

## 主論文の要約

### 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

名古屋大学大学院創薬科学研究科  
基盤創薬学専攻  
博士後期課程  
恩田将成

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。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、単一の記録点をもつ電気生理学的手法により、個々の神経細胞の発火特性の解析が盛んに行われ、神経細胞ごとの機能が明らかにされてきた。しかし現在では、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(マイクロサーキット)であるという知見が示され、個々の神経細胞の応答性のみを理解では、脳の完全な理解は達成できないと考えられる。この考えの始まりは、Hebb が 1940 年に提唱したセルアセンブリである。これは、異なる神経細胞の組み合わせが特定の情報処理を表現するという考えであり、10 個の神経細胞は 10 個の事象の処理にとどまらず、 $2^{10}$  個もの事象を処理可能になる。近年のマルチレコーディング技術、並びにイメージング技術の発達により、マイクロサーキットの存在が実験的に示され初めている。しかし、脳は空間的に様々な神経細胞が情報を伝達するにもかかわらず、現在、生体におけるマイクロサーキット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、脳深部の観察は可能ではあるが、単一平面のみ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. 立体的に存在する脳の神経細胞を同時に記録する手法として、二光子顕微鏡を改良し、可変焦点レンズ(ETL)と空間光変調器(SLM)を有する二平面同時記録系を構築した。ETLとSLMを用いて新たな焦点面を作製し、単一レーザーをガルバノスキャナで時間分割し、二平面を交互に記録した。蛍光ビーズの x 軸および z 軸分解能を評価した結果、変更した焦点距離依存的に空間解像度の低下が認められた。次に生体の機能イメージングに十分な解像度を有するか評価する目的で、マウスの *in vivo* イメージングに適用した。マウス大脳皮質一次視覚野(V1)の深さ約 200  $\mu\text{m}$  と 500  $\mu\text{m}$  にて各平面で 500 個前後の細胞から 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。結果、いずれの観察面においても個々の神経細胞は、V1 に特徴的な方位選択性応答を示した。これらの結果より、異なる深度における細胞由来の  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルの解析には解像度の低下は無視でき、生体において異なる 2 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唆された。

2. 開発した二平面同時記録二光子顕微鏡を用いてマウス V1 に存在するマイクロサーキットを

構成する細胞が、空間的に存在するか評価した。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イメージングを行った。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、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た。その割合は 87%であった。これらの結果より、大脳皮質の異なる層間においてもアンサンブルが構成されていることが示唆される。

3. 我々が開発した二光子顕微鏡のさらなる応用性として異なる光学効果を組み合わせた二平面同時イメージングを試みた。神経細胞は樹状突起上のスパインにて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。空間的に複雑な構造を形成する神経細胞は、スパインを 1000~10000 個ほど有していると考えられている。スパインの構造的特徴から複数の樹状突起上のスパインの情報入力を記録・解析するのは困難であった。そこで、新規 2 光子顕微鏡を応用し SLM を用いてベッセルビームを作製し、z 軸方向の解像度を変更することで、異なる深さに存在するスパインを同時に撮像した。次に、ベッセルビームを用いた空間イメージングを組み合わせた二平面同時イメージングにて、空間的に複雑な分布をしているスパインの活動を評価した。マウス V1 の単一細胞に GCaMP6m を導入し、ベッセルビームを用いた空間イメージングにより apical dendrite 上のスパインを、通常のガウシアンビームにより細胞体と basal dendrite 上のスパインを同時記録した。本研究では、約 200 個のスパインを同時に観察し、これは先行研究と比較し極めて大規模なスパインである。さらに、各 dendrite 上のスパインの同期活動に加え、apical dendrite と basal dendrite のスパイン間でも同期活動が認められた。本結果は、先述したマイクロサーキットが異なる領野を跨いだより空間的に広がりを持って分布し、そのマイクロサーキットが同期して単一細胞に入力していることと示唆される。

著者は、本研究で開発した新規 2 光子顕微鏡が単一細胞の微小構造を記録可能な解像度を有していることを示し、空間的に複雑な構造をとる dendrite やスパイン、ネットワークの機能解析への応用性を示した。同時記録可能な新規多平面イメージングにより、大脳皮質におけるマイクロサーキットが 4 次元的に構成されること、さらには空間的に異なる場所に分布するスパインが同時入力を受けていることを明らかにした。

本研究は、脳機能の基本原理に迫る基盤技術ならびに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、現在、超高齢化社会を迎える我々が抱える最重要課題の一つである、アルツハイマー病をはじめとする神経疾患や精神疾患の理解につなげることで、創薬開発や治療法開発へと発展することが期待される。