

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「光の特性を活用した生命機能の時空間
制御技術の開発と応用」
研究課題「自由行動下での神経情報操作・解読技
術の開発と意思決定の神経基盤解明への応用」

研究終了報告書

研究期間 2017年10月～2024年03月

研究代表者：渡邊 大
(京都大学 大学院医学研究科 教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

脳機能の解明を困難にしている一因として、脳が極めて多様な神経細胞サブタイプから構成されていることが挙げられる。しかも個々の神経細胞の興奮性や回路連絡は一定ではなく、絶えず適応的・可塑的に変化するため、分子マーカー等では同じタイプに分類される神経細胞であっても、その特性は不均一であり神経活動パターンは時として大きく異なる。従って、脳の情報処理を理解するためには、基本ユニットである単一細胞レベルの精度で解析することが重要である。さらに、このように神経細胞の特性が絶えず可塑的に変化することから、ある時点の神経活動をスナップショット的に計測するのではなく、各神経細胞に作用する可塑性シグナルのダイナミクスと神経情報の推移を追跡可能な研究手法を確立することが重要である。

本研究では、自由行動下の動物個体から単一細胞レベルの精度で長期に渡り神経活動および細胞内シグナル動態を追跡するためにマルチカラー内視顕微鏡 (endomicroscopy) の開発を第 1 の目標とした。次に次世代の神経活動計測技術として期待される膜電位指示タンパク質 (genetically encoded voltage indicator, GEVI) による膜電位イメージングへの対応を図るべく、イメージ取得の高感度高速化を包括する光操作技術の開発を第 2 の目標に設定した。さらに、これらのオプトバイオロジー技術による意思決定の神経基盤の解明を第 3 の目標に設定した。

渡邊グループは、内視顕微鏡の光学系およびイメージセンシング機構に関する基本的な設計開発および生体での活動電位イメージングを目的とする GEVI の開発を担当した。石川グループは、イメージ取得の高感度・高速化について条件検討し、自由行動下のイメージングで問題となる体動による画像のブレの補正技術、動物個体の動作解析手法の開発を行なった。大羽グループは、イメージングデータから個々の神経細胞に由来する信号を抽出するパイプラインの開発を担当した。

その結果、生体で数週間にわたり単一細胞精度で神経活動および細胞内シグナル動態を追跡可能な内視顕微鏡イメージング技術の開発に成功した。さらに GEVI のハイスループットなスクリーニング手法を確立した結果、蛍光強度の電位依存的な変化率が大きく、かつ高速な電位変化への追従性の良い GEVI の開発に成功した。この改変型 GEVI により、認知課題実施中の動物個体の同一神経細胞からの約 4 週間にわたる活動電位計測にも成功しており、様々な脳機能研究への展開が期待できる成果といえる。

上記のオプトバイオロジー技術を導入することで、従来困難であった自由行動下での長期にわたる神経活動及び細胞内シグナル動態の計測が可能となったことで、意思決定に関する神経機構の研究も大きく展開した。

従来、中脳ドパミン系-基底核回路に注目した研究が展開し、報酬履歴からの行動価値計算に基づく意思決定の神経機構について多くの知見が得られてきた。しかしながら、このような過去の試行結果による強化学習モデルのみでは、ヒトの柔軟な意思決定を説明するのは困難である。情報処理能力に自ずと限界のある脳を持つヒトは、コンピューターのように過去の履歴データを瞬時に処理することは不可能である。またロボットのように膨大な試行を繰り返すこともできない。その代わりに脳には「認知的柔軟性」と呼ばれる機能が備わっており、状況変化に応じて柔軟に行動や戦略の切替えを行うことでスパースな試行で行動の最適化を図る。この認知的柔軟性に注目して、イメージング及び光操作技術を適用し、意思決定の神経情報の解析を行なった。その結果、環境変化が予測可能な場合と困難な場合では、異なる認知的柔軟性が作用すること、さらにそれぞれ異なる前頭皮質領域が関与することが明らかとなった。認知的柔軟性は、若年層から高齢者に至る幅広い年齢層が罹患する様々な中枢疾患により障害される。これらの疾患の病態解明や治療法開発に資する成果といえる。

内視顕微鏡における長時間の蛍光観察を実現するために、蛍光プローブの褪色に対して効果が期待できる計測系の確立を目標として、1年間研究期間を延長し、励起光の時空間パターン制御と高速高感度の受光素子を組み合わせた新しい計測手法の開発を行った。

自由行動中の個体からの神経機能計測を目的とする内視顕微鏡による蛍光イメージングでは、行動を阻害しないように、光学系のサイズや重量には制約があり、強い励起光が必要となる。その結果、蛍光プローブの褪色が強くなり、長時間の連続計測が困難であった。高効率の信号検出および高い時間解像度を達成するため、励起光の時空間パターン制御と高速高感度の受光素子を組み合わせた新しい計測手法の開発を行なった。また自由行動下でのライブ細胞イメージングでは、体動や血管拍動、呼吸等に起因する計測対象の動きが問題となる。そのため、このような動きを補正してターゲットの細胞を常時トラッキング可能な励起光制御技術が重要である。そこで計測対象の動きに合わせて励起光パターンをリアルタイムに更新するシステム開発を行なった。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. 予測による意思決定の神経機構

概要：発達した脳を持つ動物は、環境の変化とその規則を学習し、変化を予測してリスクを回避するなど適切な行動をとることができる。しかしながら、環境変化の規則性を学習し、予測により行動を決定する過程で、脳にどのような変化が起こっているのか詳細は不明である。このような予測による意思決定の神経回路機構を研究するために、連続逆転学習課題を開発し、 Ca^{2+} イメージングおよび光遺伝学的な神経回路操作を適用した。その結果、予測に基づく行動価値情報を表現し、さらに予測を行動選択に変換する脳領域を2次運動皮質(M2)内に特定することに成功した。

2. 認知バイアスによる行動戦略切替えの神経機構

概要：実世界は、極めて多様な要素から構成され、相互に影響を及ぼすため、その変化を合理的に推論することは困難である。このような状況でヒトは「認知バイアス (行動／意思決定バイアス)」の作用により、行動戦略のスイッチングを行うことが示されているが、その生物学的基盤は不明である。マウスを対象に弁別逆転学習課題を設定し、マウスにも行動バイアスが作用し行動戦略の切替えが生じること、さらに行動バイアスが必ずしも適切な行動選択を阻害するものではないことを見出した。本CREST課題で開発した内視顕微鏡イメージングにより、バイアスによる行動戦略のスイッチングに関与している脳領域を見出した。この神経機構をさらに追求することにより、「ヒューリスティクス」と呼ばれる直観的な意思決定の神経回路基盤およびその生物学的意義が明らかになると期待される。

3. 線条体直接路・間接路におけるERKシグナル伝達

概要：線条体は、大脳皮質-基底核間の主要なインターフェースとなる神経核であり、その投射経路は、直接経路と間接経路に大別される。直接経路と間接経路を構成する中型有棘神経細胞 (medium spiny neuron, MSN) は、それぞれ異なるドパミン受容体 (Drd1 および Drd2) を発現し、興奮性および可塑性が適切に制御されることが、意思決定や運動制御のような脳機能に重要と考えられている。しかしながら Drd1/2 の違いにより、核への細胞内シグナル伝達がどのように異なるか不明な点が多い。内視顕微鏡イメージングにより、生体の線条体 MSN の Drd1 および Drd2 の下流で核へ情報を伝える細胞外シグナルキナーゼ (ERK) の活性動態を単一細胞の精度で長期間計測する研究手法を確立した。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1. 膜電位指示タンパク質の開発

概要：脳の情報処理の基盤となる神経細胞の電氣的活動 (膜電位変化) の計測は、脳の動作原理やその病態を理解するための最も基本となる研究手法である。本研究では、次世代の膜電位計測技術として期待される膜電位指示タンパク質 (GEVI) の新規スクリーニング手法を開発した。従来の手法と比較してハイスループットなスクリーニングが可能となった結果、電位依存的な蛍光強度変化率が大きな改変型 GEVI の開発に成功した。本スクリーニングの原理を適用することで、従来の電気生理学的手法では困難な膜電位の時空間変化を計測・解析可能な様々な GEVI の開発が加速すると期待される。

2. デジタルミラーデバイス (DMD) による高速高感度イメージング技術の基盤開発

概要：今日のライフサイエンスには、微弱な光信号を計測する光学的イメージングは欠かすことができない基幹技術となっている。本技術は、DMD により、従来のイメージセンサーでは達成困難な高速高感度なイメージングを実現するものである。上記の改変型 GEVI と組み合わせることで、生体の脳深部の活動電位イメージングに成功した。今後は、ソフトウェアのアップデートにより DMD 制御のインテリジェント化を進める事で、様々なライフサイエンス分野のイメ

ーシングへの応用を目指す。

3. マルチカラー内視顕微鏡による自由行動下での神経機能計測技術の確立

概要: 中枢神経系の神経細胞の大半は出生時には増殖能のない分裂終了細胞であるため、シナプス伝達等の細胞外シグナルを細胞内シグナルに変換し、電氣的興奮性や回路連絡を変化させることで、脳機能の獲得とその制御に対応する。しかしながら、生体の神経細胞の細胞内シグナルの動態について未解明な点が多い。本研究課題ではマルチカラー内視顕微鏡技術を開発し、基底核神経細胞の細胞外キナーゼ (ERK) 活性動態を動物個体の行動を制限する事なく 24 時間計測することに成功した。行動を制限することなく、単一細胞の精度で神経細胞の細胞内シグナル動態を解析することで、脳機能およびその病態の解明が期待される。

4. 光制御技術の高速・高感度計測への応用

概要: 神経活動の長期的な追跡は、神経回路解析において最も重要な技術のひとつである。蛍光プローブによる光学的計測は、長期にわたる追跡を可能にする手法であるが、蛍光褪色が大きな問題となる。特に、神経活動を計測する場合、高い時間解像度が要求されるため、強い励起光が必要となり、褪色が引き起こされ、連続した長時間の観察が難しい。高効率の信号検出および高い時間解像度を達成するため、励起光の時空間パターン制御と高速高感度の受光素子を組み合わせた新しい計測手法を開発した結果、内視顕微鏡による単一細胞精度の蛍光イメージングの長時間化 (脳深部からの GEVI 計測において連続 40 分以上の活動電位単一ユニット計測) に成功した。さらに、自由行動下のマウスでの顕微内視鏡イメージングで実用上問題となる $<50\mu\text{m}/\text{秒}$ の細胞の動きをトラッキング可能な励起光パターン制御システムの開発に成功した。

<代表的な論文>

1. Hamaguchi, K., Takahashi-Aoki, H., and Watanabe, D. (2022). From Retrospective to Prospective: Integrated Value Representation in Frontal Cortex for Predictive Choice Behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 119, e2206067119.

概要: 予測により行動を決定する過程で、脳にどのような変化が起こっているのか詳細は不明である。このような予測による意思決定の神経回路機構を研究するために、連続逆転学習課題を開発し、イメージングおよび光遺伝学的な神経回路操作を適用した。その結果、予測に基づく行動価値情報を表現し、さらに予測を行動選択に変換する脳領域を 2 次運動皮質 (M2) 内に特定することに成功した。

2. Nishioka, T., Hamaguchi, K., Yawata, S., Hikida, T., and Watanabe, D. (2020). Chemogenetic Suppression of the Subthalamic Nucleus Induces Attentional Deficits and Impulsive Action in a Five-Choice Serial Reaction Time Task in Mice. *Frontiers in Systems Neuroscience* 14, 38.

概要: 分子遺伝学的に視床下核の神経活動制御技術を開発し、タッチスクリーンによる認知課題の結果、視床下核の神経活動と実行機能と分類される認知プロセスの関係について明らかにした。

3. Okunomiya, T., Hioki, H., Nishimura, C., Yawata, S., Imayoshi, I., Kageyama, R., Takahashi, R., and Watanabe, D. (2019). Generation of a MOR-CreER knock-in mouse line to study cells and neural circuits involved in mu opioid receptor signaling. *Genesis* e23341.

概要: 基底核線条体の striosome を構成する中型有棘神経細胞 (MSN) 選択的な遺伝子操作が可能なマウス系統を開発した。

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 渡邊グループ

研究代表者: 渡邊 大 (京都大学医学研究科 教授)

研究項目 1. 内視顕微鏡による高速・高感度イメージング技術の確立

- ・高速・高感度イメージング技術の開発
- ・GEVI による膜電位イメージング技術の開発

研究項目 2. 光操作技術の内視顕微鏡イメージングへの応用

- ・内視顕微鏡下の光学的神経回路操作技術の開発
- ・光操作における細胞トラッキング技術の開発

研究項目 3. 自由行動下の意思決定の神経基盤

- ・皮質神経回路の解析
- ・基底核神経回路の解析

② 石川グループ

主たる共同研究者: 石川 正俊 (東京大学情報基盤センター 特任教授)

研究項目 1. 内視顕微鏡による高速・高感度イメージング技術の確立

- ・高速・高感度イメージング技術の開発
- ・GEVI による膜電位イメージング技術の開発

研究項目 2. 光操作技術の内視顕微鏡イメージングへの応用

- ・内視顕微鏡下の光学的神経回路操作技術の開発
- ・光操作における細胞トラッキング技術の開発

研究項目 3. 自由行動下の意思決定の神経基盤

- ・皮質神経回路の解析
- ・基底核神経回路の解析

③ 大羽グループ (2019 年度まで)

研究代表者: 大羽 成征 (京都大学情報学研究科 講師)

研究項目 1. 内視顕微鏡による高速・高感度イメージング技術の確立

- ・高速・高感度イメージング技術の開発

研究項目 2. 光操作技術の内視顕微鏡イメージングへの応用

- ・光操作における細胞トラッキング技術の開発

研究項目 3. 自由行動下の意思決定の神経基盤

- ・皮質神経回路の解析
- ・基底核神経回路の解析

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

CREST オプトバイオ領域内:

- ・石北 央 教授 (東京大学 先端科学技術研究センター): GEVI 開発で共同研究実施。
- ・磯部圭佑 博士 (理化学研究所 光量子工学研究センター): DMD 制御技術に関して共同研究実施。
- ・松田道行 教授 (京都大学生命科学研究科): FRET バイオセンサーに関して技術・情報提供を受けた。

マウス系統開発:

今吉 格 教授 (京都大学 生命科学研究科): 遺伝子組換えマウス系統開発。

水野聖哉 准教授 (筑波大学 医学医療系): ゲノム編集技術による遺伝子組換えマウス系統

開発。

イメージング計測技術およびデータ解析:

岡田知久 准教授 (京都大学医学研究科): イメージングデータ解析。

今井宏彦 助教 (京都大学情報学研究科): イメージング計測技術およびデータ解析。

福嶋誠 助教 (奈良先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科): グラフ理論によるデータ解析。

向山洋介 博士 (米国 NIH): イメージビッグデータ解析。

重本隆一 博士 (オーストリア IST Austria): 免疫電顕に関して共同研究。

伊藤 博 博士 (ドイツ Max-Planck 研究所): 神経データ解読技術に関して共同研究。

高橋良輔 教授 (京都大学医学研究科): パーキンソン病態モデルへの顕微内視鏡イメージング技術の適用で共同研究実施。