

## 論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※甲	第	号
------	----	---	---

氏 名

恩田 将成

論 文 題 目

新規多平面二光子顕微鏡を用いた神経情報処理機構の4次元解析

論 文 審 査 担 当 者

主 査	名古屋大学准教授	小坂田 文隆
委 員	名古屋大学教授	饗場 浩文
委 員	名古屋大学教授	廣明 秀一

脳は多くの生物に普遍的に存在する情報処理システムである。脳が正常に外界からの情報を処理し、情報に基づく意思決定を下し、各組織を制御することで、我々は考え、行動することが可能となる。このような我々の中枢たる脳の機能はどのように生じるのだろうか。

脳機能を形成する最小単位は、Cajal によって、神経細胞であることが示された。その後、個々の神経細胞の電気生理学的な特性が解析され、単一細胞レベルでの神経細胞の機能が明らかにされてきた。しかし1940年にHebbは、セルアセンブリという概念を提唱した。多数の神経細胞がセルアセンブリを構成し、同期活動することで情報を表現すると考えた。さらに、セルアセンブリを構成する神経細胞数は多様であり、セルアセンブリを構成する神経細胞は重複し入れ替わることで、柔軟な情報表現を可能にする。つまり、情報を処理するのは、単一の神経細胞ではなく、複数の神経細胞の活動の組み合わせであるという考えである。

しかし、近年のマルチレコーディング技術、ならびにイメージング技術の発展により、セルアセンブリの実体を実験的に示されつつあるが、生体におけるセルアセンブリの空間的解析は進んでいない。それは、現在主流となっている二光子顕微鏡を用いた機能解析法では、単一平面の記録しか行えないという技術的制約のためである。そこで著者は、生体に適用可能な新規二平面二光子顕微鏡を構築し、生体脳における情報処理機構を4次元的に解析した。

1. 立体的な組織構築を有する脳の神経細胞の神経活動を記録するために、二光子顕微鏡を改良し、空間光変調器 (SLM) を用いた二平面同時記録系を構築した。フェムト秒レーザーを2つの光路に分割し、一方はそのままの焦点位置に、もう一方はSLMを用いて異なる深さに新たな焦点面を作製し、光学チョッパーを用いてそれぞれの光路を切り替えることで2つの焦点面を交互に励起した。このSLMを搭載した二光子顕微鏡を *in vivo* イメージングに適用し、マウス大脳皮質一次視覚野 (V1) の深さ約 250  $\mu\text{m}$  と 500  $\mu\text{m}$  にて各平面で約 500 個の神経細胞からカルシウム感受性蛍光タンパク質である GCaMP6m の蛍光強度変化を撮像した。マウス V1 細胞の自発活動をいずれの観察面においても 15 Hz で観察した。以上より、SLM 二光子顕微鏡は、生体の異なる二平面上の個々の神経細胞の活動を記録・解析可能であることが示された。
2. さらなる機能の拡張を目指して、焦点面の変更が可能な可変焦点レンズ (ETL) と SLM を組み合わせ、ガルバノミラーを光路切り替えシステムとして用いた二平面同時記録系を新たに構築した。単一レーザーをガルバノミラーで交互に振り分け、2つの焦点面を交互に励起した。マウスの V1 の深さ約 200  $\mu\text{m}$  と 500  $\mu\text{m}$  にて各平面で約 500 個の細胞から GCaMP6m の蛍光強度変化を撮像した。マウスに視覚刺激として正弦波刺激を提示し、応答特性を評価したところ、いずれの平面においても個々の V1 神経細胞は、V1 に特徴的な方位選択性応答を示した。ETL-SLM 二光子顕微鏡は、生体の異なる二平面上の個々の神経細胞の応答特性を記録・解析可能であることが示された。

3. 生体脳におけるセルアセンブリの 4 次元的情報処理機構を明らかにする目的で、独自開発した二平面同時記録系を用いてマウス V1 に存在するセルアセンブリの解析を試みた。V1 の 2/3 層および 5 層から自発活動を GCaMP6m の蛍光強度変化として記録した。同期的自発活動を偶然より高い確率で行う神経細胞の組み合わせを、機能的ネットワークを示すアンサンブルと定義した。2/3 層細胞間あるいは 5 層細胞間で同期的な活動が偶然より高い確率で存在した。さらに、2/3 層細胞と 5 層細胞の間においても同期的な活動が偶然より高い確率で存在し、その割合は 87%であった。さらに、同期活動した細胞を含むフレームを時空間的に解析したところ、セルアセンブリを構成する神経細胞は異なる時間において重複して出現すること、同時に細胞集団の組み合わせを入れ替えて出現することを見出した。以上より、大脳皮質の異なる層に存在する細胞群がアンサンブルを構成すること、機能を表現するセルアセンブリは、機能ごとに空間的に異なる細胞集団により構成されることが示唆された。
4. 神経細胞は樹状突起上のスパインに、シナプス前細胞から様々な入力を受け、その情報を統合し、軸索を介して情報出力を行う。しかし、空間的に複雑な構造を形成する神経細胞から、樹状突起上の多数のスパインへの情報入力を同時に記録・解析するのは困難であった。そこで独自開発した ETL-SLM 顕微鏡を用い、異なる深さに存在する多数のスパインを同時に撮像した。マウス V1 の単一神経細胞に GCaMP6m を導入し、SLM により作製したベッセルビームを用いた空間イメージングにより先端樹状突起上の多数のスパインを、通常のガウシアンビームにより細胞体と基底樹状突起上の多数のスパインを同時記録した。単一細胞の約 200 個のスパインの同時観察に成功し、これは先行研究にない極めて多数かつ広範囲な記録である。各樹状突起上のスパインの同期活動に加え、先端樹状突起と基底樹状突起のスパイン間でも同期活動が認められた。本結果は、先端樹状突起と基底樹状突起に分布する異なるスパインに同期した入力が存在することを示唆する。以上より、セルアセンブリが異なる領野を跨いで分布し、そのセルアセンブリが同期して単一細胞に入力していると考えられる。

本研究において著者は、2 種類の新規 2 光子顕微鏡を開発し、それらはカルシウムイメージングにより生理的な活動を計測可能な空間解像度および時間解像度を有することを示した。さらに、独自開発した多平面同時イメージングにより、大脳皮質におけるセルアセンブリが 4 次元に構成されること、セルアセンブリが、単一細胞の、空間的に異なる場所に分布するスパインに同時入力することを明らかにした。本研究は、生体の脳活動を 4 次元計測する基盤技術、ならびに脳機能の基本原理の解明に迫る重要な基礎的知見を提供するものである。さらには本成果を、超高齢化社会における最重要課題の一つである神経疾患や精神疾患の理解につなげることで、新たな治療戦略の創出に貢献できると期待される。

よって、本論文は博士（創薬科学）の論文として価値あるものと認める。さらに、2021 年 2 月 15 日に本論文とそれに関する口頭試問を行った結果、合格とした。