



Title	全脳イメージング法を用いた精神疾患動物モデルの脳機能解析
Author(s)	勢力, 薫
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/61683
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏名 (勢力 薫)

論文題名

全脳イメージング法を用いた精神疾患動物モデルの脳機能解析

論文内容の要旨

脳は、特徴的な構造や神経結合の違いにより多数の領域に分類することができ、各脳領域が担う視覚や聴覚などの機能の統合が、認知や情動などの複雑な脳機能の制御に繋がる。このような階層性のある脳機能は、多数の神経細胞によって構成される脳全体としての神経ネットワークによって統御されている。そして、神経ネットワーク構造や機能の障害は、脳機能の制御・統合に影響し、精神疾患の発症に繋がり得る。そこで、精神疾患の生物学的機序を解明するためには、脳構造や神経活動を脳全体で体系的に捉えることが有効であると考えられている。

近年、細胞単位の構造や活動を全脳で捉えるための顕微鏡イメージング技術が開発されつつある。主に二つの方法に大別することができ、撮影と組織の切片化を自動で繰り返す連続切片イメージング法と、脳組織を透明化し、光シート顕微鏡を用いて光学切片画像を取得する方法がある。しかし、撮影速度と解像度の両立が難しく、疾患モデル動物の解析が容易ではないのが現状である。連続切片イメージング法では、高い解像度により一細胞レベルの神経投射を捉えることができるが、マウス脳あたり3日以上撮影時間を要するものが多い。そのため、複数個体のイメージングと比較解析を要する疾患モデルの解析への応用はあまり行われていない。一方、組織透明化と光シート顕微鏡を用いる方法では、組織を切断せずに高速にイメージングでき、神経活動の変化などを全脳で比較解析することができる。しかし、対物レンズの作動距離を超えた組織深部を撮影することが難しいため、連続切片イメージング法と比べて低倍率で作動距離の大きい対物レンズを用い、脳内に散在する一部の細胞種の分布が主に解析されている。

本研究では、脳内の様々な細胞の位置情報や形態情報を得て、疾患モデルの全脳領域における細胞単位の神経活動や脳構造の変化を検出するため、当研究室で開発してきたマウス全脳イメージング法を改良・高速化し、新しいイメージングシステムの確立を行った。本システムでは、海馬歯状回などの細胞が密に存在する脳領域でも単一細胞を識別できる解像度に設定しており、今回、撮影速度を高速化するために光学系部品の調節を行った。このシステムを用いて、全脳領域における細胞核をHoechst 33258で蛍光標識した脳や、FITC標識トマトレクチンの灌流により血管内皮細胞を蛍光標識した脳、神経ペプチドvasoactive intestinal peptide (VIP)を発現する細胞が蛍光標識されているVIP::tdTomatoマウスの脳などをイメージングした結果、全脳領域にわたって単一細胞核や、血管の分岐、神経線維など、脳内の様々な微小構造を解像できることが確認できた。

また、全脳画像から細胞レベルの構造変化を検出可能か検証するため、海馬歯状回に細胞の脱落を引き起こすことが知られているトリメチルスズを投与したマウスの解析を行った。特定の脳領域に着目せずに、脳全体の細胞数を計数し、対照群と比較解析した場合においても、歯状回における細胞数の減少を検出することができ、細胞数に基づく構造の解析に利用できることが示された。このような細胞が密に存在する領域も含めた全脳領域で、その細胞をイメージングして計数する解析では、本システムが有効な手法であると考えられる。

ヒトへの橋渡し研究には、ヒト死後脳や非ヒト霊長類を用いた脳解析が有効である。本検討では、非ヒト霊長類である成体のマーモセットを用いて、細胞核を標識した脳半球と、ウイルスベクターにより神経投射を蛍光標識した全脳のイメージングを行い、マウスと同じ解像度で細胞や神経投射などの脳構造を撮像できることを示した。また、過去最大レベルの組織サイズのヒト死後脳の三次元イメージングを実施し、視覚野の一部をHoechst 33258で細胞核染色し、その空間分布を捉えることができた。このように、細胞レベルの解像度を維持したまま高速化したことにより、非ヒト霊長類の全脳やヒト死後脳への応用が可能になった。

次に、本システムを用いて、統合失調症モデルの神経活動の変化を体系的に解析した。N-methyl-D-aspartate型グルタミン酸受容体 (NMDA受容体) 拮抗薬は、乱用によりヒトに統合失調症様の症状を起こす場合があり、また、齧歯類でも統合失調症様の行動異常(多動、社会的行動の低下、感覚情報処理障害等)を引き起こすことが知られている。そこで、全脳イメージングシステムと、活性化した神経細胞を蛍光標識できるArc-dVenusマウスを用いて、NMDA

受容体拮抗薬MK-801による神経活動変化を解析した。0.5 mg/kgのMK-801を腹腔内投与し、その5時間後にイメージングした結果、全脳領域の中でも前嗅核、眼窩前頭皮質など複数の領域においてdVenus陽性細胞が増加していた。また、顕著なdVenus陽性細胞の増加が認められた眼窩前頭皮質の局所傷害により、新奇環境下における自発運動量は変化しないものの、MK-801による多動が抑制されたことから、眼窩前頭皮質の活動がNMDA受容体拮抗薬による多動に関与することが明らかになった。

以上のように、本イメージングシステムは、細胞分布の疎密によらず、脳全体にわたって個々の細胞を識別できる解像度で高速に画像を取得可能であり、様々な細胞種の分布や形態の変化を定量的に比較解析できる特徴を有する。実際に、本研究では、NMDA受容体拮抗薬による行動異常に眼窩前頭皮質が関与することを示した。この成果は、統合失調症の神経基盤の理解に貢献できると考えられる。さらに、非ヒト霊長類の全脳やヒト死後脳への応用性は、新しい解析手法としてヒトへの橋渡し研究に利用できる。今後、本研究により確立したイメージング法を用いて疾患モデル動物やヒト死後脳の解析を行うことで、精神疾患の生物学的理解や、治療薬の効果機序の解明、非臨床試験における薬物の新しい評価方法の確立など、医学や創薬への幅広い貢献が期待される。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (勢 力 黨)			
	(職)		氏 名
論文審査担当者	主 査	教授	橋本 均
	副 査	教授	土井 健史
	副 査	教授	平田 收正

論文審査の結果の要旨

「全脳イメージング法を用いた精神疾患動物モデルの脳機能解析」と題する論文において学位申請者は、細胞レベルの脳構造や神経活動を全脳レベルでイメージングするための光学顕微鏡システムの高速化を行い、疾患モデル動物の全脳レベルでの表現型解析や、非ヒト霊長類の脳、ヒト死後脳組織の三次元イメージングを行った。

脳は、機能が高度に局在・分化し、可塑性に富む組織であり、その機能統合の障害は、精神疾患の発症に繋がり得ると考えられる。したがって、疾患の病態を理解し、治療機序を解明するためには、仮説に基づく特定の脳領域を詳細に解析する従来の研究に加えて、仮説を設けず、広範な脳領域における神経等の変化をバイアス無しに捉え、それらを定量的に比較解析することが有効であると考えられる。この観点において、高速・高精細全脳イメージング法は、精神疾患モデル動物のシステムレベルの病態研究や創薬研究に貢献することが期待される。

以下に、本学位論文において発表された成果と、その評価を示す。

1. **Serial sectioning** による自動イメージング法のレーザー照射を含む光学系、センシング系等、各所に改良を加え、細胞レベル～サブセラーレベルの空間分解能でマウス全脳を高速にイメージングすることに成功した。
2. 非ヒト霊長類マーモセットの成体の脳を用いて、蛍光標識された神経投射のイメージングを実施し、マーモセット全脳における後帯状皮質の三次元回路構造などを示した。また、細胞核を蛍光標識したヒト死後脳の一部の三次元イメージングを実施し、ヒト脳における細胞の空間分布の解析への応用性を示した。
3. 活性化した神経細胞を蛍光標識できるArc-dVenusマウスを用いて、*N-methyl-D-aspartate*型グルタミン酸受容体(NMDA受容体)拮抗薬の急性投与による統合失調症モデルを作製し、活性化する脳領域を観察した結果、眼窩前頭皮質においてdVenus陽性細胞が著明に増加することを見出した。また、眼窩前頭皮質の局所傷害により、NMDA受容体拮抗薬による多動が抑制されることを明らかにし、眼窩前頭皮質の機能が疾患様の行動変化に関与することを示した。

以上のように、本学位論文において確立された高速の全脳イメージング法は、細胞レベル～サブセラーレベルの分解能で、脳構造や神経活動を解析することを可能にし、今後の脳機能や病態に関する研究に有用であると考えられる。また、非ヒト霊長類やヒト死後脳のイメージングの実施例から、ヒト疾患の病態理解のための橋渡し研究にも有用であることが期待される。これらの研究成果は、今後の薬学や脳科学研究に貢献するものと考えられることから、博士(薬学)の学位論文に値するものと認める。