

睡眠時の感覚・記憶神経回路動態の光観察と光操作

富山大学研究推進機構アイドリング脳科学研究センター

睡眠脳ダイナミクス研究室

宮本 大祐

概要

脳は外界の情報を長期記憶として保存する過程の中で、覚醒時の学習情報に対応した神経活動と睡眠時の神経活動を統合して神経回路を再編する。睡眠と記憶の関係を行動・脳領域・神経細胞レベルで理解するため、*in vivo* 光・電気生理学の実験系を確立した。自由行動下・頭部固定下及び睡眠時において、刺激提示しやすい音を利用した手がかり恐怖条件付けを行った。前頭前皮質や海馬や扁桃体等の記憶・情動関連ネットワークにおける細胞種選択的な神経活動の観察と操作用の実験系を構築した (Miyamoto, *Neurosci Res*, 2022)。遺伝子コード型膜電位インディケーター (GEVI) を利用して、前頭前皮質-扁桃体回路のシナプス応答を高速イメージングして、初期の脱分極応答と後期の過分極応答の分離に成功した。自由行動マウスにおいて扁桃体の様な脳深部において過分極応答を細胞種選択的に計測した報告は例がなく、感覚・記憶神経回路動態研究における画期的な成果と言える。今後は神経回路動態の更なる解明や PTSD の治療を考える上で、過分局応答の理解の重要性を総説に纏めた (Miyamoto, *Neurosci Res*, 2023)。

- 1) マウスに音恐怖条件付け学習を行わせて、連合音刺激 (CS+) と非連合音刺激 (CS-) の弁別をテストした。学習直後の断眠は CS- 提示時ではなく CS+ 提示時のすくみ反応を障害する傾向があった。
- 2) AAV ウイルスの作成と脳実質内注入を行った。光遺伝学的プローブの発現を固定脳切片における蛍光観察により確認した。CaMKII プロモーターによる興奮性神経細胞選択的な標的遺伝子の発現を、海馬 CA1 錐体細胞層への選択的な蛍光タンパク質の発現により確認した。プラスミド内のシナプシンプロモーターを CaMKII プロモーターに組み替えて、ゲル電気泳動により確認した。
- 3) 長期神経活動計測を目的とした Ca²⁺イメージングや高速神経活動計測を目的とした膜電位イメージングの光学系を検討した。自由行動マウスにおいて、ファイバーフォトメトリーや2カラーイメージング用の超小型顕微鏡 (Inscopix, nVue) を利用した Ca²⁺イメージングを確立した。頭部固定マウス用に高速高感度の CMOS カメラを適用可能な一光子ワイドフィールド顕微鏡を自作した。
- 4) 高速・高感度の CMOS カメラ 2 種類 (浜松ホトニクス社 Orca Fusion-BT, Teledyne Photometrics 社 Kinetics) を導入して、ハードウェア・ソフトウェアの設定を行った。浜松ホトニクス社の標準ソフトではフレーム落ちが顕著であったが、Micromanager ソフトウェアや M.2 SSD を使用して、高速長期計測 (400 fps, 2 時間又は 1000 fps, 40 分間) に成功した。
- 5) 青励起の ChR2 による光刺激との同時適用を想定して、赤蛍光の膜電位インディケーターを検討した。VARNAM を興奮性神経細胞に発現させて、ファイバーフォトメトリー及び一光子ワイドフィールドイメージングにより、イソフルラン麻酔下における徐波を計測した。SomArchon を用いて細胞体選択的に膜電位インディケーターを発現させて、単一神経細胞の解像度でスパイク活動を観察した。
- 6) 前頭前皮質の興奮性神経細胞に光刺激用の ChR2 を発現させて、その投射先の扁桃体の興奮性神経細胞に膜電位インディケーター VARNAM を発現させた。扁桃体に光ファイバーを埋め込み、前頭前皮質-扁桃体経路の軸索を ChR2 により青色光刺激して、扁桃体における後シナプス応答を VARNAM のファイバーフォトメトリー計測により計測した。10 ミリ秒をピークとして脱分極応答を生じて、続いて過分局応答が観察された。
- 7) 睡眠状態の判定のために、自由行動下/頭部固定下のマウスにおいて脳波・筋電位計測を行った。
- 8) 高 Z 分解能のイメージングのために二光子顕微鏡を導入して、大脳皮質 II/III 層の興奮性神経細胞の *in vivo* イメージングにより Z スタックを作成した。

詳細

1. 記憶痕跡細胞のオシレーション活動観察

・ファイバーフォトメトリーによる単一脳領域の活動観察

- 1) 留学直後の研究室立ち上げ時(2020年度)に何も実験装置がなく、研究費も限定的であったため、(2021-2023年度)は in vivo 光生理学用の光路の自作に力点を置いて研究を進めた。ファイバーフォトメトリーと一光子/二光子顕微鏡用のパーツに共通部分が多く、同時並行で実験系の構築を進めることにより、トータルコストの低減やシステムの包括的理解に繋がった。
- 2) 前頭前皮質や扁桃体に AAV 注入や光ファイバーや局所場電位用の電極のインプラント手術を行い、自由行動下における慢性記録を行った。前頭前皮質や扁桃体等の脳深部において、ガラスピペットが詰まりやすかった。そのため、手術時間の長期化によるマウスの死亡が生じやすかった。プラーや研磨器や複数種のインジェクターを検討して、安定的な手術環境を構築した。

・記憶関連ネットワークの複数脳領域における同時活動観察

- 1) 局所場電位計測とファイバーフォトメトリーの同時適用による複数脳領域の同時活動観察を行った。
- 2) 複数脳領域における細胞種選択的なファイバーフォトメトリー装置 (Neurophotometrics) を用いた、Ca²⁺イメージングに成功した。

2. 記憶痕跡細胞の入力回路の同定及びその睡眠時の可塑性

・オール光学式電気生理学の実験系開発

- 1) 青励起の ChR2 による光刺激との同時適用を想定して、赤蛍光の膜電位インディケーターを検討した。VARNAM を興奮性神経細胞に発現させて、ファイバーフォトメトリー及び一光子ワイドフィールドイメージングにより、イソフルラン麻酔下における徐波を計測した。SomArchon を用いて細胞体選択的に膜電位インディケーターを発現させて、単一神経細胞の解像度でスパイク活動を観察した。
- 2) 長期神経活動計測を目的とした Ca²⁺イメージングや高速神経活動計測を目的とした膜電位イメージングの光学系を検討した。自由行動マウスにおいて、ファイバーフォトメトリーや2カラーイメージング用の超小型顕微鏡 (Inscopix, nVue) を利用した Ca²⁺イメージングを確立した。
- 3) 青励起の ChR2 による光刺激は体性感覚皮質や運動皮質において既に実施経験がある (Miyamoto et al., Science, 2016)。前頭前皮質に AAV インジェクションを行い、細胞外フィールド電極により、前頭前皮質における刺激応答を確認した。
- 4) 前頭前皮質の興奮性神経細胞に光刺激用の ChR2 を発現させて、その投射先の扁桃体の興奮性神経細胞に膜電位インディケーター VARNAM を発現させた。扁桃体に光ファイバーを埋め込み、前頭前皮質-扁桃体経路の軸索を ChR2 により青色光刺激して、扁桃体における後シナプス応答を VARNAM により。自由行動マウスにおいて初期の脱分極応答と後期の過分極応答を計測した(図)。

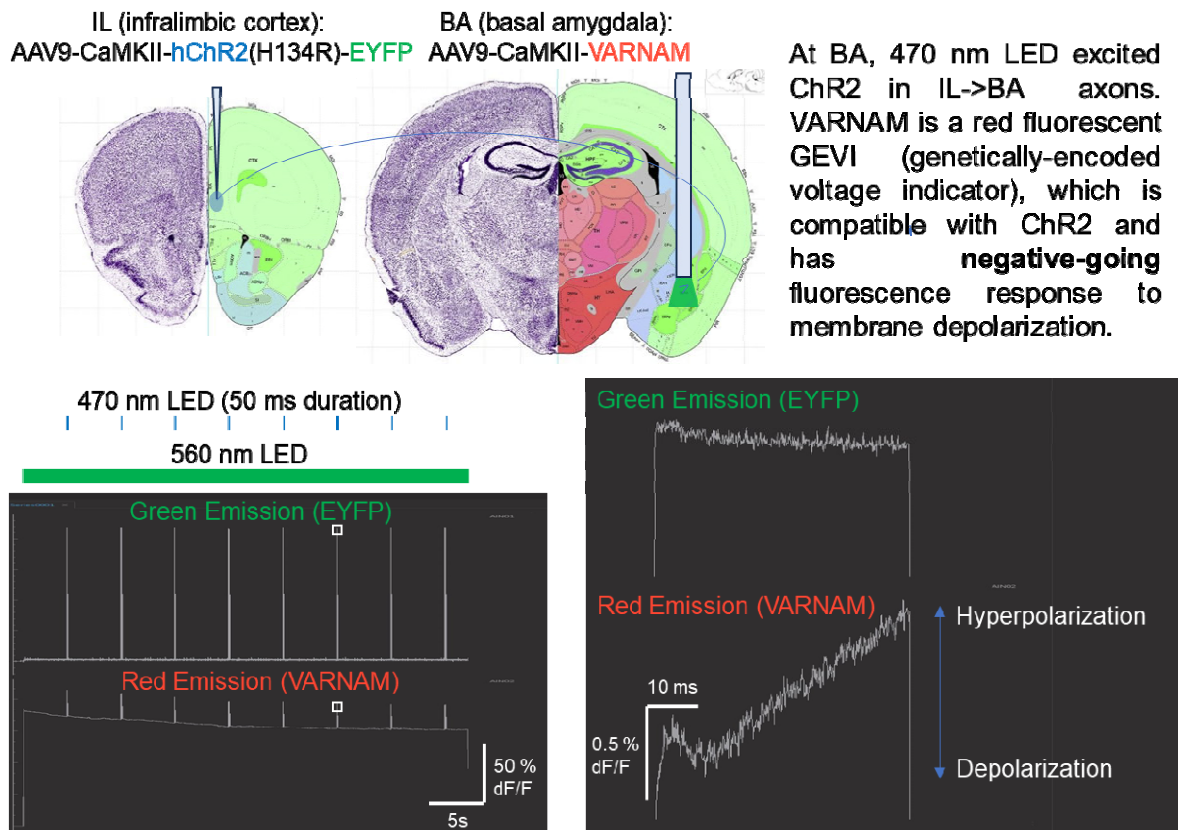


図. オール光学式計測・操作法による前頭前皮質-扁桃体回路における脱分極応答と過分極応答の高速計測

・記憶痕跡細胞-記憶痕跡細胞間のシナプス可塑性

- 1) 覚醒時の体験によって活性化した神経細胞に選択的に光遺伝学的プローブを発現させるために c-fos::tTA トランスジェニックマウスを導入しており、ジェノタイピングにより野生型と変異型マウスを判定している。
- 2) c-fos::tTA トランスジェニックマウスに AAV をインジェクションしており、現在膜電位インディケーターの発現待ち中である。
- 3) マウスに音恐怖条件付け学習を行わせて、連合音刺激 (CS+) と非連合音刺激 (CS-) の弁別をテストした。学習直後の断眠は CS-提示時ではなく CS+提示時のすくみ反応を障害する傾向があった。

3. 記憶痕跡細胞の出力回路の同定及びその睡眠時の活動記録

・前頭前皮質の記憶痕跡細胞の出力先脳領域の解剖学的同定

- 1) 前頭前皮質や海馬において、固定脳切片において緑または赤蛍光のタンパク質により、標的遺伝子の発現を確認した。
- 2) 研究室内にドラフトチャンバーが無い場合、実験室を開放しながらパラホルムアルデヒド (PFA) を用いた灌流固定を実施してきた。しかし、研究室員の増加につれて、毒性の高い PFA を吸気する可能性が増加した。そこで、毒性が低く抗体染色も行きやすいグリオキサル (Konno et al., Science Advances, 2023) を購入した。

・前頭前皮質の記憶痕跡細胞の出力先脳領域における軸索活動計測

- 1) AAV により GCaMP を前頭前皮質に発現させて、前頭前皮質におけるシングルファイバーフォトメトリーを行った。軸索活動計測を行うため、前頭前皮質及び扁桃体に同時に光ファイバーのインプラント手術を行った。細胞体の位置するインジェクション領域における GCaMP イメージングに成功しており、現在軸索への GCaMP の発現待ち中である。

・前頭前皮質-扁桃体回路の軸索活動と膜電位活動の関係解明

- 1) 前頭前皮質及び扁桃体の各脳領域におけるファイバーフォトメトリーを確立した。
- 2) 前頭前皮質に GCaMP 発現用の AAV を注入し、扁桃体に VARNAM 発現用の AAV を注入し、各脳領域に光ファイバーをインプラントした。

代表的な研究成果

論文発表

1. Said ES, Miyamoto D*, Multi-region processing during sleep for memory and cognition. *Proceedings of the Japan Academy, Series B: Physical and Biological Sciences*, 2025, in press
2. Miyamoto D*, Multi-fiber photometry of multi-region information integration in the prefrontal cortex during fear conditioning and sleep. *Toyama Medical Journal*, 2025, in press
3. Miyamoto D*, Mahmoud MA, Post-conditioning sleep deprivation facilitates delay and trace fear memory extinction. *Molecular Brain*, 17(90):1-11, 2024
4. Inokuchi K*, Miyamoto D, NSR special issue “The idling brain in cognition”. *Neuroscience Research* 2023, 189, 1-2, doi.org/10.1016/j.neures.2023.02.007.
5. Miyamoto D*, Neural circuit plasticity for complex non-declarative sensorimotor memory consolidation during sleep. *Neuroscience Research* 2023, 189, 37-43, doi.org/10.1016/j.neures.2022.12.020.
6. Miyamoto D*, Optical imaging and manipulation of sleeping-brain dynamics in memory processing. *Neuroscience Research* 2022, 181, 9-16, doi.org/10.1016/j.neures.2022.04.005.

受賞

1. 2023年5月理化学研究所理事長感謝状
2. 2023年4月科学技術分野の文部科学大臣表彰 若手科学者賞
3. 2022年7月富山第一銀行奨学財団賞特別賞
4. 2022年7月日本神経科学学会奨励賞
5. 2022年6月花王科学奨励賞
6. 2022年4月笹川科学研究奨励賞

謝辞

アステラス病態代謝研究会の研究助成金は研究室の立ち上げに伴う光学機器の購入に利用いたしました。本研究期間において、研究環境整備や研究成果に進捗があり、多数の受賞にも恵まれました。研究報告会では、新旧の交流を温める機会を頂きました。この場を借りて御礼申し上げます。