

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26640016

研究課題名(和文) ランダムスキャン2光子励起顕微鏡による多点膜電位計測

研究課題名(英文) Multiple cell membrane potential measurement by a random-scan two-photon microscope

研究代表者

井上 貴文 (Inoue, Takafumi)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：10262081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：独自に開発したランダムスキャン型二光子励起顕微鏡システムを用い、脳切片中の神経細胞の膜電位計測を同時多点で行うことを目的とした。複数培養神経細胞から同時に計測した活動電位記録のスパイク抽出アルゴリズムと時系列の細胞間の比較アルゴリズムを開発し、ソフトウェアに実装し、神経細胞のシナプス結合の有無および結合の方向性について解析を行うことに成功した。脳切片中の神経細胞の膜電位感受性色素を用いた染色法の開発に成功し、これら神経細胞の活動電位計測に成功した。

研究成果の概要(英文)：This research project aimed to measure membrane potential changes from multiple neurons simultaneously by means of an in-house developed random-scan two-photon microscope. For this purpose, I developed algorithms for extraction of spikes from time course changes of fluorescence intensity and for temporal correlation of spike events of pairs of neurons, which were implemented to analysis software. With these analysis methods enabled successful extraction of neuron spikes and determination of synaptic connection and even the direction of synaptic connections of every neuron pair. I was also successful in development of a staining method of neurons in brain slice preparations. With these developments of methods I succeeded in measuring action potentials optically from multiple neurons, e.g., cerebellar granule cells and neocortical neurons in brain slice preparations.

研究分野：神経生理学

キーワード：膜電位測定 電位感受性色素 2光子励起顕微鏡 脳スライス

1. 研究開始当初の背景

近年、機能的磁気共鳴画像法 (fMRI) の進歩などにより、個体レベルでの脳神経系の機能解析が飛躍的に進んできたが、fMRI では細胞レベルの解析は困難である。脳神経系は、1000 億個にも及ぶ非常に多様な神経細胞が微細なシナプスを介してお互いに結合していることから、fMRI のような全体的な解析のみではなく、個々の神経細胞レベルでの機能解析がとりわけ必須となっている。例えば、記憶・学習過程の変化は個々の神経細胞の樹状突起上に存在する無数の数 μm の構造物である棘突起上のシナプスにおける機能的・形態的变化の反映である。このような「まるごとの」個体における個々の細胞を可視化するための技術としての、2 光子励起共焦点顕微鏡の実用化は近年の画期的な技術革新であり、生きた脳の中の神経細胞内で起こっていることの理解は格段に進んだ。しかし従来の 2 光子励起顕微鏡は計測速度の限界のために、非常に興味ある領域が手つかずで残されている。脳の局所神経回路は高密度に集積した神経細胞相互の複雑なシナプス結合により成り立っている。この局所回路の中で神経細胞がどのように協調し、全体として様々なパターンのリズムをつくりだしているのか。少数の指揮者ニューロンが制御する交響楽団形式か、神経細胞相互の連絡により全体のリズムを形成する室内楽形式か、神経回路理論からは様々な仮説が提案されている。これらを検証するために近年カルシウム感受性色素と高速 CCD カメラを用いた研究が行われている。円盤型共焦点装置と高速カメラを組み合わせることにより数 10 フレーム/秒の速度で神経細胞集団のシナプス結合が明らかにされつつあるが、活動電位をカルシウムイメージングで捉えることにより真の単シナプス結合を間接的シナプス結合から分離するに至っていない。脳の局所神経回路を理解するためには多数の神経細胞から同時に膜電位を記録する必要があると考えた。

2. 研究の目的

我々が開発したランダムスキャン方式 2 光子励起顕微鏡を用い、その高時間分解能により従来の 2 光子励起顕微鏡の限界を打ち破ることを目的とした。本研究は、この装置の高速性を生かして電位感受性色素による多点膜電位記録を行い、同期して活動電位を発生する複数ニューロンの組み合わせを正確に抽出し、局所神経回路の構造を明らかにすることを目指した。申請者はランダムアクセス型 2 光子励起顕微鏡により培養神経細胞からの同時多点活動電位計測に成功していた。本研究ではこれをさらに進めて電位感受性色素を用いた多点活動電位計測を脳スライスあるいは動物個体の脳に適用して局所神経回路の構造を明

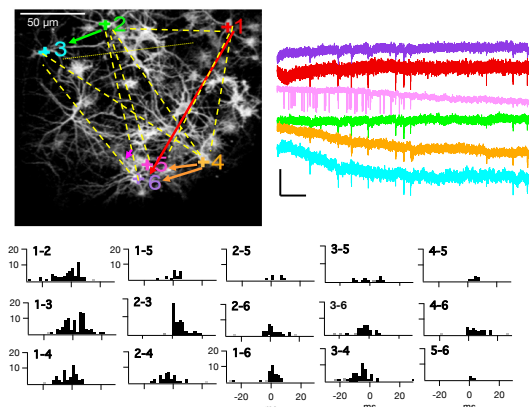
らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

電気生理学的記録とランダムスキャン型 2 光子励起顕微鏡システムを組み合わせる。ランダムスキャン型 2 光子励起顕微鏡システムは通常の 2 光子励起顕微鏡で使われるガルバノミラーによる XY 両軸のスキャンではなく、直交する 2 つの音響光学偏光器 (AOD) による XY スキャンを採用することによって、従来型では不可能であったランダムスキャンが可能で、これにより非常に低侵襲で高速な (最大 100 kHz) 観測が可能である。従来型 2 光子顕微鏡で高速にスキャンするためにはラインスキャンモードを用いる必要があり、これにより数 kHz の時間分解能が出せるが、2 次元的な広がり犠牲になる。AOD によるスキャン方式は 2 次元空間上の複数点から測定できるので、多数の細胞の情報を同時に収集できる。蛍光電位感受性色素として DiO・DPA 間の FRET を利用した方法を用い、脳スライス標本を用い多数の神経細胞の活動状況の同時記録を行う。本研究では脂溶性の高い電位感受性色素の脳スライス内の神経細胞への効率のよい導入方法を検討する。

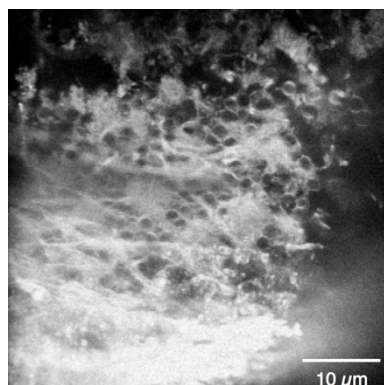
4. 研究成果

本研究着手前に培養神経細胞での活動電位光学計測系を立ち上げていた。電位感受性色素として DiO と DPA の 2 種類の色素の組み合わせを採用した。DiO は疎水性が高く、通常の培地添加法では初代培養神経細胞を膜電位計測が出来る程度には染色できなかった。遺伝子銃を用いた DiO 染色を選択し、本研究開始時にこの方法により 90 分以上の長時間にわたる活動電位記録を 20 個程度の神経細胞



培養神経細胞の同時多点膜電位計測。左上：膜電位感受性色素の蛍光画像。シナプス結合の方向を示す。右上：各点からの蛍光強度変化（活動電位は下向きに表示）。下：神経細胞同士の発火タイミングの相互相関。相互相関の対称性からシナプス結合の方向を読み出すことに成功した (Shafeghat et al)。

胞から取得することに成功していた。本研究開始後、光学的活動電位記録データの解析法を整備し、培養神経細胞での多細胞の光学的活動電位記録測定の結果を解析し、論文として報告した(Shafeghat et al.)。ノイズを含む蛍光強度の時間変化データから活動電位特有のスパイクを検出するアルゴリズムを考案し、自製ソフトウェアに組み込んだ。スパイク検出のアルゴリズムとしては Schmitt Trigger 法と template matching 法を試した結果、どちらも十分な検出感度を得られることがわかった。さらに神経細胞相互のスパイク時系列の相互相関を神経細胞のペアごとに検出することで、ミリ秒の精度での活動電位の時間差を統計学的裏付けを含めて検出するソフトウェアを構築した。数十分以上の連続記録により十分な活動電位イベント数の取得ができ、神経細胞相互のシナプス結合の有無ばかりかシナプス結合の方向まで検出することができた(Shafeghat et al.)。この成果に基づき本研究は対象を培養細胞よりも実際の脳の神経回路により構造に近い脳スライスとし、DiO と DPA の 2 種類の色素の染色法の開発を行った。培養細胞ではうまく使えていた遺伝子銃による色素導入は、脳組織へのダメージが大きく使用することが出来ないことが判明した。色素を含む液への脳スライスの長時間浸漬を試みたが脳切片中の神経細胞への浸透が十分でないとの結論に至った。そこで、脳スライス作成前に生きたマウス脳に DiO を局所注入し、組織内の拡散を数日待って、脳切片を作製する方法を試みた。その結果、十分な染色が得られ、複数の神経細胞からの活動電位の記録を得ることができた。また、DiO 類似化合物をテストし、Fast DiO と Neuro DiO は膜浸透性や親水性の違いから、DiO よりも脳内注入法に適していることが判明した。以上の成果をもとにして、マウス小脳スライスの顆粒細胞、あるいは大脳皮質スライス中の神経細胞を DiO/DPA で染色し、染色された神経細胞をの近傍に刺激電極を刺入し、電気刺激により、電気刺激と同期して蛍光強度の変化が見られた。すなわち活動電位のスライス内神経細胞



小脳スライス中の神経細胞の DiO による染色。色素の脳内注入後スライスを作成することで神経細胞の細胞膜を効果的に染色することができた。

からの記録に成功した。また、自発発火による蛍光強度の変化も捉えることができた(投稿準備中)。

また、研究の過程で、顕微鏡のステージに細胞や脳切片を保持するチャンバーについて新たな構造と製法を考案し、特許を申請した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Masaru Ishibashi, Iryna Gumenchuk, Kenichi Miyazaki, Takafumi Inoue, William N. Ross, Christopher S. Leonard
Hypocretin/orexin peptides alter spike-encoding by serotonergic dorsal raphe neurons through two distinct mechanisms that increase the late afterhyperpolarization
Journal of Neuroscience, 36:10097-10115 (2016), 査読有, doi:10.1523/JNEUROSCI.0635-16.2016
- ② Nasrin Shafeghat, Morteza Heidarinejad, Noboru Murata, Hideki Nakamura, Takafumi Inoue,
Optical detection of neuron connectivity by random access two-photon microscopy
Journal of Neuroscience Methods, 263:48-56 (2016), 査読有, doi:10.1016/j.jneumeth.2016.01.023
- ③ Mitsumasa Homma, Yoshiaki Takei, Atsushi Miura, Takafumi Inoue, Shinji Takeoka
A retinometric fluorescent molecular probe for visualization of mitochondrial temperature in living cells
Chemical Communications, 51:6194-6197 (2015), 査読有, doi:10.1039/C4CC10349A

[学会発表] (計 14 件)

- ① Keishi Narita, Shohei Sasamoto, Shuichi Koizumi, Shizuka Okazaki, Hideki Nakamura, Takafumi Inoue, Sen Takeda
Regulation of the blood-cerebrospinal fluid barrier functions by TRPV4
第 38 回日本神経科学大会, 神戸, 7 月 28-31 日 (2015)
- ② V.N. Samios, T. Inoue
Electrophysiological properties of thalamic relay cells are prone to neuro-immune modulation by Interleukin-1 β , interleukin-6 and tumor necrosis factor- α
Neuroscience 2014 (Annual Meeting of Society for Neuroscience), Washington, DC, November 15-19 (2014)

○出願状況（計 1 件）

名称：顕微鏡観察用容器
発明者：井上貴文、中澤誠、染谷さやか
権利者：学校法人早稲田大学、株式会社東海
ヒット
種類：特許
番号：特願 2017-105701
出願年月日：2017 年 5 月 29 日
国内外の別： 国内

〔その他〕
ホームページ等
<http://inouelab.biomed.sci.waseda.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
井上 貴文 (INOUE, Takafumi)
早稲田大学・理工学術院・教授
研究者番号：10262081