

# 研究報告書

## 「空間選択的光操作を用いた脳内生成モデルに基づく行動決定機構」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2016年10月～2020年3月

研究者: 伊藤 博

### 1. 研究のねらい

脳の作動原理を探るためには、神経細胞活動の観察のみならず回路の人工的操作を可能とする技術が不可欠である。近年の光感受性タンパク質の開発により、光を照射することで、神経細胞活動を自由に制御することは可能になった。残された問題は如何にして脳の中の特定の細胞群にのみ光を選択的に照射するかということにある。これには光の空間選択的制御技術の応用が不可欠である。この技術を確立させることで、脳回路の実験、つまり、ある脳領域に特定の活動パターンを与え、他の脳領域での計算への影響をみるという研究が初めて可能になり、それにより、これまで研究が不可能であった脳の内部モデルに踏み込んだ研究を行うことで、脳科学の新たな地平を開けると考えられる。

私の研究では特に、空間探索課題遂行中のラットの脳内において、狙った細胞特異的に光を照射する技術の開発を試みた。この研究では、如何にしてラットが目的地に向けて最適なルートを通ってたどり着くことができるのかを解明することを目標としている。多くの行動実験から、ラットはヒトと同じく地図を頭の中に描きながら目的地への経路を決めていると考えられている。ここで、頭の中に描く地図とは、過去の情報や経験に基づき作り出した、脳内のモデルであり、このモデルと実際の感覚刺激や自己の動作などの情報と結びつけながら、自己の現在位置ならびに目的地の方向を正確に把握していると考えられる。本プロジェクトでは、光技術により脳内の空間モデルが動物行動にどのような影響を与えているか、そして脳内空間モデルと外界の刺激がどのように関わり合って行動を選択しているかの計算機構の解明を目指した。

この研究は多くの臨床への可能性も秘めており、精神疾患症状の解明・治療に利用できると考えられる。例えば統合失調症の主要症状である幻聴・幻覚は、脳内のモデルが暴走して、外界からの情報を無視している状態なのではないかとの示唆があるが、実際の実験的証拠は未だ得られていない。これを本プロジェクトで開発する技術により脳の内部モデルを直接操作することで証明できるのではないかと考えられる。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

多くの脳科学研究で行われている、顕微鏡下での実験では動物の頭部を固定しなければならず、感覚情報が大きく制限され、自然な脳活動観察を望めない。そのため空間選択的光操作技術を開発し、その照射パターンを光ファイバーを用いて転送することで、自由行動下の動物で実験できるようにすることを目標とした。

- 光の空間選択的照射の為に、われわれはホログラフィー技術を用いることとし、空間光変調器を用い、光の位相を操作することで、自在な光照射パターンを実現し

た。

- この照射イメージを自由行動動物の脳内に転送する為、数万個の光ファイバーの束である光ファイバー束をもちいることで、画像転送を試みた。
- さらに、神経細胞活動を観察する為に、カルシウム感受性タンパク質を用いた、細胞活動イメージングを検討した。

これらの検証実験は、単純行動をする覚醒動物の下で成功し、光ファイバー束で蛍光観察画像を脳内から取り込み、狙った細胞に光を選択的に照射することが可能であることが分かった。

しかし、実際の課題遂行中の動物にこの技術を応用する為には、コンピューターの開発が必要不可欠であることが分かった。この点は、これまでの光学論文ではあまり重視されていなかった点だが、光ファイバーがいかにかにフレキシブルとはいえ自由行動動物を観察し続けるとすぐにファイバーが捻じれ絡まってしまい実験を中止しなければならなくなる。この為に、サーボモーターと角度センサーを組み合わせたフィードバックシステム設計が必要になり、この問題を克服することが本プロジェクトの一つの鍵となった。

## (2) 詳細

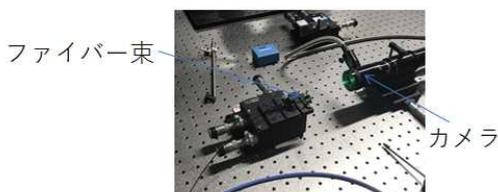
### 1. ファイバー束を用いたホログラフィー技術の開発

空間光変調器を用いることで、光位相を調節し、その照射光をファイバー束に通すことで、遠隔地点での自在な照射を可能にした。自在に照射画像を形成する為の位相の計算には Gerchberg-Saxton アルゴリズムを最適化することで、照射精度に対する計算速度を向上させた。

空間光変調器により照射画像に対応する位相変化を作り出す



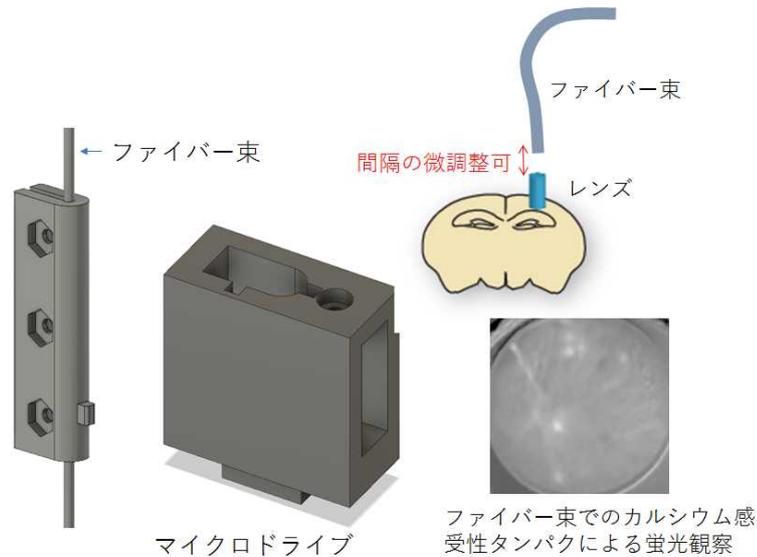
ファイバー束の先端のイメージ



### 2. カルシウム感受性タンパク質の発現による神経細胞機能イメージングの確立

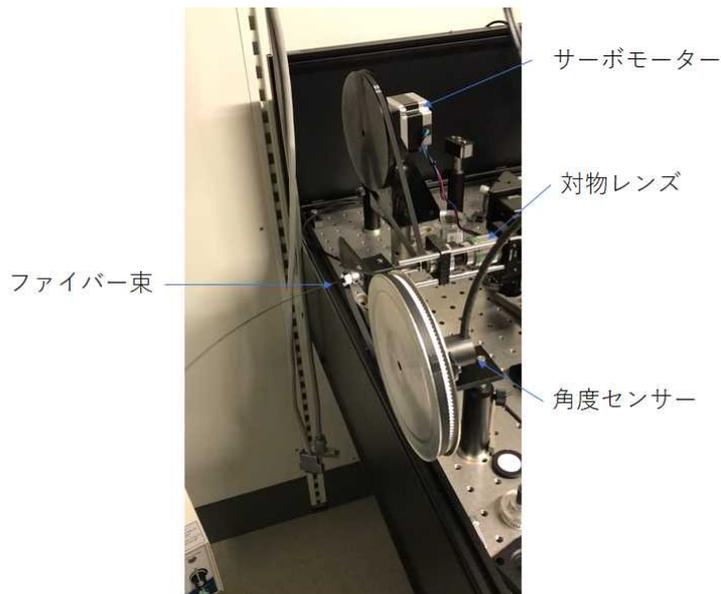
神経細胞からの蛍光観察のために、脳内にウイルス注入、レンズの埋め込みを行い、さらにはファイバー束を固定する為のマイクロドライブを開発した。レンズとファイバー束との間隔は画像の焦点を決める重要なパラメーターであり、開発したマイクロドライブではこれの微調整を可能とした。またファイバー束と対物レンズの相性があることが分かり、いくつかの対物レンズを試すことで、光伝達効率が最適なものを探し、高感度カメラで観察することで、比

較的小パワーの励起光(<1 mW/mm<sup>2</sup>)で十分な蛍光観察ができるようにした。



### 3. 課題遂行中の自由行動動物での実験を可能にするコンピューターの開発

ファイバー束が課題行動中にねじれないようにする為に、ファイバー束のねじれを角度センサーで感知し、それに応じて、ファイバー束を回転させるコンピューターを作成した。対物レンズと光ファイバー束との回転軸をずらしてしまうことのないように、ファイバー束の回転角度をサーボモーターにより正確に調節した。また回転中はイメージングや光照射を停止する必要がある為、回転速度をできるだけ上げることで、データ欠損を最小限にした。この際、フィードバックの多少のエラーが大きな問題につながるため(ファイバーの破損など)、様々な微調整が必要になったが、現在コンピューターは行動実験での使用に耐えるレベルにまでになった。



#### 4. 課題遂行中のラットでの応用

本システムを用いるための、空間探索課題を新たに開発した。この課題では、目的地と報酬の場所を分けることで、目的地に向かう際の脳状態を、報酬への期待とは独立して、観察することが可能である。現在この課題遂行中の動物から神経細胞活動計測並びに活動制御を行っているところである。

#### 3. 今後の展開

必要な技術開発をほぼ終えたことで、これを実際の脳機能解明に結びつけることが今後の課題である。この技術を応用できる実験は多くあり、一つは本プロジェクトの目的である、脳内地図の自由な改変である。脳内地図を変化させることで、外界からの刺激を変えず、行動決定に影響を及ぼすことができるなら、脳内モデルと動物行動を結びつける神経回路がより明らかになっていくと考えられる。

#### 4. 自己評価

最終成果として、イメージングならびにホログラフィーシステムを自由行動動物に応用できる段階まで来たということで、当初の目的の多くは達成できたと考えている。現在のところ、我々のようなコンピューターを用い自由行動動物に自在に使えるシステムは存在せず、これから、本システムを用いて、様々な脳現象解明に利用していきたいと考えている。このプロジェクトの目的である脳内モデル解明のための実験までは現時点では完結できていないが、これからの実験・解析により、脳内モデルと動物行動との関係の解明、さらには最終的に精神疾患症状のメカニズムの解明につながればと考えており、その為の大きな第一歩がこのプロジェクトを通じて踏み出せたのではないかと思う。

一方で、当初の研究目的まで達することができなかった部分もあり、その一つは二光子励起技術を利用できなかった点がある。しかしこれは主にハードウェア上の問題で、少なくとも限界をもたらしめている原因を突き止めたことが大きいと考えており、これからの技術開発などでこの問題点が克服できた時点でまた挑戦したいと思う。このプロジェクトを通じ、様々な点で、最先端光技術開発と動物実験への応用の理想と現実の違いを認識することが多かったが、これに関しても、どのような点を克服することが実際の実験に応用するために必要であるかを認識できたことが大きく、将来の技術開発に役立つ知見が多く得られたと考えている。

研究実施体制は私自身が中心となって行ってきた一方、我が研究所のイメージング部門との議論を定期的に行うことで、光学技術的問題解決を比較的スムーズに行えたと思う。研究費に関しても、必要な備品を必要なだけそろえることができ、本プロジェクトを支障なく進めることができた。

#### 5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

なし

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0件

(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)

口頭発表: 光遺伝学とホログラフィー技術を利用した自由行動動物下での神経細胞の機能  
選択的制御技術、日本分子生物学学会年会(福岡、日本、2019年12月6日)

ポスター発表(予定): IMAGING AND MANIPULATING SINGLE NEURONS IN FREELY  
BEHAVING RATS、Focus on Microscopy 2020(大阪、日本、2020年4月5-8日)