

## 平成 27 年度 委託研究開発成果報告書【公開版】

## 1. 研究開発課題名と研究開発代表者名

事業名		革新的技術による脳機能ネットワークの全容解明プロジェクト
研究開発課題名		マクロとミクロをつなぐマルチモーダル機能マッピング技術の開発
機関名		国立大学法人九州大学
研究開発	所属 役職	大学院医学研究院 教授
担当者	氏名	大木 研一

## 2. 研究開発成果の内容

## ①マクロレベルでの血流とカルシウムシグナルの同時イメージング

広範囲で、シグナル・ノイズ比のよいデータを取得するためにマクロズーム顕微鏡を導入し、低倍(2倍)高NA(0.5)の対物レンズを用いて、1光子で機能マッピングを行う技術をマウスで開発した。カルシウムイメージングの領域を拡大するため、マーモセットの二次視覚野(V2)に、カルシウム指示薬であるOGB-1AMを15~25箇所注入することにより、5mm x 2.5mm程度の広範囲にカルシウム指示薬を導入することに成功した。さらに、マクロレベルの血流イメージングをマーモセットに適用し、マーモセットV2の3mm x 3mmの範囲の機能イメージングを行い、方位選択性マップを計測することに成功した。

GCaMPなどのGECIを使う場合は、AAVで従来(500 microns程度)より広範囲に導入する必要があるが、この技術をマウスで開発した。具体的には以下の4つの方法を開発した。

- (1) 広範囲(5mm程度)に高密度に感染。生後0-2日齢のマウスの脳にAAV1-Syn-GCaMP6sを注入することにより実現した。
- (2) 広範囲(片側の全脳)に高密度に感染。生後0日齢のマウスの脳にAAV9-Syn-GCaMP6sを感染させることにより実現した。
- (3) 広範囲(5mm程度)に高密度に感染。大人のマウスの脳にAAV9-Syn-GCaMP6sを感染させることにより実現した。
- (4) 全脳に低密度で感染。E13-14のマウス胎児の脳室にAAV1-Efla-GCaMP6sを注入することにより実現した。

(2)の方法は、大人の脳でも使えるため、マーモセットに適用しやすい。マーモセットのV2にAAV9-Syn-GCaMP6sを注入したところ、従来(300 microns程度)よりは広い範囲(500 microns程度)に発現が見られたが、まだ十分、広範囲に発現させるに至っていない。理由としては、マーモセットの脳においては、後述のようにhSynapsin, CAGなどのプロモーターではGCaMPの発現量が十分でない可能性があり、現在、国立研究開発法人理化学研究所山森班と連携してTet-systemを用いた発現系を試している(後述)。

## ②マーモセット脳の安静時の機能的相関

安静時におけるマウスの脳活動の詳細な時空間構造、更にそれが脳血流に変換される様子を観察することに成功した。行動していない状態の動物で自発的に起きる安静時脳活動は、機能的磁気共鳴画像法 (fMRI) により脳血流信号でも観察できるため近年活発に研究され、脳疾患診断などへの応用が期待されている。これまで、安静時における神経活動の詳細や、それがどのように脳血流信号に変換されているのかは不明だった。この研究では、神経活動を可視化した遺伝子改変マウスで神経活動と脳血流信号を同時計測するシステムを開発し、安静時脳活動の詳細な時空間パターンと、それが脳血流へ反映される過程を解明した。これにより、血流変化による領野間相互作用がカルシウムシグナルによる相互作用と対応していることが示された。さらに、安静時の自発活動は、脳全体に波及する波として発生していること、その波の各時点でのパターンが領野間相互作用のパターンと類似していることが見出され、領野間相互作用のパターンは、自発活動の波に埋め込まれていることが明らかになった。この知見は、安静時脳活動を利用した脳のネットワーク構造の解明や脳疾患診断の技術開発へ繋がるのが期待される。研究結果は「米国科学アカデミー紀要 (PNAS)」に発表された(Matsui et al., 2016, PNAS)。マーモセットの安静時の神経活動、脳血流の変化については、データ取得を開始した。十分なデータを得ることと、その解析は平成28年度の課題である。

### ③マーモセットの視覚関連領野の機能マッピング

まず、マウスの全脳をマクロレベルで全て同時に機能マッピングする技術を開発して、高次視覚野の外にも視覚刺激に反応する領域があることを見出した(Murakami et al., 2015)。マウスにおける全脳機能マッピングは重要な課題となってきたが、脳が小さいため、fMRIを適用することは困難だった。この研究では、全脳の興奮性細胞にカルシウム感受性タンパク質を発現している遺伝子改変マウスと、広域蛍光顕微鏡を用いて、大脳半球全体を含む広範囲で機能マッピングを行い、視覚刺激に対して応答を示す領野を調べた。その結果、視覚刺激に対して、一次・高次視覚野だけではなく、脳梁膨大後部皮質(RS)と前帯状皮質(AC)が視覚応答を示すことを見出した。これらの領野は、高空間周波数・低時間周波数の縞模様強く反応した。さらに、二光子カルシウムイメージングを用いて、RSの神経細胞は方位選択性を持っていることを見出した。これらの結果から、RSの神経細胞は視覚情報の中でも、物の形のような空間的に細かい情報を表現していて、その情報を空間ナビゲーションに役立てているのではないかと考えられる。

マーモセットにおいてはV2の広域機能マッピング(3mm x 3mm)を行った。方位選択性マップが観察されたが、高空間周波数の方位刺激に対しては反応の弱い領域があった。このV2内の領域による反応の性質の違いは、V2の縞(stripe)構造、さらには背側経路・腹側経路の違いに関係している可能性がある。また、マーモセットのV2において、cytochrome oxidase染色を行って、stripe構造を観察する技術を開発した。平成28年度には、V2内の反応の性質の違いとstripe構造の関係を調べる。

### ④領野間をつなぐ軸索の2光子機能イメージング

2光子機能イメージングで観察するための準備として、マーモセットのV1に蛍光タンパクを発現するAAVウイルス(AAV1-Syn-GCaMP6sまたはAAV1-CAG-GCaMP6s)を感染させ、その軸索の蛍光を高次視覚野(V2)で観察することに成功したが、残念ながら軸索での発現量は、2光子で活動

を観察するのに十分なものではなかった。現在、山森班と連携して、山森班により開発された、Tet-system により GCaMP の発現量を増幅するウイルスの作成に取り掛かっており、平成 28 年度にはそのウイルスを用いて、軸索の 2 光子機能イメージングを行う。

#### ⑤ マーモセットの視覚関連領野の間を伝わる情報のマッピング

上記のように、AAV1-Syn-GCaMP6s または AAV1-CAG-GCaMP6s を用いた場合、軸索での発現量は 2 光子で活動を観察するのに十分なものではなかったため、現在、山森班と連携して、山森班により開発された、Tet-system により GCaMP の発現量を増幅するウイルスの作成に取り掛かっている。また、マーモセットの V1/V2 において、cytochrome oxidase 染色を行って、blob / stripe 構造を観察する技術を開発した。平成 28 年度には上記のウイルスを用いて、マーモセットの視覚関連領野の間を伝わる情報のマッピングを行う。

#### ⑥ コラム～細胞レベルをつなぐ血流シグナルとカルシウムシグナルのイメージング

マーモセットの二次視覚野 (V2) に、カルシウム指示薬である OGB-1AM を 15～25 箇所注入することにより、5mm x 2.5mm 程度の広範囲にカルシウム指示薬を導入することに成功した。この方法を用いてマーモセットの V2 にカルシウム指示薬を導入し、16 倍対物レンズ(NA0.8)を用いて 2 光子カルシウムイメージングを行ったところ、約 800 x 800 microns の範囲にある約 1000 個の程度の神経細胞の活動を計測することに成功した。同じ部位から血流シグナルのイメージングも行い、約 3 x 3 mm の範囲から血流シグナルによる方位選択性マップを計測することに成功した。また、マーモセットの V2 に AAV2/9-Syn-GCaMP6s または AAV2/9-CAG-GCaMP6s を注入し、2 週間後に約 500 x 500 microns の範囲に GCaMP6s が発現していることを確認し、2 光子カルシウムイメージングで、約 200～300 個の神経細胞の活動を計測することに成功した。GCaMP6s の発現は、樹状突起やそのスパインにも観察された。

#### ⑦ マーモセットの視覚関連領野のコラム構造の機能マッピング

⑥の方法を用いて、マーモセットの一次視覚野 (V2) の、単一細胞レベルの機能マッピングを行った。4 方位 8 方向の視覚刺激を与えて、それに対する反応を計測したところ、個々の細胞が方位選択性を示すのが観察された。800 ミクロンの範囲内にある多数の神経細胞の方位選択性の分布を調べたところ、方位選択性の類似した細胞が横方向に 100 x 200～300 microns 程度の範囲に集合していて、方位選択性マップ作っていることが観察された。2/3 層の細胞の方向選択性は非常に弱かった。V2 内に方位刺激にあまり反応を示さない細胞からなる領域があることも観察された。血流シグナルを用いた機能マッピングでも方位選択性マップが観測され、2 光子カルシウムイメージングから得られた方位選択性マップの構造とおおよそ一致することが観察された。

また、マーモセットの色覚 (opsin) 遺伝子の genotyping の技術を開発し、2 色型の個体と、3 色型の個体を識別できるようになった。

#### ⑧ 2 光子機能イメージングによる 3 次元機能マッピング

カルシウム指示薬である OGB-1,AM をマーモセットの V2 に注入し、OGB-1 が導入された細胞群を、レゾナントミラーも用いた高速イメージングと対物ピエゾを用いた縦方向のスキャニングを

組み合わせて、3次元的に観察した。300 x 150 x 100 microns の範囲から、800 ms /frame の速さで3次元的な volume imaging を行い、この範囲内にあるマーモセット V2 の約 2200 個の神経細胞の活動を網羅的に計測することに成功した。

#### ⑨ マーモセットにおける機能単位の探索

⑧の方法を用いて、マーモセットの V2 における方位選択性・方向選択性を3次元的に調べた。同じ方位選択性を持つ細胞が集合している単一方位ドメインから計測したところ、300 x 150 x 100 microns の範囲にある 2200 個の細胞の大多数がほぼ同じ方位選択性を示した。

#### ⑩ マーモセットの V1 におけるハイパーコラム内の神経細胞活動の網羅的計測とデコーディング

⑧の方法を用いて、マーモセットの V2 の 300 x 150 x 100 microns の範囲にある約 2200 個の神経細胞の活動を網羅的に計測することに成功した。平成 28 年度には、この方法を用いて、これらの細胞の活動からの視覚情報のデコーディングを行う。

#### ⑪1 光子イメージングによる細胞レベルの全脳機能マッピング

GCaMP6s を発現するウイルスをスパースに感染させるための感染条件をマウスで最適化し、2つの方法を開発した。

(1) E13-14 のマウス胎児の脳室に AAV1-Efla-GCaMP6s を注入することにより、全脳にスパースに感染させることを実現した。

(2) 大人のマウス的大脑皮質に、AAV9-Syn-Cre を low titer で、AAV9-Syn-Flex-GCaMP6s を high titer で感染させることにより、約 4 x 4 mm の範囲にスパースに GCaMP6s を発現させることを実現した。

後者の方法は、大人の脳でも使えるため、マーモセットに適用しやすい。従って、さらにこの方法を用いて、マウスの脳で、細胞レベルの分解能をもつ広域 1 光子イメージングの開発を行った。マクロズーム顕微鏡と、低倍高 NA の対物レンズを用い、さらに高空間分解能の CCD カメラを用いることにより、4 mm x 4 mm の範囲から、5-10Hz の速度で画像を取得することに成功した。比較的スパースに細胞に GCaMP6s が発現しているため、4 mm x 4 mm の範囲にある無数の単一神経細胞の活動を計測することに成功した。

#### ⑫ プロジェクトの総合的推進

プロジェクト全体の連携を密としつつ円滑に運営していくため、革新的技術による脳機能ネットワークの全容解明プロジェクトに参画する各機関と積極的に連携・情報共有にあたった。また、P S、P O、P L との連携を密にし、助言を仰ぎながらプロジェクト全体の進捗状況を確認しつつ計画の合理化を検討した。データベース委員会に参加し、データベースの様式の策定に関与した。プロジェクトで得られた成果については、積極的に公表した。また、光遺伝学・細胞活動測定班の一員として他の班員と密に連携した。