



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_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (情報科学)

氏名 澤田 和明

審査担当者 主 査 教 授 根本 知己

副 査 教 授 岡嶋 孝治

副 査 准教授 榎木 亮介

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)

近年、脳機能の創発原理の解明を目指して、ニューロン間の情報伝達のメカニズム、化学シナプスに関する研究が盛んに実施されている。特に、興奮性シナプスの樹状突起の棘構造 (スパイン) と呼ばれる特異的な微細形態に着目し、シナプス可塑性など研究が進められている。さらに、このような微細形態を指標としたシナプス可塑性の研究に基づいた精神疾患のメカニズムの解明も近年、期待されている。一方で、超解像顕微鏡や 2 光子顕微鏡など、新規的なバイオイメーjingの技術の研究開発が盛んに実施されている。

本研究は、このような現況において、超解像顕微鏡である構造化照明顕微鏡法 (SIM) を用いた固定脳標本におけるニューロンの重要な微細形態である樹状突起やそのスパインの可視化方法の開発を目的とした。SIM では励起レーザー光を縞状のパターンでサンプルに照射し蛍光分子を励起する。そして、得られた蛍光画像を計算処理することで古典的な光学分解能を越えた 100nm の空間分解能を実現するものである。この縞状パターンは固定脳スライス標本の深部では屈折率の不均質さによる散乱や吸収のため著しく劣化した。そこで筆者は、最近提案された新規透徹化剤である LUCID を用いて固定脳スライス標本の透徹化処理を試みた。ここでは、ある割合のニューロンが EYFP を発現するトランスジェニックマウスである Thy1-YFP(H Line) マウスを用いた。LUCID を用いて透徹処理を実施したところ、透明度の向上と屈折率の均質化が認められた。微小蛍光ビーズを用いた定量的な評価により、SIM を用いた撮像においても、固定脳スライス標本を表面から深さ 60 μ m までの領域で、空間分解能を 160 nm に向上したことが判明した。このように、筆者は、新規透徹剤と超解像顕微鏡法である SIM とを併用することで、単一ニューロンの樹状突起の 1 本のシャフトについて、その 150 μ m もの長さに渡って 200 個以上のスパインを可視化することに成功し、いままでは困難であった網羅的な微細形態の可視化解析への道を拓くことに成功した。

次に、この開発した方法論を用い、筆者はうつ病モデルマウスにおけるスパイン形態の超解像イメージングと定量的な形態解析を実施した。本研究では、人工ストレスホルモンである Dexamethasone を 3 週間投与したマウスを用い、その前頭前野領域の新皮質のニューロンを解析対象とした。その結果、薬剤投与マウスと対照群とを比較すると、スパインの頭部の形状はわずかながら楕円形へ変化している、すなわち細くなる傾向があることが有意に検出された。一方、この変化は旧来の蛍光顕微鏡法である共焦点顕微鏡を用いた場合には有意に検出することはできなかった。以上から、本開発手法の高い空間分解能により、微細な形態を高精度で計測できることから、スパインの形態の

より詳細な検討が可能であることが示された。

一方で、近年、2光子顕微鏡を用いた生体内のシナプスイメージングに関する研究が盛んに行われている。しかし、その多くは皮質表層から約 1mm までの深さにある大脳皮質内のイメージングを目的としており、海馬や前頭前野領域を対象とした深部イメージングは未開拓の分野で、今後の発展が待たれている状況にある。本研究は、このような現況にある in vivo 2光子顕微鏡法について、新規開発の高ピークパワー半導体レーザーの導入によって、イメージングの深部到達性を向上させるための観察条件を得ることを目的として条件検討を行った。この観察法を脳内の一部のニューロンに 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 に位置するニューロンの観察を達成し、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、旧来の顕微鏡法では観察が困難であった固定・生体脳内の樹状突起、スパイン頭部などの微細な構造を可視化し解析することを可能とした。これを要するに、本論文は、生体標本や固定標本の深部における微細構造の可視化解析を実現する画期的な新手法を開拓したものであり、コネクトーム研究などの神経科学領域の展開のみならず、将来の精神医学分野や生命科学研究の発展にも大きく貢献するものである。よって著者は、北海道大学博士 (情報科学) を授与される資格あるものと認める。