

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：82675

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14659

研究課題名（和文）二光子顕微鏡と光操作による単一神経・グリア回路網の活動伝播様式の可視化

研究課題名（英文）Visualization of activity propagation patterns in autaptic neuron-glia networks utilizing two-photon microscopy and optogenetics

研究代表者

石井 宏和 (Ishii, Hirokazu)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構（新分野創成センター、アストロバイオロジーセンター、生命創成探究・生命創成探究センター・助教

研究者番号：70743409

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、多点走査型二光子顕微鏡と二光子励起を用いたオプトジェネティクスの手法により、オータプス初代培養標本における単一神経・グリア回路網の活動伝播様式を時空間的に可視化解析する新規イメージング手法を構築した。また超解像二光子誘導放出制御（STED）顕微鏡を高度化・応用することで、単一神経・グリア回路網の活動伝播様式をナノスケールから細胞スケールで階層的に可視化解析することを試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では培養細胞系ではあるが、神経・グリア回路網の活動変化パターンを包括的に可視化解析できるイメージング手法を確立した。疾病モデルマウスの脳組織やヒトiPS細胞由来の神経細胞・アストロサイトから構築したオータプス初代培養標本に適用することも可能である。将来的には脳機能の解明だけでなく、神経・グリア回路網を標的とした新規阻害剤や薬剤のスクリーニングなどに貢献できる成果であり、社会的意義も大きい。

研究成果の概要（英文）：We developed a novel imaging method to visualize the spatial-temporal patterns of activity propagations in autaptic neuron-glia networks utilizing a multipoint scanning two-photon microscopy and optogenetics based on two-photon excitation. We also attempted to visualize the activity propagation patterns at the nanoscale by utilizing super-resolution two-photon STED microscopy.

研究分野：生物物理学

キーワード：二光子顕微鏡 光操作 ライブイメージング 神経・グリア回路網 オータプス 超解像

1. 研究開始当初の背景

ヒトの脳内には、神経細胞を取り巻くグリア細胞が、神経細胞の約10倍も多く存在している。長年にわたりグリア細胞は、神経細胞の物理的支持や栄養補助といった補助的役割を担うと考えられてきた。しかし近年では、グリア細胞の中で最も数の多いアストロサイトが、電気的には不活性ではあるものの、細胞内カルシウムイオン濃度の変化によって「活動」していることが明らかとなった。アストロサイトがカルシウム濃度上昇に伴ってATPやグルタミン酸などを放出し、アストロサイト間でコミュニケーションをとり、神経細胞の活動にも影響を及ぼしていることも明らかとなった (Mitsuhiro et al., 2003)。このように、グリア細胞や神経細胞は、伝達物質などを介して相互作用しており、グリア細胞と神経細胞が形成する回路網を理解することが、脳の高次機能を理解するうえで重要であることがわかってきた。一方で、脳内には膨大な数の神経細胞、グリア細胞が存在し、これらの複雑な回路網やその情報伝達・処理の全容を明らかにすることは技術的に困難である。

2. 研究の目的

本研究では、独自の二光子顕微鏡・光操作システムとオータプス初代培養標本を用いて、神経・グリア回路網の時空間活動パターンおよび応答特性を明らかにする新規イメージング手法の確立を目的とした。さらには神経・グリア回路網をターゲットとした新規阻害剤や薬剤のスクリーニングにも有用な研究モデルを提案することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 多点走査型二光子顕微鏡

研究代表者らの研究室が独自に開発・運用する多点走査型二光子顕微鏡を多角的に利用した。この顕微鏡システムは、二光子励起とスピニングディスク共焦点顕微鏡を組み合わせることで、二光子顕微鏡が持つ励起の局所性、深部到達性、低浸潤性、そして多色同時励起が容易という利点に加え、ミリ秒オーダーで細胞内部を高解像度にライブイメージングできるという特徴を持つ。本研究ではこのシステムに、細胞活動を光操作するための光刺激用の二光子励起光学系を導入した。具体的には、二種類の近赤外フェムト秒パルスレーザーを独立に観察試料に照射できる仕様とし、一方の光線は二光子励起用に、もう一方は光刺激用として観察視野下の任意の一点に照射して単一細胞を光刺激できる仕様にした。二光子励起を利用することで、一光子励起に比べて焦平面内のごく限られた領域のみに、三次元的にピンポイントで光刺激を行うシステムを構築した。

(2) オータプス初代培養標本

観察対象として、オータプス初代培養標本を用いることにした。オータプス初代培養標本は、複数のアストロサイトを島状に培養した上に、一つの神経細胞を共培養して構築する培養系である (図1)。非常にシンプルな構成でありながら、神経細胞は成熟した自己投射シナプス (オータプス) を形成する。さらに観察視野下に収まるように任意の範囲に培養することが可能であり、イメージングとの相性が非常に良い。他の神経細胞からの入力を受けないため、単一神経回路と複数のアストロサイトとの相互作用だけに着目した解析が可能である。このオータプス初代培養標本に、光刺激用のチャンネルロドプシン2や神経細胞・アストロサイトの細胞内カルシウムイオン濃度変化などをライブイメージングするためのプローブを遺伝子工学的に導入し、多点走査型二光子顕微鏡下で観察することを試みた。

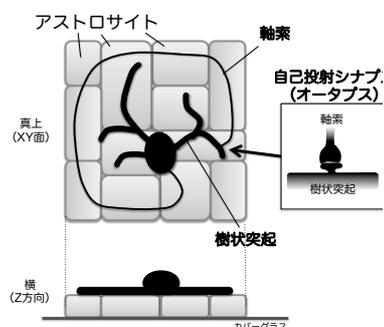


図1 オータプス初代培養標本

(3) 超解像二光子 STED 顕微鏡

オータプス初代培養標本における活動伝搬や、それに伴った神経樹状突起スパインなどの超微細形態の変化を可視化するために、多点走査型二光子顕微鏡に加えて、研究代表者らが独自に開発・運用する超解像二光子誘導放出制御 (STED) 顕微鏡の高度化・応用を試みた。

4. 研究成果

(1) 細胞活動を光操作するため、多点走査型二光子顕微鏡に対して二種類の近赤外フェムト秒パルスレーザーを独立に観察試料に照射できる仕様とし、一方のビームを用いて任意の単一細胞を光刺激するための二光子励起光学系を構築した。またオータプス初代培養標本の培養系・観察条件の最適化、遺伝子導入法の検証を行った。観察視野下に収まるような任意の範囲に複数のアストロサイトを島状に培養し、各アストロサイトアイランドに単一、もしくは複数の神経細胞を共培養した自己投射型の初代神経細胞を培養する系を立ち上げた。アデノ随伴ウイルスベクターを用いて神経細胞に Ca^{2+} センサータンパク質を発現させ、オータプス初代培養標本における自発的な神経細胞内カルシウム濃度変動の伝搬様式を多点走査型二光子顕微鏡によりライブイメージングすることに成功した。また、神経・アストロサイト間の神経伝達物質に由来するカルシウム濃度上昇を可視化するためにグルタミン酸感受性プローブの使用検討を進めるなど、蛍光プローブの選定および顕微鏡条件の最適化をほぼ完了させることができた。研究期間終了後も研究を継続し、神経細胞・アストロサイト回路網の光刺激に対する応答特性を明らかにすると共に、本研究で構築したイメージング手法の有用性を評価していく。

(2) 透過型液晶素子を用いた光波面補正、半導体制御による超短パルスレーザー光の発生といった独自の光学技術を統合し、コンパクトかつ低侵襲的な超解像二光子 STED 顕微鏡を開発した (図 2)。空間分解能は、通常二光子顕微鏡に比べて約 5 倍高い 70-nm に達した。またこのとき顕著な光退色は観察されず、同じ蛍光ビーズを 50 回、最低速で繰り返し観察しても蛍光輝度は顕著に減少しなかった。これは生物試料観察に有利な特徴であり、実際に初代神経培養細胞におけるプレシナプスタンパク質 Bassoon の局在を顕著な光退色なく 100 nm 以下の空間分解能で超解像観察することに成功した。本研究成果をまとめた原著論文を *Biomedical Optics Express* 誌に投稿し、受理された (Ishii et al., 2019)。この成果は「日本光学会 光学誌が選ぶ 2019 年の日本の光学研究を代表する成果」に選定された (石井ら, 2020)。本研究への応用を見据え、

超解像二光子 STED 顕微鏡の更なる高度化や、蛍光プローブの探索、超解像ライブイメージングへの応用条件の検討を進めてきた。多点走査型二光子顕微鏡に加えて、超解像二光子 STED 顕微鏡でも同様にオータプス初代培養標本を観察することで、単一神経・グリア回路網の活動伝搬様式をナノスケールから細胞スケールで階層的に可視化解析していく。

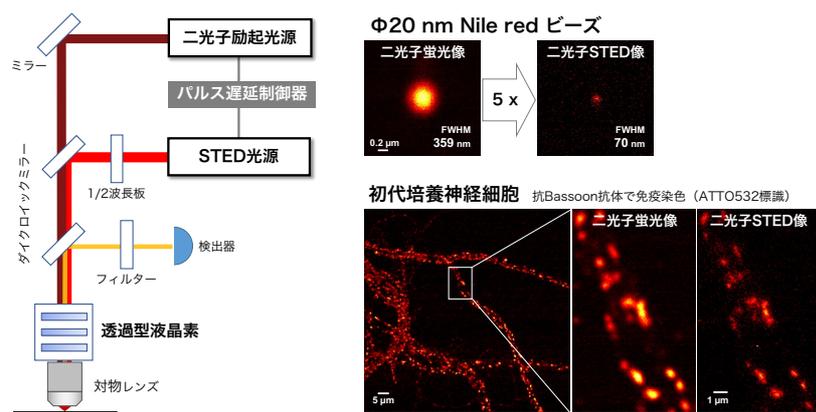


図 2 超解像二光子 STED 顕微鏡の概要と観察例

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 OTOMO Kohei, YAMAGUCHI Kazushi, ISHII Hirokazu, NEMOTO Tomomi	4. 巻 62
2. 論文標題 Spatial and Temporal Resolution Improvements on 2-Photon Microscopy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Seibutsu Butsuri	6. 最初と最後の頁 131 ~ 133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.62.131	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishii Hirokazu, Otomo Kohei, Takahashi Taiga, Yamaguchi Kazushi, Nemoto Tomomi	4. 巻 -
2. 論文標題 Focusing new light on brain functions: multiphoton microscopy for deep and super-resolution imaging	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2021.11.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 大友康平, 高橋泰伽, 山口和志, 石井宏和, 根本知己	4. 巻 50
2. 論文標題 生命多光子顕微鏡による深部高解像・超解像イメージング	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 光学	6. 最初と最後の頁 141-146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 大友康平, 石井宏和, 根本知己	4. 巻 31
2. 論文標題 二光子顕微鏡の技術開発と生物学応用	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 光アライアンス	6. 最初と最後の頁 42-45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 石井宏和, 大友康平, Jui-Hung Hung, 堤元佐, 横山弘之, 根本知己	4. 巻 49
2. 論文標題 新規パルス光源系を用いた二光子STED顕微鏡の開発	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 光学	6. 最初と最後の頁 232
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishii Hirokazu, Otomo Kohei, Hung Jui-Hung, Tsutsumi Motosuke, Yokoyama Hiroyuki, Nemoto Tomomi	4. 巻 10
2. 論文標題 Two-photon STED nanoscopy realizing 100-nm spatial resolution utilizing high-peak-power sub-nanosecond 655-nm pulses	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomedical Optics Express	6. 最初と最後の頁 3104 ~ 3104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1364/BOE.10.003104	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Avena Ramon Francisco, Qiao Lin, Fujii Yuki, Otomo Kohei, Ishii Hirokazu, Suzuki Takeyuki, Tsujino Hirofumi, Uno Tadayuki, Tsutsumi Yasuo, Kawashima Yusuke, Takagi Tatsuya, Murai Kenichi, Nemoto Tomomi, Arisawa Mitsuhiro	4. 巻 5
2. 論文標題 Absorption, Fluorescence, and Two-Photon Excitation Ability of 5-Phenylisolidolo[2,1-a]quinolines	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 2473 ~ 2479
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.9b04070	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 石井 宏和, 大友 康平, 根本 知己	4. 巻 30
2. 論文標題 2光子励起顕微鏡法のナノイメージングへの展開	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 光アライアンス	6. 最初と最後の頁 49 ~ 53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 大友 康平, 石井 宏和, 根本知己	4. 巻 5
2. 論文標題 透過型液晶素子を用いた二光子励起STED顕微鏡	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 フォトニクスニュース	6. 最初と最後の頁 192 ~ 195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Kaito Nakata, Kohei Otomo, Hirokazu Ishii, Motosuke Tsutsumi, Ryosuke Enoki, Tomomi Nemoto
2. 発表標題 High spatiotemporal imaging of A β oligomers-induced calcium elevations in primary culture of astrocyte using multi-beam scanning two-photon microscopy
3. 学会等名 The 8th Japan-China Symposium on Nanomedicine
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hirokazu Ishii
2. 発表標題 Improvement of two-photon microscopy for in vivo nanoscale imaging
3. 学会等名 第4回 ExCELLSシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石井宏和, 大友康平, 根本知己
2. 発表標題 生体深部ナノイメージングを目指した 二光子顕微鏡法の超解像化
3. 学会等名 レーザー学会学術講演会第42回年次大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hirokazu Ishii
2. 発表標題 Advanced two-photon microscopy for super-resolution deep-tissue imaging
3. 学会等名 第4回ExCELLS若手リトリート
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kaito Nakata, Kohei Otomo, Hirokazu Ishii, Motosuke Tsutsumi, Ryosuke Enoki, Tomomi Nemoto
2. 発表標題 Visualization of calcium elevations and glutamate release under A β oligomers exposure in primary cultured astrocytes with spatiotemporal resolution
3. 学会等名 第4回ExCELLS若手リトリート
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hirokazu Ishii
2. 発表標題 Improvement of two-photon microscopy toward realizing in vivo nanoscale imaging
3. 学会等名 The 11th NIPS-PRI-BRINU Joint Symposium
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kaito Nakata, Kohei Otomo, Hirokazu Ishii, Motosuke Tsutsumi, Ryosuke Enoki, Tomomi Nemoto
2. 発表標題 High-speed imaging of calcium elevations and glutamate release under A β oligomers exposure in primary cultured astrocytes
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hirokazu Ishii
2. 発表標題 Two-photon STED nanoscopy with novel pulse laser system for deeper super-resolution imaging
3. 学会等名 Registration web form: The 10th NIPS - Primate Research Institute -Niigata University Brain Research Institute Joint Symposium
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中田開人、鎌田恭史、大友康平、石井宏和、堤元佐、榎木 亮介、根本知己
2. 発表標題 多点走査型2光子顕微鏡による A オリゴマー曝露時の アストロサイト Ca2+動態の可視化解析
3. 学会等名 第29回 日本バイオイメーjing学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hirokazu Ishii
2. 発表標題 Two-photon STED nanoscopy with novel light source system for deeper super-resolution imaging
3. 学会等名 第2回ExCELLS若手リトリート
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hirokazu Ishii
2. 発表標題 Two-photon nanoscopy with novel pulse laser system
3. 学会等名 UK-Japan Neuroscience Symposium (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hirokazu Ishii, Kohei Otomo, Tomomi Nemoto
2. 発表標題 Two-photon pulsed STED nanoscopy utilizing electrically controllable components
3. 学会等名 ResonanceBio International symposium (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hirokazu Ishii, Kohei Otomo, Tomomi Nemoto
2. 発表標題 Improvement of two-photon excitation microscopy for super-resolution bioimaging
3. 学会等名 7th Nanomedicin (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hirokazu Ishii, Kohei Otomo, Jui-Hung Hung, Motosuke Tsutsumi, Hiroyuki Yokoyama, Tomomi Nemoto
2. 発表標題 Compact two-photon excitation STED nanoscopy with high-peak-power sub-nanosecond 655-nm pulsed light source
3. 学会等名 Focus on Microscopy 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石井 宏和, 大友 康平, 根本 知己
2. 発表標題 生体深部ナノイメージングを目指した2光子顕微鏡法の超解像化
3. 学会等名 第二回ExCELLSシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石井 宏和, 大友 康平, 根本 知己
2. 発表標題 生体深部ナノイメージングに向けた2光子励起顕微鏡法の高度化
3. 学会等名 東海大学マイクロ・ナノ啓発会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------