

研 究 報 告 書

「レーザー誘起光集合制御による神経細胞内分子動態の 時空間ダイナミクスの解明」

研究期間：平成18年10月～平成23年3月

研 究 者：細川 千絵

1. 研究のねらい

生命現象は多様な機能分子の活動に応じて生体情報ネットワークを形成し、時空間的にダイナミックな制御を受けている。これまでにプロテオーム解析や X 線構造解析により生体分子の静的な構造が解明されており、今後それらの機能分子の細胞内分子動態を単一分子から分子集合体レベルで捉え、細胞内の内部状態を変化させ、機能を発現するかを明らかにすることは、生命システムの動作原理やそれに関わる多数の因子の作用を理解する上で必要不可欠となる。そこで本研究では、従来の光ピンセット技術を分子系に展開し、集光レーザービームにより誘起される光集合を神経細胞の局所機能操作に応用することにより、細胞内分子動態の時空間ダイナミクスの解明を行った。

2. 研究成果

神経細胞は電気的結合とシナプス結合を介した情報伝達を行い、細胞ネットワークを動的に変化させることにより、脳の情報処理を実現している。このような神経細胞内、細胞間における相互作用を理解するためには、細胞内の個々の分子動態から細胞ネットワークにおける時間的、空間的挙

動を明らかにする必要がある。本研究では、神経回路網の能動操作を、単一シナプスレベルで可逆的に行う手法として、光ピンセットに着目した。光ピンセットは、これまで主にミクロンサイズの単一粒子を非接触、非破壊に捕捉し、操作する手法として利用されてきた。捕捉対象がナノサイズとなると、その大きさがレーザー光の集光スポット径より小さいために複数の分子やナノ粒子が捕捉、集合することが見出されており、光ピンセットがいわゆるマニピュレーションにとどまらず、分子集合体の作製や局所反応制御に有効であることが示されている。そこで本研究では、神経シナプスの局所領域に集光レーザービームの光捕捉・集合を誘起することにより、単一シナプス動態を制御し、分子動態から細胞ネットワークに至る時空間ダイナミクスの解明を目指した(図1)。具体的な研究項目およびその成果を以下に示す。

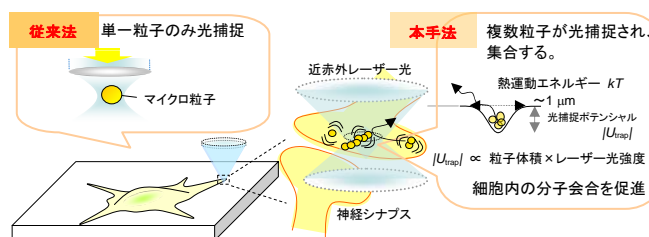


図1. 光ピンセットを用いた神経細胞内分子集合操作の模式図

1) 光ピンセットを用いた神経細胞内単一シナプスの操作

神経回路網を構成する神経細胞のシナプス内の分子集合を集光レーザービームの光捕捉・集合を誘起することにより直接操作することに成功した。ラット胎児脳から調整した海馬神経細胞に、シナプス活動依存的に取り込まれる蛍光色素 FM1-43 を用いてシナプス小胞群を染色した。神経シナプス部位と思われる領域に波長 1064 nm の近赤外レーザー光を集光すると、集光領域からの発光が観測された(図2a, b)。分光測定によりこの発光はレーザー光によるFM色素からの二光子励起蛍光であることが示された。二光子励起蛍光強度はレーザー照射時間とともに増加したことから(図2c)、光捕捉によりシナプス小胞群が集光スポット内に集合することが明らかとなった。また、この蛍光強度の増加は照射レーザー光強度が高いほど顕著にみられた。レーザー光照射直後の蛍光強度とレーザー光強度との関係を調べたところ、120 mW 以下の低レーザー光強度で

は、蛍光強度はレーザー光強度に対して約 2 次で与えられ、観測している蛍光が光ピンセット用の近赤外レーザー光の二光子励起過程であることと対応づけられた。これに対し、高レーザー光強度では、蛍光強度の照射レーザー光強度依存性は 2 次以上となり、捕捉粒子数の増加に相当することが示唆された。このことから、照射レーザー光強度が高い程、光放射圧により神経細胞内のシナプス小胞群がより多く捕捉され、集合することを見出した。

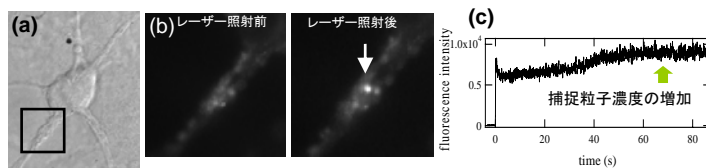


図 2. シナプス領域を蛍光色素(FM1-43)で染色したラット海馬神経細胞の透過像(a)、蛍光像(b)。レーザー照射後、集光スポットからの二光子励起蛍光が確認された。(c)シナプス領域の蛍光強度変化。

2) 光捕捉された神経細胞シナプス領域の蛍光相関分光測定と捕捉、集合機構の検討

光捕捉された細胞内シナプス小胞群の運動特性を明らかにするため、蛍光相関分光測定を行った。レーザー光を神経細胞シナプス領域に照射し、蛍光相関分光測定によりシナプス小胞群の細胞内動態を調べたところ、蛍光強度の自己相関関数は、捕捉用レーザー光強度が高い場合において減衰時間が長くなる傾向がみられた。自己相関関数の減衰時定数はレーザー光強度とともに増加したことから、集光スポット内のシナプス小胞群の運動が光捕捉力の増大にともなって束縛されたと考えられる。シナプス領域内の粒子運動は、レーザー照射により約 1.5 倍遅くなることを明らかにした。さらに、光捕捉ポテンシャルエネルギーを考慮することにより、シナプス小胞群が捕捉可能な条件を数値計算により求め、シナプス小胞群の捕捉・集合機構の検討を行った。粒径 40 nm の単一シナプス小胞は、レーザー光強度が高くとも捕捉が困難であることがわかった。シナプス領域では複数個のシナプス小胞がクラスターを形成していることが知られており、レーザー光の集光領域内にシナプス小胞のクラスターが局在するならば、捕捉ポテンシャルの増大が期待される。計算の結果、10 個、および 20 個のシナプス小胞クラスターの光捕捉ポテンシャルエネルギーは粒子の熱運動エネルギーよりも大きくなり、20 個の小胞クラスターでは安定に光捕捉される条件を上回ることも見出された。以上の計算結果は、レーザー光強度が高い程、集光スポット内の粒子濃度の上昇が顕著にみられたという実験結果をよく説明しており、細胞内シナプス小胞クラスターが捕捉可能であると考察した。

3) 光ピンセットによる神経細胞単一シナプスの放出制御

神経細胞にレーザー光を照射した状態で、高濃度 KCl 添加により神経細胞の脱分極を誘導し、シナプス小胞の放出刺激を試みた。レーザー光強度が 180 mW では、高濃度 KCl 添加後 80 秒以内において蛍光強度の消滅が観測されたことから、集光スポット内のシナプス小胞が放出されたと考えられる。これに対し、レーザー光強度が高い場合(370 mW)では、同時間経過後においても蛍光強度の消滅がみられなかった。このことから、光捕捉力の強い高レーザー光強度条件においてのみ、光ピンセットによる細胞内操作がシナプス小胞の放出を抑制できることを示した。

4) 神経細胞ネットワークの時空間ダイナミクスの解明のための基盤技術開発

光ピンセットにより単一シナプス動態を操作し、分子動態から細胞ネットワークに至る時空間ダイナミクスを明らかにするため、神経細胞ネットワーク内の特定の細胞を操作する基盤技術を開発した。

集光フェムト秒レーザーを用いて、二次元多点電極皿上で培養した神経回路網を、電極を損傷することなく局所領域を分断することに成功した(図 3a)。フェムト秒レーザーを神経細胞に照射すると、集光点において多光子吸収に基づく数 μm 程度のバブル発生が確認され、軸索が切断された。フェムト秒レーザーは焦点以外での光吸収がなく、深部到達性が高い特徴から比較的厚みのある細胞集合体の局所切断が可能となる。さらに、神経回路網の分断に伴い、分断したそれぞれのエリアで独立した活動リズムが発現し、分断した神経回路網が機能再生することを見出した。

(図 3b)。本手法は、神経回路網の局所領域の再生機能を定量評価できることから、神経再生を促進する新規化合物のスクリーニング技術への応用が期待される。

また、空間的に制御された神経回路網における細胞間の機能的結合特性を評価することを目的として、細胞外電位計測皿上への神経細胞のパターニングに成功した。高強度フェムト秒レーザーをシリコンゴムに集光してラインスキャンすることにより線状にくり抜かれたマスクパターンを作製し、8×8 個の電極アレイ上に配置し、その上からラット胎児脳より調整した海馬神経細胞を全体に播種した。培養日数の経過とともに、ライン状の流路内において神経細胞が個々に軸索や突起を伸ばし、ネットワークを形成している様子が観測された。また、神経回路網の自発的活動電位測定により流路内に沿って神経細胞ネットワークを形成していることが示された。本手法により、空間的に制御された神経回路網の機能的結合特性を評価することが可能となる。

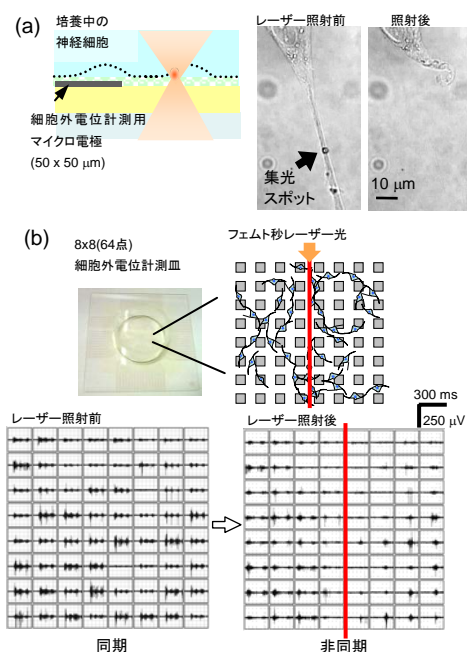


図 3 (a) 単一神経細胞の集光フェムト秒レーザー切断。神経突起の一部を選択的に切断した。(b) 神経細胞ネットワークのレーザー切断による自発的活動電位変化。レーザー照射後、細胞が切断され、右側左側における活動リズムの同期性が失われた。

3. 今後の展開

神経シナプス伝達効率を非接触、ラベルフリーに制御することが可能な技術として本手法を発展させることにより、従来の遺伝子操作を補完する脳機能操作や、脳疾患治療の標的分子に注目した細胞レベルでの光治療研究への展開を目指している。

4. 自己評価

本研究では、神経シナプスの局所領域に集光レーザービームの光捕捉・集合を誘起することにより、単一シナプス動態を制御し、分子動態から細胞ネットワークに至る時空間ダイナミクスを解明することを目標として研究を推進した。その結果、神経細胞のシナプス領域に近赤外レーザー光を照射すると、光放射圧により神経細胞内シナプス小胞群が捕捉され、集合することを初めて見出すことができた。また、神経細胞内シナプス小胞群の運動が光捕捉力の増大にともなって束縛されることを明らかにした。以上のことから、本研究の主要課題である、光ピンセットを用いた神経細胞内単一シナプスの操作を実証することができた。一方、光ピンセットによる操作が神経細胞ネットワークのシナプス伝達制御を可能とするかという課題に関しては、研究期間内において実験系の改良に時間を有したため、今後も引き続き明らかにしていく必要がある。また、実験結果をもとにした神経回路網の情報処理モデルの構築も検討課題である。今後、本手法を基盤技術として確立し、神経システムの動作原理の解明に迫ることを目標としている。

本研究期間中において総括やアドバイザー、さらには領域研究者と議論することにより、本研究課題を改善しつつ進めることができました。また、ライフプランに伴う研究期間延長の際にも的確なアドバイスを賜りました。ここに御礼申し上げます。

5. 研究総括の見解

単一シナプスの動態の制御機構解明の実験系を開発し、技術基盤の確立の目途が出来てきたと評価している。神経ネットワークの分子動態のダイナミクスを解析するとともに、この技術を広める上での生物学的な検証も進めることを期待したい。

6. 主要な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

| | |
|----|---|
| 1. | S. N. Kudoh, C. Hosokawa, A. Kiyohara, T. Taguchi, and I. Hayashi, "Biomodeling System – Interaction between Living Neuronal Network and Outer World", Journal of Robotics and Mechatronics, Vol. 19, No. 5, pp. 592–600 (2007). |
| 2. | C. Hosokawa, S. N. Kudoh, A. Kiyohara, Y. Hosokawa, K. Okano, H. Masuhara, T. Taguchi, "Laser Micro-Patterning of Neuronal Network on Multi-Electrode Arrays", Proceedings of Multi-Electrode Array (MEA) meeting, pp. 300–301 (2008). |
| 3. | C. Hosokawa, S. N. Kudoh, A. Kiyohara, and T. Taguchi, "Resynchronization in Neuronal Network Divided by Femtosecond Laser Processing", NeuroReport, vol. 19, pp. 771–775 (2008). |
| 4. | C. Hosokawa, S. N. Kudoh, A. Kiyohara, Y. Hosokawa, K. Okano, H. Masuhara, and T. Taguchi, "Femtosecond Laser Modulation of Living Neuronal Network", Applied Physics A, vol. 93, pp. 57–63 (2008). |
| 5. | C. Hosokawa, S. N. Kudoh, M. Suzuki, A. Kiyohara, Y. Hosokawa, K. Okano, H. Masuhara, and T. Taguchi, "Micro-channel Fabrication by Femtosecond Laser to Arrange Neuronal Cells on Multi-Electrode Arrays", Applied Physics A, vol. 101, pp.57–63 (2010). |
| 6. | C. Hosokawa, S. N. Kudoh, A. Kiyohara, and T. Taguchi, "Optical Trapping of Synaptic Vesicles in Neurons", Applied Physics Letters (accepted). |

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 1 件

発 明 者: 細川 千絵、工藤 卓、田口 隆久

発明の名称: 神経回路再生機能の解析装置、解析方法およびスクリーニング方法

出 願 人: 独立行政法人産業技術総合研究所

出 願 日: 2007/11/19

(3) その他(主要な学会発表、受賞、著作物等)

1. "光圧による液中ナノ粒子の捕捉・集合ダイナミクス"、細川千絵、吉川裕之、増原宏、光アライアンス, Vol. 18, No. 7, pp. 19–24, 日本工業出版 (2007).
2. "Focused Femtosecond Laser Processing of Cultured Neuronal Network", C. Hosokawa, A. Kiyohara, S. N. Kudoh, and T. Taguchi, The 9th International Conference on Laser Ablation (COLA 2007), 24–28 September, Tenerife, Spain (2007).
3. "Regeneration of Neuronal Network Divided by Femtosecond Laser Processing", C. Hosokawa, A. Kiyohara, S. N. Kudoh, and T. Taguchi, The 37th annual meeting of the Society for Neuroscience (Neuroscience 2007), 3–7 November, San Diego, California, USA.
4. 「光ピンセットを用いた神経細胞内単一シナプスの操作」、細川千絵、工藤卓、清原藍、田口隆久、第 23 回生体・生理工学シンポジウム、名古屋大学、愛知県、2008 年 9 月 28 日
5. 「レーザー光を活用した神経回路網の操作技術」、細川千絵、第 10 回次世代医療システム産業化フォーラム 2008、神戸市商工会議所、兵庫県、2009 年 1 月 27 日
6. 「光ピンセットを用いた培養神経細胞シナプス操作過程の蛍光解析」、細川千絵、大西映里子、工藤卓、田口隆久、第 33 回日本神経科学大会合同大会(Neuro2010)、神戸コンベンションセンター、兵庫県、2010 年 9 月 3 日