

研究課題別評価書

1. 研究課題名

多ニューロン活動を可視化して脳回路システムに迫る

2. 氏名

池谷 裕二

3. 研究のねらい

脳の理解には機能素子であるニューロンの大規模記録が必須である。本研究では、(1)多ニューロン Ca^{2+} イメージング法 (fMCI) を用いて数百のニューロン活動を高空間分解能で一斉に可視化し、かつて例がないほどの大規模なスパイク列データを再構築すること、(2)得られたスパイク列にデータマイニングを施すことで回路作動の原理を解き明かすこと、の2点を目指す。

4. 研究成果

あらゆるシステムの作動は、ノード(節点)とエッジ(辺)で構成されるグラフ(回路)と、グラフ内部を流れる情報に帰着される。システムを対象とすると、近現代科学は多分に還元的であり、対象を各要素に細分化してから分析するという戦略をとってきた。しかし、要素は集団になると予想を超えた非線形な挙動を示す。すなわちシステムを理解するためには、要素解体することなく実在の“総体性(entity)”を掌握する必要がある。

そこで私は本研究の究極目標を「神経回路のシステム作動を統合的なアプローチで探ること、システムに普遍的な動作原理を明らかにすること」と定めた。具体的には、(1)生命システムを解明するための新しいツールや戦略を提供する、(2)システム生理学における“オミクス解析”的な戦略法を提唱し、神経回路の情報コードおよびデコードの作動原理を網羅的に理解すること、の2点を目指した。

ニューロンは回路システムの機能素子である。つまり脳を理解するためには同時に多数のニューロンからスパイク列をモニターする必要がある。私が開発を進めてきた「多ニューロン Ca^{2+} 画像法 (functional multineuron calcium imaging, fMCI)」は、単一細胞の空間解像度で数百のニューロンからスパイク活動を一斉に再構築できるという点で、世界的にも例を見ない大規模なモニター法である。

(1) fMCI の改良と応用

ニポウ式共焦点ユニット CSU-X1 と高速背面照射型 CCD カメラ DU860 を採用することで 2000 Hz という超高速の画像取得を可能にした (Neurosci. Res., 58:219-225, 2007) (図1)。一方、広域 CCD カメラ DU888 と低倍率高開口数の対物レンズを併用することで、10,000 個以上のニューロンからの大規模記録も可能にした (Nature Precedings 2009.2893.1, 2009)。上記の撮影速度とニューロン数は現時点で世界最高である。

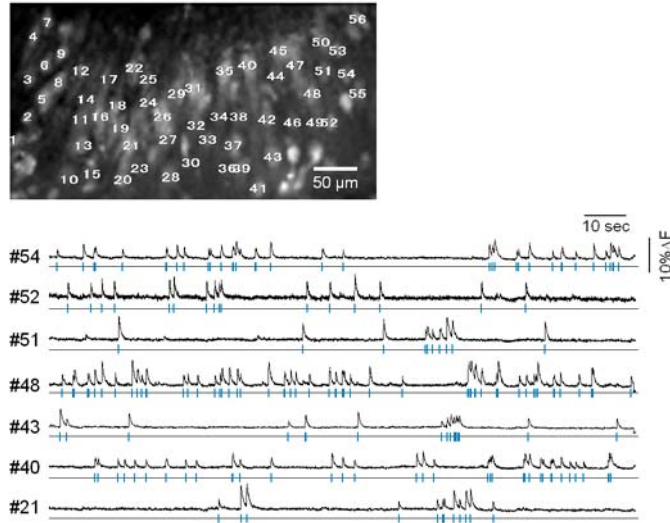


図1 高速 fMRI。海馬スライス培養標本に Oregon Green 488 BAPATA-1 を負荷し(上映像)、ニポウ式共焦点レーザー顕微鏡にて500 Hz で撮影した。代表的な7個のニューロンについて映像の下に生トレースを示した。さらに各トレースから検出されたスパイク列をその下のラスタプロットに示してある。

fMRI で得られるデータは大規模であり、手動でスパイクを検出することは非効率であるばかりでなく、人為的なミスも避けられない。そこでカルシウム変動からスパイクタイミングを逆推定するアルゴリズムを考案した(J. Neurophysiol., 100:1668-1676, 2008.)。これは、シグナルを主成分分析によって低次元に圧縮した後、パターン認識アルゴリズムであるサポートベクトルマシンによって自動検出する方法である。人為プロセスを一切経ないため、主観的要因を完全に排除できる。十分な学習を行ったのちの平均偽陰性率は3%程度、偽陽性率は1%であり、手動検出はもちろん、既存のアルゴリズムによる半自動検出法よりもはるかに精度の高い検出が可能となった。

fMRI の特長を活かし、シナプス結合を効率よく探索できるマッピング技法 (Reverse Optical Trawling: ROTing) を考案した(J. Neurophysiol., 102:636-643, 2009) 。海馬CA3-CA1 野間のシナプス結合を例に、以下ROTingの手順を解説する。ROTingは3ステップから形成される。ステップ1 シナプス前細胞の候補となるニューロンが存在するCA3 野の錐体細胞層にガラス電極を刺し、空気圧によりカルシウム蛍光指示薬を局所的に注入する。この負荷方法は、従来のインキュベーション法による蛍光色素の導入に比べて、(i)実験時間が短縮できること、(ii)色素負荷の影響を導入部位のみに最小限に抑えることができる、などの利点がある。ステップ2 別の微小ガラス電極を用いて、グルタミン酸をイオントフォoresisによって局所的に適用し、CA3 野の細胞の発火活動パターンをfMRIによって記録する。また同時にCA1 野細胞に入力されるシナプス電流をパッチクランプ法により記録する。ステップ3 カルシウム活動とシナプス電流のタイミングを統計的に比較することにより、fMRIで記録されたすべての細胞において、シナプス結合を有するか否かを検証する。なお、ROTingの基本アイデアは、2006 年にAaronとYusteによって考案された(Reverse Optical Probing (ROPing) から得た。ROPingはシグナル-ノイズ比が悪く、実用性は低かったため、(i)人工細胞外液の改良、(ii)局所的に細胞活動を誘発する方法の開発、などの工夫を処し、欠点を克服した。とくに変更点(i)は、自発的な細胞活動を大幅に抑制するのみならず、シナプス伝達効率を向上させるという利点を併せ持つ。その結果、シグナル-ノイズ比が向上し、結果として、平均偽陰性率は4%以下、偽陽性率は1%と高い確度でシナプス結合を同定することが可能となった。例を図2に示す。

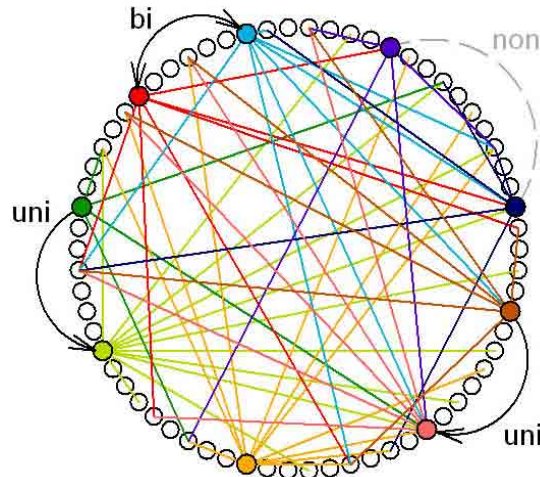


図2 ROTing で同定した CA3 野のシナプス結合パターン。丸印は各ニューロン(結合トポロジーを保持したまま円形空間にアレンジした)。色で塗りつぶされた丸はパッチクランプ記録を行ったニューロン。これら計9個のニューロンに対し投射するシナプス結合が63個見つかった。

(2) 神経スパイク同期のメカニズム

CA3 野回路の自発活動を高速 fMRI で撮影したところ、異なるニューロンが同時に発火する、つまり「同期スパイク」を発することが頻繁に観察された。この同期スパイクはミリ秒オーダーの時間精度を持ち、ポアソン発火を想定した場合よりも10倍程度高い頻度で観察された。fMRI で自発活動を撮影した後に、ROTing によってシナプス結合を検出したところ、結合したニューロンペアは同期スパイクを高い頻度で示し、また親ニューロンの共有率も高いことがわかった。実際、ダブル標的パッチクランプ記録を行ったところ、同期スパイクを示すペアは類似した自発的 EPSC を受けていることが判明した。興味深いことに、自発的 IPSC に関しては、同期のしやすさに依存せず、常に相関が高かった。そこでランダム発火する2階層ニューラルネットワークを用いて高相関の EPSP を作成し、ダイナミッククランプ法を用いて、シナプス伝達を遮断した2つのニューロンに注入した。しかし、自然な回路で見られるような高頻度な同期スパイクは観察されなかった。そこで回路全体の活動に目を向けた。その結果、回路全体として同期の大きさがベキ分布していることを見出した。そこで再度、2階層ニューラルネットワークを用いて、第一層がベキ発火したときの下層の相関 EPSP を作成し、ダイナミッククランプ法で注入した。すると同じ入力相関値に対して高い出力相関が得られた、この結果はスパイク同期が CA3 野回路における再帰性に依存していることを示すものである。なお、回路同期活動の結合性を、グラフ理論によって探索したところ、スモールワールド性を有することが明らかとなった。以上のデータは、神経回路の自己組織的な機能発現における本質的な基底ルールに対して重要な示唆をもたらすものである。

5. 自己評価

掲げた目標はおおむね達成できたと考えている。イメージング性能の向上に関しては、とりわけ、(a) 2000Hz の超高速撮影、(b) 1 万以上のニューロンからの記録、(c) 従来の約 10 倍のシグナル・ノイズ比を達成し単スパイクの検出が可能となった、の 3 点を強調したい。また得られたスパイク列を解析する過程で、自発活動のなかにベキ則を伴った時間精度の高い同期発火を見出した。同期発火が同期した共通入力が必要とすること、共通入力を与えるような回路トポロジが存在することを実証し、皮質回路の作動原理に迫ることができた。反省点としては、(i) 本研究のメインとなる発見に関して論文が未受理であること、(ii) Ca^{2+} 感受性蛍光タンパク質をニューロン選択的に

発現するマウスの作成に失敗したこと、が挙げられる。とくに後者(ii)については、1200個もの卵に遺伝子導入を試みたが、マウス作成に至らず、たいへん落胆している。しかしマウス作成中はその成功を信じ、来るべき日のためにin vivo実験系を準備した。その結果、(1)スティック型対物レンズを用いてin vivoマウスからの観察を行い、血流の撮影、およびアストロサイトの活動記録に成功、(2)覚醒マウスからのパッチクランプ記録に成功(しかも2細胞からの同時記録)、などの副次的な成果を得ることができ、今後の展開につながる芽を得た。

6. 研究総括の見解

多ニューロンCa²⁺イメージング法(fMCI)のイメージング性能の向上に関して、2000Hzの超高速撮影、1万以上のニューロンからの記録、従来の約10倍のシグナル・ノイズ比を達成し、単スパイクの検出を可能にするなど、新しい技術の開発を積極的に行い、着実に成果を挙げている。また、海馬体の回路演算の解析においても、新しい知見を見出ししており、さらに、興味深い研究へと発展している。このネットワークの作用機序の中から脳機能のメカニズムの解明に発展することを望む。

7. 主な論文等

【A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの】

①論文

1. Tsukamoto-Yasui, M., Sasaki, T., Matsumoto, W., Hasegawa, A., Toyoda, T., Usami, A., Kubota, Y., Ochiai, T., Hori T., Matsuki, N. and Ikegaya, Y. Active hippocampal networks undergo spontaneous synaptic modification. PLoS One, 2(11):e1250, 2007.
2. Ikegaya, Y., Matsumoto, W., Chiou, H. Y., Yuste, R., Aaron, G. Statistical significance of precisely repeated intracellular synaptic patterns. PLoS ONE, 3(12):e3983, 2008.
3. Usami, A., Matsuki, N. and Ikegaya, Y. Spontaneous plasticity of multineuronal activity patterns in activated hippocampal networks. Neural Plast., 108969, 2008.
4. Sasaki, T., Takahashi, N., Matsuki, N. Ikegaya, Y. Fast and accurate detection of action potentials from somatic calcium fluctuations. J. Neurophysiol., 100:1668-1676, 2008.
5. Sasaki, T., Minamisawa, G., Takahashi, N., Matsuki, N. and Ikegaya, Y. Reverse optical trawling for synaptic connections in situ. J. Neurophysiol., 102:636-643, 2009.

②受賞

1. 日本薬学会・奨励賞(2008年3月)
2. 文部科学大臣表彰・若手科学者賞(2008年4月)

③招待講演

1. Y.Ikegaya "Mesoscopic network dynamics revealed by high-speed multineuron calcium imaging." German-Japanese CNS workshop in Berlin.(2009.5)
2. Y.Ikegaya "Functional multineuron calcium imaging and large-scale spike trains" Neural Coding 2009 (NC2009)(台南).(2009.5)
3. Y.Ikegaya "Functional multineuron calcium imaging and large-scale spike trains" Topical Problems of Biophotonics: Russian-Japanese Workshop "Neuroimaging and Neurodynamics"(2007.8)