

和氣 弘明

神戸大学大学院医学研究科  
教授

## ホログラム光刺激による神経回路再編の人為的創出

### § 1. 研究成果の概要

本課題では、ホログラフィ技術を搭載した計測・操作一体型の顕微鏡を開発し、2光子顕微鏡による高次脳機能を担う中枢神経系細胞活動の検出とその操作を目指す。

本年度は、1) 2光子顕微鏡をホログラフィック刺激と一体化した顕微鏡の開発、2) ホログラフィック3次元光刺激技術による細胞活動制御と、3次元蛍光デジタルホログラフィシステムによる細胞応答観察の2つを一体化する条件検討、3) 脳スライス標本をもちいた光活性化タンパク質の条件検討、4) ハイパワーパルスレーザーの生体応用化の条件検討を推進した。

1) 和氣チームと的場チームで、ニコン C1 顕微鏡をベースとした2光子顕微鏡(特注品)にホログラフィック刺激が導入できる光学系の構築を行い、同時刺激ができるシステムを構築した(図1)。本顕微鏡では可変波長のレーザーによる2光子顕微鏡画像取得を固定波長(1040nm)によるパターン刺激と同時に行うことが可能である。アストロサイトに光活性化蛋白質(C1V1)およびカルシウム感受性蛍光蛋白質を導入した脳切片に対して、パターン刺激をあたえることで、これらの活動を誘導することに成功している(図2)。

2) ホログラフィック3次元光刺激技術に関しては、波長 473nm と 532nm の2つのレーザー光を用いた1光子光刺激・観察技術を構築した。作成する光スポット数、スポット位置に関わらず、均質な光刺激を行なうための位相最適化法を考案し、その有効性を実証した。3次元蛍光デジタルホログラフィシステムの構築とターゲット検出では、蛍光ビーズ、肺癌細胞、植物細胞を用いて奥行き位置が異なる対象を一度に記録して、計算機内での逆伝搬計算により、フォーカスが合った再構成像を得ることに成功した。ホログラフィック光刺激と観察を一体化したデジタルホログラフィック顕微鏡に対して肺癌細胞等の記録と再生実験を行なった。その研究成果をアメリカ光学会の学術論文誌 *Optics Letters* に論文として掲載し、神戸大学、京都工芸繊維大学、宇都宮大学からプレスリリースを行ない、日刊工業新聞と下野新聞に掲載された。

3) AAV1-CaMK2-C1V1 を大脳皮質に投与し大脳皮質神経細胞に光活性化イオンチャネル

C1V1 を発現させたマウスを準備し、その脳切片を準備した。電気生理学的手法を用いることで、上述の顕微鏡を用いて、C1V1 を発現する神経細胞を直接 2 光子刺激し、活動電位の誘発に成功した (図 3 刺激領域 1)。一方、記録細胞周辺を刺激すると、記録細胞近傍では若干の脱分極が誘導されたものの活動電位は生じないことが確認できた。記録細胞から離れた部位の刺激では記録細胞に影響は起きなかった (図 3 刺激領域 2)。この結果は、新たに構築した位相変調式 LCOS 顕微鏡は限局した領域を高精度に刺激することに成功していることを示唆している (図 3)。また、刺激条件の最適化を行うために、刺激領域やレーザーパワーを変えてみたところ、刺激領域が  $0.16\text{-}13\ \mu\text{m}^2$  は発火したが、出射パワーが 4 W 以下だと発火が起きないことを確認した。カルシウムセンサーと同時に C1V1 を発現させたスライスでも同様の刺激が可能であることが確認できている。

4) パルス幅を 500ps から 218ps にまで短くする事に成功した Nd:YAG/Cr:YAG マイクロチップレーザー出力 (14~17mW の平均出力) を、生後 8 週齢の VGAT-Venus トランジットマウスの透明化脳サンプルに照射したところ、2 光子蛍光を確認できた (図 1)。次に、マイクロチップレーザーの高出力化法としてバーストモード発振を試み 10ms 間隔で 66.7kHz までの高繰り返し発振が可能である事を確認した。

#### 【代表的な原著論文】

1. X. Quan, M. Kumar, O. Matoba, Y. Awatsuji, Y. Hayasaki, S. Hasegawa, and H. Wake, “Three-dimensional stimulation and imaging-based functional optical microscopy of biological cells,” *Optics Letters*, vol. 43, no. 21, pp. 5447–5450, 2018

## § 2. 研究実施体制

### (1)「和氣」グループ

- ① 研究代表者:和氣 弘明 (神戸大学大学院医学研究科、教授)
- ② 研究項目
  - ・2光子顕微鏡と一体化したホログラフィックシステムの開発及びその最適化
  - ・疑似感覚を創成するための感覚学習過程の神経回路基盤
  - ・機械学習を用いた細胞抽出法の改良

### (2) 平等グループ

- ① 研究代表者:平等 拓範子 (自然科学研究機構分子科学研究所、教授)
- ② 研究項目
  - ・ジャイアントパルス・マイクロチップレーザーの生体応用への最適化

### (3) 鍋倉グループ

- 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  
基盤神経科学研究領域生体恒常性発達研究部門、教授)
- ② 研究項目
  - ・脳スライスの系において神経・グリア細胞の多点刺激による神経回路の人為的操作
  - ・in vivo での人為的神経回路再編の創出

### (4) 的場グループ

- ① 研究代表者:的場 修 (神戸大学システム情報学研究科、教授)
- ② 研究項目
  - ・特定された細胞へのホログラフィック2次元光刺激技術の創成
  - ・ホログラフィック3次元光刺激技術の創成
  - ・3次元蛍光デジタルホログラフィシステムの構築とターゲット検出
  - ・収差補正機能による3次元生細胞群への高品位光刺激