

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料  
〔令和4（2022）年度 中間評価用〕

令和4年3月31日現在

研究期間：2020年度～2024年度  
課題番号：20H05669  
研究課題名：ニューロフォトニクス創成による脳機能創発原理の探究

研究代表者氏名（ローマ字）：根本 知己（NEMOTO Tomomi）  
所属研究機関・部局・職：大学共同利用機関法人自然科学研究機構・生命創成探究センター・教授  
研究者番号：50291084

研究の概要：

光技術と神経科学が融合した新しい学際的な領域「ニューロフォトニクス」を確立し、生体中のありのままの状態での神経活動やそれに関わる生体分子のダイナミクスを可視化し、定量的な解析を可能とすることを目標とする。これにより、機能的疾患の診断・治療の開発への扉を開き、国民の健康と福祉に寄与することを旨とする。

研究分野：生物物理学、応用物理学、神経科学

キーワード：イメージング、光脳科学

1. 研究開始当初の背景

「我々の精神活動がどのような神経細胞集団的な活動により実現されているか」を理解したいという問いは、多くの人々を魅了して止まない。その脳の機能の創発原理・作動原理の理解のためには、生きたままの状態（*in vivo*）で、局所的な神経回路機能とその実体である神経活動の細胞間の伝搬（神経伝達）や同期状態を明らかにすることが重要である。しかし、分子・細胞レベルにおいては神経シナプスにおける情報伝達は確率的に生じる一方で、局所神経回路の機能の創発にはネットワーク的な同期性をもった集団活動が不可欠であると考えられている。この乖離を越えて、真に脳の機能の創発原理・作動原理を理解するためには、神経細胞集団の活動を直接的に可視化し、伝達過程を静止画像ではなく動画として、可視化し解析することが不可欠である。即ち、光技術と神経科学が融合させ、生体中のありのままの状態での神経活動やそれに関わる生体分子のダイナミクスを可視化し、定量的な解析を可能とすることが必然的に求められていた。

2. 研究の目的

本研究課題では、最先端の非線形光学を十全に活用することで、研究代表者が長年牽引してきた生体脳の *in vivo* イメージング・光操作を高度化し、上述の課題解決への道を拓かんとするものとした。その問題の抜本的な解決のために提案する斬新な顕微鏡法により得られた多元的な神経細胞の応答や同期的な集団活動の変化の解析から、脳内の情報伝達の本質を理解していくこととした。加えて、局所光活性化等をもちいた局所刺激や薬剤の賦活化を併用することにより、精神疾患や分泌疾患の解明、治療にむけた方途を開拓することとした。以上のように、本研究課題の推進する新規「ニューロフォトニクス」は、生体深部イメージングの高度化により、光による生理機能の制御や光細胞治療などのライフサイエンスのイノベーションに資するものとして立案した。

3. 研究の方法

これまでに培った技術基盤を統合発展させて、以下の3点を中心に研究開発を推進した。

- ① **生きたままの動物の中での超解像イメージング**: 生体脳深部での深部到達性、時空間分解能の向上や超解像イメージングの実現による神経活動のライブイメージングを実現する **2光子ナノスコープの高度化**
- ② **臓器的な構造を保ったままでの生理機能の3次元高速イメージング**: 光の伝搬を自在に操作する技術と超高速画像取得技術を駆使した **新規二光子光ニードル顕微鏡による体積イメージング**の確立
- ③ **神経伝達機能の分子基盤の解明**: 神経伝達や開口放出における分子機構の解明を目指した **ナノメーター機能解析法の確立**

最終的には、生きたままのマウスの臓器の広範囲の領域で、開口放出などの細胞の微細な形態変化や  $Ca^{2+}$  濃度上昇を観察する方法、特に神経の活動電位の伝搬と関連する集合解離を高精度・高速で可視化する手法を実現することとした。

4. これまでの成果

二光子ナノスコピーの空間分解能の向上に成功し、特に厚い標本への適用を試み 100nm を切る空間分解能の向上に成功し、Thy1-H-YFP-line マウス(H-line マウス)の海馬固定スライス標本の深部において、蛍光抗体染色法を用い樹状突起スパインの超解像観察に成功した。また、対物レンズの焦点位置において軸性方向に光強度が長距離に分布する光ニードルを発生させ、高速体積イメージングを実現した。この結果、100 $\mu$ m を越える長さの光ニードルの形成に成功し、約 300 $\mu$ m の被写界深度を実現した。さらに蛍光  $\text{Ca}^{2+}$ インジケータを発現するモデルマウスを新たに導入し、神経活動の高速体積イメージングに成功した。また、補償光学や新規ナノ材料を用いた生体脳イメージングの高度化に成功した。また、独自の利得スイッチング半導体レーザー(GS-LD)をベースに、主要な蛍光タンパク質を二光子励起できる多波長のピコ秒パルス光源およびそれとタイミング同期可能な多波長のサブナノ秒光源の実現を図った。また、上記光源の開発過程で、誘導ラマン効果を起点とするスーパーコンティウム光発生における強度やタイミングの揺らぎに関する新奇な実験データも得ることができた。

#### 5. 今後の計画

令和2、3年度に研究開発した先端光科学技術を活用したバイオイメーjing手法を展開、活用し、マウス生体脳における神経活動・分泌の *in vivo* イメーjing法の確立、*in vivo* イメーjingによる神経伝達や分泌機構の分子基盤の解析を中心に研究を推進する。改良したオープンスカル法と新規蛍光プローブを用い、神経活動やアストログリア細胞の *in vivo* イメーjingを確立し、樹上突起スパイン、トリパタイトシナプス等における超微細形態の変化や  $\text{Ca}^{2+}$  スパイクの高分解能のイメーjingや、グルタミン酸の分泌、活動電位の同時可視化を試みる。また、波長選択可能なピコ秒光源を、GFP、YFP、RFP 等の主要な蛍光タンパク質の二光子励起に対応できるように完成度を高める。特に、各機能の小型筐体への実装、全体機能のエレクトロニックな統合制御、および長期間にわたる高安定動作の実現に取り組む。これにより、本研究の主課題である *in vivo* 光イメーjing・操作の効率性および信頼性を高める。

#### 6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Takafumi Kamada, \*Kohei Otomo, Takashi Murata, Kaito Nakata, Shota Hiruma, Ryota Uehara, Mitsuyasu Hasebe, \*Tomomi Nemoto, "Low-invasive 5D visualization of mitotic progression by two-photon excitation spinning-disk confocal microscopy," *Sci. Rep.* (2022) vol. 12, article#:809, pp:809-1 – 809-10, doi:10.1038/s41598-021-04543-7 査読有
2. 堤 元佐、高橋泰伽、小林健太郎、根本知己 (2021.9.10) 画像解析による超解像法 SRRF の *in vivo* イメーjingへの適用、第 30 回 日本バイオイメーjing学会学術集会 ベストイメーjing賞 OLYMPUS 賞 受賞
3. Taiga Takahashi, Hong Zhang, Kohei Otomo, Yosuke Okamura, \*Tomomi Nemoto, "Protocol for constructing an extensive cranial window utilizing a PEO-CYTOP nanosheet for *in vivo* wide-field imaging of the mouse brain", *STAR Protocols* (2021) 2(2):100542, DOI:10.1016/j.xpro.2021.100542 査読有
4. Kazushi Yamaguchi, Kohei Otomo, Yuichi Kozawa, Motosuke Tsutsumi, Tomoko Inose, Kenji Hirai, Shunichi Sato, \*Tomomi Nemoto, \*Hiroshi Uji-i, "Adaptive Optical Two-photon Microscopy for Surface profiled Living Biological Specimens," *ACS Omega* (2021) vol.6, pp:438-447, doi: 10.1021/acsomega.0c04888 査読有
5. Kouichirou Iijima, Takuto Oshima, Ryosuke Kawakami, \*Tomomi Nemoto, "Optical clearing of living brains with MAGICAL to extend *in vivo* imaging", *iScience* (2020) vol. 24, pp. 101888-1 – 101888-11, doi: 10.1016/j.isci.2020.101888
6. Taiga Takahashi, Hong Zhang, Ryosuke Kawakami, Kenji Yarinome, Masakazu Agetsuma, Junichi Nabekura, Kohei Otomo, Yosuke Okamura, \*Tomomi Nemoto, "PEO-CYTOP Fluoropolymer Nanosheets as a Novel Open-Skull Window for Imaging of the Living Mouse Brain", *iScience* (2020) vol. 23, pp. 101579-1 -101579-13, doi: 10.1016/j.isci.2020.101579 査読有

#### 7. ホームページ等

自然科学研究機構生命創成探究センター・生理学研究所 根本研 <https://www.nips.ac.jp/bp/>

東北大学未来科学技術共同研究センター 横山研究室 <https://www.yokoyama.niche.tohoku.ac.jp/index.html>

順天堂大学医学研究科 <https://med.juntendo.ac.jp/research/course/kisokenkyu.html>