

和氣 弘明

名古屋大学大学院医学系研究科分子細胞学
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

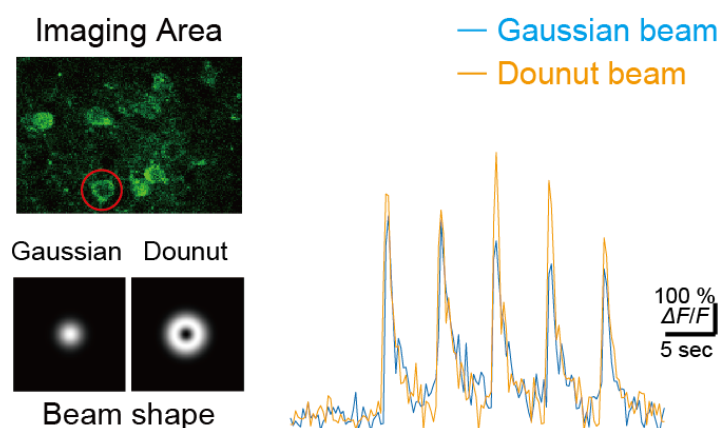
§ 1. 研究成果の概要

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最適化、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つの一体化する条件検討、3) デジタルホログラフィックを用いた神経科学的研究への応用を推進した。

- 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。これを最適化するために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

図1. 刺激形状の最適化



性を実証した。さらに細胞刺激の為の刺激レーザー光の形状の最適化を行った。これまで、ドーナツ型の形状の刺激光(細胞刺激の際の表面積が大きい)を Gaussian 型の形状のものと比較した(Dr. Vincent R Daria Group Leader (Daria group / Neurophotonics), The Australian National University との共同研究)。その結果、パワーの低いドーナツ型の形状の刺激光で、Gaussian 型の形状の刺激光と同等の神経細胞応答が得られることをカルシウムイメージングおよび電気生理学的な検証で明らかにした(図1)。この最適化した刺激光を用いて、生体に応用した。

- 2) 次の場チームでは、神経細胞・グリア細胞の3次元光操作・観測一体化システム構築に向けて、2光子励起を用いたホログラフィック並列光スポットの形成とそれを用いて20個以上の細胞の同時光刺激に成功した(図2(a))。3次元蛍光観察については、強度輸送方程式を用いたコンピュータシミュレーション手法を提案し、マウス脳スライスの神経細胞イメージングに成功した(図2(b))¹⁾。

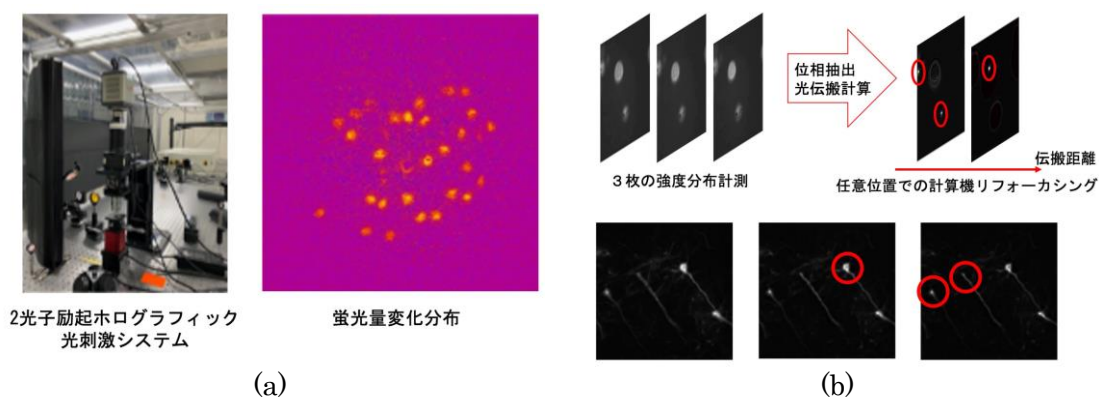


図2 実験結果;(a) 2光子励起ホログラフィック同時細胞刺激の様子, (b) 強度輸送方程式を用いた3次元蛍光イメージングにおける再構成結果。

- 3) 次に生体への応用にあって、本年度はまず慢性疼痛モデルへの応用を試みた。慢性疼痛は、外傷や炎症などに起因して起こる疼痛で、薬剤抵抗性のもも多く社会的な問題となっている。本研究では2光子顕微鏡を用いた神経回路活動の可視化データを基にホログラフィック刺激を用いた細胞刺激によって回路動態を明らかにした。慢性疼痛形成過程の神経細胞の活動変化を単一細胞レベルで明らかにするために2光子顕微鏡を用いて同一細胞活動の変化を経時的に観察した。疼痛刺激に対する応答は、慢性疼痛モデルは正常群と比較して有意にその特性に変化はなく、刺激時の同期性の増加およびカルシウム活動の上昇を認めた。そこで刺激を伴わない自発活動の変化を検証したところ、同期性およびカルシウム活動の強度変化を認めた。これらは活動強度および同期性の低い神経細胞の同期性および活動強度が上昇することによって得られる結果だということがわかった。化学遺伝学的手法を用いて、これらの活動強度および同期性を人為的に増加させると動物に疼痛行動が認められることから

これらの要素が疼痛神経回路形成に重要であることがわかった。さらにこのような神経回路活動変化を引き起こす分子基盤として電位依存性カルシウムチャネル(Cav2.2)の発現上昇によるものであることを薬理学的手法を生体に応用することで明らかにした。またホログラフィック顕微鏡を用いて、神経細胞間の機能的結合の評価を行い、慢性疼痛モデルにおいて、神経細胞間の機能的結合が強化されていることによって、同期性及び活動強度が増加することがわかった。さらにこれは NMDA の受容体阻害剤によって抑制されることから、この機能的結合強度の増加が NMDA 依存的であることがわかった。さらに機械学習を用いて、疼痛を担う神経細胞を抽出し、これをホログラフィック刺激することによって痛み行動を引き起こすことができるか検証した(論文投稿中)。

【代表的な原著論文】

1. Sudheesh K. Rajput, Manoj Kumar, Xiangyu Quan, Mitsuhiro Morita, Tomoyuki Furuyashiki, Yasuhiro Awatsuji, Enrique Tajahuerce, Osamu Matoba, “Three-dimensional fluorescence imaging using the transport of intensity equation”, Journal of Biomedical Optics, vol. 25, no.3, 032004-1-7, 2020.

§ 2. 研究実施体制

(1)「和氣」グループ

- ① 研究代表者:和氣 弘明 (名古屋大学大学院医学系研究科 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 (自然科学研究機構分子科学研究所メゾスコピック計測研究センター 特任教授)
- 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 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 (神戸大学大学院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