

# 新規高分子超薄膜を活用した、マウス脳深部の *in vivo* イメージング

自然科学研究機構 生命創成探究センター長 根本知己 教授、東海大学工学部 岡村陽介 教授らの研究グループは、新規高分子超薄膜「PEO-CYTOPナノシート」を活用し、生きたままのマウス脳深部の神経細胞を長期観察する成果を発表している。本アプリケーションノートでは、生体脳組織の観察が可能な多光子共焦点レーザー顕微鏡システム A1R MP+を使用して取得された、この研究による成果について紹介する。

## 研究の背景

神経科学分野において、複数の脳領域間を繋ぐ神経ネットワークの機能の解明は、非常に重要である。生体組織の観察に広く用いられる二光子蛍光顕微鏡を用いて、生きたままのマウス脳内の局所神経回路を高解像度でイメージングする場合は、頭蓋骨の一部に穴を開けてカバーガラスで蓋をして観察窓を作成する「オープンスカル法」が一般的に用いられる。しかしながら、この方法では、頭蓋骨の除去に伴う手術で出血が発生する。この時、血液に含まれるヘモグロビンの光学的な吸収により蛍光シグナル強度が大きく低下するため、脳深部観察の障害となっていた。また、カバーガラスは硬く平坦であることから、脳の圧迫を避けるために、観察窓のサイズは最大でも直径6 mm程度に制限されていた。

根本教授らの研究グループは、上記の課題を解決するため、マウス脳の*in vivo*イメージングに最適化した高分子超薄膜（ナノシート）を応用した手法を開発した。

## PEO-CYTOPナノシートを用いた広範囲観察窓

ナノシートとは、厚さ100 nm程度のポリマー等を素材とした薄膜を指し、高い柔軟性や光透過性、物体への高い接着性などのユニークな特性を持つことが知られている。

根本教授らの研究グループは、高い光透過性を持つCYTOPの表面をpolyethylene oxide (PEO) で化学的に改質した「PEO-CYTOPナノシート」を開発した。PEO-CYTOPナノシートは、PEOの添加によって脳との接着面が親水性となっているため、生体脳組織への貼り付きやすさが向上している。次に、このPEO-CYTOPナノシートを、従来のカバーガラスの代わりに、オープンスカル法の観察窓素材として使用した。その高い接着性により、PEO-CYTOPナノシートを生きたままのマウス脳へ貼り付けた際に、脳表面での出血を抑制できた。また、PEO-CYTOPナノシートの柔軟性を活かして、頭頂部とほぼ同じサイズの大きな頭蓋窓を実装することもできた（図1）。

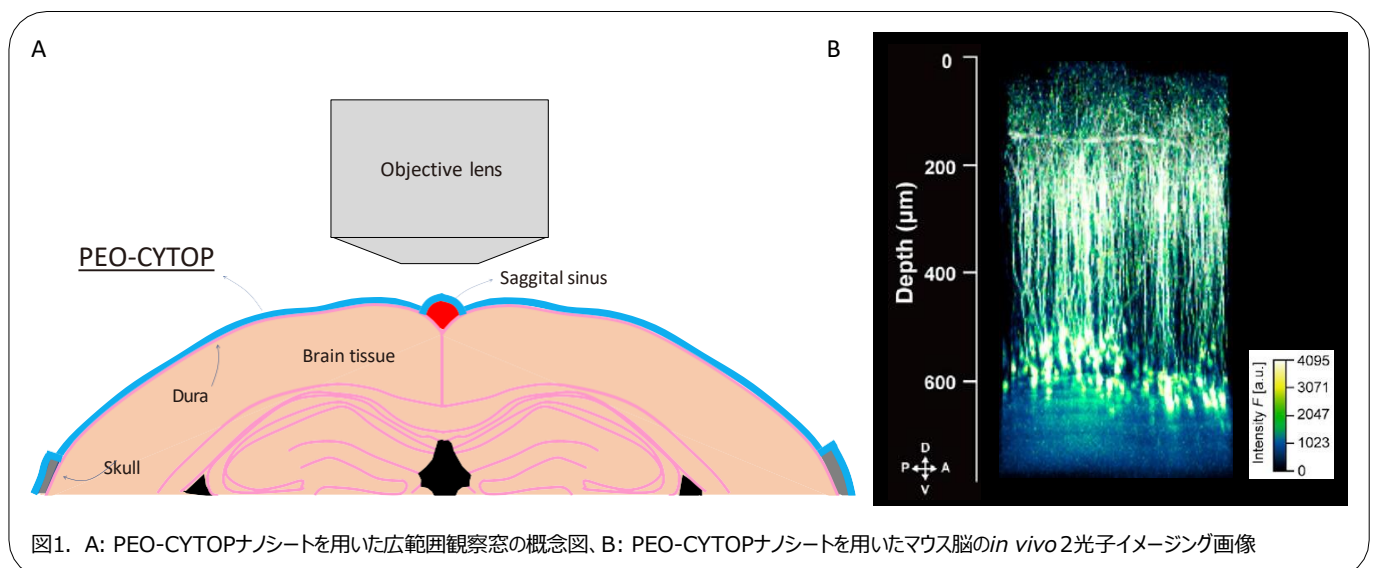


図1. A: PEO-CYTOPナノシートを用いた広範囲観察窓の概念図、B: PEO-CYTOPナノシートを用いたマウス脳の*in vivo* 2光子イメージング画像

## PEO-CYTOP ナノシートを使用した、深部の *in vivo* 2光子イメージング

PEO-CYTOPナノシートを使用した観察窓を作成したマウスにおいて、*in vivo* イメージングが可能かを検証した。ここでは、神経細胞の形態イメージングを行うために、大脳皮質第5層の錐体細胞に蛍光タンパク質EYFPを発現する Thy1-EYFP遺伝子組み換えマウスを使用している。図2Aは、PEO-CYTOPナノシートを用いて作成した観察窓を示す。この観察窓において、二光子蛍光顕微鏡を用いた *in vivo* イメージングを実施し、広範囲にわたる神経細胞の形態イメージングを行った。その結果、PEO-CYTOPナノシートを用いた観察窓では脳表面の曲面形状が保持されていることが可視化された (図2C)。

加えて、神経細胞の軸索と樹状突起 (図2D,E)、細胞体 (図2F) を広範囲にわたって可視化できた。特に、大脳皮質第6層に相当する深さ (約700 μm) に位置する神経細胞の細胞体についても可視化できた。

これらにより、PEO-CYTOPナノシートを観察窓に活用することで、脳の深部および広範囲における *in vivo* 二光子イメージングが可能であることが示された。

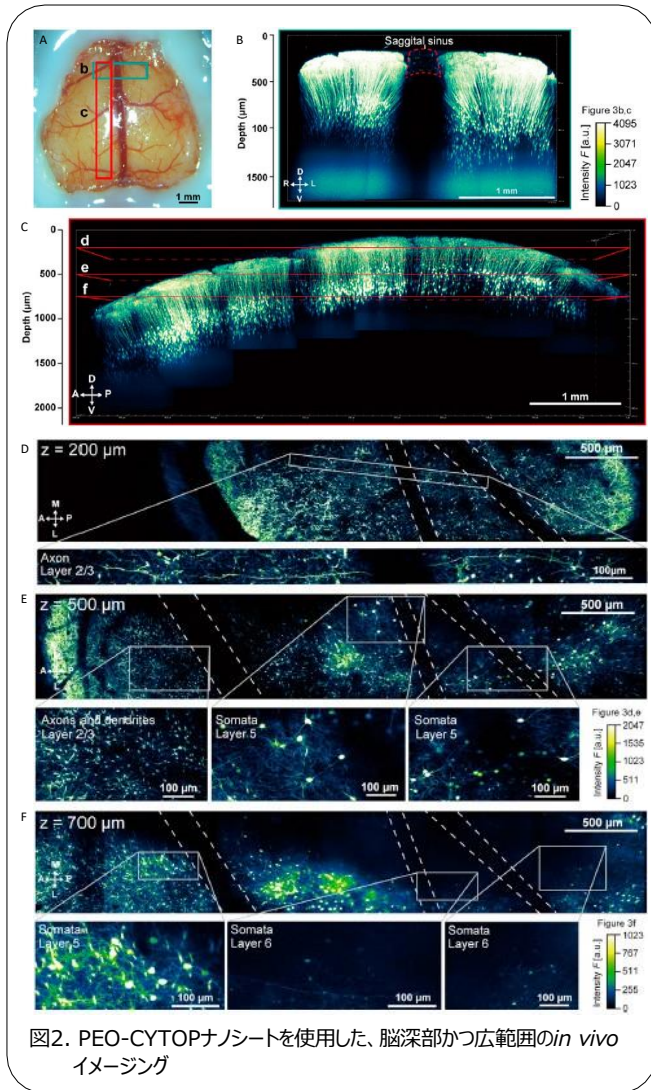


図2. PEO-CYTOPナノシートを使用した、脳深部かつ広範囲の *in vivo* イメージング

### 参考文献

PEO-CYTOP Fluoropolymer Nanosheets as a Novel Open-Skull Window for Imaging of the Living Mouse Brain *iScience* 23, 101579, October 23, 2020

## PEO-CYTOPナノシートを使用した、長期間イメージング

次に、PEO-CYTOPナノシートを脳の硬膜の代わりに使用できるかを評価した。まず、頭蓋骨および硬膜を取り除いた後に、PEO-CYTOPナノシートを貼り付けた。その後、長期間の観察を可能とするために、カバーガラスをPEO-CYTOPナノシートの上に固定して脳を保護した。その結果、手術から14週間後でも出血が生じていないことが確認された。さらに、手術から1日後と14週間後のイメージング結果を比較したところ、同じ深さで同じニューロンと軸索を観察することができた。このことから、硬膜を除去した場合でもPEO-CYTOPナノシートを使用して長期間にわたる脳組織の観察が可能であることが分かった。

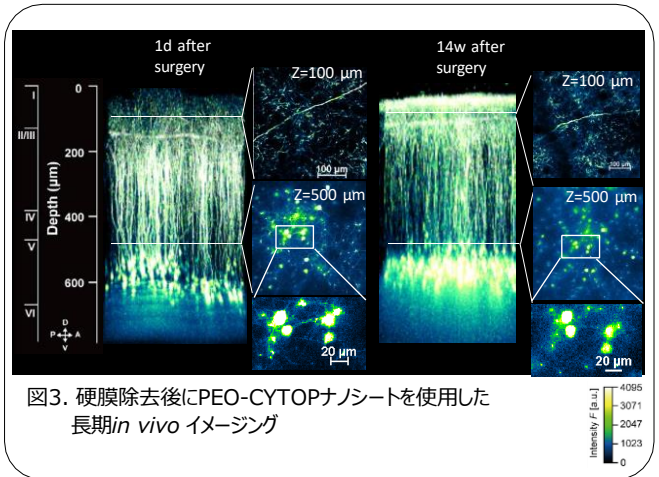


図3. 硬膜除去後にPEO-CYTOPナノシートを使用した長期 *in vivo* イメージング

### アプリケーションに期待される効果

最後に、PEO-CYTOPナノシートを脳イメージングに応用することで得られるメリットをご紹介します。観察窓に適用し、6mmを超える観察領域は、脳の左右や複数の脳領域を跨ぐ神経ネットワークの機能解明に有用である。これは脳神経ネットワークの基礎研究において大きなメリットとなる。また、PEO-CYTOPの密着性は長期観察における毛細血管からの出血を抑止し、長期 *in vivo* イメージングの可能となることが期待される。本手法による生体脳の長期イメージングは、長い時間をかけて複数の脳領域間で生じる現象、例えば記憶や学習、精神疾患等の原理解明の研究に役立つことが期待される。

また、PEO-CYTOPナノシートをマウス脳の *in vivo* イメージングに応用することで、新薬の探索段階の薬物動態研究において、疾患モデル動物や薬物を投与した動物の全脳領域における全神経細胞の活動をより長期間、より広範囲にS/N良く観察したい、といったニーズにこたえられる可能性を示唆しています。

### 製品情報

## 高速多光子共焦点レーザー顕微鏡システム AX R MP

広視野・高速・高解像度の深部イメージングを実現。柔軟なサンプル設置を可能にする広いスペースを確保。

- ・広視野：視野数22
- ・高速：最速毎秒720フレーム (2048 × 16画素) /レゾナント
- ・高解像度：最大 8 K画素/ガルバノ、2K画素/レゾナント

