

# 研究シーズ探索プログラム 研究課題別評価書

## 1. 研究課題名

In vivo 神経活動・分子変化検出可能な蛍光顕微内視鏡システムの開発

## 2. 研究代表者

船曳 和雄（大阪バイオサイエンス研究所 システムズ生物学部門 研究副部長）

## 3. 研究シーズ探索成果の概要

我々は、脳を含めた軟組織に低侵襲で刺入し、その組織像を in vivo で得ることのできる顕微内視鏡システムを開発した。このシステムは脳深部に存在する標的された一群の神経細胞を in vivo で可視化するのに成功し、頭部固定した覚醒マウスからの in vivo 活動記録を細胞レベルで行うことを可能にした。さらに今回、このシステムの光検出部分を音響光学素子、プリズム素子を用いた分光システムに変更し、励起された蛍光のスペクトル情報を得ることができるようにした。このシステムと FRET プローブを使うことで、in vivo で脳を含めた軟組織内の標的した分子の変化を細胞レベルの空間解像度で捉えられることが期待される。我々は、電極や多光子励起顕微鏡などの既存の手法では記録が困難であった小脳顆粒細胞層の in vivo での個々の顆粒細胞の活動をトランスジェニックマウスと本システムを使って解析し、前庭・視覚刺激などの生理的な感覚入力に応じた反応を細胞レベルで記録し始めており、本研究で開発した顕微内視鏡が in vivo での様々な変化を捉えうる新しい研究手法であることを確認しつつある。

## 4. 研究シーズ探索のねらい

本研究は、申請者が開発した in vivo で個々の神経細胞を観察可能な蛍光顕微内視鏡システムのレーザー光源、光検出部を蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) プローブの蛍光変化の検出に対応させることで、覚醒状態の動物の脳内でおこる神経細胞・神経回路の形態ならびに活動変化、さらには FRET 信号による分子変化を、細胞レベルの分解能でリアルタイムに捉えることを可能にする研究ツールを開発することを目的とした。

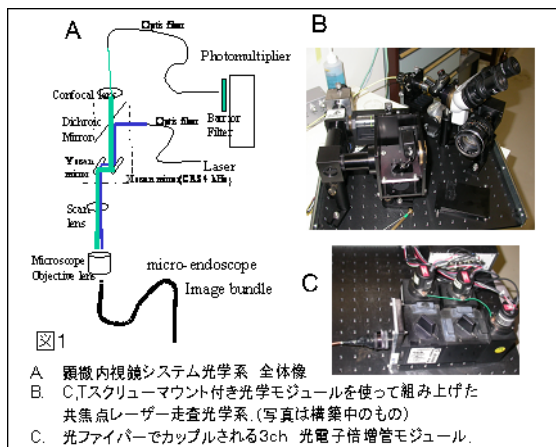
## 5. 研究シーズ探索の方法と成果

### 5.1 方法

#### 1) 分光に対応した顕微内視鏡システムの構築

本研究は、三田技研の技術協力のもと、申請者が大学院生(京都大学大学院 中原一郎君)とともに、大阪バイオサイエンス研究所にて行った。

我々は一般的な T,C スクリューマウント光学素子を多用することで、安価で拡張性の高い共



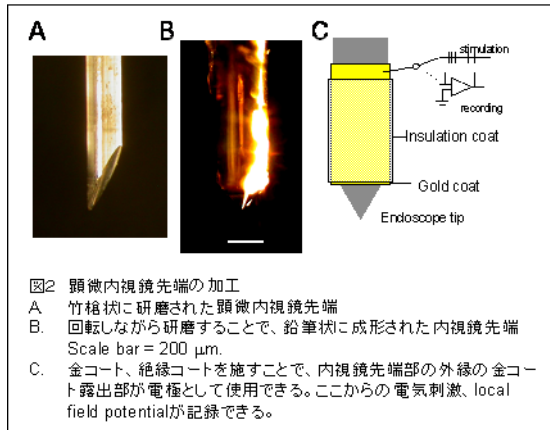


図2 顕微内視鏡先端の加工  
 A. 竹笹状に研磨された顕微内視鏡先端  
 B. 回転しながら研磨することで、鉛筆状に成形された内視鏡先端  
 Scale bar = 200  $\mu$ m.  
 C. 金コート、絶縁コートを施すことで、内視鏡先端部の外縁の金コート露出部が電極として使用できる。ここからの電気刺激、local field potentialが記録できる。

の光学系を、音響光学チューナブルフィルター (Acousto Optic Tunable Filter : AOTF, AA 社製) 及び二つのプリズムを使ってスペクトル分光できるように変更を行った。(成果欄参照)

焦点レーザー走査光学系を構築し(図1、図2参照)、これを用いて in vivo で GFP などの蛍光物質でラベルされた特定の神経細胞の形態及び活動記録が可能であることを確認した(図3参照)。

今回の研究では、いままでダイクロイックミラー、フィルターなどで行っていた波長選択部分

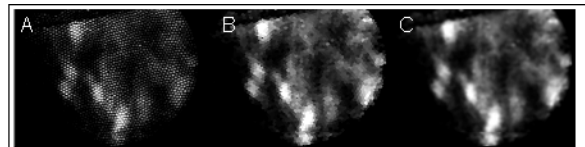


図3 顕微内視鏡による in vivo での神経細胞観察例  
 A. In utero electroporationによりGFPが導入された大脳皮質II, III層錐体細胞の細胞体部分に in vivo で顕微内視鏡を刺入して得られた像。  
 B. Aの画像で、各光ファイバーのもつ伝達開数を測定後、それにより補正した画像。  
 C. さらにスムーズフィルターにより滑らかにしたもの。図のごとく、錐体細胞の細胞体がはっきりと in vivo で可視化される。(視野: 300ミクロン)

## 2) transgenic mouse を用いた小脳顆粒細胞層の in vivo での情報処理の解明

我々はこの顕微内視鏡システムを、電極や多光子励起顕微鏡などの従来の測定法では計測が困難な小脳片葉の顆粒細胞層の情報処理解析へ応用することを試みた。このために理研 BSI の Thomas Knopfel 博士との共同研究を開始し、Knopfel 研で作製された小脳顆粒細胞特異的に GCaMP2 (Ca 感受性蛋白) が発現しているトランスジェニックマウスの供与をうけ、これらマウスの小脳顆粒細胞層の活動を顕微内視鏡で観察開始した。

我々は今まで、前庭眼反射(VOR)や視運動性眼球運動(OKR)などの反射性眼球運動と同時に小脳片葉のプルキンエ細胞からの単一神経活動記録をガラス電極を用いて行ってきたが、この電極を顕微内視鏡に変更する形で in vivo 実験装置を構築した(図4参照)。顕微内視鏡の直径は200ミクロン程度であるため、頭部固定した覚醒マウスの小脳片葉(脳表から約3000ミクロンほど深部に存在)に刺入により容易にアクセス可能であり、かつ前庭刺激、視刺激を加えても安定して in vivo で神経活動を観察することができた。(成果参照)

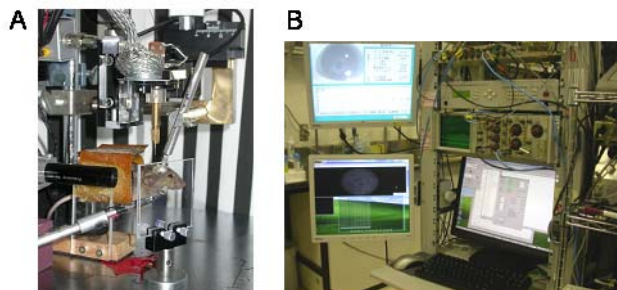


図4 反射性眼球運動と顕微内視鏡による in vivo 神経活動の同時計測  
 A. 頭部固定した覚醒マウスでも200ミクロン程度の顕微内視鏡は容易に刺入により脳深部神経回路像をえることができる。  
 B. 眼球運動、内視鏡画像とも同時に online でコンピュータ解析し、記録することができる。

## 5.2 成果

### 1) 分光に対応した顕微内視鏡システムの構築

光学定盤上で構築した共焦点顕微内視鏡分光光学系の全体図を図5A に示す。ガルボスキャナーより内視鏡側は今までのシステムと同様に構築し、それより遠位側を今回新たに拡張する形で分光システムを導入した。具体的には今までピンホールがわりに用いてきたマルチモードファイバーと同等の空間フィルターとなる約30cm の C マウントチューブと、音響光学素子(AOTF)、そして二つのプリズムである。これらにより理論上80%を超える透過率で分光が行えるようになる。

図5B は比較的暗い生物標本と同等の蛍光強度をもつ為に我々が検出用の試金石に用いている蛍光基準液(uranine 10uM)の蛍光を顕微内視鏡経由で分光測定したものである。比較的環境ノイズが高い状態であるが、明らかに蛍光部分のスペクトルが高く、設計通りの分光が行えている。このときは分光虹の波長校正をとるため光検出器としてデジタルカメラ(Olympus E-510)を用いているが、実験時には、この部分には2つの可動式ウエッジミラーが設置され、任意の波長で切り分けた後、光電子増倍管で多チャンネル蛍光記録を行う。

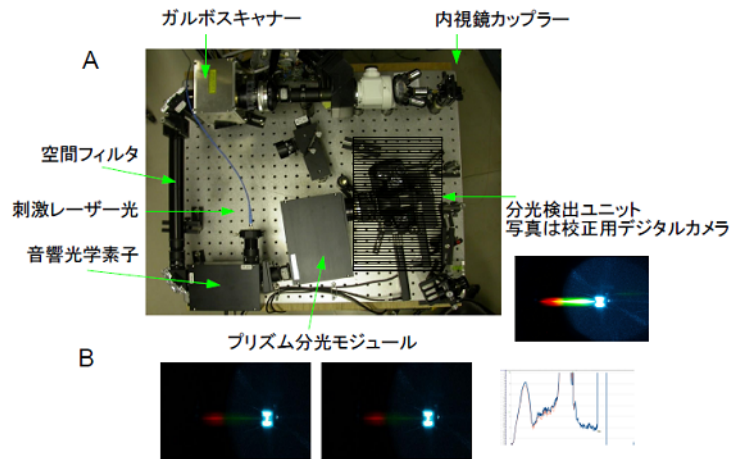


図5 顕微内視鏡に導入した分光システム  
A、ガルボスキャナーから内視鏡カプラーまでは今までのシステムと同様だが、それより遠位はダイクロイックミラーではなく、空間フィルタ、音響光学素子、プリズム分光ユニットを今までと同様にT,Cスクリーマウントで接続する形で構築している。  
B、顕微内視鏡経由で検出した基準蛍光液(uranine 10uM, 比較的暗い生物標本相当の蛍光)の蛍光スペクトルデータ。(右は純水による環境ノイズの測定)。

## 2) transgenic mouse を用いた小脳顆粒細胞層の in vivo での情報処理の解明

図6に顕微内視鏡システムを使って記録した頭部固定した覚醒マウス小脳片葉の顆粒細胞層の前庭・視刺激に対する反応の一例を示す。図6C の左列は内視鏡画像の各画素の蛍光強度の時間経過と、前庭あるいは視刺激の波形との相互相関の最大値を擬似カラーで表示している。図6C の右列は相互相関が最大値を示すときの時刻を示しており、負の値は反応位相が刺激位相より先行することを意味する。

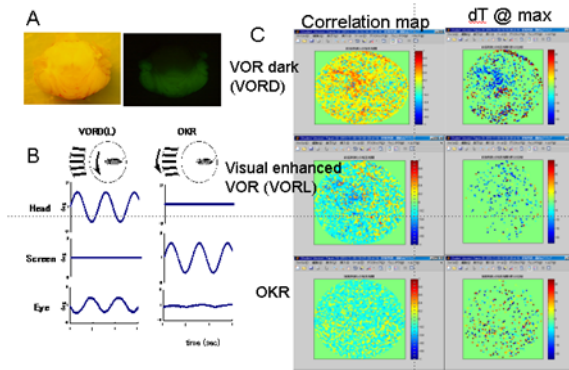


図6 前庭・視覚刺激に対する小脳片葉顆粒細胞層の反応  
A、GCaMP2発現マウスの小脳断面図  
B、反射性眼球運動の模式図。前庭刺激・視刺激それぞれを定量的に与えることができ、眼球運動出力も定量的にモニターできる。  
C、前庭刺激、前庭刺激+視刺激、視刺激のみ(0.2Hz 振り子様回転)を与えた時の小脳片葉顆粒細胞層の反応。この部位では、主に前庭刺激に反応している。同時に視刺激を加えた中段の条件では反応が大きく異なっている。

ことを意味する。

図6の例の如く、視刺激と前庭刺激を同時に加えた場合の反応は前庭刺激のみ、視刺激のみの反応、あるいはその数学的加算で得られるべきものとかかなり異なっているように見える。今後、このような実験を繰り返し、in vivo での顆粒細胞層の情報処理の一端を明らかにしていきたい。

## 6. 自己評価

顕微内視鏡システムの開発・発展、具体的には分光システムの導入については、概ね予想通り進行することができた気がします。分光された光の検出システムに関しては、要求される実験系の時間分解能・波長分解能に応じて CCD, 多チャンネル PMT などを使い分ける必要があり、実験に応じて容易に変更可能にしておくことが重要と知りました。

我々は上記光学系をそれぞれのパーツをモジュール化し、その連結をユニバーサル T,C タイプのスクリーマウントで連結する形で構築しました。こうすることで、実験者自らが実験ニーズに応じて容易に各種仕様を変更できる様になりました。個々の光学モジュール、具体的にはレーザ

一走査器、レーザー光源、音響光学素子、分光ユニット、光電子倍增管などは数十万程度で購入できるので、実験に応じて適宜購入し、変更・拡張することができます。このため、どうしても実験に必要な機能(例えば高速の走査や分光など)を追加するために、市販の共焦点顕微鏡の様にシステム全体を新規に購入する必要がなく、既存のリソース資産をムダにすることがありません。いくつかの学会、研究会で我々のシステムについて発表した折に他の研究者の方からこの点(拡張が容易)に関して強く共感が得られました。我々は基礎医学の研究者であり光学の専門家ではありませんが、今回この顕微内視鏡システムを開発、発展を通じて、光学系構築の際に押さえておくべき TIPS を少しずつ蓄積してきました。具体的には如何にしてコリメート光を作り、このアライメントを如何にしてとるかなどです。(これらについて多くの有益な助言を三田技研 三田剛氏より頂きました) これら TIPS は学術論文で発表する様なものではありませんが、他の研究者にも寄与することが非常に多いのではないかと感じましたので、今後これらについてホームページなどを通じて発信していきたいと考えています。

また、これらシステムを用いた基礎医学、生物学での新知見を見出すことによる原著論文執筆は1年という本シーズ探索研究の期間内では実現することが難しかったのが正直な感想ですが、我々の顕微内視鏡システムは小脳顆粒細胞層、大脳基底核を初め多くの脳深部の重要な神経回路を解析の対象とできるので、近年中にこれら生物学の新知見の探求を急ぎたいと思います。

## 7. PO の見解

本研究は比較的低侵襲で *in vivo* で脳活動を観測できる顕微内視鏡の開発を目指すもので、空間分解能が  $3\mu\text{m}$  と細胞レベルで詳細な観測が可能と点に特徴がある。また、分光・多色蛍光同時記録により FRET 測定も可能とし非常に発展性の期待できる技術である。

脳科学に求められる計測装置の開発であり、光学系の研究者と情報科学研究者の協力により開発が進められたと思われるが、分野融合の観点は弱い。開発された装置は有用で、眼球運動に関与する小脳皮質細胞の役割や聴覚空間マップの作成等の研究に利用されようとしている。脳科学の発展には大きな寄与が期待される研究である。光バイオ、内視鏡は日本の得意分野でもあり、今後の研究の深化が求められる。

## 8. 研究成果リスト

### (1)論文(原著論文)発表

Distinct roles of synaptic transmission in direct and indirect striatal pathways to reward and aversive behavior.

Hikida T, Kimura K, Wada N, Funabiki K, Nakanishi S.

Neuron. 2010 Jun 24;66(6):896-907.

10.1016/j.neuron.2010.05.011

Protein kinase G dynamically modulates TASK1-mediated leak K<sup>+</sup> currents in cholinergic neurons of the basal forebrain.

Toyoda H, Saito M, Okazawa M, Hirao K, Sato H, Abe H, Takada K, Funabiki K, Takada M, Kaneko T, Kang Y.

J Neurosci. 2010 Apr 21;30(16):5677-89.

10.1523/JNEUROSCI.5407-09.2010

顕微内視鏡による脳深部神経回路の *in vivo* での機能解析

船曳和雄

Equilibrium Research 日本めまい平衡医学会雑誌

(in press)

## (2)特許出願

研究期間累積件数： 0件

## (3)口頭発表

### ①学会

国内 1 件, 海外 0 件

第 69 回 日本めまい平衡医学会学術講演会 シンポジウム  
前庭系の最先端研究 —分子生物学からシステムニューロサイエンスまで—  
2010 年 11 月 18 日 京都  
「顕微内視鏡を使った in vivo 神経活動の時空間的解析でおこなうシステム解析」  
船曳和雄

### ②その他

国内 1 件, 海外 0 件

第 12 回 京都大学生命科学研究科シンポジウム  
2010 年 7 月 1 日 京都大学 芝蘭会館 稲森ホール  
「顕微内視鏡による In vivo 神経活動の時空間的解析」  
船曳和雄

## (4)その他の成果(受賞、著書、招待講演、特記事項等)

### 招待講演

The 15<sup>th</sup> auditory research forum (第 15 回 聴覚研究フォーラム)  
2010 年 12 月 4 日 同志社大学びわこリトリートセンター  
「Development of micro-endoscope for functional imaging of neurons located deep  
in the brain」 Kazuo Funabiki