

プログラム名：ユビキタス・パワーレーザーによる安全・安心・長寿社会の実現

PM名：佐野雄二

プロジェクト名：超小型パワーレーザー応用

委 託 研 究 開 発

実 施 状 況 報 告 書 (成 果)

平成29年度

研究開発課題名：

生体適合性マイクロチップレーザーを用いた高次脳機能の4次元操作

研究開発機関名：

神戸大学大学院 医学研究科

研究開発責任者

和氣 弘明

I 当該年度における計画と成果

1. 当該年度の担当研究開発課題の目標と計画

近年、光学技術の発達に伴って脳、免疫、骨、皮膚などの臓器の細胞構造および動態・機能が生体動物において可視化されるようになってきた。特に中枢神経系においては2光子顕微鏡を用いた生体イメージングが動物覚醒下で行われ、様々な感覚学習、運動学習・記憶などの高次脳機能に伴う関連領域の構造変化・活動情報が抽出されるようになった。また、その抽出された情報をもとに光遺伝学的手法を用いたオプトジェネティクス法によって細胞活動を光操作することで、高次脳機能発現に伴う構造変化・活動を再現させることができるか、あるいは、個体の行動発現を操作できるかが検証され、神経活動を操作し、正常化することで精神・神経疾患などの病態へのアプローチも試みられるようになった。さらにこれらオプトジェネティクス法の臨床応用が開始され、網膜変性症において一定の効果を上げることが示されている。このように、光学関連技術の発達により、脳機能発現に必要とされる特定の細胞集団を集団として、あるタイミングで光刺激し操作することが可能な時代に突入しつつある。しかしながら、これまでの光操作法では、LED、レーザーなどを用いた光源を直接照射もしくはファイバーを用いて照射することで、特定の領域の遺伝的背景が類似した細胞活動を誘導することは可能であるが、空間的に隣接する微小領域に対して高い時間的精度で連続刺激を行い、神経細胞の時空間的制御を行うことは非常に難しい。また、刺激を局所で行うためにはファイバーを生体内に挿入する必要があるため、生体に対する侵襲が大きい。その為、臨床応用し、神経・免疫細胞活動を制御するためにはこれらの課題を克服し、脳・免疫機能の細胞空間を厳密に制御された時間で刺激する必要がある。そこで本課題では

1) マイクロチップレーザーを用いて、生体深部領域における光刺激をアレイ状に行う系を構築する。さらにそれぞれのアレイを独立して制御することで、細胞活動を高い時空間分解能で制御することを可能にする。 2) またマイクロチップレーザーをLCOS素子、ホログラムの系と組み合わせることで高時空間精度の操作 - イメージングを同時に行う技術の確立と生体応用を目指し、生体活動の高精度の4次元活動調節による脳などの生体機能の評価を行う。 3) 頭蓋骨に複数のレーザー光源を設置することにより、脳内多領域の細胞活動の高時空間制御を行う技術の構築を行う。さらにこれらの技術を臨床的に応用することが可能な系の構築を目指す。

2. 当該年度の担当研究開発課題の進捗状況と成果

2-1 進捗状況

2-2 成果

近年の光遺伝学の発達により、神経細胞やグリア細胞などの中枢神経系の細胞に光活性化蛋白質であるチャンネルロドプシン(ChR2)、アーキロドプシン(Arch)などを発現させてその細胞活動を操作することで動物の行動を制御する手法(オプトジェネティクス)が着目されている。これまでこのような手法を用いて睡眠・呼吸・食欲などの機能が詳細に解析され、一定の成果を収めてきた。申請者はこれまで2光子顕微鏡を用いて、生体マウスのイメージングによって、大脳皮質における感覚学習および運動学習にともなう神経細胞およびグリア細胞の活動を可視化する研究を行い、これらの可視化されてきた神経細胞・グリア細胞の活動は時空間的に多様であることを明らかにしてきた。しかしながら現在のオプトジェネティクスでは遺伝的背景の同一細胞集団に対して、ある特定のタイミングで刺激することは可能であるが、このような時空間的に多彩な活動を創出することは困難である。そこで本研究では、高精度時空間分解能をもつ光刺激を可能にするシステムの構築を試みた。本申請においては Liquid Crystal On Silicon (LCOS)ベースの投影素子およびホログラフィック技術による光刺激装置の作成を神戸大学の場修先生および分子科学研究所平等拓範先生と共同で行った。これは LCOS をもちいてレーザーを任意の形に 50-60Hz で脳内に投影できるシステムである。本装置は当初蛍光観察のための LED 光源および CCD カメラを内蔵し、撮像した画像に対して任意の形の光刺激を多点かつ高速に行うことが可能で、さらに刺激中画像を高時間分解能で撮像することが可能であった。その後継続してシステムの構築を行い、現在2色のレーザーのパターンを作成することが可能となり、これによってイメージング(計測)と刺激が同時に可能なシステムとなっている。システムの検証を行う為に、神経細胞に GFP 及び tdTomato (赤色蛍光蛋白質)の発現している遺伝子改変マウスの固定標本から脳切片を作成した。緑色のレーザーをシート状に作成し、そこに青色のレーザーの刺激を与えることで、CCD カメラで照射されることによって励起される蛍光の検出をおこなったところ、任意の関心領域からの蛍光の検出を行うことができた。さらに対物レンズの倍率を変更することによって励起サイズ(刺激解像度)を大きく変更することができ、スパインから神経細胞体における蛍光の励起を行うことができた。また本光刺激の生体応用が可能かどうかを検証するため、大脳皮質神経細胞に YFP の発現しているマウスの頭蓋骨を 2mm 程カバーガラスで置換するマウスを作成し、そのカバーガラスを通して光刺激による蛍光励起を行ったところ任意の各点で蛍光励起を行うことに成功した。次に、光活性化物質の光刺激による神経活動応答を電気生理学的に検出するために、大脳皮質神経細胞にチャンネルロドプシンを発現しているマウスの大脳皮質に記録電極を挿入し、神経活動を記録しながら光刺激をおこない、各種光刺激を行うことに成功した。このようなシステムにおいて、多点(100~500個の点)の刺激を行う為には、ハイパワーパルスレーザーが必要となる、また空間分解能の向上すなわち高精度時空間分解能を持つ搭載型多点光刺激システムの創成には、パルスレーザーの使用は必須である。これまでチタンサファイアレーザーを用いた光刺激が行われてきたが、このようなレーザーは大型で高価であるため、汎用性に欠ける。そこで世界に先駆けセラミックレーザー、特に Nd:YAG または Yb:YAG セラミックスによるマイクロチップレーザーの可能性を実証し、米国や欧州が日本を迫試する形で進歩してきた平等らとの共同研究によって、この小型セラミックレーザーの生体応用を目指している。まずこの小型セラミックレーザー

による蛍光励起を実証するために、蛍光色素の入ったキュベットにセラミックレーザーから照射されるピコ秒パルスレーザーを照射し、その蛍光励起を確認し、繰り返し周波数およびパワー、エネルギーによる蛍光の変化について検討した。レーザーを直射状に照射すると線状の蛍光励起が確認され、レンズを通すことにより、集光され点状の蛍光励起が可能となることがわかった。そこでこの蛍光励起が生体に適応可能かどうか検証するために、大脳皮質神経細胞に GFP の発現したマウスを固定し、取り出した脳を透明化した標本に対してレーザーを照射し、その蛍光励起を確認することができた。しかしながら GFP の信号は微弱であった。これは蛍光励起波長の問題であると考え、スルフォローダミン 101(赤色蛍光色素)で染色した脳切片の蛍光を観察し、励起・検出することに成功した。

そこで、今後はこれらの技術を応用し、ホログラフィック顕微鏡の構築を行うとともに、疑似感覚の創出による光 BMI の構築を目指していく。本研究がベースとなって CREST に採択いただいたため、継続して研究を行っていく予定である。

2-3 新たな課題など

より正確な空間精度を必要とすることがわかり、現在光学系を改良しているところである。さらにハイパワーレーザーに耐えうるだけの LCOS の開発も必要とされる。これに関しては今後の課題となる。

3. アウトリーチ活動報告

特に無し