



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	マウス中枢神経系回路の可視化を目指した新規レーザー蛍光顕微鏡法に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	澤田, 和明
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(情報科学)
Dissertation Number	甲第13729号
Issue Date	2019-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/75856
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Kazuaki_Sawada_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（情報科学） 氏名 澤田 和明

学 位 論 文 題 名

マウス中枢神経系回路の可視化を目指した新規レーザー蛍光顕微鏡法に関する研究
(Research on novel laser scanning fluorescence microscopy for visualizing neurocircuit of mouse
central nervous system)

うつ病は精神疾患の中でも有病率が人口の 5~8 パーセントと高く、発症後は Quality of life を著しく損なうことから、現代社会においては大きな問題となっている。その発症機序は複雑であり不明な点が多く残されているが、過剰な精神的ストレスが一因であると考えられている。神経科学において頻繁に使用される動物モデルであるマウスにおいて、過剰な精神的ストレスは脳内の神経細胞の樹状突起などを衰退させることが、近年、明らかになっている。例えば、うつ病の責任領域の一つである前頭前野領域の神経細胞では樹状突起の長さが短くなり、興奮性シナプスの数の減少や形態異常が生じることが報告された。この興奮性シナプスは樹状突起スパイン (以下、スパイン) と呼ばれる 100 nm ~ 1 μ m の構造を有している。その形態やサイズは、シナプスの伝達効率との間に強い相関があり、シナプス可塑性の発現に伴い変化するとされている。シナプスの微細形態の観察には電子顕微鏡や蛍光顕微鏡が用いられるが、これまではその技術的・時間的制約から単一神経細胞全てのスパイン形態を詳細に解析することが困難であった。例えば、電子顕微鏡では固定した脳組織標本を用いるためスパイン形態の経時変化を追うことは不可能であり、また、単一細胞の網羅的な解析には膨大な時間を必要とする。一方で、蛍光顕微鏡では、初代培養スライス標本や単離細胞を用いた場合、単一のシナプス形態を経時变化的に観察することは行われてきたが、神経細胞全体の樹上突起やスパインを網羅的に可視化、解析することは困難であった。一方、蛍光顕微鏡を用いた固定脳スライス標本の観察の場合、特に 3 次元的な観察では散乱による蛍光シグナルや空間分解能の劣化のため標本内部でシナプス形態を可視化できないという問題があった。そこで本論文では、超解像顕微鏡法や 2 光子励起蛍光顕微鏡法 (以下、2 光子顕微鏡法) を改善し、蛍光シグナルや空間分解能の劣化、観察深度の限界という問題点を克服することにより、蛍光顕微鏡を用いた固定脳標本や生体脳内の単一神経細胞上のシナプス形態の可視化を目指した。

本論文ではまず、単一神経細胞上のシナプスの微細形態を固定脳内で可視化するため、超解像顕微鏡法の一つである構造化照明顕微鏡法 (SIM) に着目した。SIM はサンプルを縞状パターンで励起し、モアレ現象を活用した画像処理により、空間分解能として約 110 nm を達成すると報告されていた。しかし、固定脳スライス標本の内部ではこの縞状パターンが散乱により劣化し、観察は困難であった。そこで筆者は、固定標本における光の吸収や散乱を低減するために、新規透徹化剤 LUCID を用いた固定脳スライス標本の透徹化法を確立した。その結果、固定脳スライス標本において表面から深さ 60 μ m までの領域で空間分解能 160 nm を実現した。以上から筆者は、LUCID 透徹化法と SIM 法を組み合わせることによって、単一神経細胞の樹状突起の幹上のスパインを網羅的に超解像観察することを可能にした。

次に、うつ病モデルマウスの神経系回路の解析を目指し、長期薬剤投与を行ったモデルマウスの前頭前野領域においてスパイン形態の解析を実施した。この実験では、人工ストレスホルモンである

Dexamethasone を 3 週間投与したのち固定脳スライス標本を作成し、単一神経細胞におけるスパインの形態解析を網羅的な実施を実施した。その結果、共焦点顕微鏡では薬剤投与の有無によるスパイン形態の優位な差を示すことが出来なかったが、SIM ではスパイン形態が楕円形へ変化していることを検出することができた。以上から、スパイン形態の変化を記述するためには超解像顕微鏡法が有用であることが示された。

次に、筆者は単一神経細胞上のシナプス形態を生体脳内で可視化するため、2 光子顕微鏡法の改良を実施した。2 光子顕微鏡では通常、近赤外レーザー光を励起に用いることから、生体深部観察に優れている。しかし、その観察範囲は脳表から 1 mm までが限界であり、脳表から 1.5 mm 以上の場所に位置する前頭前野領域の神経細胞を観察することは困難であった。一方で先行研究より、励起レーザー光の条件を検討することにより観察の深部到達性が向上することがわかっていた。そこで本論文では高ピークパワー半導体レーザーを励起レーザーとして用いることにより、さらなる深部観察を目指した。この観察法を脳内の一部の神経細胞に EYFP を発現している遺伝子改変マウスの生体脳に適用したところ、皮質全層や海馬 CA1 領域、海馬歯状回の顆粒細胞を *in vivo* 観察することに世界で初めて成功した。さらに、この方法を前頭前野領域に適用した結果、深さ 1.8 mm に位置する神経細胞の観察を達成し、前頭前野 PreLimbic 領域の可視化に成功した。

以上より本論文では超解像顕微鏡法である SIM、及び 2 光子顕微鏡法の改良を行うことで固定・生体脳内のスパイン観察方法を改善した。SIM は汎用性の高い超解像顕微鏡法であるため、スパイン形態の観察のみならず、シナプス前終末の形態やシナプス内部に局在するタンパク質の可視化などに応用可能であると考えられる。加えて、本手法により長期薬剤投与モデルにおいて、既存の蛍光顕微鏡法では捉えられない微細なスパイン形態の異常を見出した。今後はうつ病や統合失調症モデル等のシナプス機能異常が認められる病態の解明に対して応用されることが期待される。また、本論文の 2 光子顕微鏡法の改良の成果では、1.6 mm を超えるマウス脳の深部イメージングを達成した。今回の研究によってレーザーの波長や出力、パルス幅が観察の深部到達性の向上に寄与することがわかったことは、今後の 2 光子顕微鏡法によるマウス脳深部イメージングの分野において大きな貢献である。また、この技術は海馬領域や神経節基底核などにおける生体脳の機能的なコネクトームにおいて、神経活動を細胞レベル及び分子レベルで明らかにするための基礎技術になることが期待される。