

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23657106

研究課題名(和文) 第二高調波イメージングの応用による神経生理機能解析

研究課題名(英文) Characterization of neuronal physiology by second harmonic generation imaging

研究代表者

塗谷 睦生 (Nuriya, Mutsuo)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：60453544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：光第二高調波(SHG)イメージングは、これまでの手法では不可能であった生理現象の可視化能を持つにも関わらず、生体への応用が限られていた。本研究では色素の改良および応用領域の開拓の両面からSHGの生体イメージングへの展開を模索した。本研究により、既存の物とは全く異なるSHG専用色素が開発され、脳のアストロサイトと呼ばれる細胞がSHGイメージングの重要な対象となる事が明らかになった。今後の更なるSHG専用色素の開発とアストロサイトへの応用により、解析技術としてのSHGイメージングの更なる発展と、脳におけるアストロサイトの機能発現の理解が飛躍的に進むものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Despite its unique potential to visualize biological phenomena that can hardly be achieved by other means, applications of second harmonic generation (SHG) imaging to biological researches had remained unexplored. In this study, we tried to overcome this problem by searching for novel SHG dyes as well as new biological targets to apply SHG imaging. We successfully developed new SHG dyes based on unprecedented concepts and found that astrocytes play crucial roles in the brain functions by virtue of their unique cellular characteristics, making astrocytes ideal and important new targets of SHG imaging. Further development of SHG dyes and their applications to SHG imaging of astrocytes are expected to contribute to the development of SHG imaging as well as the cellular understandings of astrocytes in the brain.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：第二高調波発生 2光子顕微鏡 神経細胞 グリア細胞 SHG イメージング

1. 研究開始当初の背景

我々の複雑な精神機能を支える脳の動作原理の理解は、現代科学に残された最大の課題の一つである。正常な脳機能の理解およびその障害に対する医療の発展のためには、脳細胞の基礎的な理解が必要不可欠となる。特に、脳の情報伝達という観点からは、電位情報伝達を担う神経細胞、そしてそれに併せて近年その生理・疾患条件下における重要性が着目されるようになったグリア細胞の生理機能の理解が必須となる。しかしここで神経細胞・グリア細胞共に非常に複雑で微細な構造を持ち、更に侵襲的な操作に対して非常に弱いという性質から、その生理・病理学的な解析が非常に困難であった。これに対し2光子顕微鏡は空間分解能・組織浸透性が高くまた細胞毒性も低い事から、その神経細胞への応用以来、神経科学の分野に革新的な知見を多くもたらして来た。しかしその応用はほとんどが一般的な2光子励起現象を応用したものに限られ、1光子を用いた共焦点顕微鏡の特性を飛躍的であるにせよ延長したというものに限られてきた。

これに対し、同じ2光子現象であっても第二高調波発生 (Second Harmonic Generation: SHG) はその性質が抜本的に異なるものであり、1光子の共焦点顕微鏡とは全く異なる現象を可視化できる可能性を秘めている。実際、SHG イメージングは様々な生物現象をラベリングせずに特異的に可視化するものとして、その応用が試みられてきた。特に、コラーゲン繊維など内在性のタンパク質からのSHGシグナルを用いた組織イメージングの研究は、非侵襲的組織診断への応用の期待と共に進められてきた。しかし、神経科学の分野においてはその応用は未だに非常に限られていた。ここで、研究代表者らはこれまでSHGイメージングの神経生理学研究への応用を試みてきた。特に従来の電極による計測が困難であり、それが故に謎に包まれてきた神経細胞細部における膜電位変化をSHGにより定量的に可視化し計測する事に成功した。

しかしこのように非常に高い可能性を持ったSHGイメージングもその用途は限られたものであり、また他のイメージング法に比べて精度も十分とは言えないのが現状であった。SHGイメージングが生物学の研究においてより有効に用いられその力を発揮するためには、抜本的な技術の改良とより広範な生命現象の解析への応用による有用性の検証が必要であった。

2. 研究の目的

本研究は上記のような背景を踏まえ、これまでに培ってきた技術と知見を活かしてSHGイメージングの抜本的な改良と更なる生命現象への応用を試み、神経科学に残された謎に挑むと共に新たなSHGイメージングの展開を模索する事を目的とした。

まず色素の導入による外因性SHGを用い、

細胞内カルシウム・イメージングとの融合による電位・カルシウム同時イメージングと、2光子アンケーシングによる局所刺激との融合による2光子刺激・観測、の二つの系の確立を図った。そして更なるSHGイメージングの神経科学への応用を開拓するため、内因性SHGシグナル観測をこれまでに我々が開発してきた様々な病態モデルに適用する事、更に重要性が認識されながらその生理機能の多くが謎に包まれたグリア細胞にSHGイメージングを応用する事を試みた。

3. 研究の方法

本研究では既存、或いは新規の色素を用い、これを培養細胞、或いはマウスから調製する急性脳スライス細胞に導入し、それを2光子顕微鏡下で観測・解析した。

2光子顕微鏡観測は、Newport社製MaitaiHP超短フェムト秒レーザーを搭載したオリンパス社製FV1000MPEシステムを用いた。レーザーはこれまでの研究から細胞毒性が少ない事を確認した1,000nmの波長に合わせたものを用い、この照射から得られる500nmのSHGシグナルをバンドパス・フィルターにより取得し、500nmより長波長で得られる2光子励起蛍光シグナルを赤色付近のバンドパス・フィルター(570-625nm)により検出した。

SHGイメージングの観測対象試料としては、基礎的な実験においては均一な細胞集団を得るため、カバーガラスの上で培養したCHO (Chinese Hamster Ovary)細胞を用いた。色素としては、これまでにSHGイメージングでの実績のあるFM4-64を標準色素として用い、研究協力者らにより新たに合成された色素群の応用を試みた。

また、応用研究にはビプラトーム (Leica社製VT1200S)により300 μ mの厚さで調製したマウス大脳皮質急性脳スライスを用い、その中に存在するグリア細胞をSulforhodamine 101色素により同定して研究を進めた。

4. 研究成果

これまで行われてきたSHGイメージングは既存の色素を用いたものであるが、これらの色素は蛍光特性を基に開発されたものであるため、SHGシグナルに増して強い蛍光シグナルを発する。この蛍光シグナルはカルシウム・イメージングなど他の蛍光画像取得時のシグナルに夾雑し、よって純粋なSHGおよび他のシグナルの同時検出は非常に困難である事が明らかとなった。つまり、本研究の目的の一つとなるSHGイメージングとカルシウム・イメージングなどとの同時イメージングのためには、蛍光を発さないSHG専用色素の開発と応用が不可欠であると考えられた。

そこで、本研究ではこのような色素の開発を目指し、これまでに合成されてきた蛍光特性の低い色素や新たな色素のSHGイメージングへの応用を模索した。その結果、2光子励

起蛍光を最小限に抑えたまま SHG シグナルを発する、新たな「無蛍光性 SHG 専用色素」の開発に成功した。これは、これまでの蛍光特性を主眼に置いて開発された色素とは抜本的に異なる新しいイメージング色素であり、このような概念に基づいて合成された色素としては世界でも初めてのものと考えられた。この色素を用いる事により、蛍光シグナルの無い純粋な SHG イメージングが可能となる事が明らかとなり、今後カルシウム・イメージングを含む様々な蛍光イメージングとの併用による正確なマルチモーダル・イメージングが初めて可能になるものと期待された。そして今回開発された色素をプロトタイプとして今後の開発を進める事により、更に優れた SHG 専用色素の開発と応用が可能となる事が強く期待された。

SHG イメージングの発展のためには、上記のような色素の開発から始まる手技の改良と共に、多様な生命現象への応用性が鍵を握る。ここで、これまでに我々は SHG イメージングの神経細胞への応用を試みてきたが、近年神経細胞と同様に重要であるとさえ提唱されるようになってきたグリア細胞に関しては、まだ世界的にも応用がなされて来なかった。そこで、グリア細胞への SHG イメージングの応用に向け、グリア細胞の中でも特にその生理学的機能が着目されているアストロサイトに関し、SHG イメージングによる電位計測の可能性の検討を行った。ここで、アストロサイトに関しては神経細胞と異なり、電位情報伝達を考える手がかりとなる細胞内情報伝達機構そのものが謎に包まれていた。そこで、まずこのような基礎的な性質の解析を、主に 2 光子励起蛍光イメージングを用いて行った。ここから、アストロサイトの足突起と呼ばれる血管周囲を取り巻く構造が細胞内外の分子の拡散を制限する非常に重要な役割を果たす事や、アストロサイトが虚血時の脳組織の保護に重要な働きをする事などが明らかとなった。これらはアストロサイトの生理学的重要性と、その機能発現時における細胞細部、特に足突起の重要性を示すものとなった。特に、足突起の細胞内コンパートメントとしての性質は、これらアストロサイト細胞内微細構造が電位情報伝達において重要な役割を果たす事を初めて示唆するものとなった。ここで SHG イメージングはこのような細胞の微細構造における定量的膜電位イメージングを可能にする唯一の手段と考えられるため、これらの結果はアストロサイトが SHG イメージングの重要な応用対象となる事を示すものとなった。

今後の更なる SHG 専用色素の開発とアストロサイトへの応用により、解析技術としての SHG イメージングの更なる発展と、アストロサイトの機能発現の細胞生物学的機構の解明が飛躍的に進むものと期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

(1) Shinotsuka T, Yasui, M and Nuriya M., Astrocytic gap junctional networks suppress cellular damage in an in vitro model of ischemia.

Biochem Biophys Res Commun., 査読有、444 (2)、2014 年、171-6.

DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.01.035.

(2) 塗谷 睦生

「生体試料における Second Harmonic Generation イメージング」

生体の科学、査読無、64 (6)2013 年、545-50.

(3) Nuriya M., Momotake A, Kimura Y, Yasui M, Kasai H and Arai T.

Evaluation of dialkylaminofluorene-based hemicyanine dyes for second harmonic generation imaging by the direct comparison approach.

Bull. Chem. Soc. Jpn., 査読有、86 (10)、2013 年、1190-2.

DOI: 10.1246/bcsj.20130094

(4) Nuriya M and Yasui M.

Endfeet serve as diffusion-limited subcellular compartments in astrocytes.

J. Neurosci., 査読有、33(8)、2013 年、3692-8.

DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3050-12.2013.

(5) Nuriya M., Shinotsuka T and Yasui M.

Diffusion properties of molecules at the blood-brain interface: potential contributions of astrocyte endfeet to diffusion barrier functions.

Cerebral Cortex、査読有、23 (9)、2013 年、2118-2126.

DOI: 10.1093/cercor/bhs198.

(6) 塗谷 睦生

「神経細胞における電位情報伝達のイメージング」

レーザー研究、査読無、40 (4)、2012 年、224-9.

(7) 塗谷 睦生

「2 光子顕微鏡の神経科学研究への応用：分子から個体までを繋ぐ病態解明への新たな光として」

実験医学増刊号「心とからだのクロストーク 精神・神経疾患のメディカルサイエンス」、査読無、30 (13)、2012 年、107-11.

[学会発表](計 10 件)

(1) 篠塚崇徳, 安井正人, 塗谷睦生
アストロサイトのギャップジャンクション
によるネットワークは虚血ダメージを軽減
する
第87回日本薬理学会年会, 2014年3月19日,
仙台

(2) 塗谷睦生
「アストロサイト足突起における情報伝達
様式 ~ 神経血管連関の細胞生物学的基盤
の理解に向けて~」
第2回 Neurovascular Unit 研究会, 2014年
1月25日、東京

(3) 塗谷睦生
「光第二高調波イメージングの生命科学研
究への応用 ~ 神経細胞における定量的膜
電位イメージング~」
応用物理学学会・量子エレクトロニクス研究会,
2013年12月21日、軽井沢

(4) 篠塚崇徳, 塗谷睦生, 安井正人
アストロサイトのギャップジャンクション
によるネットワークは虚血ダメージを軽減
する
日本神経科学学会年会, 2013年6月21日,
京都

(5) Shinotsuka T, Yasui M, Nuriya M
Astrocytic gap junctional networks
suppress cellular damages in an in vitro
model of ischemia
Annual Meeting of Society for Neuroscience,
2013年11月13日、San Diego (USA)

(6) 塗谷睦生
「アストロサイト細胞内外における分子動
態解析が明らかにするグリア・血管相互作用
様式」
第86回日本薬理学会年会, 2013年3月22日,
福岡

(7) 塗谷睦生
「血液脳関門での物質拡散抑制機能に対し
るアストロサイト足突起の寄与」
第85回日本薬理学会年会, 2012年3月14日,
京都

(8) 塗谷睦生
光第二高調波イメージングの生理学研究へ
の応用
平成23年度生理研研究会「神経活動の光操
作」, 2011年9月30日、岡崎

(9) Mutsuo Nuriya
“Application of two-photon microscopy in
physiology”
7th Congress of the Federation of Asian and
Oceanian Physiological Societies, 2011年

9月13日、台湾

(10) 塗谷睦生
「第二高調波イメージングの生理学研究へ
の応用」
日本顕微鏡学会第67回学術講演会, 2011年
5月16日、福岡

〔図書〕(計 1件)

(1) Nuriya M & Yuste R (2013) Imaging
membrane potential with second harmonic
generation. A book chapter in “Second
Harmonic Generation Imaging” Taylor and
Francis. 229-244.

〔産業財産権〕
出願状況(計 1件)

(1)
名称: 光第二高調波発生化合物、光第二高調
波発生色素組成物及び細胞検査方法
発明者: 塗谷睦生、安井正人、新井達郎、百
武篤也、福嶋瞬
権利者: 学校法人慶應義塾
種類: 特許
番号: 特願 2013-109179
出願年月日: 2013年5月23日
国内外の別: 国内

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
塗谷グループのホームページ
[http://web.keio.jp/~nuriya/main/homepag
e.html](http://web.keio.jp/~nuriya/main/homepage.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者
塗谷 睦生 (Mutsuo Nuriya)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号: 60453544

(2) 研究分担者 なし
()
研究者番号:

(3) 連携研究者 なし
()
研究者番号: