

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「統合 1 細胞解析のための革新的技術基
盤」

研究課題「非標識神経伝達物質イメージセンサに
よる細胞活動可視化システム構築と脳機能の時空
間解析」

研究終了報告書

研究期間 2014年10月～2020年3月

研究代表者：澤田和明
(豊橋技術科学大学大学院
工学研究科、教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

細胞外の複数種類の神経伝達物質を、時空間情報を維持したまま非標識に観察できるイメージセンサシステムの開発をおこなった。時間分解能 0.52msec, 空間解像度 2 μ m, ノイズレベル 0.1pH 以下で駆動できるイメージセンサ, および駆動システムが完成した。本センサ, およびセンサシステムは(2019年9月時点)世界で最も微小領域のイオン分布計測が可能であり, 最も高速に動作するイオンセンサアレイである。また, センサアレイのばらつきや不良率に関しても他の報告(N.Moser et al., IEEE Trans. Biomedical Circuits and System Vol.12, 2018)に比べて優れている結果である。本システムを生理学研究研, 山梨大学の応用グループにセンサ及びシステムを提供した。これらのセンサ製造技術は浜松ホトニクスにライセンスの許諾契約を実施し, 計測装置は東朋テクノロジー株式会社にライセンスの許諾契約を実施し技術移転を進め, 販売ができる体制を整えることができた。

豊橋技術科学大学において, ATP, 乳酸, グルタミン酸, GABA の神経伝達物質の動画像を非標識で取得する技術の確立や複数種類の神経伝達物質(ATP, ACh, H⁺および K⁺)の分布を, 時空間情報を保ったまま取得するイメージング技術を確立した。本センサシステムを活用し, 山梨大学グループが海馬スライス標本を用いてアストロサイト EAAT を介し同時に K⁺の放出, H⁺の吸収が起こっている実験結果を得た。また, 乳酸イメージセンサシステムを作製し, 海馬から乳酸が放出される様子のリアルタイム観察に成功した。乳酸はグリア細胞より細胞外に放出されるグリア伝達物質として脳機能制御に寄与しているという“乳酸シャトル仮説”をリアルタイムで可視化した例は無かったが, グルタミン酸刺激により乳酸の放出の事象が観察でき細胞相互作用の解明につなげることが可能となった。その他ATPイメージセンサシステムにより, 海馬への電氣的な刺激により ATP がシェーファー側枝に従って放出する様子のリアルタイム観察に成功し, グリア細胞活動の生理学的解明につながる結果を得ている。

豊橋技術科学大学で in-vivo 計測が可能で空間解像度 30 μ m, 2 μ m および空間解像度 5 μ m, 時間分解能 20msec の刺入型センサシステムの設計・試作を行い, マウスなどの生態に刺入できるセンサを実現した。本チップも共同研究企業に研究用サンプルとして配布できる状況に至った。刺入型イオンイメージセンサにおいては, 水素イオンだけではなく, Na⁺, K⁺, 水素イオンを同時に動画像として取得できるマルチ神経伝達物質イオンイメージセンサチップを製作し, 生理学研究所チームに提供した。

生理学研究所グループは, 豊橋技術科学大学で作製した刺入型 H⁺ イメージセンサをマウスの脳内に刺入し静置させたところ, 表層部と深層部では明らかに異なる pH 分布 (0.4pH 程度) を示していること, Gabazine 投与により表層, 深層ともにスパイク状の信号が生じることを見出した。次に Na⁺, K⁺, 水素イオンを同時可視化できる刺入型マルチイオンイメージセンサにより, イオンチャネルを介して細胞外において, Na⁺の減少と K⁺放出現象を同時に世界で初めて可視化でき, 細胞外の微小環境観察ができた。次に刺入型 pH イオンイメージセンサをマウスの視野に刺入し, 白黒格子を様々な角度に動かすことによって, 空間的に異なる神経細胞を刺激し, それに伴う pH 変化の検出を行った。マウス視覚領域の神経細胞は運動する格子の移動方向・方位に対して特異性を持つことが知られている(方向・方位選択性)。したがって, 様々な方向に移動する格子を提示することで, 視覚領域の神経細胞を広域にわたって刺激することが可能である。この性質に着目し, 視覚刺激を行ったところ, 格子の移動方向あるいは方位に依存して異なるパターンの局所 pH 変化を捉えることに成功した(Horiuchi et al., Nature Commun., 2020)。さらに慢性てんかんモデルマウスを用いて, てんかん発作に伴う脳内 pH 変化を計測するために, pH 電極と並行に海馬へ脳は電極を挿入し, pH と脳波の同時記録を行った。その結果, 発作の約 60 秒前から Parietal association cortex 領域が局所的に, 約 0.1pH アルカリに変化することがわかり, 発作が治まるのに伴い, pH が酸性方向へ戻る結果を得た。このことは発作に先立つダイナミックな脳内のアルカリ化を初めて可視化することに成功した結果である。

以上のように非標識神経伝達物質イメージセンサシステムが脳機能の時空間解析に有用なツールあることが確認できた。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. 世界最高機能を持つイオンイメージセンサの実現

概要:

種々のイオンや神経伝達物質を可視化するプラットフォームとして、世界最高の空間解像度、フレームレートを有する水素イオンイメージセンサの開発に成功した。本センサは 2 μ m ピッチで水素イオンセンサが 256 \times 256 画素 (6 万 5 千画素) がアレイ化され、1 秒間に 1966 フレームの画像を取得することに成功している。このフレームレートはシナプス間の神経伝達物質放出速度 (1msec) を捕らえることが可能である。

2. 細胞外微小領域を計測できる細胞連関計測技術の創出

概要:

神経-グリア細胞連関が脳の理解に必須であることが明らかになってきている。その機能を制御する重要な「グリア伝達物質」として注目されている Lactate センサを開発し、グルタミン酸及び電気刺激により海馬アストロサイト (グリア細胞) から Lactate が放出される様子をイメージングすることに世界で初めて成功した。同様にアストロサイト (グリア細胞) に存在するグルタミン酸トランスポーター (GLT-1) を介した H⁺ の取り込みと K⁺ の排出している様子を観察できた。

3. 刺入型イオンイメージセンサによる脳機能解明

概要:

慢性てんかんモデルを作製し、センサおよび脳波電極を並走させて皮質及び海馬へ挿入し、てんかん発作に先立って皮質海馬を含む観察領域で局所的なアルカリ化が拡散していく様子を捉えることに成功した (Horiuchi et al, 投稿準備中)。またマウスの視覚野にイオンイメージセンサを挿入し格子状の視覚刺激によって位置の異なる神経細胞を刺激し、それに伴う微細かつ微量な pH 変化を捉えることに成功した (Horiuchi et al., Nature Commun., 2020)。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1. イオンイメージングシステム構築と企業への技術移転

概要:

2 μ m ピッチイメージセンサ (据え置き型、刺入型共に) を駆動できるソフトウェアおよび計測システムを完成させユーザーが使用できるシステムを構築した。またこのシステムはトリガタイミング、サンプル間隔 (17frame/sec から 1966frame/sec) を自在にコントロールでき応用研究者の要望に応える仕様とした。またライセンス許諾契約に伴ってセンサチップは浜松ホトニクス、イオンイメージセンサシステムは東朋テクノロジー株式会社に技術移転し、他の外部機関が使用を申し出た際に安定的に提供できる仕組みを構築した。実際に技術指導を行い刺入型、据え置き型共に提供できるチップ及び装置開発が終了した。

2. 細胞外微小空間の観察技術の開発による生命科学への貢献

概要:

細胞内 Ca²⁺濃度の測定に代表されるように、「細胞内」分子のイメージング技術は大きく発展し、それにより細胞機能の理解は大きく進んだ。しかし、1つ1つの細胞は周辺の同種及び異種細胞等、非常に多くの細胞とコミュニケーションをとることにより、組織、器官として機能する。従って細胞内の理解だけでなく、「各細胞外の微小環境」を理解することが生物学の大きな課題であった。本 CMOS イメージセンサは、非標識複数分子の時空間解析を in situ で可能とするものであり、これにより細胞外微小環境の高感度イメージングが可能となる。細胞外微小環境の理解は、脳科学を含む生物学分野の大きなテーマであることから、本成果はこのテーマを支える新産業の創出に繋がり、また同時に生物学における新分野の創成に貢献できる。

3. 一般社団法人豊橋センサ協議会設立

概要:

非標識神経伝達物質イメージセンサの基盤技術である、イオンイメージセンサに関する特許およびノウハウを運用し、イオンイメージセンサ及びシステムに関する規格化・標準化を行う。豊橋技術科学大学が保有しているイオンイメージセンサ関連の特許について、本法人が特許実施許諾契約を大学に代わり締結できる権利を受け、社会実装に向けた運用を行う。本協議会には、チップ製造、パッケージ製作、計測装置開発、品質検査ならびに用途展開企業が参画してコンソーシアムを組織し、CREST プロジェクト成果を素早く製品化へと結び、チップ並びに計測装置の標準化が可能な体制を整えた。

<代表的な論文>

1. You-Na Lee, Takeshi Araki, Yasuyuki Kimura, Fumihiro Dasai, Tatsuya Iwata, Kazuhiro Takahashi, Kazuaki Sawada, "High-density 2- μ m-pitch pH image sensor with high-speed operation up to 1933 fps", IEEE Transactions on Biomedical Circuits and Systems, 2019 13(2) :352
2. Hiroshi Horiuchi, Masakazu Agetsuma, Junko Ishida, Yusuke Nakamura, Dennis Lawrence Cheung, Shin Nanasaki, Yasuyuki Kimura, Tetsuya Iwata, Kazuhiro Takahashi, Kazuaki Sawada, Junichi Nabekura, "CMOS-based bio-image sensor spatially resolves neural activity-dependent proton dynamics in the living brain", Nature Commun, 2020 11 (1) :712.
3. Morizawa YM, Hirayama Y, Ohno N, Shibata S, Shigetomi E, Sui Y, Nabekura J, Sato K, Okajima F, Takebayashi H, Okano H and *Koizumi S. Reactive astrocytes function as a phagocyte after brain ischemia via ABCA1-mediated pathway. Nature Commun, 2017 8(1) ,:28.

§2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 研究代表者グループ

・研究代表者: 澤田 和明 (豊橋技術科学大学大学院工学研究科 教授)

・研究項目

1. 神経伝達物質イメージセンサの高解像度化, 高速化, 神経伝達物質イメージングとマルチ検出機能, センサの高感度化と開口率改善を含む,
2. in-vivo 計測用イメージセンサの構築
3. 集団レベル, 1細胞レベルの複数種類の神経伝達物質同時計測技術

② 共同研究グループ(1)

・主たる共同研究者: 小泉 修一 (山梨大学大学院総合研究部医学域基礎医学系 教授)

・研究項目

1. グリア細胞及び神経細胞からの ATP 放出の時・空間ダイナミクス超高解像度解析法の確立
2. In situ 脳標本からの ATP 放出法の開発と脳機能制御様式の解明

③ 共同研究グループ(2)

・主たる共同研究者: 鍋倉 淳一 (自然科学研究機構生理学研究所基盤神経科学研究領域生体恒常性発達研究部門 所長)

・研究項目

1. 神経細胞におけるシナプス入力活動および伝達物質放出の超高解像度解析法の確立
2. 超高解像度解析法を用いた神経ネットワーク活動ダイナミクスの抽出

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

平成 24 年 5 月に設立したマルチモーダルバイオイメージセンサ研究会において現在まで、民間企業のべ約 34 社がセンサの実用化・事業化を目指し参加している。平成 26 年度に本プロジェクトが採択された際にも企業会員に対し、いち早く研究情報を提供し、大学との共同研究 7 件の締結に至っており企業からの関心も高い。この活動を通して、大阪大学命機能研究科 明石研究室との共同研究が始まり、iPS 細胞で作製した心筋細胞の活動の様子を本イメージセンサで観察することに成功した。また、新たなイオンイメージセンサの用途展開として生活環境のマルチ検出として、東海大学 撫中教授グループにセンサシステムを提供した。

平成 28 年 9 月にマルチモーダルバイオイメージセンサ研究会の運営、イオンイメージセンサ及びシステムの規格化・標準化を推進する一般社団法人豊橋センサ協議会を設立した。一般社団法人豊橋センサ協議会では、企業とコンソーシアムを組織し、標準化準備会を平成 29 年 4 月より設置し活動を開始した。また、研究会の活動に対しては静岡大学、早稲田大学、京都工芸繊維大学、九州工業大学等の研究者も参画しており、イオンイメージセンサ技術や応用技術に関して幅広い観点から議論を行っている。この活動を通して、“産学共創プラットフォーム共同研究推進プログラム FS ステージ”に採択され、フィジカル空間とサイバー空間を繋ぐ、センサプラットフォームとする展開を進めている。

その過程から、イオンイメージセンサプラットフォームにガスの吸着特性が異なる 9 種類の有機膜を固定化し、複数のガスの成分により構成される匂い情報を可視化する装置(かおりカメラ)として、展示会に展示やマスコミ報道(NHK 全国放送を含む 20 件)された。このカメラを販売するためのベンチャー企業(豊橋技術科学大学認定大学発ベンチャー1号)の設立につながった。