

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15635

研究課題名（和文）広視野2光子顕微鏡を用いた神経回路評価系の開発と脳疾患研究への応用

研究課題名（英文）Development of a neuronal network evaluation system and application to brain disease research using wide-field two-photon microscopy.

研究代表者

漆畑 拓弥 (Urushihata, Takuya)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：40847670

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では単一細胞レベルの神経ネットワークの記憶・学習による変化を明らかにすることを目的とした。記憶・学習試験を行ったマウスに対して、広視野型2光子レーザー顕微鏡を使用したカルシウムイメージングを実施し、マウスの大脳皮質における数千個のニューロンの活動を同時に記録した。神経ネットワークの変化を捉えるために開発された新規評価手法により、記憶形成に伴う脳ネットワーク変化が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの脳神経機能研究では単一細胞レベルの空間分解能で神経ネットワークの機能及びその変化を評価する方法は実現されていなかったため、脳疾患や加齢に伴う神経ネットワークの変化についての調査は不十分であった。本研究で開発された評価手法は脳疾患研究における脳機能障害の理解や治療法開発だけでなく、基礎神経科学における神経回路の解釈や制御などにも役立つことが考えられる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of the present study was to elucidate learning-induced changes in neuronal network on a single cellular level. Calcium imaging using a wide-field two-photon laser microscope was performed on mice conditioned with fear memories to record the activity of thousands of neurons in the cerebral cortex. A novel evaluate method developed to detect changes in neuronal networks revealed changes in brain networks associated with memory formation.

研究分野：神経科学

キーワード：in vivoイメージング 神経ネットワーク 二光子顕微鏡

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

認知症などの神経変性疾患では、運動障害、記憶障害、行動障害、高次脳機能障害をはじめとする様々な症状が、個々の神経細胞や脳領域が構成する多様な神経ネットワークの破綻を原因として現れると考えられている¹。脳内に病理性タウの過剰発現・蓄積を示し、行動・学習異常を引き起こすタウオパチーモデルマウス (rTg4510 マウス) の神経機能評価において²⁻⁵、神経細胞個別の活動評価はこれまでに実施されているものの、脳萎縮や学習障害が起きている月齢においても神経機能障害を検出できていないことや、いくつかの先行研究の結果に相違があることから、神経細胞個別の活動評価は認知症モデル動物の神経機能評価系としては不十分であると考えられる。したがって、脳疾患による脳機能障害を捉えるためには脳における情報処理機能の本質である神経ネットワークの破綻を評価する必要がある。現在、神経ネットワーク評価のために機能的磁気共鳴画像 (fMRI) がよく実施されている。しかしながら fMRI は全脳の活動を非侵襲で評価可能であるというメリットを持つものの、fMRI 信号が血管反応を介した 2 次的な神経活動指標であることや、空間分解能が低いことから細胞レベルの神経ネットワークを評価することは不可能である。単一細胞レベルの空間分解能で脳領域内および領域間神経ネットワークの機能の評価する系の実現は、疾患における神経回路破綻のメカニズムや、病理性蛋白と神経回路破綻の因果関係の解明につながると考えられる。

また、神経ネットワークは、記憶や学習に伴い可塑的に変化するといわれているが、領域内および領域間の神経ネットワークのレベルでは直接証明されていない。本研究では新規ネットワーク評価系の開発を行い、記憶形成に伴う領域内および領域間の神経ネットワークの可塑的変化の定量化を実現する。記憶形成に伴う神経ネットワークの可塑的変化を理解することは、脳疾患によるその破綻を理解するために非常に重要である。

2. 研究の目的

本研究では、個々の神経細胞から構成される領域内および領域間の神経ネットワークの機能評価を実現し、記憶学習時の神経ネットワークの可塑的変化及び、認知症モデル動物におけるその破綻について評価することで、病理性蛋白による認知・記憶障害のメカニズム解明を研究開始当初の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 本研究課題の申請時では、記憶・学習時のマウス神経ネットワークの可塑的変化を捉えるために、バーチャルリアリティ行動実験システムを使用し、記憶学習試験中のマウスの神経活動を測定する計画であった。しかし、バーチャルリアリティ行動実験システムを使用した行動実験系の立ち上げに時間がかかったため、申請段階で考えられていた次善策である音刺激を使用した恐怖条件付けによりマウスの記憶形成を行うこととした。実験の一連の流れは、恐怖条件付けで使用する音刺激に対する神経活動の 2 光子カルシウムイメージングによる測定、恐怖音条件付け、恐怖音条件付け後の音刺激に対する神経活動の測定であった。

(2) カルシウムイメージングによる神経活動の測定のために、マウスの脳神経細胞にアデノ随伴ウイルス (AAV) による遺伝子改変を施し (シナプシン: GCaMP) 直径 5mm の頭蓋窓をプレグマに対して AP: -1.5mm, ML: 2.5mm を中心に取り付けた。測定は広視野型の 2 光子レーザー顕微鏡 (Multiphoton Mesoscope, THORLABS) を使用し、Posterior parietal association areas (PTLp) Retrosplenial area (RSP) Somatosensory areas (SS) Somatomotor areas (MO) の領域を含む矢状方向に長い 3200 μm \times 2000 μm の領域の神経活動を測定した。測定は脳表から 125 ~ 225 μm の深さを 25 μm 枚に測定し (z=5 slice, 2/3 層) 時間分解能は 1Hz であった。

(3) 恐怖音条件付けはチャンバーの中で条件刺激であるブザー音を 30 秒鳴らし、ブザー音の終了間際に電気ショックを与えることで実施した。条件付けの成立は、電気ショックを与えた時とは異なるチャンバーにマウスを入れ、条件刺激であるブザー音を提示した時のすくみ反応を測定することで確認した。

4. 研究成果

(1) ネットワーク評価系の開発

神経ネットワークを評価するために神経細胞や領域間の同期性を評価する相関解析は有効な手段でありよく使用されているが、評価する神経細胞が多数である場合に機能的に関連のない神経細胞の組み合わせが多くなり変化を過小評価してしまう可能性がある。したがって本研究では機械学習を使用したネットワークの評価手法を開発した。機械学習は入力値の重要性を示す「Weight vector」を求めることで分類や回帰を行うため、重要性の低い入力値の影響を受けにくい。研究代表者は神経ネットワークにおいて強い機能接続を持つ神経細胞はネットワーク内の他の神経細胞とともに秩序立った活動を行っているかと仮定し、標的となる神経細胞の活動をほかの神経細胞の活動からどの程度推定できるかどうかを調べることで、標的神経細胞がネ

ネットワークに寄与している度合いを評価可能であると考へた(図1)。具体的には、

2光子カルシウムイメージングによって測定された神経細胞の活動から、機械学習(サポートベクター回帰)を用いて神経活動の法則を学習することで神経活動推定器を作成した。これを使用して標的神経細胞の神経活動を推定し、実際に測定された神経活動との相関係数を神経活動の推定精度の指標とし、標的神経細胞のネットワークへの接続の強さを評価した。また、領域内のネットワークの評価だけでなく、1つの領域における神経細胞群の活動から別の領域の標的神経細胞の活動を推定することで、領域間のネットワークについても評価を行った。

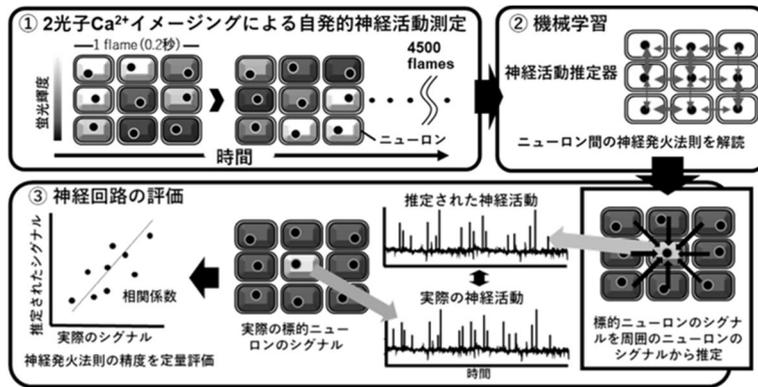


図1. 神経ネットワーク評価法

また、領域内のネットワークの評価だけでなく、1つの領域における神経細胞群の活動から別の領域の標的神経細胞の活動を推定することで、領域間のネットワークについても評価を行った。

(2) 音刺激に対する神経反応の恐怖条件付けによる変化

測定した画像におけるPTLp、RSP、SS、MOの4領域は脳アトラスに基づき分類された。まず、各領域における音刺激に対して神経応答を示した神経細胞の割合について、恐怖条件付けの前後で調べた。PTLpにおいて恐怖条件付け前に比べて恐怖条件付け後で音刺激に反応する神経細胞の割合の有意に増加することが明らかとなった(図2)。

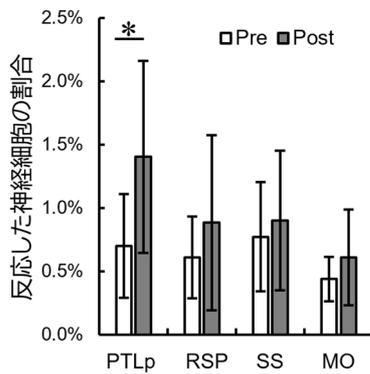


図2. 音刺激に反応した神経細胞

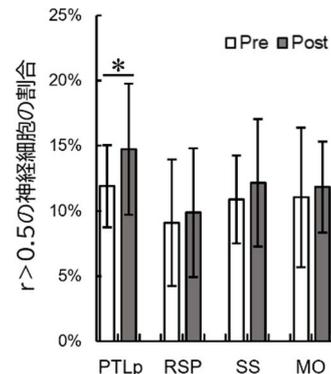


図3. 領域内ネットワークの変化

(3) 領域内ネットワークの恐怖条件付けによる変化

ネットワーク評価手法を使用し、4つの領域内のネットワークについて恐怖条件付けによる変化を調べた。高い推定制度($r > 0.5$)を示した神経細胞の割合はPTLpにおいて恐怖条件付け後に恐怖条件付け前に比べて有意な増加を示し(図3)、恐怖条件付けによりPTLpにおけるネットワークの接続が強くなることが明らかになった。

(4) 領域間ネットワークの恐怖条件付けによる変化

各領域の神経活動をほかの領域の神経活動から推定することにより、領域間ネットワークの恐怖条件付けによる変化について評価を行った。図4はa: PTLp、b: RSP、c: SS、d: MOの領域における神経細胞の活動をほかの領域の神経活動から推定した場合の推定制度の高い($r > 0.4$)神経細胞の割合を示す。RSPの活動から高い精度で推定されるPTLpの神経細胞の割合(図4a)、RSPの活動から高い精度で推定されるSSの神経細胞の割合(図4c)、PTLpの活動から高い精度で推定されるMOの神経細胞の割合(図4d)が恐怖条件付け後に有意な増加を示し、PTLpとRSP、RSPとSS、PTLpとMOのネットワーク接続が恐怖条件付けにより強くなることが明らかとなった。

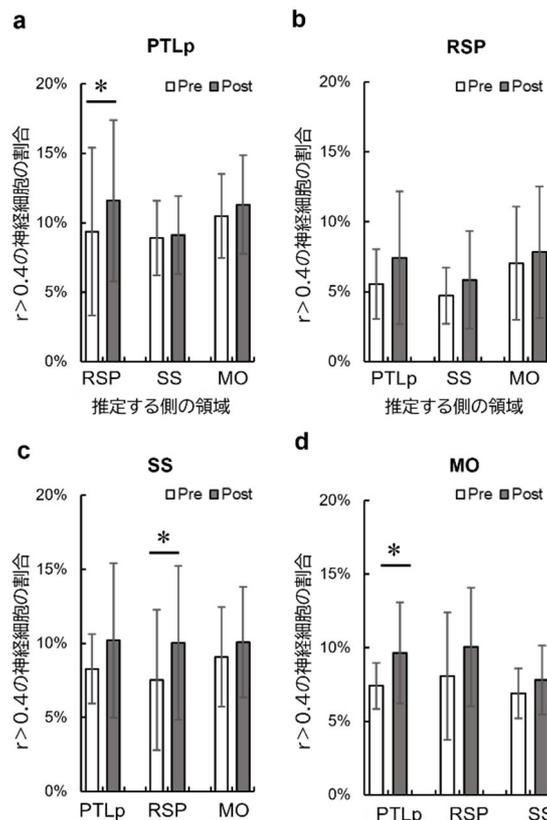


図4. 領域間ネットワークの変化

(5) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

本研究では、広視野型2光子レーザー顕微鏡で測定された複数領域における神経活動を新規ネットワーク評価手法によって解析し、領域

内及び領域間のネットワークの記憶形成に伴う変化を捉えることに成功した。この手法を使用することで、認知症における行動・記憶障害の根底にある脳神経回路破綻のメカニズムの正しい理解が可能になることが期待される。加えて、本研究で開発された新規ネットワーク評価手法は脳疾患研究だけでなく基礎神経科学の分野に対しても重要な知見を提供することが期待される。

(6) 今後の展望

本研究では当初予定していた認知症モデルマウスのネットワーク解析まで研究期間内に解析を終了することができなかった。これは、従来よりも約 25 倍広い測定視野かつ、5 つの深度で神経活動を測定したため想定を大きく越えた時間を画像解析に要したためである。今後は、引き続き認知症モデルマウスの恐怖条件付けに伴うネットワーク形成異常について解析を進めるとともに、深さ方向のネットワークにも着目した解析を進めていく。

<引用文献>

1) Palop et al., 2006 Nature 19;443:768-73. 2) Rocher et al., 2010 Exp Neurol 223:385-93. 3) Kuchibhotla et al., 2013 Proc Natl Acad Sci USA 7;111:510-4. 4) Menkes-Caspi et al., 2015 Neuron 4;85:959-66. 5) Jackson et al., 2017 Cell Rep 28;18:3063-3068.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田桑弘之、漆畑拓弥
2. 発表標題 タウ病変モデルにおける抑制性神経の機能障害
3. 学会等名 タウ研究会2022
4. 発表年 2022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
---------	---------