

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 9 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H04961

研究課題名（和文）脳波のコヒーレンスを生み出す細胞間協同作用のin-vivoラベルフリー可視化

研究課題名（英文）In-vivo label-free visualization of intercellular cooperative interactions for electroencephalogram

研究代表者

加納 英明（Kano, Hideaki）

九州大学・理学研究院・教授

研究者番号：70334240

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 32,800,000円

研究成果の概要（和文）：睡眠のメカニズムの解明を目指して、非線形ラマン散乱による新しい分子イメージング手法の開発を行った。本手法により、マウスの脳内分子分布を詳細に観察できるようになった。特に、マウスの海馬および脳室で特異的な第二高調波発生信号を検出し、それが神経細胞の一次線毛および脳室表層の上皮細胞の繊毛に由来することを明らかにした。後者の知見は、睡眠時に脳内の不要物質がクリアランスされる過程を可視化する新たな手段になりうることを期待される。また、線虫を用いた研究では、細胞内カルシウム濃度の上昇が「睡眠恒常性」の分子メカニズムに関与することを示した。以上の成果は睡眠の複雑なメカニズム解明に新たな道を拓くものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果の学術的特徴の一つとして、フォワードジェネティクスの研究スタイルをメソドロジーにも拡張した点が挙げられる。対象を特定せず、スペクトルベースで細胞・生体組織の隠れた特徴を探索することで、脳室表層に存在する上皮細胞がもつ繊毛の可視化に成功した。脳室に満たされている脳脊髄液は、睡眠時に脳内不要物質のクリアランスに寄与しているとの報告があるため、この知見は睡眠に関連する脳内病態をラベルフリーで可視化できる可能性がある。以上のように、“仮説を立てない（仮説探索型）研究スタイル”の特徴を活かすことで、従来のイメージングでは得られない新しい発見が得られた。

研究成果の概要（英文）：We developed a novel molecular imaging system using a coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) process to understand mechanisms of sleep. This technique enabled label-free visualization of membrane potentials and detailed observation of molecular distributions in the mouse brain. Specific SHG signals were detected in the mouse hippocampus and ventricles, originating from the primary cilia of neurons and the cilia of ependymal cells in the ventricular surface. This finding suggests a new method to visualize waste product clearance from the brain during sleep. Research using nematodes identified neurons that promote sleep, showing that an increase in intracellular calcium levels is involved in the molecular mechanism of sleep homeostasis. Additionally, it was discovered that endoplasmic reticulum stress in actively working tissues triggers sleep, with PERK and eIF2 as key molecules. These findings open new avenues for understanding the complex mechanisms of sleep.

研究分野：分子イメージング

キーワード：ラマン イメージング 顕微鏡 第二高調波 CARS SHG

1. 研究開始当初の背景

健全な睡眠はわれわれの健康と密接に関係している。2015年に厚生労働省が行った「国民健康・栄養調査」の結果によると、国民の1日の平均睡眠時間は、男女とも「6時間以上7時間未満」と回答した者の割合が最も高く、睡眠の質に関する項目については、6時間未満の者が男女とも「日中、眠気を感じた」が最も高かった。睡眠の量的不足や質の悪化は健康上の問題や生活の支障を生じ、生活習慣病のリスクにつながることもわかっている(厚生労働省健康局「健康作りのための睡眠指針 2014」)。さらに、不眠はうつ病発症のトリガとなり得ること、睡眠不足や睡眠障害による日々の眠気がヒューマンエラーに基づく事故につながることも明らかになってきており、睡眠不足や睡眠障害は、社会的にも大きな問題となってきた。

その一方で、睡眠と覚醒を司る体内メカニズムの分子科学的理解は、依然立ち遅れている。特に、睡眠の自発性の根源である「眠気」は我々が日々体感する感覚であるが、その分子実態は謎に包まれている。近年、光・化学遺伝学、またウイルスを用いたトレーシング技術や脳内内視鏡によるイメージングなどの手法の発展に伴い、睡眠と覚醒を誘導する複雑な分子生物学的メカニズムが少しずつ明らかになりつつある。これらによって、マウスのノンレム睡眠を制御する遺伝子(*Sik3*)のホモログが、線虫やショウジョウバエなどの無脊椎動物の睡眠様行動も制御すること、ノンレム睡眠の深さは、徐波と呼ばれる低周波の脳波と相関があること、レム睡眠はノンレム睡眠中の徐波を誘発し、記憶形成を促進すること、脳内に蓄積した不要代謝物がノンレム睡眠中に除去されていること、等がわかってきた。

複雑な睡眠メカニズムにアプローチするために、睡眠研究では一つの新しい潮流が生まれている。それは、フォワードジェネティクス(順遺伝学)に代表される、“仮説を立てない(仮説探索型)研究スタイル”である。通常の研究は、仮説検証型の研究スタイルが主流である。しかしながら、睡眠研究の現状では仮説の構築そのものが難しい。そこで、フォワードジェネティクスでは、例えば約1万匹という膨大な数のマウスに遺伝子変異を導入し、遺伝性がみられる表現型からその原因となる遺伝子を探り当てる。仮説を立てない代わりに、一貫した探索実験をシステムティックに行うことにより、睡眠が非常に多い家系「*Sleepy*」と、レム睡眠が減少する家系「*Dreamless*」が見つかり、それぞれの原因遺伝子 *Sik3* と *Nalcn* が同定されている(Funato, Hayashi *et al*, *Nature* (2016); 研究分担者が共著)。これにより、仮説探索型研究スタイルの有効性が立証され、同様なフォワードのアプローチで研究の突破口を開こうとする機運が生まれている。

2. 研究の目的

本研究では、フォワードジェネティクスの研究スタイルをメソドロジーにも拡張した。色素や蛍光タグ等のラベル分子を導入せず、非線形ラマン散乱をはじめとした各種の非線形光学効果をプローブとして用いることで、膜電位のラベルフリー可視化という新規モダリティを持つフォワード分子機能イメージング法(forward & functional molecular imaging, *ffMI*)の開発を目標として研究を行った。特に、睡眠のメカニズムおよび作用を明らかにするために、個々のニューロンの発火現象(マイクロ)と脳波(マクロ)、そして個体(システム)というレベルに着目した。これらすべてのレベルを統合して包括的に睡眠を理解するために、(1)研究分担者(林)らが世界で初めて「睡眠」固有の生体高分子構造の変化を可視化することに成功したシンプルなモデル動物である線虫(個体;システム)、(2)我々と同じほ乳類であるマウス、という複数のモデル生物を用いた。睡眠操作ができるトランスジェニックマウス(脳)や線虫(個体全体)を用いることで、睡眠がなぜ個体生存に必須なのか、マイクロ(分子、細胞)及びマクロ(細胞間協調)の挙動がシステム(個体)の睡眠をどのように駆動するのか、それらのメカニズムを明らかにし、睡眠の作用の包括的解明を目指した。

3. 研究の方法

本研究では、標識無しで膜電位はじめ細胞機能を可視化することのできる新規分子機能イメージング手法の開発を行った。特に、ラベルフリー・イメージングの主軸として非線形ラマン散乱の一種である coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS)を用いた。

ラマンスペクトルは分子の指紋とも呼ばれ、分子の個性を鋭敏に反映する特性を持つため、細胞内分子についての詳細な情報を“ありのまま”の試料から抽出することが可能である。分子に関するこのように豊富な構造化学的情報は、スペクトルを通して得ることができ、分光計測が欠かせない。しかしながら、従来のCARSイメージングの研究では、構造情報に乏しいCH₂伸縮振動のみに着目したモノクロ・イメージの取得がほとんどであった。CARSイメージングにおけるこのような流れの中で、本研究では分光法とイメージングを組み合わせた「分光学的イメージング」を実現した。CARSスペクトルを得るために、フォトニック結晶ファイバーから発生するスーパーコンティニューム光源を日仏共同研究で開発した。従来の光源と比べ、繰り返し周波数が5倍(1 MHz ~ 5 MHz)にスペックアップした光源をCARS分光顕微鏡の光源として新た

に採用した。この光源を CARS 過程に活かすことで、基本音のほぼすべての領域をカバーできる、高速・超広帯域 CARS 顕微分光システムの構築を行った。

これに加え、研究分担者らは独自の生命科学的アプローチで睡眠研究にアプローチした。

4. 研究成果

4.1. フォワード分子機能イメージング法の開発とその応用

高繰り返し周波数 5 MHz の新規スーパーコンティニューム光源を用いることにより、分子振動コントラストに基づくマルチカラー・イメージの高速取得を可能とする超広帯域 CARS 顕微分光システムの構築を行った。さらに、CARS の他に第二高調波発生(second harmonic generation; SHG)や第三高調波発生(third harmonic generation; THG)など様々な非線形光学効果を同時に取得できるようにシステムを拡張したマルチモーダル非線形光学イメージング装置を構築し、膜電位検出に加え、生細胞や生体組織のラベルフリー・イメージングを実現した。これまでの研究成果の一例として、図 1 にマウス脳スライス切片の結果を示す (Murakami *et al.*, *SPIE BiOS* (2022)). 脳組織全域を、水 (OH 伸縮)、タンパク質 (CH₃ 伸縮など)、脂質 (CH₂ 伸縮など) の分子情報を用いてラベルフリー観察できることを実証した [Murakami *et al.*, *SPIE BiOS* (2022), Murakami *et al.*, *ACS Chemical & Biomedical Imaging* (2024)].

本研究では、フォワード分子機能イメージングの特徴を活かした結果を得ることができた。マウス脳スライスを対象とした実験中に、マウス海馬および脳室に特異的な SHG 信号を検出した (図 1(b)). このような SHG 輝点の報告はこれまでに無く、その分子同定・オルガネラ同定に取り組んだ。海馬は神経細胞が密集した部位であり、観察された SHG 輝点は神経細胞の細胞体が局在するところであるため、培養神経細胞 (研究協力者: 慶應義塾大学 塗谷准教授) を用い

たラベルフリーイメージングおよび蛍光イメージングも行い、総合的に検討した。その結果、海馬で見られた SHG 信号は神経細胞の一次線毛に由来することがわかった。

本研究ではさらに、同様な SHG 信号を脳室においても見出した。海馬の信号とその研究結果を手がかりとして、この SHG 輝点は脳室表層に存在する上衣細胞がもつ繊毛に由来することがわかった。脳室に満たされている脳脊髄液は、睡眠時に脳内不要物質のクリアランスに寄与しているとの報告があるため、この知見は睡眠に関連する脳内病態をラベルフリーで可視化できる可能性がある。以上のように、フォワード分子機能イメージングにより、“仮説を立てない(仮説探索型)研究スタイル”の特徴を活かすことで、従来のイメージングでは得られない新しい発見が導かれた。本知見は、睡眠のメカニズム解明に関する新しい知見を得るために鍵となるオルガネラのラベルフリー描出を実現した可能性がある [Murakami *et al.*, *bioRxiv* (2024)].

4.2. 後方散乱 CARS 顕微鏡の開発と生細胞イメージング

睡眠中のマウスの脳を評価するためには、レーザー光の照射と信号光の検出を同一の対物レンズで行う必要がある。このような信号検出配置を後方散乱配置と呼ぶ。CARS は位相整合条件のためレーザーの入射方向に強い信号が発生するが、生体組織による散乱のため、一部の信号光が後方に散乱される。本研究では、この後方散乱 CARS 信号の検出を行うセットアップを新たに立ち上げた。日・仏・蘭の三国間国際共同研究により、新規装置の立ち上げとそれを用いた生細胞のイメージングを行い、睡眠中のマウスの *in vivo* ラベルフリー測定への道を開いた [Murakami *et al.*, *Optics Continuum* 2: 2044 (2023)].

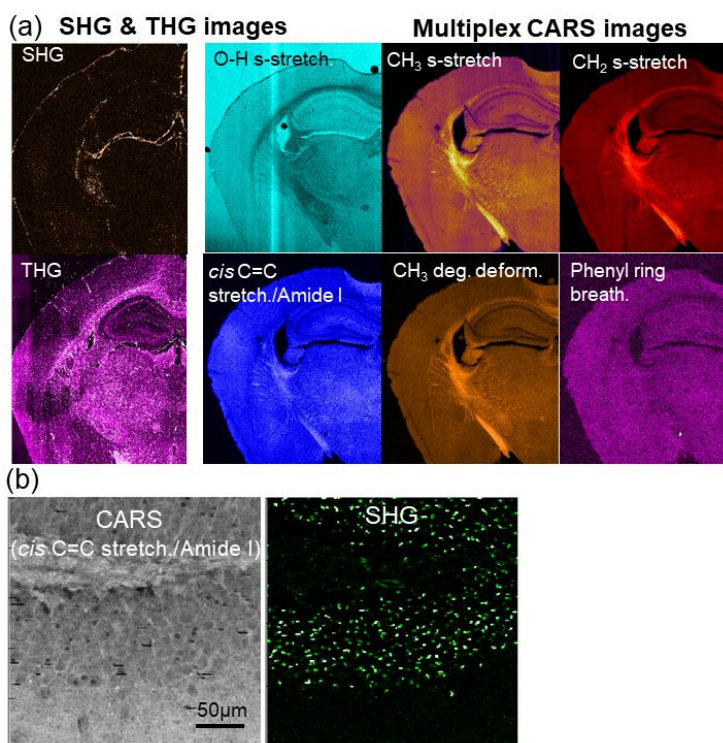


図 1(a) マウス脳スライス切片の全域非線形光学イメージング (Murakami *et al.*, *SPIE BiOS* (2022).), (b) マウス脳歯状回におけるイメージング

4.3. ALA ニューロンの細胞内 Ca^{2+} ダイナミクスが与える線虫への睡眠制御

起きている時間が長いほど、その後に長時間の睡眠や深い睡眠が誘導されやすいことが良く知られ、「睡眠恒常性」とよばれるが、その機構は良く分かっていなかった。本研究では線虫において、睡眠を促す神経細胞を同定した[Miyazaki *et al.*, *iScience* 25(6):104452 (2022)]。この細胞には、それまで起きていた時間に応じて細胞内のカルシウムイオン濃度が上昇する性質があることも判明し、「睡眠恒常性」の分子機構を解明するための重要な手がかりを与えるものと期待される。

4.4. ER プロテオスタシス制御因子による細胞非自律的睡眠制御

体の疲れがどのようにして睡眠を引き起こすのか、という仕組みはよく分かっていなかった。本研究では、線虫とマウスという2種類の動物を用いた研究から、活発に働いた組織の細胞内の小胞体に不良品タンパク質がたまること(小胞体ストレス)が睡眠のトリガーとなることを明らかにした。さらに、その際に睡眠を促す分子として PERK や eIF2 α を特定した[Kawano *et al.*, *Cell Reports* 42(3):112267 (2023)]。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Miyazaki Shinichi, Kawano Taizo, Yanagisawa Masashi, Hayashi Yu	4. 巻 25
2. 論文標題 Intracellular Ca ²⁺ dynamics in the ALA neuron reflect sleep pressure and regulate sleep in <i>Caenorhabditis elegans</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 104452 ~ 104452
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.104452	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 -
1. 著者名 Kawano Taizo, Kashiwagi Mitsuaki, Kanuka Mika, Chen Chung-Kuan, Yasugaki Shinnosuke, Hatori Sena, Miyazaki Shinichi, Tanaka Kaeko, Fujita Hidetoshi, Nakajima Toshiro, Yanagisawa Masashi, Nakagawa Yoshimi, Hayashi Yu	4. 巻 42
2. 論文標題 ER proteostasis regulators cell-non-autonomously control sleep	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 112267 ~ 112267
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2023.112267	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 -
1. 著者名 Murakami Yusuke, Masaki Minoru, Miyazaki Shinichi, Oketani Ryosuke, Hayashi Yu, Yanagisawa Masashi, Honjoh Sakiko, Kano Hideaki	4. 巻 13
2. 論文標題 Spectroscopic second and third harmonic generation microscopy using a femtosecond laser source in the third near-infrared (NIR-III) optical window	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedical Optics Express	6. 最初と最後の頁 694 ~ 694
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1364/BOE.446273	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 Murakami Yusuke, Ando Masahiro, Imamura Ayako, Oketani Ryosuke, Leproux Philippe, Honjoh Sakiko, Kano Hideaki	4. 巻 0
2. 論文標題 Molecular Fingerprinting of Mouse Brain Using Ultrabroadband Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS) Microspectroscopy Empowered by Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares (MCR-ALS)	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Chemical & Biomedical Imaging	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/cbmi.4c00034	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

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 加納英明
2. 発表標題 フォトニック結晶ファイバーによるスーパーコンティニューム光発生 ~CARS分光イメージングへの応用~
3. 学会等名 電子情報通信学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村上優介, 宮崎慎一, 本城咲季子, 加納英明
2. 発表標題 マウス脳スライスの全域ラベルフリーCARS分光イメージング
3. 学会等名 第16回分子科学討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加納英明
2. 発表標題 マウス脳組織のラベルフリー・マルチモーダル非線形光学イメージング
3. 学会等名 日本分光学会年次講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hideaki Kano
2. 発表標題 Toward constructing label-free mouse brain atlas using nonlinear Raman spectroscopic imaging
3. 学会等名 15th International Symposium on Nanomedicine（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hideaki Kano
2. 発表標題 Ultrabroadband CARS spectroscopic imaging using a sub-1-MHz supercontinuum light source
3. 学会等名 -TECH DAYS (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hideaki Kano, Philippe Leproux
2. 発表標題 Multiplex CARS microspectroscopy in the “long-pulse” regime: where are we now?
3. 学会等名 SPIE Photonics West (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yusuke Murakami, Shinichi Miyazaki, Damien Boildieu, Zakaniaina Rajaofara, David Helbert, Amandine Magnaudeix, Philippe Carre;, Philippe Leproux, Sakiko Honjoh, and Hideaki Kano
2. 発表標題 Toward Whole Brain Label-free Molecular Imaging with Single-cell Resolution Using Ultra-broadband Multiplex CARS Microspectroscopy
3. 学会等名 SPIE Photonics West (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

加納研究室ウェブサイト https://kanolab.jp/
--

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	桶谷 亮介 (Oketani Ryosuke) (00908890)	九州大学・理学研究院・助教 (17102)	
研究分担者	本城 咲季子 (Honjoh Sakiko) (30551379)	筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・助教 (12102)	
研究分担者	林 悠 (Hayashi Yu) (40525812)	筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・客員教授 (12102)	

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			
フランス	Limoges University			
オランダ	Groningen University			