

研究終了報告書

「生体脳における神経情報伝達の大規模光同定技術」

研究期間：2018年10月～2022年3月

研究者：北西 卓磨

1. 研究のねらい

脳は、多数の神経細胞が織りなす情報伝達により機能を発揮する。ひとつひとつの神経細胞は、ほかの神経細胞から入力を受けて固有の活動パターンを発生し、生じた活動パターンは脳の領域をまたいで伝搬する。こうした細胞間・脳領域間の情報伝達が、多彩な脳機能を支えている。したがって、脳の情報処理を真に理解するには、こうした情報伝達を直接に計測することが重要となる。ところが、これまで生体脳において細胞間・領域間の情報伝達を実測した研究は少ない。こうした現状に留まっている大きな理由は、複雑に配線された脳組織のなかで情報伝達を実測するための良い手法がないという点にある。一般的な神経活動の計測法では、活動を計測している細胞が、ほかのどの神経細胞や脳領域に活動を伝えているかは知りえない。そのため、情報の「伝達」を知ることは困難だった。

そこで本研究は、「自由に行動する動物の脳において、細胞間・領域間の情報伝達を実測するための革新的な計測手法」を開発することを目的とした。具体的には、神経細胞の投射先領域を光同定して活動計測をおこなう技術（研究項目1）と、神経細胞間のシナプス結合を光同定して活動計測をおこなう技術（研究項目2）、という2つの計測技術の開発を進める。この2つの計測技術は、いずれも光遺伝学と大規模電気生理計測の融合により実現する。本研究では、この技術を記憶に重要な脳部位である海馬体に適用し、場所細胞などの空間情報の生成と分配の様態を明らかにする。これらの計測技術は、神経細胞間の複雑な配線を解きほぐし、回路上を伝播する情報の流れを明らかにする。これにより、細胞集団のあいだの平均的な情報伝達の議論にとらわれた現状から、個々の神経細胞における情報伝達へと理解を推しすすめる。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究は、生体脳における神経情報伝達を捉える新規手法を開発し、これを用いて海馬体の空間情報の伝達を解明することを目的とした。具体的には、情報の分配（研究項目1）と生成（研究項目2）という、相補的な2種類の情報伝達の様態を捉えることを目指した。

研究項目1については、光遺伝学と大規模神経活動計測を組み合わせ、当初の想定通り、神経細胞の投射先を光同定して活動計測をおこなう技術を構築した。さらに、この技術を用いて、海馬から海馬台を経て下流の4領域へと、多様な空間情報が「分配」される様態を明らかにした（Kitanishi et al., Sci Adv, 2021）。これは、海馬から下流領域への空間情報の送出を捉えた初めての研究である。

研究項目2では、上流の2箇所の脳領域から単シナプス入力を受ける神経細胞を選択的に標識する新規技術の開発に成功した（Kitanishi et al., Commun Biol, 2022）。上流の2領域

からシナプス入力を受ける神経細胞は、上流から得た情報を統合し新たな情報を生み出す重要な役割を持つ可能性がある。本研究項目は、こうした情報の「生成」の規則の解明に資する技術である。

以上のように、本さきがけ研究は、生体脳における領域間情報伝達を計測する技術を構築し、これを用いて海馬体の神経情報伝達の一部を明らかにした。

(2) 詳細

項目 1 「神経細胞の投射先を光同定して活動計測をおこなう技術—情報の分配規則の解明」

「いま自分がどこにいて、どこへ向かっているか？」という空間認識は、動物の生存にとって重要な能力である。海馬には、動物のいる場所・移動速度・道順などに応じて活動の頻度が変化する神経細胞が存在する。これらの神経細胞の発する空間情報は、海馬から下流の脳領域群へと分配されて活用されることで、脳機能を支えると考えられる。海馬の出力は、海馬台という脳領域を介して多くの下流領域へと投射するが、具体的にどのように情報が分配・伝達されるかはこれまで不明だった。

本研究項目では、さまざまな空間情報が海馬から海馬台を経て下流の 4 箇所の脳領域へと分配される情報伝達の様式を明らかにした。一般的な神経活動の計測法では、活動を計測している神経細胞がどの脳領域に投射するかは分からない。そこで、256 個の多点電極による大規模活動計測と光遺伝学を組み合わせることで、ラット海馬台の 100 個程度の神経細胞の活動を一齐に計測しつつ、さらに、これらの神経細胞の投射先領域を網羅的に調べる実験系を構築した (図 1)。この手法では、投射先領域への光照射により逆行性の活動電位を生じることが指標として、個々の神経細胞の投射先を同定する。この計測系を用いて、ラットが空間探索の課題を行う際の情報伝達を調べ、3 つの事柄を発見した。

第一に、海馬台は海馬に比べて、ノイズに強い情報表現を持つことを見いだした。海馬の神経細胞に比べると、海馬台の神経細胞は場所・速度・道順に対する選択性は低い一方で、神経活動の頻度が高いために海馬と同等の情報量を持ち、さらに神経活動に確率的に生じうるノイズの影響を受けにくいことが分かった。この正確で頑強な情報表現は、海馬台から長距離の神経投射を通じた下流領域への情報伝達に適していると考えられる。

第二に、多様な空間情報は海馬台から下流の脳領域群へと、情報の種類に応じて領域選択的・非選択的に伝達されることを見いだした。具体的には、速度と道順の情報はそれぞれ帯状皮質と側坐核に選択的に伝達され、場所の情報は側坐核・視床・乳頭体・帯状皮質の 4 領域に均等に分配されることを明らかにした。このことから、海馬台は、情報の種類と標的領域に応じて、情報を分配する役割を持つことが分かった。

第三に、海馬台から下流の脳領域への情報伝達は、ミリ秒の時間精度で正確に制御されることを見いだした。海馬や海馬台では、動物の行動の状態によりシータ波やシャープウェーブ・リップル波という脳波が発生する。海馬台から下流領域へと投射する神経細胞は、標的とする脳領域によって、これらの脳波のリズムに対して特定のタイミングで活動を生じたり、活動の頻度が変化したりすることが分かった。

以上のように、この研究は、多様な空間情報が海馬から海馬台を経て、下流の 4 領域へと

分配される情報の流れを初めて明らかにした (Kitanishi (責任著者) et al., Sci Adv, 2021; 図 1)。海馬は、空間情報を含めたさまざまな情報を取り扱い、記憶に重要な役割を果たす。今回の成果は、海馬を中心とした記憶システムの動作原理の解明や、認知症の病態の理解につながると期待できる。

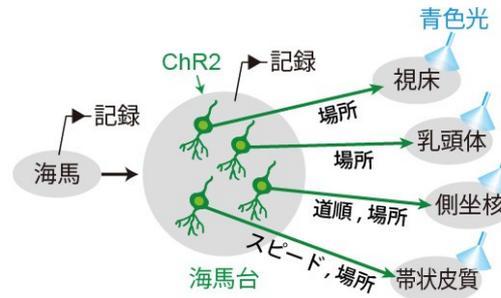


図 1 海馬から下流領域への情報の分配の解明。大規模な神経活動計測と光遺伝学を組み合わせることで脳情報の流れを明らかにした。

・順行性経シナプスウイルスベクターを用いた、海馬台の下流経路の探索

上述の研究から派生・発展した課題として、海馬台の下流領域を、順行性経シナプスウイルスベクターを用いて解剖学的にさらに探索した。1 型アデノ随伴ウイルスベクター (AAV1) は、感染細胞の軸索からシナプスを越えてシナプス後細胞へと移行する。そこで、シナプス前細胞を含む上流領域に AAV1-Cre、シナプス後細胞を含む下流領域に Cre に依存して蛍光タンパク質を発現する AAV をそれぞれ導入すると、上流領域から単シナプス入力を受けるシナプス後細胞を明瞭に蛍光標識できる。さらに、標識された軸索の到達領域を調べることで、シナプス後細胞の投射先を明らかにできる。この標識法を、海馬台 (AAV1-Cre を注入) から内側乳頭体 (AAV-DIO-EYFP を注入) へいたる経路に適用したところ、海馬台から単シナプス入力を受ける内側乳頭体の神経細胞は、視床と VTg という脳領域に投射することが分かった。すなわち、海馬台→内側乳頭体→視床/VTg という神経経路が、単シナプスで接続することを明らかにした (Umaba, Kitanishi (共筆頭著者・共責任著者), Mizuseki, Neurosci Res, 2021)。この結果から、この神経経路は、海馬台からの出力をすばやく頑強に下流へと伝達する可能性が示唆された。

項目 2 「シナプス結合を光同定して活動計測をおこなう技術—情報の生成ルールの解明」

これまで、さまざまなウイルスベクターや遺伝子改変動物により、特定の回路構造を標的とした蛍光標識や光操作が行われてきた。ところが、2 箇所の上流脳領域の両方からシナプス入力を受ける神経細胞に選択的にアクセスする手法は存在しなかった。こうした神経細胞は、上流領域から得た情報を統合し、神経回路上に新たな情報の流れを生み出す重要な役割を持つ可能性がある。そこで、本研究項目では、「2 箇所の上流脳領域から単シナプス入力を受ける神経細胞の標識・操作・計測法」を開発することを目的とした。この技術は、シナプス前細胞から後細胞へとシナプスを越えて感染する AAV1 と、部位特異的組換え酵素 Cre, Flp の両方に依存して遺伝子発現を生じる INTRSECT 法を組み合わせることで実現した (図 2)。具体的には、上流の 2 箇所の脳領域にそれぞれ AAV1-Cre と AAV1-Flp を導入し、下流領域には、

Cre/Flp 依存性に蛍光タンパク質 EYFP を発現する AAV を導入した。すると、上流の 2 領域の両方から単シナプス入力を受ける細胞のみが選択的に EYFP で標識された。また、Cre/Flp 依存 EYFP 発現カセットを、PHP.eB 型 AAV を用いて脳全体に供給することで、2 領域から単シナプス入力を受ける神経細胞を、全脳にわたり検出することが可能となった (Kitanishi (責任著者) et al., Commun Biol, 2022)。

この技術は、これまで、分布・細胞種・機能のいずれも不明瞭であった、シナプス入力を統合する神経細胞に選択的にアクセスする手法を与えるものであり、情報の生成ルールの解明に役立つと期待できる。今後、EYFP を、ChR2 などの光操作ツールへと変更し、光操作や神経活動計測を実現していく。

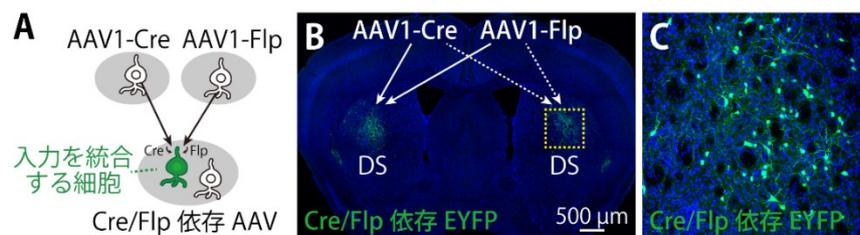


図 2 二箇所的大脑領域からの単シナプス入力を受ける神経細胞の選択的標識。(A)実験手法。(B,C)左右の大脳皮質運動野から入力を受ける背側線条体 DS の神経細胞を、蛍光タンパク質 EYFP で標識した例。マウス脳の冠状断切片。

3. 今後の展開

本さがけ研究を通じて、脳領域をまたいだ情報伝達を大規模に計測する手法を確立した。また、この手法を用いて、海馬から海馬外への空間情報の流れを捉えることに成功した。こうした成果を踏まえて、今後の展開としていくつかの方向性が考えられる。第一は、本研究手法の他の脳領域への直接的な適用である。本研究で確立した脳情報の流れの計測は、脳領域を問わず適用できると期待できる。したがって、様々な脳領域へと展開し、脳の各所における情報の流れを明らかにしていく。とりわけ、末梢の感覚入力が高次神経表象を生みだし、さらに、生成された神経表象から動物行動へといたる、一連の情報伝達の全体像を明らかにしていきたいと考えている。第二は、情報科学的な研究アプローチの導入である。本研究の手法で得られる情報は、動物行動・細胞活動・投射パターンを含む高次元なものであり、今後もさらに大規模化が進むと予想される。こうした膨大なデータから、有意義な知見を得るためには、機械学習など情報を適切に縮約するアプローチを取り込むことが重要となる。第三は、疾患研究への応用である。多くの精神疾患では、脳に細胞脱落などの器質的な変化が生じる以前から、脳機能に障害を生じる。こうした疾患において、脳情報の流れがどのように障害されており、また、情報の流れを復調することで脳機能を改善できるか、という点は医療応用・社会実装へ繋がるために重要な展開となる。

4. 自己評価

本さがけ研究では 2 つの研究項目を掲げた。研究項目 1 については、当初の想定通りの成果を得るとともに、さらに経シナプスウイルスベクターの活用など、発展的な成果を生んだ。研究項目 2 については、当初の計画とは異なる内容となったものの、目的としていた情

報の生成ルールの解明につながる新たな技術を開発することに成功した。こうした内容から、本さきがけ研究は、おおむね当初の想定通りの成果を挙げたものと自己評価している。本研究の主なメッセージは、(神経活動の計測だけにとどまることなく) 神経活動の「伝達」を捉えることで脳の作動原理が垣間見えるという点にあり、これを実証したことで、システム神経科学の分野に一定のインパクトを与えたものと考えられる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 7件

1. Kitanishi T*, Umaba R, Mizuseki K*. (*責任著者) Robust information routing by dorsal subiculum neurons. *Sci Adv* (2021) 7:eabf1913.

海馬は、空間記憶に関係するさまざまな情報をあつかう脳部位だが、海馬で処理された情報が下流の複数の脳領域にどのように分配・伝達されるかは、分かっていなかった。本研究は、光遺伝学と大規模神経活動計測を組み合わせることで、脳領域間の情報伝達を網羅的に計測する手法を確立した。そして、この方法を用いることで、海馬→海馬台→下流の4領域(視床・乳頭体・側坐核・帯状皮質)という経路における各種の空間情報(場所・スピード・道順)の流れを明らかにした。

2. Umaba R†, Kitanishi T†*, Mizuseki K*. (†共筆頭著者) Monosynaptic connection from the subiculum to medial mammillary nucleus neurons projecting to the anterior thalamus and Gudden's ventral tegmental nucleus. *Neurosci Res* (2021) 171:1-8.

海馬の出力層に位置する海馬台は、複数の脳領域へと投射して情報を分配する。この研究では、順行性経シナプス感染を示す1型アデノ随伴ウイルスベクターを用いて、海馬台の投射細胞が下流領域のどのような種類の神経細胞にシナプスを形成するかを探索した。その結果、海馬台は、内側乳頭体のなかで、視床とVT_g領域へと投射する神経細胞にシナプスを形成することを明らかにした。この、海馬台→内側乳頭体→視床/VT_gの経路は、単シナプスですばやく頑強に情報を伝達することが示唆される。

3. Kitanishi T*, Tashiro M, Kitanishi, N, Mizuseki K*. (*責任著者) Intersectional, anterograde transsynaptic targeting of neurons receiving monosynaptic inputs from two upstream regions. *Commun Biol* (2022) 5: 149.

上流の2箇所の脳領域から単シナプス入力を受ける神経細胞は、神経回路上の情報の統合に重要な役割を果たす可能性がある。しかし、こうした神経細胞に選択的にアクセスする手法はこれまで存在しなかった。そこで、この研究では、順行性経シナプス感染を示すAAV1と、交差遺伝子発現を実現するINTRSECT法を組み合わせることで、2領域から単シナプス入力を受ける神経細胞への選択的な遺伝子導入法を開発した。この手法は、複数脳領域のあいだの情報の統合についての研究を促進するものと期待できる。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0件(特許公開前のものも含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. (学会発表) Kitanishi T, Umaba R, Mizuseki K. Pathway-specific information outflow from the subiculum. 49th Society for Neuroscience (Chicago) Oct. 19, 2019, 084.01, poster
2. (学会発表) 北西卓磨、馬場良子、水関健司、海馬台からの経路選択的な空間情報の送付、第44回日本神経科学大会(神戸)2021年7月30日、3O09a-1-1、口頭
3. (受賞) 北西卓磨、南部陽一郎記念若手奨励賞、大阪市立大学、2021年7月26日
4. (受賞) 北西卓磨、大阪市立大学教員活動表彰、2021年6月30日
5. (プレスリリース)「世界初、空間認識を支える脳情報の流れを解明 ～認知症などの病態解明に期待～」、2021年3月11日