の差を検討する。

#### (4) 脳インターフェースデバイスを用いた樹状突起長期観察

脳インターフェースデバイスを用いてケイジドグルタミン酸を脳内に灌流し uncaging することで、ある樹状突起にシナプス可塑性 (スパイン体積変化) を誘導する。この誘導は数日以上にわたって断続的に継続することが可能である。可塑性を誘導したスパインの観察を3日-数ヶ月の長期にわたって継続することにより、そのスパイン形態がその後どのように変化するかを検討する。

#### (5) 自然刺激によるシナプス可塑性の観察

ネコの視覚野において、方位選択性の最適方位の格子画像と、最適方位と異なる格子画像の2種類を決められた順番で繰り返し提示することによって最適方位が変化することが報告されている (Yao, H. and Dan, Y. etc.)。そこで、麻酔下あるいは覚醒マウスを用い同様の実験パラダイムを用いて神経細胞の最適方位の変更を生じさせる。最適方位の測定には電極あるいはカルシウムイメージングによる活動電位の検出を用いる。最適方位の変化を生じる前後で樹状突起を観察し、スパイン形態を精査することにより最適方位の変更に貢献したと予想されるスパインを特定する。このスパインの分布・あるいは可塑性誘導前の形態等を検討することにより樹状突起における演算メカニズムの考察を行う。

#### (6) 光誘導 in vivo 可塑性を用いた反応選択性の改変

上記(3)で開発した方法を用いて樹状突起上の複数のシナプス (スパイン) に可塑

性を誘導することにより視覚野において方位選択性の最適方位を変更するプロトコルを開発する。例えば、樹状突起のひとつの分枝に集中してシナプス可塑性を導入すれば効率的に最適方位を変更できる可能性がある。

最適方位を検定する手段として、我々の実験セットでAM体カルシウム指示薬を2/3層錐体細胞へ *in vivo* で導入できることは確かめている。また、エレクトロポレーション（電気穿孔）法によって単一の神経細胞に直接カルシウム指示薬を導入することも成功している。同様の操作により、Cameleon等のタンパク質カルシウム指示薬の使用も考えている。

#### 4. 研究成果

##### (1) 低分子化合物の脳表面から脳内への拡散の検討

まずケイジド化合物のような低分子量の化合物が脳内にどのように拡散していくかを分子量が同等の蛍光分子 Alexa fluor 488 を用いて調べ、脳内の濃度を推定した。また、色素の蛍光強度を脳外と脳内で比較することにより脳内の細胞間隙の割合を推定した。これは、カリウム電極や電子顕微鏡による結果とほぼ一致した。これにより脳内ケイジド化合物投与の基盤が整った。

##### (2) 機能的なグルタミン酸受容体分布の検討

次に、実際にケイジドグルタミン酸を必要な濃度脳内に拡散させ、2光子励起法を用いてそれぞれの単一スパインにグルタミン酸を投与した。これにより、大脳皮質2/3層錐体細胞樹状突起のそれぞれのシナプスの機能的なグルタミン酸受容体の密度はスパインの体積に比例することが世界で初めて生体マウスで確認できた（図2）

##### (3) グルタミン酸投与によるシナプス可塑性の *in vivo* 誘導

上記の結果から、機能的なグルタミン酸受容体の密度はシナプスの形態（スパイン体積）から推定できることがわかった。そこで、我々はスパイン体積を指標にして、頻回刺激による可塑性の誘導を試みた。その結果、1時間以上にわたるスパイン体積の縮小を *in vivo* で誘導することに成功した。単一スパインの可塑性を *in vivo* で生じさせた報告はまだ無く、将来的な治療への応用や脳内の計算メカニズムの解析につながる成果と考えている。

##### (4) 脳インターフェースデバイスを用いた樹状突起長期観察

東京大学工学部一木研究室と共同開発したデバイスを用いることにより、数日から1週間にわたって薬剤を一定濃度投与した条件下で、大脳皮質樹状突起スパインの変

化を経時観察した。

NMDA型グルタミン酸受容体阻害剤存在下や Enriched Environment (EE) 等でスパイン新生率あるいはスパイン消滅率が人工脳脊髄液 (ACSF) を灌流したときと異なることを見出した。

##### (5) 自然刺激によるシナプス可塑性の観察

##### (6) 光誘導 *in vivo* 可塑性を用いた反応選択性の改変

これらのテーマは実施することができなかった。

(7) *in vivo* (生体) マウス大脳新皮質錐体細胞樹状突起スパインの収縮現象のメカニズム解明のため、一旦培養脳スライス系の系に立ち戻り解析を行った。我々はアクチン線維を切断するタンパク質である cofilin をパッチピペット等を用いて神経細胞に注入するとスパインが収縮することを見出した。また、LTD条件刺激によるスパイン収縮は周囲のスパインに影響を与えて、周囲のスパインも収縮させることを見出した。cofilin タンパク質がスパインの収縮の周囲のスパインへの拡散と深く関係していると考えて解析を現在も進めている。

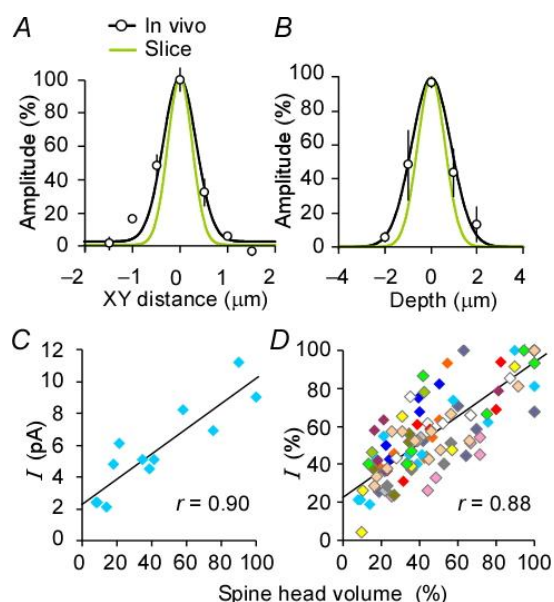


図2 In vivo uncagingによるAMPA型グルタミン酸受容体電流( $I_{AMPA}$ )の計測。

A, B.  $I_{AMPA}$ の横(A)および深度(B)方向空間解像度。解像度は脳スライスよりもわずかに悪かったが(*in vivo*: 0.8  $\mu\text{m}$ , 1.9  $\mu\text{m}$ , Slice: 0.6  $\mu\text{m}$ , 1.4  $\mu\text{m}$ ), それぞれのスパインを独立して刺激するのに必要な解像度を有していた。

C, D.  $I_{AMPA}$ のスパイン頭部体積依存性の検討。代表樹状突起のデータ(C), 全16樹状突起からのデータ(D).  $I_{AMPA}$ はスパイン頭部体積に強く相関した。

## 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8件)

- ① Kanemoto Y, Matsuzaki M, Morita S, Hayama T, Noguchi J, Senda N, Momotake A, Arai T, Kasai H. Spatial distributions of GABA receptors and local inhibition of Ca<sup>2+</sup> transients studied with GABA uncaging in the dendrites of CA1 pyramidal neurons. PLoS One、査読有、Vol. 6、No. 7、2011、e22652.  
DOI: 10.1371/journal.pone.0022652
- ② Noguchi J, Nagaoka A, Watanabe S, Ellis-Davies GC, Kitamura K, Kano M, Matsuzaki M, Kasai H. In vivo two-photon uncaging of glutamate revealing the structure-function relationships of dendritic spines in the neocortex of adult mice. The Journal of Physiology、査読有、Vol. 589、2011、pp. 241-249.  
DOI: 10.1113/jphysiol.2011.207100
- ③ Takahashi N, Hatakeyama H, Okado H, Noguchi J, Ohno M, Kasai H. SNARE conformational changes that prepare vesicles for exocytosis. Cell Metab、査読有、Vol. 12、2010、pp. 19-29.  
DOI: 10.1016/j.cmet.2010.05.013
- ④ Kasai H, Hayama T, Ishikawa M, Watanabe S, Yagishita S, Noguchi J. Learning rules and persistence of dendritic spines. Eur J Neurosci.、査読有、Vol. 32、2010、pp. 241-249.  
DOI:10.1111/j.1460-9568.2010.07344.x.
- ⑤ Kasai H, Fukuda M, Watanabe S, Hayashi-Takagi A, Noguchi J. Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. Trends Neurosci.、査読有、Vol. 33、No. 3、2010、pp. 121-129.  
DOI: 10.1016/j.tins.2010.01.001
- ⑥ 河西春郎, 野口潤. 特集 シナプスをめぐるシグナリング 11. 細胞骨格タンパク Actin. 生体の科学、査読無、Vol. 61、No. 5、2010、pp. 506-507.
- ⑦ 安松信明, 松崎政紀, 宮崎崇史, 野口潤, 河西春郎. 大脳スパインシナプスの統計的性質と学習記憶. 細胞工学、査読無、Vol. 28、No. 9、2009、pp. 886-891.
- ⑧ Hira R, Honkura N, Noguchi J, Maruyama Y, Augustine GJ, Kasai H, Matsuzaki M. Transcranial optogenetic stimulation for functional mapping of the motor cortex. J. Neurosci. Methods.、査読有、Vol.179、No. 2、2009、pp. 258-263.  
DOI: 10.1016/j.jneumeth.2009.02.001

[学会発表] (計13件)

- ① Noguchi J. Neuronal function analysis by in vitro and in vivo application of two-photon uncaging. 第89回 日本生理学会大会、2012年3月31日、長野県松本市 信州大学松本キャンパス.
- ② Takehara H, HYDROGEL REACTIVE MICROBONDING (HRMB) METHOD FOR THE USE OF TETRA-PEG GEL AS A STRUCTURAL MATERIAL FOR MICROFLUIDIC DEVICES. 15th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μTAS 2011), 2011年10月3日、米国ワシントン州シアトル市 Washington State Convention Center.
- ③ 野口潤, in vivo 2光子アンケイジング法を用いた成体マウス新皮質樹状突起スパインの形態機能相関解析. 第34回 日本神経科学大会、2011年9月15日、神奈川県横浜市 パシフィコ横浜.
- ④ 竹原宏明, ハイドロゲルリアクティブマイクロボンディング法を用いたハイドロゲル透過膜を有するマイクロ流路の開発. 第72回 応用物理学会学術講演会、2011年8月30日、山形県山形市 山形大学 小白川キャンパス.
- ⑤ Takehara H, MICROFLUIDIC INTERFACE DEVICES FOR IN VIVO ANALYSIS OF NEURAL CELLS USING 2-PHOTON LASER SCANNING MICROSCOPY. 2010年10月7日、オランダ国フローニンゲン Martiniplaza Congress Center.
- ⑥ 竹原宏明, 生きたマウスを用いた神経細胞研究のためのマイクロブレインインターフェイスデバイスの開発とその展望. 第71回 応用物理学会学術講演会、2010年9月15日、長崎県長崎市 長崎大学文教キャンパス.
- ⑦ Takehara H, Fabrication process of flexible and transparent microelectrode arrays for in vivo



sensing. International Microprocesses and Nanotechnology Conference, 2009年11月18日, 北海道札幌市 シェラトン札幌ホテル.

- ⑧ Noguchi J, Development of a method for in vivo neurotransmitter administration using two-photon uncaging of caged glutamate/GABA. Society For Neuroscience (北米神経学会), 2009年11月8日, 米国・シカゴ市 McCormick Place convention center.
- ⑨ 平 理一郎, チャネルロドプシン2を用いた経頭蓋的光刺激による運動野のマッピング. 日本神経科学学会, 2009年9月18日, 愛知県名古屋市 名古屋国際会議場.
- ⑩ 河西 春郎, 2光子顕微鏡が切り拓く新しい脳機能の可視化解析. 日本神経科学学会, 2009年9月16日, 愛知県名古屋市 名古屋国際会議場.
- ⑪ 竹原 宏明, 生体計測のための透明微小電極の性能評価応用物理学会. 応用物理学会, 2009年9月9日, 富山県富山市 富山大学.
- ⑫ Matsuzaki M, TRANSCRANIAL OPTOGENETIC STIMULATION FOR FUNCTIONAL MAPPING OF THE MOUSE MOTOR CORTEX. International Congress of Physiological Sciences (国際生理学会), 2009年7月31日, 京都府京都市 京都国際会館.
- ⑬ Noguchi J, IN VIVO TWO-PHOTON UNCAGING OF GLUTAMATE TO INVESTIGATE THE PROPERTIES OF DENDRITIC SPINES IN ADULT NEOCORTEX. International Congress of Physiological Sciences (国際生理学会), 2009年7月31日, 京都府京都市 京都国際会館.

[その他]

ホームページ等

<http://www.bm2.m.u-tokyo.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

野口 潤 (NOGUCHI JUN)

東京大学・大学院医学系研究科・特任助教  
研究者番号: 40421367

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし