

マウス頭部に小さな実験室を作る「ラボ・オン・ブレイン」を開発 ～生きた神経細胞のシナプスを53日間観察～

1. 発表者:

- 一木隆範 (東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻/総合研究機構 准教授)
河西春郎 (東京大学大学院医学系研究科 教授)
竹原宏明 (奈良先端科学技術大学院大学特任助教、東京大学大学院工学系研究科(当時))
長岡 陽 (東京大学大学院医学系研究科特任研究員、東京大学医学系研究科博士課程大学院生(当時))
野口 潤 (東京大学大学院医学系研究科 助教)
赤木貴則 (東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻 特任講師)

2. 発表のポイント

- ◆生きているマウスの頭部に搭載可能で微生物感染や炎症を防ぎながら、神経細胞に光や薬物の刺激を加えたり、除いたりできるマイクロオプト流体デバイス(注1)を開発
- ◆生きているマウスの神経細胞の単一スパインシナプス(注2)に刺激を与えた後、シナプス強度(シナプス伝達の強さ)の指標の変化を、数日に亘って直接観察することに初めて成功
- ◆記憶学習のメカニズムの解明、統合失調症や躁うつ病などの治療研究への応用に期待

3. 発表概要:

東京大学大学院工学系研究科の一木隆範准教授らと同医学系研究科の河西春郎教授らの研究グループは、マウスの頭部上に搭載する小さな実験室「ラボ・オン・ブレイン」を世界で初めて開発し、生きているマウスの神経細胞の活動を53日間に亘り観察することに成功しました。昨今の研究トレンドである省エネルギー・省物質の「ラボ・オン・チップ」の、生体への応用を実現しました。

脳機能や脳疾患を解明するには、生きた脳で神経細胞を調べる必要があります。しかし、脳内へ直接試薬を投与するなどの実験操作を不用意に加えると、脳は容易に損傷して本来の機能が失われる可能性があります。そのため、本研究グループは、生きている脳の観察を強力に支援し、脳と外界を仲介するインターフェイス機能を備えたマイクロオプト流体デバイス(図1)を開発しました。

本デバイスは観察用ガラス窓や髪の毛の毛程度の細い試薬用流路を備えています。このデバイスと2光子レーザー顕微鏡(注3)を用いることで、脳機能に密接に関わる神経細胞の棘状突起構造「スパインシナプス」のわずかな構造変化を、1カ月以上、継続して観察できました。さらに、脳組織へ光解離性試薬(注4)を注入しながら、レーザー光でこの試薬を分解してシナプス可塑性(注5)刺激を繰り返し与えたところ、シナプス強度の指標となるスパインの形態の変化を任意のスパインシナプスに生じさせることに成功し、さらにその変化が数日以上持続することを世界で初めて確認しました。

このデバイスの実現に用いられた技術は、記憶・学習などの脳機能の解明や、統合失調症・躁うつ病など、脳の機能不全疾患の治療研究への応用が期待されます。なお、本成果は、英国科学誌「Scientific Reports」(電子版:英国時間10月22日(水))に掲載されました。

4. 発表内容:

【研究の背景】

神経細胞同士のコミュニケーションを精密に測る手法は、脳の機能を解明するために非常に役立っています。近年著しく発展した2光子レーザー顕微鏡を用いると、脳組織をシナプス(1マイクロメートル未満)レベルの高い解像度で観察できます。こうした光学顕微鏡技術を用いて脳組織を計測する方法は、脳に電極を差し込む従来の電気生理学的な手法と比較して、下記の点で優れています。

1. 脳にダメージを与えにくい
2. 空間情報と時間情報を同時に取得できる
3. 遺伝子などによって特定の神経細胞に印を付け、対象を絞った観察ができる
4. オプトジェネティクス技術(注6)や光解離性試薬を用いることができるなど、自由度の高い実験が行える

その反面、頭蓋骨は光を通さないため、光学顕微鏡技術で動物の脳組織中の神経細胞を観察するには、頭蓋骨を外科的に切除しなくてはなりません。脳脊髄液の流出や細菌感染などにより脳機能を障害することなく簡便に光学顕微鏡を用いた動物実験を行う技術革新は産業界のみならず医学研究分野からも需要があり、ここ10年間でこれらの技術課題を解決するために、世界中でさまざまな研究が精力的に進められています。さらに、当研究グループを中心に光学顕微鏡技術と光解離性試薬を組み合わせることにより、人為的にスパインシナプスを刺激し、記憶学習の生理的な基盤と考えられているスパイン形態の変化を生じさせることも主に培養された神経細胞を用いて可能となっています。この刺激技術は、脳組織中の神経細胞のダイナミックな活動を解き明かす強力な手法と期待されています。しかし、スパイン形態の変化を生体脳内で生じさせることができるか、また、その変化がどの程度持続するかはこれまで報告されていませんでした。

【具体的な研究内容・成果】

研究グループは、マウスの頭部に搭載可能なマイクロオプト流体デバイス(図1)を開発し、生きているマウスの脳の神経細胞を観察すること、脳への試薬の直接投与を可能にする新たな研究手法「ラボ・オン・ブレイン」を確立しました。微細加工技術(注7)を駆使して作製したデバイスの大きさは約3mm、1円硬貨の1/7(1セント硬貨の1/6)程度です。脳と外界の間で、神経細胞の刺激や形態観察を行うために必要な光や試薬の出し入れを仲介するインターフェイス機能を果たします。

これまで脳組織に実験試薬を投与する場合、一般的にカニューレ(注8)が用いられてきましたが、生体を傷つけるだけでなく、顕微鏡観察の妨げとなります。そこで研究グループは、光学観察と試薬の投与を同時に実現する方法の開発を試みました。手術が容易になることも考慮し、まず、酵素で硬膜を部分的に柔軟にして、手術時の脳組織への機械的な刺激を極力減らした、生体を傷つけにくいデバイス設置手術法を開発しました。この手術法により、頭蓋骨・硬膜を除去し、デバイスを装着して人工脳脊髄液が流出しても、マウスの脳組織に炎症が起こらず、本来の状態を維持したまま、神経細胞の機能を評価できるようになりました。

次に、生体組織を2光子レーザー顕微鏡で観察するためには、画像がブレないように、生体組織の拍動を抑えなくてはなりません。頭蓋骨に固定したデバイスには、観察する部位の拍動を機械的に抑える仕組みがあり、マイクロメートル(マイクロメートルは100万分の1メートル)以下の高解像度で、神経細胞の樹状突起にある棘状の微小構造「スパインシナプス」を観察することができました(図2a)。また、デバイスを搭載しても脳組織からの出血や細菌感染が起こらず、デバイス観察用の窓がくもらずに透明な状態が持続し、生きた脳組織中でスパインシナプスが形成されたり消滅したりしながら神経細胞が構造を変化させていく様子を53日以上もの長期間に亘り追跡観察することに成功しました(図2b)。さらに、デバイスを用いて脳組織へ注入した光解離性試薬をレーザー光で解離させて、任意

のスパインシナプスにシナプス可塑性刺激を与え、スパインシナプスの形態変化を生じさせることに成功しました。そして、その形態変化が2日間以上持続することを世界で初めて観察しました(図3)。このスパインシナプスの形態変化は、シナプス強度の変化を示しており、学習や記憶の持続や忘却といった脳の機能に密接にかかわると考えられています。

【研究成果の重要性】

生きている脳の観察を強力に支援するマイクロオプト流体デバイスを開発し、脳に試薬を導入しながら2光子レーザー顕微鏡を用いて刺激を与え、神経細胞の状態変化を長期的に観察できるようにしました。これにより、神経細胞の形態変化と動物の行動を関連付ける、脳機能の解明に不可欠な研究が可能となります。このデバイスは、モデルマウスを用いた脳疾患研究への有用性が高い可能性があります。本研究グループが開発した、実験室の機能をマウスの頭部に搭載する新たな研究手法「ラボ・オン・ブレイン」が、記憶や学習機能といった脳機能の解明と、神経細胞の形態異常に起因する疾患の病因解明と治療法開発に大きく貢献すると期待されます。

なお本研究は、文部科学省「ナノテクノロジー・材料を中心とした融合新興分野研究開発」(ナノバイオ・インテグレーション研究拠点の形成)、文部科学省科学研究費補助金 特別研究員奨励費(22-8063)、基盤研究(C)(22510124)、新学術領域研究(26430005, 26111706)、特別推進研究(21000009)、及び Research Grant from the Human Frontier Science Program の支援を受けて行われました。

5. 発表雑誌:

雑誌名: Scientific Reports (2014年10月22日オンライン)

論文タイトル: Lab-on-a-brain: Implantable micro-optical fluidic devices for neural cell analysis *in vivo*

著者: Hiroaki Takehara, Akira Nagaoka, Jun Noguchi, Takanori Akagi, Haruo Kasai and Takanori Ichiki

DOI 番号: DOI: 10.1038/srep06721

6. 問い合わせ先:

一木 隆範

東京大学 大学院工学系研究科 バイオエンジニアリング専攻 准教授

7. 用語解説:

(注1) マイクロオプト流体デバイス

光学顕微鏡により生体組織を観察するための観察用ガラス窓と、脳組織へ薬剤を投与するための微小流路を備えたデバイス。半導体微細加工技術によりチップ上に形成した微小流路中でナノ及びピコリットルのスケールの微小流体を取り扱う技術であるマイクロ流体デバイス技術を応用している。

(注2) スパインシナプス

神経細胞樹状突起上の微小構造であり、シナプスを形成している部位。スパインシナプスの機能や大きさの変化が、記憶の持続や忘却、適応性や創造力など多くの精神現象と関係していると考えられている。

(注3) 2光子レーザー顕微鏡

生体組織中の細胞を高い解像度で観察することが可能な光学顕微鏡。可視光よりも波長の長い近赤外光を用いており、光が生体組織深くまで透過する点、生体への侵襲性が少ない点に優れている。

(注4) 光解離性試薬(ケイジド試薬)

光を照射することにより構造が変化し、生理活性物質などの化合物を解離して生体内に放出する試薬。2光子レーザー顕微鏡を使って局所的な領域にのみ光を照射することで、局所的に生理活性物質が放出され、細胞を刺激することができる。

(注5) シナプス可塑性

シナプスにおける神経伝達物質受容体の数が増加することなどにより、そのシナプスにおける電気的な伝達効率に変化が生じること。樹状突起上にトゲ状の形態として観察されるスパインシナプスにおいては、スパイン体積と伝達効率に正の相関があることが知られている。

(注6) オプトジェネティクス(光遺伝学)

光学と遺伝子工学の方法論を融合させて、神経回路の機能を調べる研究分野。例えば、光感受性タンパク質を神経細胞内で人為的に合成させ、外部から局所的に光を照射することにより、特定の細胞の機能を自由に制御することが可能になる。

(注7) 微細加工技術

目に見えない非常に微細なパターンや構造を形成するための加工技術。電子回路を集積化した半導体チップの製造技術として発展してきた。

(注8) カニューレ

薬液の注入や体液の排出のために、生体内に挿入するパイプ状の医療器具。

8. 添付資料:

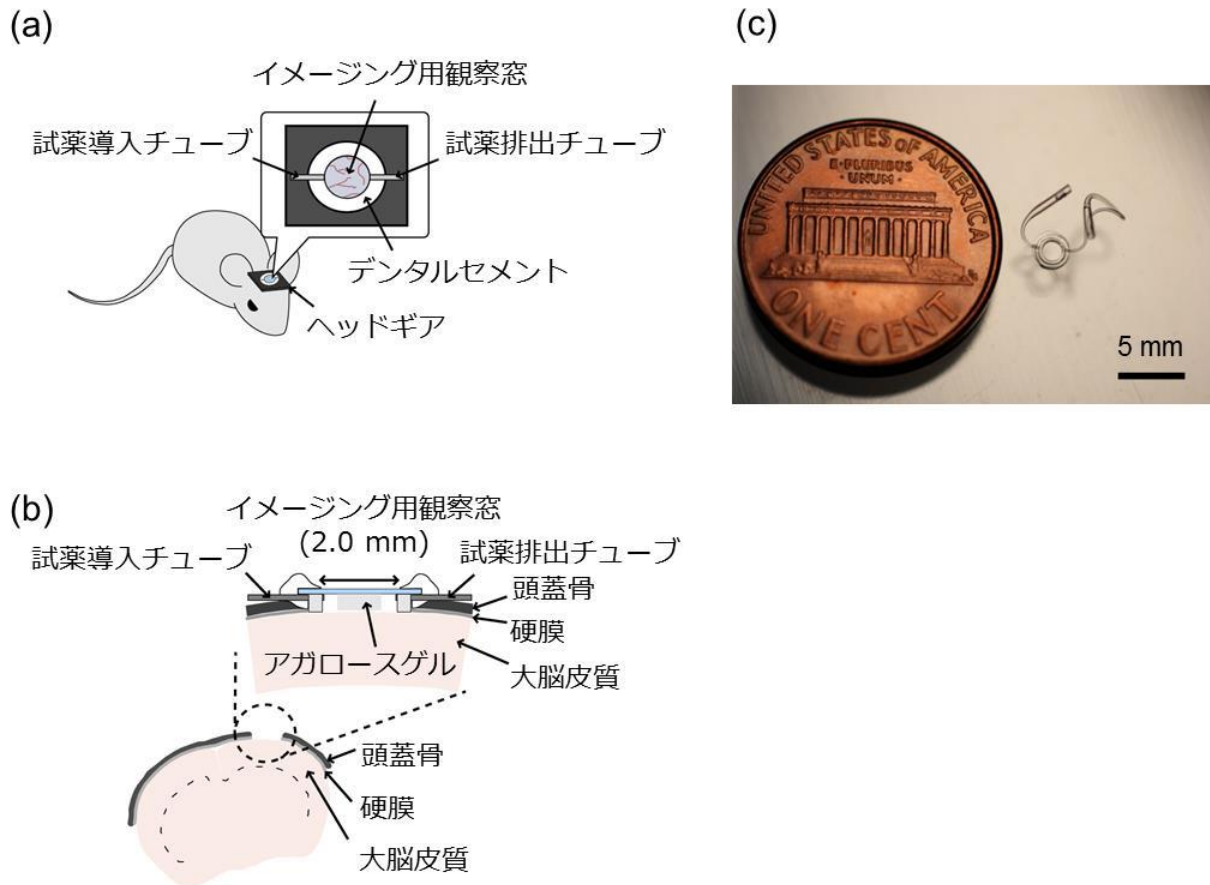


図1 本研究で開発したマウス頭部に搭載可能なマイクロオプト流体デバイス(注1)

(a) デバイスを搭載したマウスの概略図。光学窓を通して大脳皮質を観察することができます。試薬導入チューブ、排出チューブを通じて、外界と脳の間で薬物の出し入れすることができます。(b) マウスの頭部上に固定されたマイクロオプト流体デバイスの断面模式図。頭蓋骨に開けた直径 2.7 ミリメートルの穴を塞ぐようにマイクロオプト流体デバイスは埋め込まれています。2光子顕微鏡を用いると、デバイスの観察窓を通して、脳の深部の神経まで高解像で観察することができます。(c) マイクロオプト流体デバイスは、直径が 2.7 ミリメートル、厚さが 450 マイクロメートルと小さく、マウスの負担にならない大きさに設計されています。

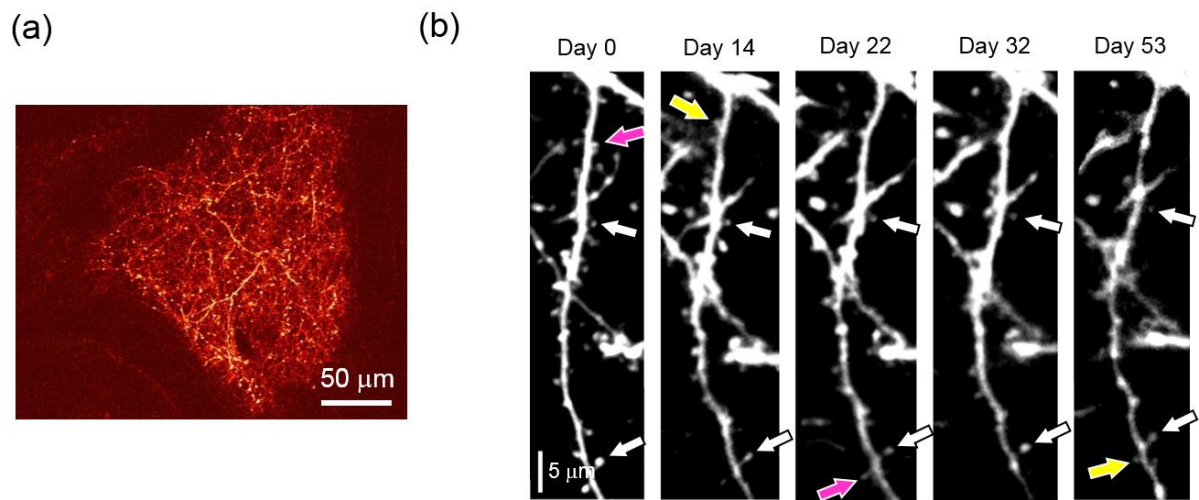


図2 マウス脳神経細胞の顕微鏡写真

(a)脳の中でネットワークを形成する神経細胞 (b)神経細胞樹状突起の長期観察。スパインシナプス(注2)の形成(黄色矢印)や消滅(マゼンタ矢印)の様子が観察された。

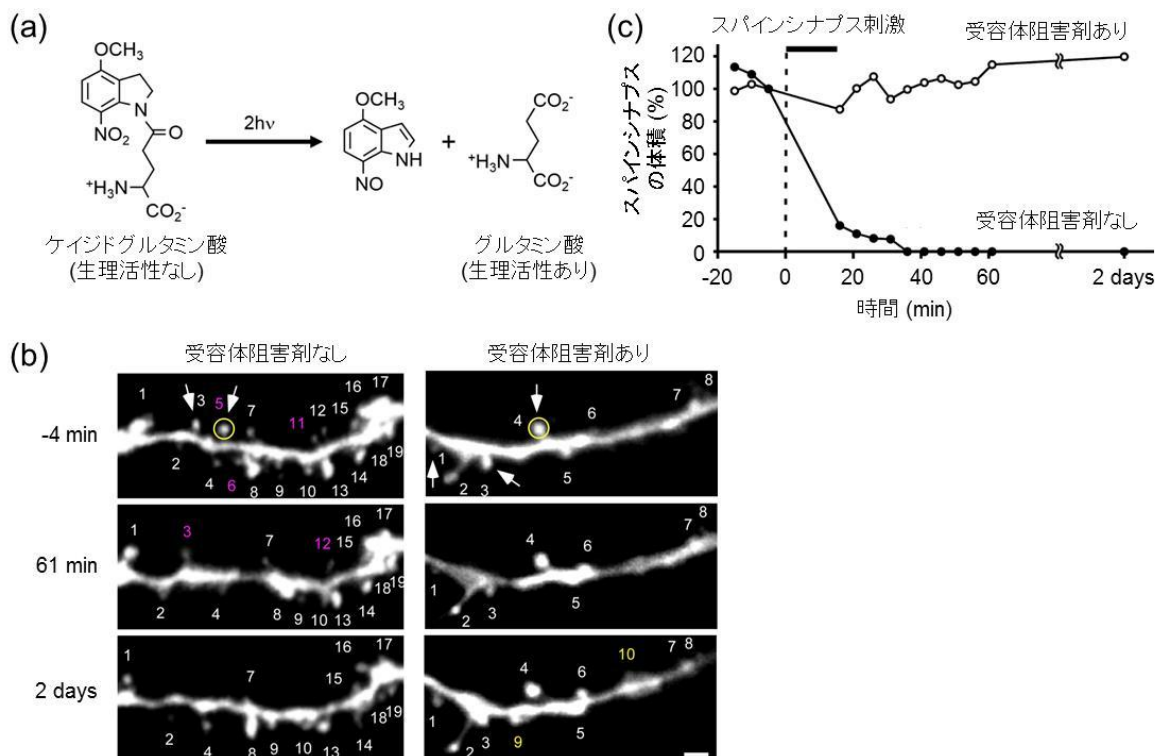


図3 2光子光解離反応を利用して、特定のスパインシナプス(注2)に人為的に繰り返し刺激を与えた後、シナプスの形状変化が経日的に持続することを初めて確認した。これは長期抑圧(LTD: Long-term depression)として知られる、シナプスの学習効率が長期にわたって減弱する可塑性現象を再現し、観察できたものと示唆される。なお、長期抑圧は学習や記憶に関わる重要な現象。

(a)光解離性試薬(ケイジドグルタミン酸)の光分解反応により神経活性物質であるグルタミン酸が生じます。光を局所的に照射することのできる顕微鏡と併せて用いると、任意の場所でグルタミン酸を発生させることができます。(b)光分解によりグルタミン酸を生成し、シナプスに刺激を与える実験の結果。白い矢印で示されたスパインシナプスに刺激が与えられました。刺激前(-4 min)、刺激してから1時間後(61min)、2日後の神経細胞の様子が2光子顕微鏡により、撮影されました。左列は、受容体阻害剤がない状態、右列は阻害剤がある状態で行われたものです。阻害剤がある場合には、神経活性物質が存在しても細胞は応答しません。つまり、レーザー照射が原因で神経細胞の構造変化が起きたのではないことを示すための対照実験です。グルタミン酸で刺激されたスパインシナプスが収縮し、ほぼ消失している様子が捉えられています。(c)写真中で黄色の円で囲まれたスパインシナプスの体積の時間変化を数値で示したものです。