

研究終了報告書

「光操作技術を用いた神経回路創出法の確立」

研究期間：2018年10月～2022年3月

研究者：正水 芳人

1. 研究のねらい

脳は様々な脳領域間で神経回路ネットワークを形成し、情報処理をおこなうことによって、脳機能を獲得する。本研究では組織工学の技術を用いて、神経細胞ファイバーを作製する技術の確立を目的とした。さらに神経細胞ファイバーを脳に移植し、新たな神経回路を創出する技術の確立を目的とした。また神経回路創出による脳活動の変化を解明するために、高速で広視野の *in vivo* カルシウムイメージング可能なマクロズーム・多点走査型共焦点顕微鏡をセットアップした。

今後これらの技術を用いて、神経回路創出による脳機能の回復と拡張を目指す。神経回路創出による脳機能の回復に関しては、脳損傷部位を迂回したバイパスや神経疾患で途切れた神経回路の再生医療につなげる。神経回路創出による脳機能の拡張に関しては、構成的アプローチ(げっ歯類の脳に霊長類特有の神経回路の創出)によって、霊長類の脳の理解につなげる。

2. 研究成果

(1) 概要

マイクロ流体デバイスを用いて、神経細胞塊と軸索の束から成る神経細胞ファイバーを作製する系を確立した。具体的には、中心部分に神経細胞等の懸濁液を、周りにアルギン酸ナトリウム水溶液を流し、さらに、凝固剤の塩化カルシウム水溶液を流すことによって、アルギン酸カルシウムゲルでコートされた細胞ファイバーを作製した。次に、作製した神経細胞ファイバーを脳へ移植し、どれくらいの期間、生存するのかを確認した。具体的には、アデノ随伴ウイルスを用いて蛍光カルシウムセンサー(蛍光カルシウムセンサーのシグナル変化は、神経活動と相関関係があることが知られている)を遺伝子導入し、顕微鏡下で長期間発火することを確認した。さらに高速で広視野の *in vivo* カルシウムイメージング可能なマクロズーム・多点走査型共焦点顕微鏡をセットアップした。対物レンズ下には、レバー引き運動課題装置を置いて、課題実行時のイメージングをおこなえるようにした。

(2) 詳細

研究テーマ A「神経細胞と軸索の束から成る神経細胞ファイバーを作製する系を確立」

神経細胞ファイバーの作製には、東京大学・竹内昌治教授らがマイクロ流体デバイスを用いて成功している(Onoe *et al.*, *Nature Materials*, 2013)。具体的には、中心部分に神経細胞等の懸濁液を、周りにアルギン酸ナトリウム水溶液を流し、さらに、凝固剤の塩化カルシウム水溶液を流すことによって、アルギン酸カルシウムゲルでコートされた細胞ファイバーの作製が可能である。このマイクロ流体デバイスを用いて、本研究では独自の工夫で神経細胞塊と軸索の束から成る脳への移植可能な神経細胞ファイバーを作製する系を確立した。

研究テーマ B「神経細胞ファイバーを脳へ移植する系の確立」

研究テーマ A で作製した神経細胞ファイバーをマウスの脳へ移植し、どれくらいの期間、生存するのかを確認した。具体的には、アデノ随伴ウイルスを用いて蛍光カルシウムセンサーを神経細胞ファバーに遺伝子導入し、顕微鏡下で観察し、長期間自発発火することを確認した。またマウス大脳新皮質に神経細胞塊を移植し、双方向に軸索伸長することも確認した。具体的には、神経細胞塊に緑色の蛍光カルシウムセンサーを、大脳新皮質に赤色の蛍光カルシウムセンサーを発現させ、*in vivo* カルシウムイメージングによって確認した。なお蛍光カルシウムセンサーは、cpEGFP (circularly permuted enhanced green fluorescent protein) もしくは cpRFP (circularly permuted red fluorescent protein)、カルモジュリン、ミオシンのカルモジュリン結合部位 M13 からなる。カルシウムイオンがカルモジュリンと結合すると、カルモジュリンは M13 と結合できるようになり、立体構造が変化し、励起光によって緑色もしくは赤色の蛍光を発する。神経細胞が興奮する際には、細胞内のカルシウムイオン濃度が上昇するため、蛍光カルシウムセンサーを神経細胞に遺伝子発現させることによって、神経活動の可視化ができる。

研究テーマ C「マクロズーム・多点走査型共焦点顕微鏡のセットアップ」

高速・広視野で、移植した神経細胞ファイバーと脳を 2 色同時 *in vivo* カルシウムイメージングできるようにするために、マクロズーム・多点走査型共焦点顕微鏡をセットアップした。この顕微鏡は、マクロズーム顕微鏡、多点走査型共焦点スキャンユニット、CMOS カメラ、488、561 nm のレーザーからなる。2光子励起顕微鏡で用いられている一点走査型と異なり、多点走査型共焦点スキャンユニットは、広げたレーザー光を多数のピンホールを持つ高速回転する円盤(スピニングディスク)に照射し、約 1000 本のレーザー光線に分割することで、観察視野を約 1000 点同時に走査するため、高速・広視野でのイメージングが可能である。また対物レンズ下には、マウス用のレバー引き運動課題装置を置いて、運動課題実行時の *in vivo* イメージングをおこなえるようにした。

3. 今後の展開

脳は様々な脳領域間で神経回路ネットワークを形成し、情報処理をおこなうことによって、脳機能を獲得する。今後、本研究で開発した技術を用いて、神経回路創出による脳機能の回復と拡張を目指す。神経回路創出による脳機能の回復に関しては、脳損傷部位を迂回したバイパスや神経疾患で途切れた神経回路の再生医療につなげる。神経回路創出による脳機能の拡張に関しては、構成的アプローチ(げっ歯類の脳に霊長類特有の神経回路の創出)によって、霊長類の脳の理解につなげる。脳機能の回復や拡張時の脳活動の変化に関しては、本研究でセットアップした高速で広視野の *in vivo* カルシウムイメージング可能なマクロズーム・多点走査型共焦点顕微鏡を用いて、解明を目指す。

4. 自己評価

本研究では、神経細胞と軸索の束から成る神経細胞ファイバーを作製し、脳へ移植する系を確立した。また、高速・広視野で、移植した神経細胞ファイバーと脳を2色同時 *in vivo* カルシウムイメージングできるようにするために、マクロズーム・多点走査型共焦点顕微鏡をセットアップした。今後、これらの研究成果を論文報告する。

2018年10月から本研究を東京大学で開始し、2019年7月に理化学研究所に異動した。さらに2021年4月に同志社大学大学院脳科学研究科で脳回路機能創出部門を立ち上げた。研究体制は、東京大学では1名で、理化学研究所ではテクニカルスタッフと2名で、同志社大学では大学院生と2名でおこなった。2022年4月からは、私、准教授2名、大学院生2名、学部生1名の6名体制となる。

今後、脳回路機能創出部門では、本研究で開発された基盤技術を基に神経回路創出による脳機能の回復と拡張を目指す。神経回路創出による脳機能の回復では、脳の領域間にフォーカスを当てた神経回路レベルでの先進的再生医療につながる事が期待される。神経回路創出による脳機能の拡張では、構成的アプローチによる脳の理解という新たな学問分野の開拓につながる事が期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:1件

1. Ebina T, Obara K, Watakabe A, Masamizu Y, Terada S, Matoba R, Takaji M, Hatanaka N, Nambu A, Mizukami H, Yamamori T, Matsuzaki M. Arm movements induced by non-invasive optogenetic stimulation of the motor cortex in the common marmoset. *PNAS*, 2019; 116(45): 22844–22850.

霊長類マーモセットの脳新皮質運動野を光遺伝学の技術を用いて刺激し、腕の運動を誘発することに成功した。さらにマーモセットの脳新皮質運動野では、異なった腕の動作が別々の領域で表現されていることを解明した。

(2) 特許出願

なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

<学会発表(口頭発表)>

1. Yoshito Masamizu

Development of techniques to construct novel brain's neural circuits
The 10th RIEC International Symposium on Brain Functions and Brain Computer,
2022年2月18日, 仙台市

2. 正水 芳人

光操作技術を用いた神経回路創出法の技術開発
第82回応用物理学学会秋季学術講演会, 招待講演, 2021年9月11日, 名古屋市

3. シンポジウム: 神経回路創出のための先進的基盤技術開発とその応用

オーガナイザー: 正水 芳人、池内 与志穂

正水 芳人

生体脳に神経回路を創出するための技術開発
第44回日本神経科学大会, 2021年7月28日, 神戸市

4. Yoshito Masamizu

Two-photon calcium imaging in the motor cortex of non-human primates during movement task

The 9th RIEC International Symposium on Brain Functions and Brain Computer,
招待講演, 2020年12月5日, 仙台市

5. 正水 芳人

構成的アプローチによって脳の情報処理機構を解明するための基盤技術開発
生理研研究会「行動の多様性を支える神経基盤とその動作様式の解明」,
招待講演, 2019年12月13日, 岡崎市

<書籍>

1. 正水 芳人、霊長類脳の *in vivo* 2 光子カルシウムイメージング
ブレインサイエンス・レビュー 2020, クバプロ