

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700403

研究課題名(和文)学習が引き起こす海馬神経回路可塑性の in vivo 二光子イメージング

研究課題名(英文) In vivo two-photon imaging of learning-induced hippocampal neuronal circuit plasticity

研究代表者

佐藤 正晃 (Sato, Masaaki)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：90518325

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000 円、(間接経費) 1,020,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究は、研究代表者が過去に確立した蛍光カルシウムセンサータンパク質発現トランスジェニックマウスや深部脳イメージングなどの技術を用いて、マウスが二光子レーザー顕微鏡周囲に作り出されたバーチャルリアリティ環境下で空間行動を行うときの海馬CA1野の神経回路活動をイメージングした。得られた各細胞の活動の時系列データについて、活動のタイミングとその時点の動物の仮想的な位置を解析したところ、全細胞のうち一部の細胞集団が場所特異的な活動を示すことが明らかとなった。またイメージング画像中での各細胞の位置から、このような場所細胞群の海馬神経回路内の解剖学的配置を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：It has been thought that acquisition, retention and recall of memories are mediated by activity of groups of neurons that are formed and reorganized by learning and experience. In this study, we imaged hippocampal CA1 neuronal circuit activity in head-fixed mice performing spatial behavior in virtual reality by using two-photon deep brain imaging of transgenic mice expressing genetically-encoded calcium indicators in the brain. We computationally extracted activity time-series of hundreds of neurons from images and confirmed that a subpopulation of CA1 pyramidal neurons exhibited virtual place-specific activity. We also observed that neurons with different virtual place fields were anatomically intermingled each other in hippocampal CA1 local circuits.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：脳・神経 カルシウムイメージング 二光子レーザー顕微鏡 バーチャルリアリティ マウス

1. 研究開始当初の背景

脳における情報表現を担う動的回路として、カナダの心理学者 Hebb(1904-85)は「細胞集合体(セルアセンブリ)」と呼ばれる、協調的に働く神経細胞集団が随時形成する機能的回路の概念を提唱した。海馬 CA1 の錐体細胞は、動物がある場所に存在するときのみ発火する「場所細胞(place cell)」としての活動を示すことが知られる(O'Keefe and Dostrovski, 1971)。テトロード電極を用いたこれまでの電気生理学的研究では、ラットにある空間を探索させると、その後の睡眠時の海馬で、覚醒探索時にみられた神経活動のパターンが再現される「リプレイ(replay)」と呼ばれる現象が起こることが報告されている(Skaggs and McNaughton, Science 271, 1870-3, 1996)。このことは海馬において、動物の覚醒時の経験が、複数の細胞からなる「細胞集合体」様の機能回路の活動パターンとして記録保存されることを示している。これまでのテトロード記録では、こうした神経活動パターンを生み出す細胞の空間的配置を正確に知ることは困難であったが、本研究で用いた海馬神経回路活動の *in vivo* 二光子イメージングでは、数十から数百の CA1 錐体細胞の位置と活動を同時に記録することができるため、海馬 CA1 野の神経回路の活動を、より網羅的に測定・解析することができる。また本研究のイメージングでは、研究開始当初に広く行われていた低分子量カルシウム感受性色素の組織内微量注入の代わりに、蛍光カルシウムセンサータンパク質を海馬に長期安定発現させたトランスジェニックマウスを用いた。これにより、覚醒マウスのイメージングのような難度の高い実験でも信頼性の高いデータを効率よく取得できるだけでなく、同一個体の同一細胞集団を繰り返し観察する慢性イメージングで、回

路活動の変化を学習の前後で比較することが可能となった。

2. 研究の目的

本研究は、申請者がこれまでに開発した深部脳イメージングや蛍光カルシウムセンサータンパク質を発現するトランスジェニックマウスなどの技術を用いて、学習と記憶形成がひきおこす海馬神経回路活動の可塑的变化を、単一細胞解像度をもつ *in vivo* 神経活動イメージング実験で解明することを目的とする。

3. 研究の方法

海馬 CA1 野の錐体細胞集団に蛍光カルシウムセンサータンパク質 G-CaMP7 を発現する Thy1-GCaMP7 トランスジェニックマウスの頭部に金属製ヘッドプレートの接着と頭蓋骨片の除去手術を施した後、背側海馬 CA1 の上にある大脳皮質組織(頭頂連合野の一部)を、海馬表面が露出する最小限の量だけ外科的に除去した。皮質除去後の穴に、底部にカバースリップを接着したステンレス製リングのイメージング窓を埋め込んだ後、マウスをホームケージに戻した。

2-3 週間ほどの回復期間の後、マウスを二光子レーザー顕微鏡下のフレームにヘッドプレートを介して頭部固定した。背側海馬表面から約 150 μm 下にある CA1 錐体細胞層に二光子顕微鏡の焦点を合わせ、顕微鏡周囲に作り出されたバーチャルリアリティ環境下でマウスが行動するときの CA1 神経回路活動のイメージングを行った。対物レンズは低倍率で高 NA 値のものを用い、ズームなしで 512x512 ピクセルの画像を取得すると、最大で約 0.5mm x 0.5mm の視野の中に数百個の錐体細胞の活動が同時にイメージングできた。スキャンは高速型のレゾナントスキャナーを使うことで 1 秒間あたり 15 枚の画像

を取得した。

4. 研究成果

平成 24 年度は、仮想空間内に設定された直線路を歩行するときの海馬の場所細胞活動ダイナミクスを in vivo 二光子カルシウムイメージングで明らかにした。二光子レーザー-顕微鏡下に頭部固定したマウスに対し、顕微鏡周囲のスクリーンに投影された仮想直線路を歩行する訓練を数日間行った。この仮想直線路には、壁に異なるパターンを描いたり、直線路の近傍に目立つ物体を配置することで場所手がかりを設定した。このように訓練した動物について、仮想直線路内で歩行するときの CA1 錐体細胞層の蛍光画像を約 10 分間経時的に取得した。得られた画像データを、画像解析プログラムによって解析すると、元の画像データから、数百個の錐体細胞の形態と蛍光強度変化の時系列が抽出された。これらの時系列データについて、細胞活動のタイミングとその時点の動物の仮想的な位置を解析したところ、全細胞のうち一部分の細胞集団のみがこのような場所特異的な活動を示すことが明らかとなった。またイメージング画像中での各細胞の位置から、このような場所細胞群の海馬神経回路内の解剖学的配置を明らかにした。続いて、これら場所細胞と非場所細胞の 2 つのグループについて、それぞれの細胞グループが歩行または安静時にどのように活動パターンを変化させているかを、活動時系列の相関解析などで明らかにした。

平成 25 年度は、前年度の仮想直線路課題の発展型として、学習と記憶に伴う神経回路活動をイメージングするための仮想空間課題学習を開発した。顕微鏡下に頭部固定されたマウスはバーチャルリアリティ環境内に設定された直線路を一方向に移動し、

途中の目標地点で報酬を得る。直線路の反対端に達したマウスは再びスタート地点に置かれ、同一のタスクを繰り返す。直線路には、その外側に 3 つの大きな物体を配置し（遠位手がかり）、加えて目標地点の壁と床の模様を変えることで（近位手がかり）、2 種類の異なる視覚的場所手がかりを設定しておく。マウスは最初、目標地点を通過したときに直ちに報酬が与えられる条件（非遅延課題）で数回訓練し、この仮想直線路で歩行することを学習させる。次に目標地点で一定時間（通常 1 ~ 2 秒）停止したときのみ報酬が得られる条件（遅延課題）に切り替えて訓練を続け、特定の場所を認識することを学習させる。

このような課題を遂行しているマウスの海馬の神経回路活動を、前年度確立した覚醒マウスからの二光子カルシウムイメージングで画像化した。得られた画像から個々の細胞の形態と活動時系列を自動画像解析プログラムによって抽出し、行動のデータとの相関を解析すると、一部の細胞集団が場所特異的な細胞活動を示すことが確認できた。次に、学習の過程に伴う神経回路活動の変化を解析するために、同一細胞集団の活動を追跡観察する慢性イメージング実験を行った。本研究期間の終了時点では、異なるセッションで得られた細胞活動の地図を比較するための解析法を検討しているところである。今後の解析により、学習に伴う海馬神経回路活動の可塑的变化が明らかになると期待できる。

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）

〔学会発表〕（計 5 件）

1. 佐藤正晃「二光子カルシウムイメージングを用いた行動中の海馬神経回路活動の可

視化」第 87 回日本薬理学会年会シンポジウム『最先端技術による神経回路網の多次元解析と脳内微小環境構造の可視化；脳疾患の原因解明を目指して』、2014 年 3 月 19 日、仙台

2. Masaaki Sato, Kotaro Mizuta, Masako Kawano, Takashi Takekawa, Tanvir Islam, Hiroshi Yamakawa, Yoko Yamaguchi, Tomoki Fukai, Masamichi Ohkura, Junichi Nakai, Yasunori Hayashi. "Hippocampal CA1 network dynamics during locomotion in virtual reality", Society for Neuroscience 43rd annual meeting, 2013 年 11 月 13 日、米国サンディエゴ

3. Masaaki Sato "Visualizing the dynamics of hippocampal circuit activity in vivo", Neuro2013(第 36 回日本神経科学大会、第 56 回日本神経化学会大会、第 23 回日本神経回路学会 合同大会) 企画シンポジウム『海馬-嗅内皮質系における認知記憶情報のダイナミクス』、2013 年 6 月 20 日、京都

4. 佐藤正晃「バーチャルリアリティ環境下におけるマウス深部脳神経回路活動のイメージング」、計測自動制御学会 システム・情報部門 学術講演会 2012、2012 年 11 月 21 日、名古屋

5. 佐藤正晃、イスラム・タンビル、竹川高志、山川宏、河野真子、山口陽子、深井朋樹、大倉正道、中井淳一、林康紀「二光子カルシウムイメージングのためのマウス仮想ナビゲーションシステム」、第 35 回日本神経科学大会、2012 年 9 月 20 日、名古屋

{その他}
ホームページ等

<http://researchmap.jp/satomasaki/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 正晃 (SATO, Masaaki)
理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員
研究者番号：90518325