

澤田 和明

国立大学法人豊橋技術科学大学大学院工学研究科
教授

非標識神経伝達物質イメージセンサによる細胞活動可視化システム構築と
脳機能の時空間解析

§1. 研究実施体制

(1)「研究代表者」グループ

① 研究代表者:澤田和明 (豊橋技術科学大学大学院工学研究科、
電気・電子情報工学系 教授)

② 研究項目

- ・神経伝達物質イメージセンサの高解像度化, 高速化
- ・神経伝達物質イメージングとマルチ検出機能
- ・センサの高感度化と開口率改善
- ・in-vivo 計測用イメージセンサの構築
- ・集団レベル, 1細胞レベルの複数種類の神経伝達物質同時計測

(2)「共同研究」グループ

① 主たる共同研究者:小泉修一 (山梨大学大学院総合研究部
医学域・基礎医学系・薬理学、教授)

② 研究項目

- ・細胞外 ATP の高度時空間解析を可能とする ATP センサの高感度化
- ・ATP センサ上でのアストロサイトを培養・維持する条件及び装置の開発と ATP 放出動態の

解明

- ・ATP 放出能の制御を可能とする、薬理的及び分子生物学的手法の開発と最適化
- ・グリア伝達物質(ATP 等)の及び細胞外イオン変化の *in vitro* イメージング
- ・グリア細胞によるグリア伝達物質・細胞外イオン濃度制御と脳機能の解析

(3)「共同研究」グループ

- ① 主たる共同研究者:鍋倉淳一 (自然科学研究機構 生理学研究所
発達生理学研究室生体恒常機能発達研究部門、教授)
- ② 研究項目
 - ・脳スライスの系において神経伝達物質の濃度変化をセンサで検出し、その変化によって引き起こされる機能応答を2光子イメージングで同定する。
 - ・*In vivo* の系の構築

§2. 研究実施の概要

平成 27 年度は前年度から開発を続けていた 1 ミクロン程度画素ピッチを持つ高速イメージセンサの 2 次試作を行った。試作を行ったイオンイメージセンサは 2 種類で有り、高速化に重点を置いたもの(3Tr.型)と微細化に重点を置いたもの(2Tr.型)である。コンピュータシミュレーションにおいて、3Tr 型イオンイメージセンサは画素ピッチ 2 ミクロンではあるが 2000frame/sec(1 秒間に 2000 枚の画像、時間分解能 0.5msec)と高速であり、シナプスからの神経伝達物質の放出観察が可能である。一方 2Tr 型は画素ピッチ 1.15 ミクロンとシナプスの大きさに匹敵する。3Tr 型イオンイメージセンサでは表示領域は約 500 μm^2 であり、2Tr 型イオンイメージセンサでは約 250 μm^2 である。その結果、取得した画像の時間分解能は、3Tr 型イメージセンサで取得した画像の時間分解能は約 5msec、2Tr 型では約 70msec で検出に成功し、この結果は世界で最も高速なイオンイメージセンサ(3Tr 型)であり、最も微細なイオンイメージセンサ(2Tr 型)を製作に成功したと言える。

複数種類の神経伝達物質を検出するため、平成 27 年度は 128 \times 128 画素イオンイメージセンサ(空間分解能 30 μm)を活用し、アデノシン三リン酸(ATP)とアセチルコリン(ACh) および 水素イオン(H⁺)の 3 種類を同時に検出することに成功した。以上の結果はプロジェクトの目的を達成するための大きな成果が得られた。脳内の神経伝達物質の活動を 2 光子顕微鏡と本センサを同時に使い *in-vivo* で検出するためのセンサおよび読み出しシステムの開発を平成 27 年度は進めた。厚さ 100 μm 以下、幅 1mm の挿入型センサの作製完了、センサのパッケージも終了、信号読み出しシステム、ソフトも製作終了した。また更なる検出感度の向上および GABA やグルタミン酸の検出を目指し、新たな過酸水素検出系の構築に成功した。その結果 1 μM 以下のグルタミン酸検出に成功し、本手法の有用性が確認できた。

山梨大学グループは細胞外 ATP 及び細胞外 H⁺に注目し、豊橋グループが開発した種々の ATP センサ及び H⁺センサを実際の脳組織に応用するための、実験環境、装置の調整、サンプル調整法、脳の生標本静置方法等、生標本の ATP イメージングに必要な実験条件の最適化を行っ

た。その過程で、副次的に、グルタミン酸刺激及び電気刺激といった生理的な刺激により、細胞外 pH が劇的に変化していることを見出した。種々の検討の結果、グルタミン酸刺激により、細胞外 H⁺が低下している可能性が強く示唆された。これはグルタミン酸トランスポーターの活動による細胞外 H⁺の細胞内への取り込みにより、細胞外 pH が上昇した可能性を示唆したと考え、そこで、グルタミン酸とトランスポーター阻害薬の TBOA(DL-threo-β-Benzyloxyaspartic acid)の検討を行ったところ、上記検討の正当性が指示された。本 pH センサの応用により、生理的刺激条件下で細胞外 pH が変化していること、これがアストロサイトにより調節されている可能性が示唆された。細胞外 pH は、0.1 変化しただけで、イオンチャネルの開閉、特に電位依存性 Ca²⁺チャネルの開閉が影響される。アルカリ化により、Ca²⁺チャネルの活性化は亢進する。従って、本結果は、グリア細胞が細胞外 pH を変化させることにより、シナプス伝達及びシナプス伝達効率を変化させている可能性を示唆する興味深い結果が得られた。

神経回路(生体)への応用を目指す生理学研究所グループは、センサによってシナプス部の神経伝達物質の動態を可視化し、その反応を2光子励起顕微鏡を用いたカルシウム感受性蛍光タンパク質の信号の変化によって可視化するための、センサによる神経伝達物質の抽出と光学イメージング法による検証法の確立を行った。本年度は光学イメージングとセンサを同時計測するための技術構築を継続して行い、特にアセチルコリンに着目して研究を進めた。中隔核から単離したアセチルコリン陽性神経細胞を、アセチルコリンに対する細胞応答を観察するために、ムスカリンレセプターおよびカルシウム感受性緑色蛍光タンパク質(GCaMP)を発現させた HEK293 細胞とカバーガラスの上に共培養し、センサ上に乗せアセチルコリンの放出を検出するとともに、2光子顕微鏡下でアセチルコリンに対する機能応答を GCaMP の蛍光輝度変化として観察した。しかし豊橋グループで開発しているセンサによる観察を行うにあたりいくつかの問題点が生じた。この問題を解決するために、①PVC 膜をセンサ上に張ることによって pH 変化を検出できないようにし、改善した。さらに②は現在加算平均、酵素膜のコーティング法の改善などを行っている。得られたセンサのデータと2光子顕微鏡による画像データを同期するためのプログラムおよびそれを解析するためのプログラムを構築し実装した。また in-vivo センサを豊橋グループから提供され、予備検討として vivo の手術の系を確立し、センサの最適化を行った。そして、in vivo におけるアセチルコリン陽性細胞に対する光刺激の系を構築し、光刺激に応答して放出されるアセチルコリンに対する大脳皮質神経細胞の機能応答を多点電極にて捉えることに成功した。

代表的な原著論文

1. Taguchi, M., Shinozaki, Y., Kashiwagi, K., Shigetomi, E., Robaye, B. and Koizumi, S., Müller cell-mediated axon outgrowth of the retinal ganglion cells via P2Y₆ receptor signals.

Journal of Neurochemistry, Vol.136, Issue4, pp.741-751, Feb.2016.

DOI:10.1111/jnc.13427

2. Toshiaki Hattori, Hikaru Satou, Kenta Tokunaga, Ryo Kato and Kazuaki Sawada

16K Array Charge Coupled Device Multi-Ion Image Sensors for Simultaneous Determination of Distributions of Sodium and Potassium Ions, Sensors and Materials, Volume 27, Number 10 (2015), pp. 1023–1034

3. Masato Futagawa, Ryota Otake, Fumihiko Dasai, Makoto Ishida, and Kazuaki Sawada, 1024 × 1024 Pixel Charge-Transfer-Type Hydrogen Ion Image Sensor, IEEE Sensor Journal, Vol.16, Issue 11, pp.4153-4157, Mar.2016.
DOI: 10.1109/JSEN.2016.2536610