

帰国後 2 週間以内に提出してください (厳守) A4 用紙 4 枚以内 下記項目は変更しないでください。

(海外・**国内**) インターンシップ報告書

2020 年 9 月 15 日提出

氏名	北野泰佑
所属	薬理学教室
学年	D4
活動先名	機関名、国名 国立研究開発法人理化学研究所 脳神経科学研究センター、日本
期間 ① (出発日―帰札日) ② (インターンシップ 実施開始日―終了日)	① 2020 年 8 月 25 日-9 月 5 日 ② 2020 年 8 月 26 日-9 月 4 日

活動目的及びインターンシップ先を選択した理由

私は主に以下の 2 つを目的として、インターンシップ活動を行った。

- ①活動先で行われている中枢神経研究における高度な手法 (急速スライス標本の作製法、中枢組織培養法、これらを用いた電気生理や蛍光イメージングなど) を学び、自分自身や薬理学教室の今後の研究活動に活かすため。
- ②自分自身のキャリアプランの 1 つとして研究所の研究者として中枢神経研究を行うことを考えており、国内の脳研究の中核拠点において「研究所での研究」というものを体感するとともに、良いコネクションを作るため。

この目的を達成するために、私は埼玉県にある理化学研究所脳神経科学研究センターをインターンシップ先として選択した。本センターは、日本における脳研究の中核拠点であるとともに、世界有数の脳科学の研究拠点として国際的にも認知されている。その中でも、合田裕紀子先生がリーダーを務めるシナプス可塑性・回路制御研究チームでは、電気生理や蛍光イメージングの手法を用いて、シナプスの調節機構について、私の研究対象であるアストロサイトの役割にも注目して研究が行われている。私は将来のキャリアプランの 1 つとして研究所の研究者として、中枢神経研究を行いたいと考えている。このような世界レベルの研究室で中枢神経研究の最先端に触れることで、今後の研究活動に直接的に活かすとともに、将来のキャリアプランを決める糧としたいと考え、活動先として選択した。また、合田先生は、海外の大学や研究所で助教授やチームリーダーを歴任され、現在でも、上記研究室のリーダーと大学の教授を兼任されている。このような経験豊富な先生が運営する研究室を活動先として選択することで、「研究所での研究」というものを体感するとともに、研究室運営に対する理念や国内外の研究所・大学といった様々な舞台での研究の違い等を学びたいと考えた。さらに、活動先の研究室は現在所属している薬理学教室とは異なり、国際色豊かなメンバーが所属しており (10 人中、3 人のポスドク、1 人の技術スタッフ、1 人のインターンシップ生が外国籍)、国内でありながら海外の研究所での研究活動を疑似体験できる。そのため、本活動先は自身のキャリアパスにおける国際的な視野を養うためにも、有意義であると考えた。

活動内容・成果

活動先へは前日入りし、インターンシップ期間中は研究所内の寮 (I-House) を利用した。研究所 (図 1) では、10 日間という限られた期間の中で、自分の現在の研究により直接的に応用できる、ラット脳の急性スライス切片作製法およびその活動状態の確認法 (電気生理手法および Ca^{2+} イメージング) と、その切片を用いたアストロサイトの免疫染色法を中心に学んだ。また、海馬培養細



図1. 活動先であるセンター内の研究棟

胞系を用いたアストロサイトのライブセルイメージングや、海馬培養切片を用いたグルタミン酸アンケーシングによるスパイン形態可塑性のイメージング実験を見学させてもらった。さらに、インターンシップの1週間前から毎週金曜日に行われる Zoom ラボミーティングに合計3回参加した。以下に、それぞれの内容の詳細と成果をまとめた。

○ラット脳の急性スライス切片作製法およびその活動状態の確認法 (電気生理および Ca^{2+} イメージング)

齧歯類より作製する中枢組織の急性スライス切片は、生体内/組織内のニューロンやアストロサイトの電気シグナル測定、 Ca^{2+} イメージング、形態評価等に幅広く用いられ、in vivo/situ の中枢神経研究において基盤的な技術である。今後の自分の研究を in vivo/situ に広げていくために、本技術を学んだ。

ラット (13-23 日齢) より脳を急速に取り出し、氷冷人工脳脊髄液 (ACSF) (95% O_2 バブリング) 中にて、ビブラトームを用いて 300-400 μm 厚に薄切した (図 2A)。薄切した標本を自家製の維持チャンバー内で 3-4 時間維持し (図 2B)、電気生理手法と Ca^{2+} イメージングを用いてスライス標本の活動状態を確認した。

電気生理手法では、海馬 CA1 領域に刺激電極と測定電極を挿入し、局所フィールド電位記録を行った (図 3A)。電気刺激による興奮性シナプス後電位 (EPSP) の発生を記録することができた (図 3B)。 Ca^{2+} イメージングでは、 Ca^{2+} 指示薬 Fluo-4 を標本にローディングし、高濃度 K^+ ACSF を適用した際の Ca^{2+} 蛍光の増加および適用後の Ca^{2+} 蛍光増加の終息を記録することができた (図 4)。いずれの手法においても、作製したスライス標本が、機能的に良好な状態であることを確認できた。

○脳スライス切片を用いたアストロサイトの免疫染色法

自分の今後の研究では、スライス標本中のアストロサイトを染色 (イメージング) し、その形態を評価する実験を考えている。その実験において、300 μm という比較的厚いスライス標本を、特に加工せずに直接用いて、アストロサイトを免疫染色する方法を模索していた。活動先の研究室で類似の研究を行っていたため、そのノウハウを学んだ。詳細なプロトコルについては割愛する。インターンシップ期間中では、学んだ免疫染色法を1回しか実施できず、残念ながら良い染色像を得られなかった (図 5A)。合田先生よりアドバイスをいただき、インターンシップ後に薬理学教室にて再度実施したところ、良好な染色像が得られた (図 5B)。

○海馬培養細胞系を用いたアストロサイトのライブセルイメージング

海馬培養細胞系において、蛍光タンパク質 mCherry を導入・発現させたアストロサイトを用いたライブセルイメージングを見学した。実験では、自分の研究で用いている β アドレナリン受容体作動薬 イソプロテレノール (2 μM) を適用し、アストロサイト形態への影響を観察させてもらった。薬物処置前に比べて、処置後には細胞表面より細かな突起が形成されているのが確認でき (図 6)、自分の研

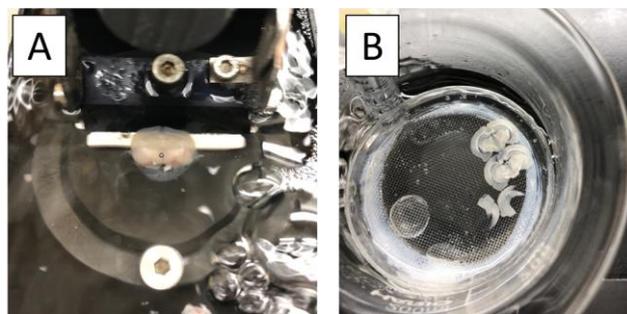


図2. ラット脳の薄切 (A) と標本の維持 (B)

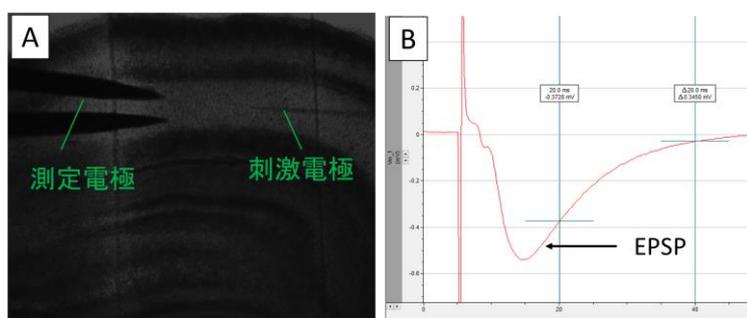


図3. 海馬の局所フィールド電位記録法 (A) と記録されたEPSP (B)

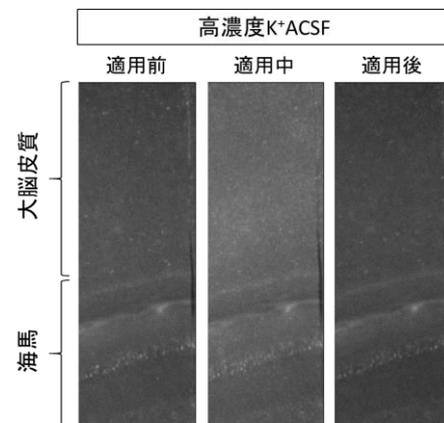


図4. 急性切片の Ca^{2+} イメージング

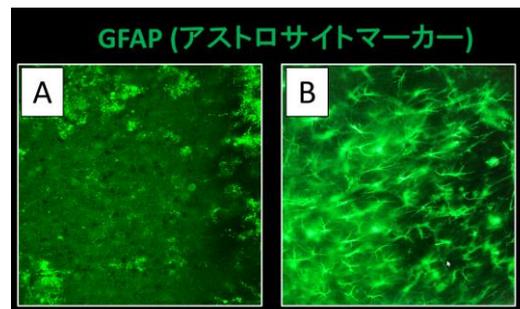


図5. 脳スライス標本中アストロサイトのGFAP免疫染色像 (A; 失敗, B; 成功)

究結果との一致性がみられた。

○海馬培養切片を用いたグルタミン酸アンケーシングによるスパイン形態可塑性のイメージング実験

合田先生の研究室では、シナプスの調節機構を詳細に探るために、グルタミン酸により生じる個々の樹状突起スパインの電気活動 [長期増強 (LTP) や長期抑制 (LTD)] や形態可塑性を測定する高度な研究が行われており、その一部として本実験を見学させてもらった。実験には、ラット (5-7 日齢) より採取した海馬を特殊なメンブレン上で 2 週間程培養した標本に、gene gun を用いて蛍光蛋白コード遺伝子をニューロンにまばらに導入したものをを用いていた。見学させてもらった実験では、2 光子レーザー顕微鏡を用いて、蛍光標識されたニューロンのスパインを高解像度で捉えるとともに、特定のレーザー光を当てることで caged グルタミン酸 (特定の波長の光により放出されるグルタミン酸) をスパインの近傍で局所的に放出させ、その際のスパインの大きさの変化を経時的に捉えていた。論文の紙面上でしか見たことのない最先端の中枢神経研究を間近で見学でき、今後、中枢神経研究の研究者を目指す上で良い刺激が得られた。

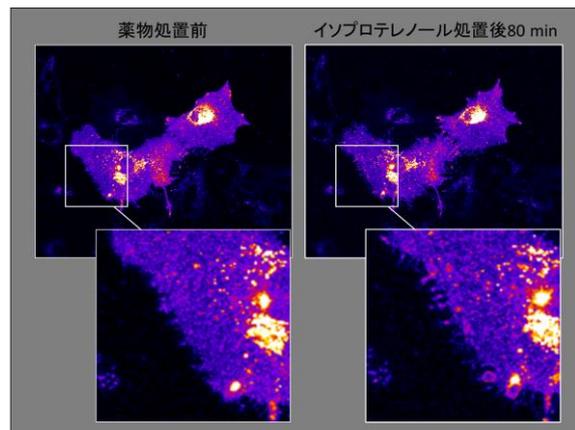


図6. アストロサイトのライブセルイメージング結果 [イソプロテレンール処置前 (左), 処置後 80 min (右)]

○Zoom ラボミーティング

インターンシップの 1 週間前より、毎週金曜日の午前中に行われるラボミーティングに合計 3 回 (8/21, 8/28, 9/4) 参加した。新型コロナウイルスの影響で、ミーティングは Zoom にて実施された。ミーティングの言語は英語で、形式は、合田先生の事務的な連絡の後、研究員の一人が自分の研究のプログレスを行い、みんなでディスカッションするというものであった。1 回目のミーティング (図 7) では、自己紹介をさせてもらうとともに、インターンシップ期間中に実施することを改めて確認できた。また、2 回目のミーティングにて研究紹介をさせてもらえることとなった。振り返ると、このインターンシップ前のミーティングに参加したことは、合田先生や他の研究員と事前に対面でコミュニケーションをとり、インターンシップを円滑に進めることができた点、また、インターンシップの前半 (8/28) に自分の研究発表をする機会を得ることができた点で非常に大きかったと考えている。2 回目のミーティングでは、25 分程度の研究発表を行い、その後ディスカッションをした。この発表を通して、自分の研究について知ってもらえたことで、インターンシップ中に他の研究員がアドバイスやアイデアをくれ、また、上記のライブセルイメージングのように自分の研究に関わる実験をさせてもらうことができた。3 回目のミーティングでは、最後の挨拶をさせてもらい、また、新型コロナウイルスで全研究員が集まることができなかつたため、Zoom にて記念撮影をした (図 8)。全体を通して、ラボミーティングでは、研究のかなり細かな点 (統計処理の手法など) についても活発に議論している印象だった。



図7. 1回目のZoomミーティング



図8. 最後のZoomミーティングにて記念撮影

○合田先生へのインタビュー

経験豊富な合田先生から、研究室運営に対する理念や国内外の研究所・大学といった様々な組織での研究の違い、研究者として大事なこと等を学ぶために、2 時間程、二人で話す機会を設けていただいた。話の中で、研究者として若いうちにやっておくべきこととして、様々な経験をして、国内・国外の研究組織の違いによる考え方やシステムの違いを理解すること、分野横断的な技術や知識を身につけることを挙げられており、自分のキャリアパスを考える上で重要な意見を聞くことができた。また、特に印象に残ったことは、研究室運営に対する理念として、研究プロ

プロジェクトの進行等の前に、ラボメンバーを人として大事にすることを挙げられていた点である。インターンシップ中、合田先生は実験室によく顔を出され、研究員と盛んにディスカッションし、研究員のパーソナリティもよく理解されている印象を受けた。また、私がはじめてインターンシップの打診メールを送った際も、新型コロナウイルスの影響が懸念されている状況下にも関わらず、翌日に承諾メールをいただき、インターンシップ期間中もとても親切かつ真摯に対応していただいた。これらのすべての行動に、合田先生の理念が詰まっているように感じられた。もし、自分が将来的に研究組織を率いる立場になった際には、このような合田先生の理念を自分も大切にしていきたいと強く思った。話の最後には、嬉しいことに、合田先生からポスドクのお誘いをいただき、現在進めている研究について詳しく説明をしていただいた。

今後のキャリアパスを考える上でどのようにプラスになったか

インターンシップに行く前は、研究所に対して「厳格で閉鎖的」なイメージを少し持っていたが、少なくとも活動先ではそのような印象は全く受けず、大学の研究室と大きな違いを感じなかった。また、研究員の方々は、研究プロジェクトの中で敷かれたレールを進むのではなく、比較的自由に考え、試行錯誤しながら研究を進められており、そのような研究スタイルは自分に合っていると感じられた。本インターンシップは、今後のキャリアパスとして「研究所での研究」をよりポジティブに捉える良い機会であった。また、合田先生との話の中で、より長期的な視点から研究者としてのキャリアパスを考える場合には、若いうちから様々な経験をして、研究者としての強み（分野横断的かつ専門的な知識や技術等）を身につけられるキャリアパスを思い描くことが大事であるということ学んだ。インターンシップ期間中、活動先のポスドクの方々と比べて、自分には中枢神経系の研究者としての強みが足りないと感じた。その中で、合田先生よりポスドクのお誘いをいただき、インターンシップでは習得しきれなかった電気生理やイメージングの知識・技術はこれから学んでいけば良いという言葉もいただいたことは、本インターンシップの大きな収穫であった。

後輩へのアドバイス

本インターンシップを通して、私が唯一後悔していることは、D4 という自分の研究が多忙でかつ大学院での残りの研究期間があとわずかのタイミングで、インターンシップに行ったことである。結果として、10日間という短い期間しか活動できなかった。もっと長ければ、学べた知識・技術が多くあった。また、インターンシップでの経験を、自分の研究活動や、将来のキャリアパスを考える上での糧とする場合には、もっと早いタイミングで行った方が、より効果的であると考えられる。これからインターンシップに行く皆さんには、自身の目的が十分達成でき、かつ、その経験を効果的に活かせるタイミングを考えてほしい。

また、自分のように全く面識のない相手を活動先として選んだ場合には、事前に、メールだけではなく、Web等を用いた対面でコミュニケーションが取れると良いだろう。実際に、私のインターンシップでも、事前に Web ミーティングに参加できたことが大きかったと実感している。

指導教員確認欄	指導教員所属・職・氏名 薬理学教室 教授 乙黒兼一
---------	------------------------------

- ※1 電子媒体を国際連携推進室・リーディング大学院担当に提出して下さい。
- ※2 インターンシップ先の担当者が活動内容を証明した文書（署名入り）を提出して下さい。
- ※3 本報告書はリーディングプログラムキャリアパス支援委員会で内容を確認します。その後、教務委員会で単位認定を受けることになります。

提出先：VETLOG

内線：9545 e-mail: leading@vetmed.hokudai.ac.jp