

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：63905

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21510

研究課題名（和文）超小型高精細マルチイオンセンサで切り拓く新たな神経回路基盤

研究課題名（英文）Elucidation of Neuronal Circuit Mechanisms Using Ultra-Small, High-Resolution Multi-Ion Sensor

研究代表者

堀内 浩（Horiuchi, Hiroshi）

生理学研究所・基盤神経科学研究領域・特別訪問研究員

研究者番号：60760733

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、生体脳の細胞外陽イオン動態を複数種同時に捉えるマルチイオンイメージセンサの開発と生体応用を目指した。センサ表面に2画素幅でイオノフォアを帯状に成膜することによって、マルチイオンセンサ化することに成功した。さらに、レーザー加工によって一画素レベルに相当する20umの精密成膜を達成した。すなわち、一画素レベルで複数のイオンを検出する当初の目標を達成することができた。今後、各イオンの検出特異性や検出感度をさらに向上させる必要がある。pHセンサを病態モデル動物に適用し、病態発現に伴うダイナミックなpH変化を捉えることに成功した。今後、イオンの変化と病態発現との関連性についても明らかにする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞外の化学的環境は脳の機能や病気と密接に関わることが知られているが、これまで電極を脳に刺し込む方法に限られ、脳のある一点の種類のイオンの濃度変化しかわからなかった。本研究成果によって、様々なイオンの様子を動画として脳内の観察することができるようになった。今後、神経疾患のモデル動物を用いることで細胞外の視点からこれまでわかっていなかった新しい病態メカニズムの発見が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to develop a multi-ion image sensor that simultaneously captures multiple types of extracellular cation dynamics in the living brain and to apply it to biological applications. We succeeded in developing a multi-ion sensor by depositing ionophores on the sensor surface in a band of two pixel widths. In addition, a precise deposition of 20um, which corresponds to the level of one pixel, was achieved by laser processing. In other words, the initial goal of detecting multiple ions at the pixel level was achieved. In the future, it will be necessary to further improve the specificity and sensitivity of detection of each ion. pH sensor was applied to animal models of pathological conditions and succeeded in capturing the dynamic pH changes associated with the development of pathological conditions. In the future, we will also clarify the relationship between ionic changes and pathological manifestations.

研究分野：神経生理学

キーワード：イオン pH 細胞外 イメージング CMOS

1. 研究開始当初の背景

神経細胞の興奮性は細胞外イオン環境によって調節されている。例えば、細胞外 K^+ の増加は神経細胞の活動を著しく増強させ、さらなる高濃度においてはてんかん様の異常活動様式を示す。同様に細胞外 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} の低下も活動を亢進させ、 H^+ 濃度の変化も神経の興奮性を惹起する (Jalalvand et al, 2018)。興味深いことに、てんかん発作に先立って細胞外スペースが縮小し、細胞外スペースの破綻はてんかん様の異常活動を示す (Perkins et al, 2017)。また、睡眠時には覚醒時と比較して細胞外スペースが大幅に拡大しており (Xie et al, 2013)、細胞外イオン組成も大きく変化する (Ding et al, 2016)。これらは、細胞外イオン環境が生理的機能および病態に重要であることを示唆している。細胞外イオン濃度を計測する手法として、古くから電極などを脳内に挿入することで計測され (Siesjo et al, 1985)、最近では、ヒトにおいて MRI を活用することで神経活動に伴って関連領域の pH が変化することが明らかになってきている (Magnotta et al, 2012)。

しかしながら、生きた個体動物において細胞外イオン環境がどのような時空間的規模で変容し、どのように脳活動に影響を与えているのかはほとんどわかっていない。これには細胞外イオンイメージング技術がないことが大きな障壁となっている。すなわち、電極を用いる手法は、計測した一点のイオン濃度から脳全体の濃度を推定していたにすぎない。また、MRI による H^+ イメージングは時空間分解能が大きく制限されており (0.16 frame/sec, 4.0mm)、齧歯類を用いた計測に耐えず、細胞レベルの空間分解能でのイメージングができない。したがって、高時空間分解能で広範囲に細胞外イオンを計測する手段が求められている。これまでに細胞外イオンイメージングを行った事例がないため、非常に挑戦的であるものの、成功すれば関連領域の特定、イオン間相互作用など新たな発見につながる可能性がある。さらに、がん領域などの細胞外環境の重要性が着目されている他領域への発展性も高いと期待される。

2. 研究の目的

本研究では、生きた個体動物に最適化した 1 細胞レベル (47.1 μm) の高精細・細胞外マルチイオンイメージングセンサ (128 \times 32 pixels) を開発し、大規模脳領域 (3.00 mm \times 0.75 mm) においてすべての細胞外陽イオン (Na^+ , K^+ , H^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) 動態を同時に捉えることにより、細胞外イオン環境から脳機能を理解する。

3. 研究の方法

(1) マルチイオンイメージング法の開発

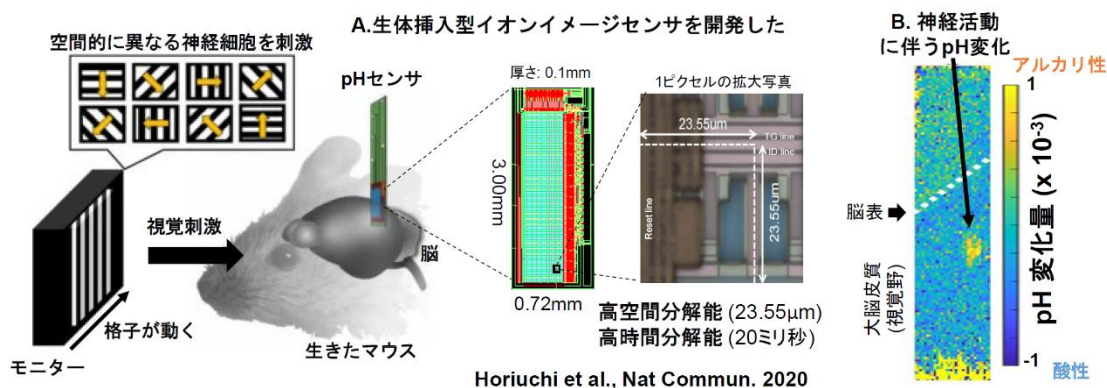
現時点で、インクジェット法を用いて、 H^+ センサ表面に最小 2 画素 (47.1 μm 幅) で Na^+ , K^+ 選択的透過性のイオノフォアを帯状に成膜することによって、生きた個体動物から 3 種類のイオンの同時検出に成功しつつある。本研究では 1 画素単位の成膜による一細胞レベルの空間分解能での細胞外マルチイオンイメージング法を開発する。

(2) マルチイオンイメージングによる脳機能の理解

本研究では、マウス生体脳にイオンイメージセンサを適用し、広域細胞外マルチイオンイメージングを行う。これにより脳機能や病態と細胞外イオン動態の関連性を明らかにする。

4. 研究成果

本研究では、生体脳からのイオン検出に最適化した生体イオンイメージセンサを世界に先駆けて開発し、視覚刺激による視覚領域の神経活動亢進によって細胞外微小空間において pH が変動することを初めて可視化することに成功した (図参照: Horiuchi et al, 2020)。センシングエリアのイオノフォア成膜によってそれぞれの陽イオンの検出に成功した。今後の課題として、各イオンの検出特異性や検出感度をさらに向上させる必要がある。インクジェット法を用いて、プロトンセンサ表面に最小 2 画素 (47.1 μm 幅) で選択的透過性のイオノフォアを帯状に成膜することによって、プロトンセンサをマルチイオンセンサ化することに成功した。最終年度はレーザー加工によって一画素レベルに相当する 20 μm の精密成膜を達成した。すなわち、一画素レベルで複



数のイオンを検出する当初の目標を達成することができた。生体応用に関しては、pH センサを病態モデル動物に適用することで生体脳細胞外 pH イメージングを行い、病態発現に伴うダイナミックな pH 変化を時空間的に捉えることに成功した。pH 変化の機序を明らかにするために、薬理的手法を用いて特定の細胞活動を制御したところ pH 変化が消失したことから責任細胞を同定することができた。今後、責任細胞上の様々な分子との関連を明らかにしていくとともに、マルチイオン計測によって、pH 変化周辺においてどのようなイオンがどのように変容するかを進める。さらに、イオン変化と病態発現との関連性についても追及する。

<引用文献>

1. Jalalvand et al, Cerebrospinal Fluid-Contacting Neurons Sense pH Changes and Motion in the Hypothalamus, *J Neurosci* 2018, 38 (35) 7713-7724; DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3359-17.2018>,
2. Perkins et al, Brain extracellular space, hyaluronan, and the prevention of epileptic seizures, *Reviews in the Neurosciences* 2017, 28(8): 869–892, DOI: <https://doi.org/10.1515/revneuro-2017-0017>
3. Xie et al, Sleep Drives Metabolite Clearance from the Adult Brain, *Science* 2013, 342 (6156) 373-377, DOI: 10.1126/science.1241224
4. Ding et al, Changes in the composition of brain interstitial ions control the sleep-wake cycle, *Science* 2016, 352 (6285): 550-555, DOI: 10.1126/science.aad482
5. Siesjo et al, Extra- and Intracellular pH in the Brain During Seizures and in the Recovery Period Following the Arrest of Seizure Activity. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 1985, 5:47-57
6. Magnotta et al, Detecting activity-evoked pH changes in human brain, *PNAS* 2012, 109 (21) 8270-8273, DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1205902109>
7. Horiuchi et al, CMOS-based bio-image sensor spatially resolves neural activity-dependent proton dynamics in the living brain, *Nat Commun*, 2020, 11(1):712, DOI: 10.1038/s41467-020-14571-y

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sakamoto Kotaro, Madokoro Mai, Horiuchi Hiroshi, Ishida Junko, Horio Tomoko, Kimura Yasuyuki, Hizawa Takeshi, Choi Yong-Joon, Takahashi Kazuhiro, Noda Toshihiko, Nabekura Junichi, Sawada Kazuaki	4. 巻 -
2. 論文標題 Needle-Type 5 μm Pixel Pitch pH-Image Sensor and Imaging of Proton Emissions in the Cerebral Cortex	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 21st International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (Transducers)	6. 最初と最後の頁 271-274
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1109/transducers50396.2021.9495573	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 該当する

1. 著者名 Sano Fumikazu, Shigetomi Eiji, Shinozaki Youichi, Tsuzukiyama Haruka, Saito Kozo, Mikoshiba Katsuhiko, Horiuchi Hiroshi, Cheung Dennis Lawrence, Nabekura Junichi, Sugita Kanji, Aihara Masao, Koizumi Schuichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Reactive astrocyte-driven epileptogenesis is induced by microglia initially activated following status epilepticus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JCI Insight	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) 10.1172/jci.insight.135391	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Takeuchi Hideyuki, Horiuchi Hiroshi, Parajuli Bijay, Komiya Hiroyasu, Tanaka Fumiaki, Suzumura Akio	4. 巻 -
2. 論文標題 Interleukin 19 ameliorates experimental autoimmune encephalitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Neuroimmunology	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) 10.1111/cen3.12642	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 該当する

1. 著者名 Horiuchi Hiroshi, Parajuli Bijay, Komiya Hiroyasu, Ogawa Yuki, Jin Shijie, Takahashi Keita, Azuma Yasu-Taka, Tanaka Fumiaki, Suzumura Akio, Takeuchi Hideyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Interleukin-19 Abrogates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Attenuating Antigen-Presenting Cell Activation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	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) 10.3389/fimmu.2021.615898	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Horiuchi Hiroshi, Parajuli Bijay, Komiya Hiroyasu, Ogawa Yuki, Shijie Jin, Takahashi Keita, Azuma Yasu-Taka, Tanaka Fumiaki, Suzumura Akio, Takeuchi Hideyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Interleukin-19 alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis by attenuating antigen-presenting cell activation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 bioRxiv	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) 10.1101/2020.07.15.204826	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 堀内 浩
2. 発表標題 細胞外イオンの時空間分布を読みだす技術開発と生体応用
3. 学会等名 第1回脳化学研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 堀内 浩
2. 発表標題 CMOSイオンイメージセンサによって捉える生体脳のイオンダイナミクス
3. 学会等名 生理学研究所-山梨大学-豊橋技術科学大学合同研究交流会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 間所 麻衣, 中村 優斗, 堀内 浩, 小林 知子, 木村 安行, 堀尾智子, 土井 英生, 崔 容俊, 高橋 一浩, 野田 俊彦, 鍋倉 淳一, 澤田和明
2. 発表標題 マウスの自由行動実験に向けた参照電極内蔵型in-vivoイメージセンサの製作と評価
3. 学会等名 第70回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 間所 麻衣, 木村 安行, 堀尾 智子, 堀内 浩, 小林 知子, 土井 英生, 崔 容俊, 高橋 一浩, 野田 俊彦, 鍋倉 淳一, 澤田 和明
2. 発表標題 覚醒・自由行動マウスの脳内pHイメージングに向けたin-vivo計測システム
3. 学会等名 第39回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 間所 麻衣, 堀内 浩, 小林 知子, 木村 安行, 堀尾 智子, 土井 英夫, 崔 容俊, 高橋 一浩, 野田 俊彦, 鍋倉 淳一, 澤田 和明
2. 発表標題 非拘束自由行動実験に向けたin vivoイメージングシステムの構築と実証
3. 学会等名 第83回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 間所 麻衣, 堀内 浩, 小林 知子, 木村 安行, 堀尾智子, 崔 容俊, 高橋 一浩, 野田 俊彦, 鍋倉 淳一, 澤田 和明
2. 発表標題 生体刺入型pHイメージセンサの開発と自由行動マウス脳内への応用
3. 学会等名 令和4年度電気学会E部門総合研究会 バイオ・マイクロシステム研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Horiuchi H, Sawada K, Nabekura J
2. 発表標題 CMOS image sensor reveals neural activity-dependent pH changes in the living brain with single-cell level resolution
3. 学会等名 The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2021 (Pacifichem 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Horiuchi H, Agetsuma M, Ishida J, Cheung DL, Sawada K, Nabekura J
2. 発表標題 CMOS-based bio-image sensor visualizes neural activity dependent proton dynamics in the living brain
3. 学会等名 The 44th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society / the 1st CJK International Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀内 浩、揚妻正和、石田順子、Dennis Cheung、澤田和明、鍋倉淳一
2. 発表標題 CMOSイオンイメージセンサによって捉える生体脳のpHダイナミクス
3. 学会等名 第99回日本生理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀内 浩
2. 発表標題 イオンイメージセンサによる生体脳pHイメージング
3. 学会等名 【機能タンパク質の構造と機能のダイナミクスと、それに基づく細胞・生体システム作動機構の研究拠点の形成】シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀内 浩
2. 発表標題 CMOSイメージセンサによる生体脳pHイメージング
3. 学会等名 名古屋大学大学院医学系研究科-生理学研究所合同シンポジウム
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

薄型CMOSセンサーによる脳内pHのリアルタイム観察に成功
https://www.nips.ac.jp/release/2020/02/cmosph_20_2355m.html
高精細イオンイメージセンサ
<http://int.ee.tut.ac.jp/bio/research>

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
研究分担者	澤田 和明 (Sawada Kazuaki) (40235461)	豊橋技術科学大学・工学(系)研究科(研究院)・教授 (13904)	

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
---------	---------