

2020年5月20日

2019年度 長期海外研修 報告書

所属 病態診断治療学講座 薬理学分野

氏名 溝口 尚子

生年月日 1980年8月12日

研究課題 歯科医療にかかわる感覚投射経路の解明
—とくに視床から皮質間の連絡について—

研修機関

名称 University of Colorado Anschutz Medical Campus

所在地 Bldg RC1 South, 12801 E 17th Ave, Aurora, CO 80045

指導教員 Diego Restrepo 教授

Department of Cell and Developmental Biology

研修期間 2019年4月1日～2020年3月31日

(COVID-19の世界的影響により3月24日に帰国)

研究目的

歯科医療のみならず医学全般に重要な脳神経システムについて研究する。留学先は他分野との共同研究が盛んであることから、最新の手法の発想から実行まで、手法のみならず考え方も学ぶ。また、医学部研究機関に留学することで、多国籍かつ多職種と交流し、さまざまな視点から問題解決へのアプローチを行う方法を学び、多様化する社会のニーズに対応できる力を強化する。



Research Center 1

コロラド大学 Anschutz Medical Campus

研究棟 RC1 (奥が North 棟, 手前側が South 棟)
向かい側には RC2 棟がある。

これら RC1 および RC2 を中心にキャンパス内を
行き来して研修を行った。

さらに RC3 棟が建設中であった。

目次

1. 所属教室について	2
University of Colorado Anschutz Medical Campus	
Department of Cell and Developmental Biology	
1) スタッフ	
2) 専属学生（博士課程・修士課程）	
3) ラボメンバー(Bioengineering)	
4) ラボメンバー(Sch of Pharmacy)	
5) Visiting research associate	
6) 兼担施設	
2. 研究・研修の方法	3
1) 関連したプロジェクトに関して	
SPARC project	
Holographic stimulation project	
2) 実施した手法に関して	
3. 結果	4
4. まとめ	15
1) 研修期間内の成果	
2) 本学の教育に寄与する点	
3) 本学の研究に寄与する点	
5. 謝辞	16

1. 所属教室について

University of Colorado Anschutz Medical Campus
Department of Cell and Developmental Biology

1) スタッフ

主任 教授 Diego Restrepo (Republic of Colombia)

Instructor Ming Ma (China)

博士研究員 Daniel Ramirez-Gordillo (Mexico)

博士研究員 Laetitia Merle (France)

助手 Nicole Arevalo

助手 Brooke D Baxter Bolt

助手 Arianna Gentile Polese

2) 専属学生 (博士課程・修士課程)

博士課程 Justin T Losacco

博士課程 Nicholas George

博士課程 Laylaa Ramos Arriaza

3) ラボメンバー(Bioengineering)

准教授 Emily A Gibson

助教 Stephanie Meyer

助教 Gregory Futia

助手 Gabriel Martinez Sanchez

博士課程 Connor McCullough

博士課程 Tarah A Welton

4) ラボメンバー(Sch of Pharmacy)

助教 Serapio Baca

助手 Matthew Svalina

5) Visiting research associate

Fabio Simoes de Souza, PhD, Associate Professor, Federal University of ABC, Brazil

6) 兼担施設 Rocky Mountain Taste & Smell Center

2. 研究・研修の方法

1) 関連したプロジェクトの種類と概要

1-1) SPARC project

Stimulating Peripheral Activity to Relieve Conditions (SPARC) Project

末梢神経を刺激することで、病態の症状を緩和する方法を模索するプロジェクト

URL: <https://commonfund.nih.gov/sparc>

プロジェクトの全貌は包括的なものであるが、なかでも光学技術の一つであるホログラフィック刺激を用いた場合の迷走神経活動の記録と心臓への迷走神経支配についての課題に取り組んだ。

SPARC project members:

John Caldwell (Professor, Department of Cell and Developmental Biology)

Diego Restrepo (Professor, Department of Cell and Developmental Biology)

Richard Weir (Associate Professor -Research, Bioengineering)

Emily A Gibson (Associate Professor, Bioengineering)

Gregory Futia (Research Associate, Bioengineering)

Arjun Fontaine (Post-Doctoral Fellow, Bioengineering)

Samuel Littich (Research Assistant, Bioengineering)

Naoko Mizoguchi (Visitor, Department of Cell and Developmental Biology)

課題（研修と担当課題）

- ・ Grin Lens の取り扱い
- ・ 免疫組織化学染色
- ・ 組織透明化

1-2) Holographic stimulation project (Lab project)

細胞を刺激する際のパッチクランプ記録を含む、脳スライスにおけるホログラフィック刺激および刺激に対する応答の記録システムの開発に取り組んだ。この一部として、ミニチュア二光子ファイバー結合顕微鏡の取り扱いについて学んだ。

Holographic stimulation project (Lab project) members:

Diego Restrepo (Professor, Department of Cell and Developmental Biology)

Emily A Gibson (Associate Professor, Bioengineering)

Gregory Futia (Research Associate, Bioengineering)

Ming Ma (Instructor, Department of Cell and Developmental Biology)

Naoko Mizoguchi (Visitor, Department of Cell and Developmental Biology)

課題（研修と担当課題）

- ・ Patch Clamp system setup
- ・ AVV ウイルスの注入およびパッチクランプ

2) 上記を研修することで、本学の研究の発展に寄与することを目的とする。

3. 結果

1-1) SPARC project (<https://commonfund.nih.gov/sparc>)

Stimulating Peripheral Activity to Relieve Conditions (SPARC) Project

本プロジェクトの迷走神経を光刺激したときの心臓の応答についての研究チームに参加し、下記担当課題に取り組んだ。

本プロジェクトの知見は下記論文にまとめ、国際誌に投稿予定である。

1) **Selective Modulation of Heart and Respiration through Holographic Stimulation of Opsins in Vagus Nerve Axons Innervating the Heart**

Arjun K. Fontaine¹, Greg L. Futia¹, Pradeep S. Rajendran^{3,4}, Samuel Littich¹, Naoko Mizoguchi^{2,5}, Kalyanam Shivkumar^{3,4}, Jeffrey L. Ardell^{3,4}, Diego Restrepo², John H. Caldwell², Emily A. Gibson¹, Richard F. Weir¹

Departments of ¹Bioengineering and ²Cell and Developmental Biology, University of Colorado - Anschutz Medical Campus, Aurora, Colorado, USA³ UCLA Cardiac Arrhythmia Center and ⁴UCLA Neurocardiology Research Program of Excellence, University of California Los Angeles, Los Angeles, California USA. Division of ⁵Pharmacology, Department of Diagnostic and Therapeutic Sciences, Meikai University School of Dentistry, Saitama, Japan

1-2) 課題 1・Grin Lens およびその周辺システムについて

Grin Lens は近年注目されている特殊レンズの1つである。脳神経の観察においては、従来型のレンズと比較して、焦点距離の変更方法が簡略化されたことで、レンズ近傍の組織を容易に観察することができる。顕微鏡やレーザーと併用して用いることが多い。本学（明海大学歯学部）で導入を計画する上で、すでに実用している研究室で研修できたことは大変有意義であった。以下に成果をまとめる。

【図1】測定装置全体の模式図：Grin Lens と顕微鏡の設置例
投稿予定の研究に用いた機材の模式図である。

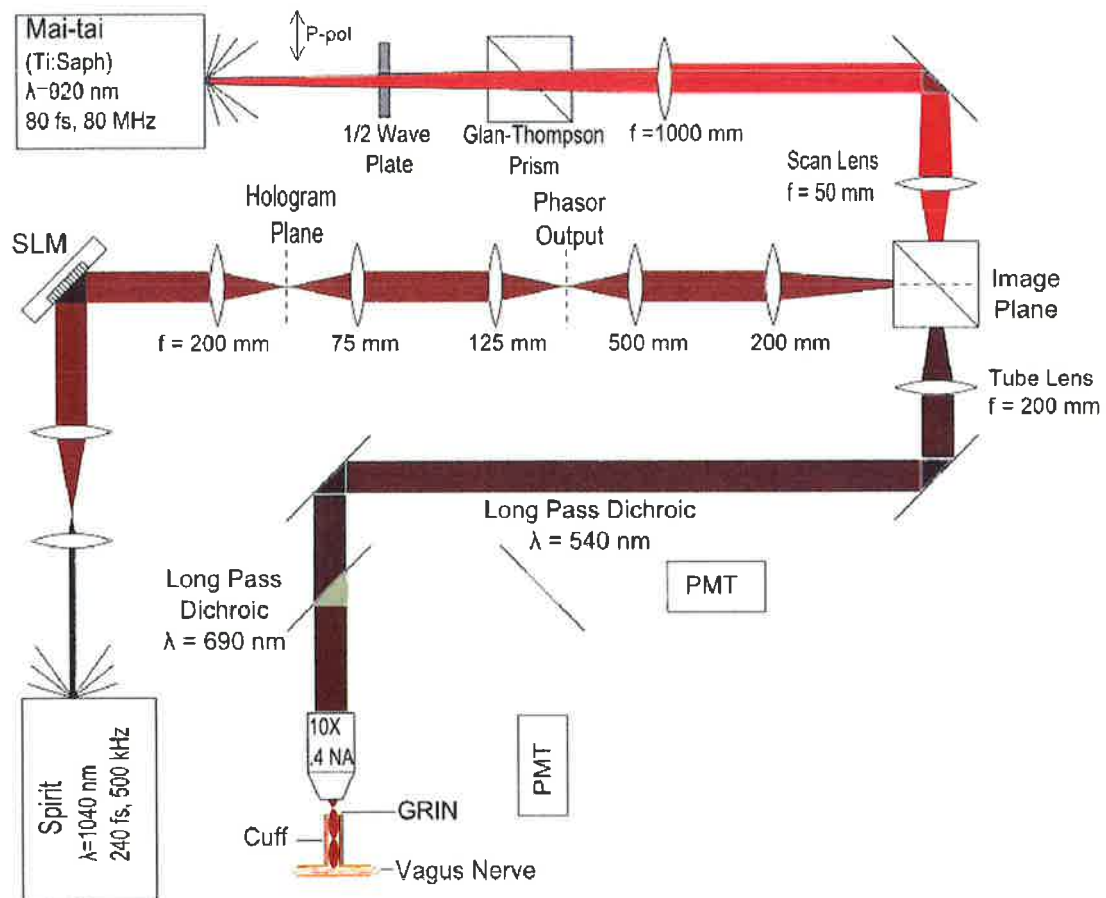


Diagram of 2-Photon Imaging and Photostimulation System

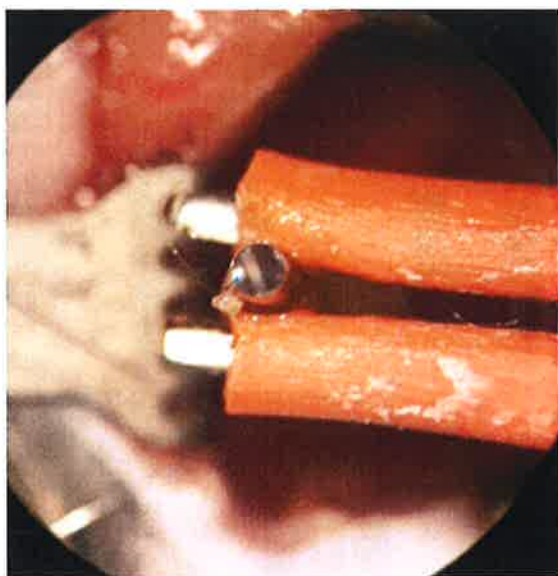
はじめに顕微鏡について説明する。Grin Lens を使用するにあたり、高性能の顕微鏡を併用することが欠かせない。使用した装置は、Bioengineering 分野の Emily および Greg らが実用化したものである。PMT、Mai-tai、Spirit のそれぞれから発せられたレーザー光線は、各種レンズおよびミラーによって対物レンズを通して組織に照射される（光照射刺激）。その後、反射光は対物レンズを通り、Image Plane に集約され結像する。

【図1】に模式図を示した顕微鏡を発展させ、以下の操作をすることができる。

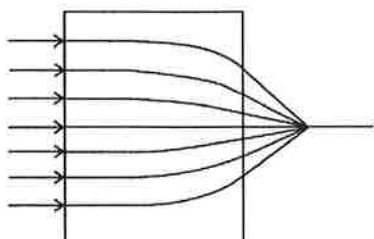
- (1) 1光子顕微鏡として、組織の観察
- (2) 2光子顕微鏡として、組織に対する平面的なレーザー刺激および組織の観察
- (3) 3光子顕微鏡として、目的の組織を3次元的な刺激および組織の観察。つまり立体的に指定し、レーザーによる光刺激および観察をすることができる。

- ・ Grin Lens の取り扱い：【図1】の下部に示すように、頸部の迷走神経を排出した後、シリコン(Silastic MDX4-4210, Dow Corning)製 *Cervical Nerve Cuff* を装着し、GRIN lens に固定する。GRIN lens と組織間には血液が含まれないように注意する。GRIN lens は、水中に保存する。

【図2】 GRIN lens (直径 0.9 mm)。クリップに固定された GRIN lens の中央に白く迷走神経線維が認められる。

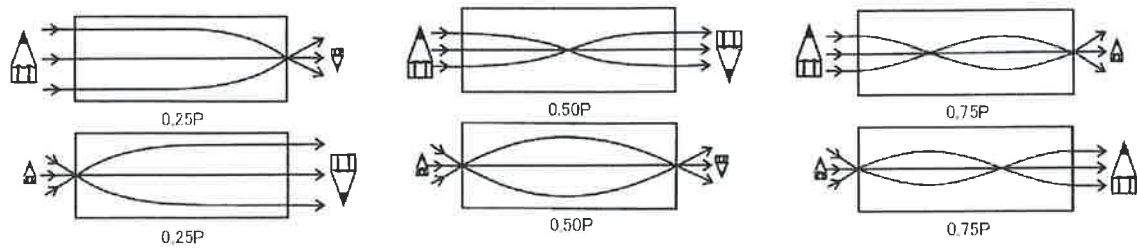


【図3】 Grin lens の原理 (<https://www.gofoton.co.jp/about-grin-lens.html>)



- ・従来のレンズは端面が曲面形状をしているのに対し、Grin lens は端面が平坦かつ全体で円柱状をしている。

【図 4】 P (ピッチ) という、レンズ内を通る光線の蛇行周期に注意して目的にあったレンズを使用する必要がある (<https://www.gofoton.co.jp/about-grin-lens.html>)。

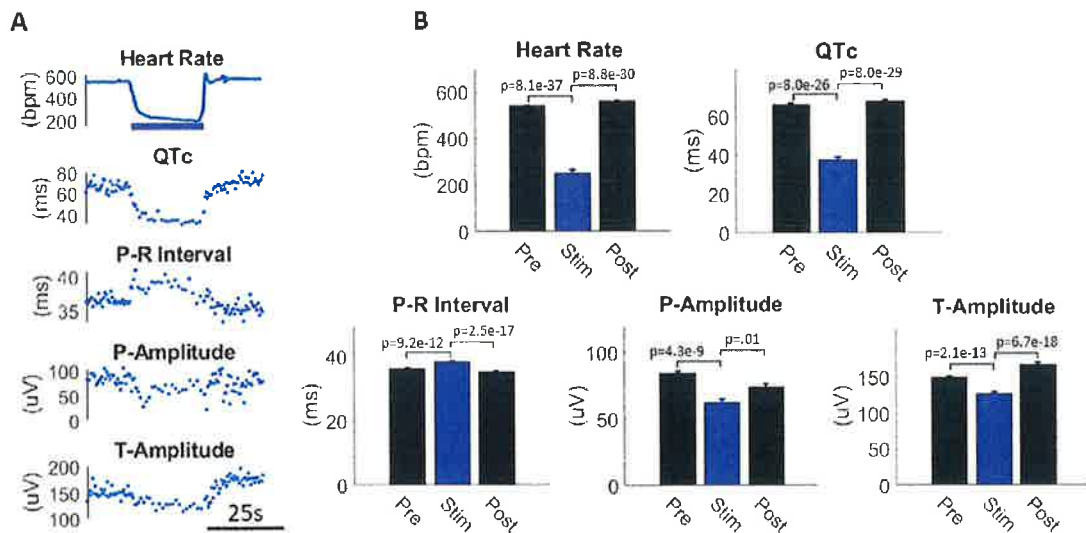


0.25P : 無限遠にある物体の倒立実像が出射端面上に結像する長さ。逆に点光源を入射端面の中心におけば、平行光を得ることができる。

0.50P : 入射端面においた物体の倒立実像が出射端面上に結像する長さ。

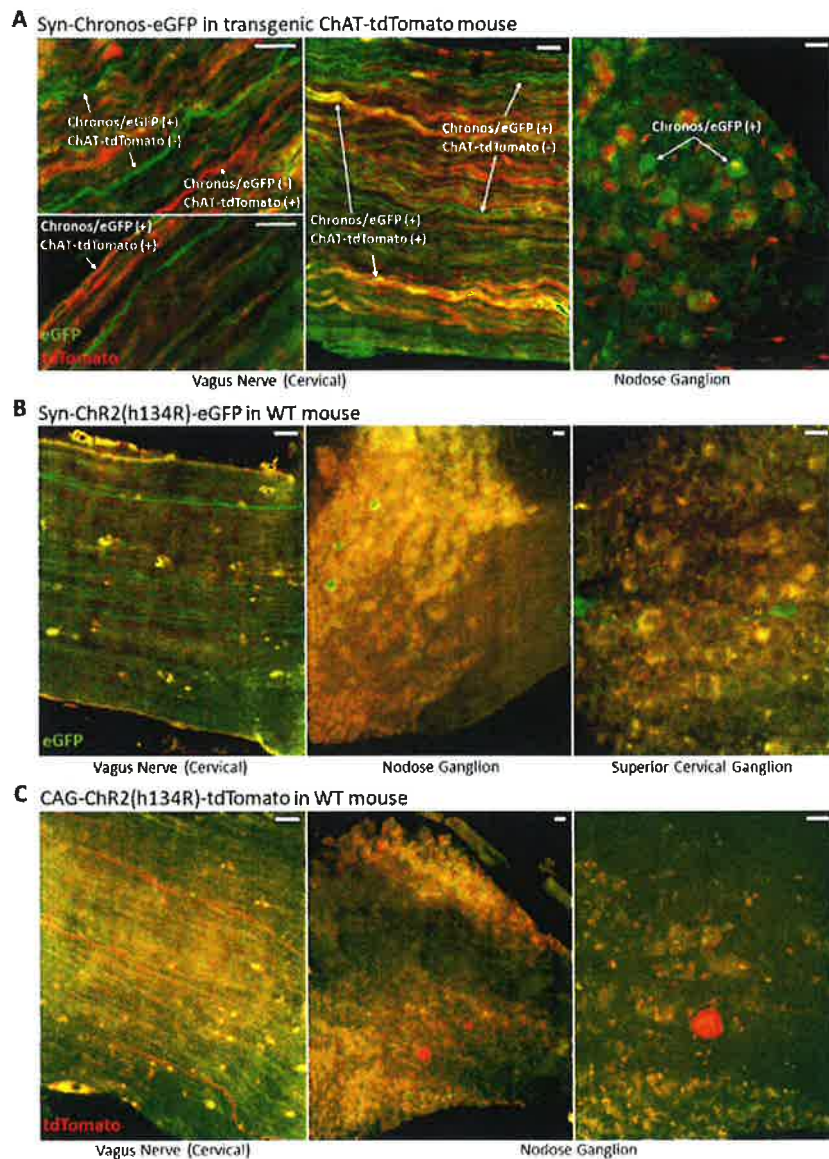
0.75P : 無限遠にある物体の正立実像が出射端面上に結像する長さ。

【図 5】 ChAT-ChR2 遺伝子改変マウスにおける迷走神経心臓枝を光刺激したときの応答



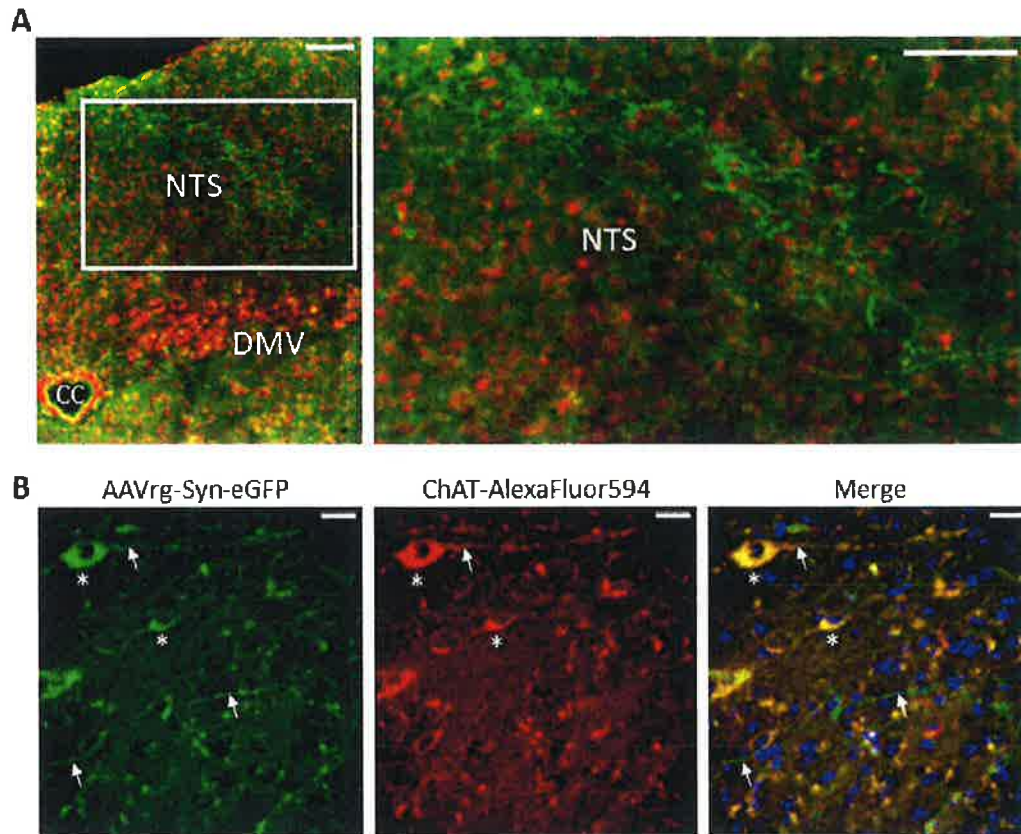
1-photon photostimulation of cervical vagus nerve in a ChAT-ChR2 transgenic mouse. (A) Heart rate is reduced, along with Q-T interval (QTc), P-wave amplitude and T-wave amplitude, while P-R interval is increased during stimulation. (B) Quantification of ECG parameters during the pre-stimulus period, stimulus period and post-stimulus period. (Blue bar: 473nm, 5ms pulses, 20Hz, 15mW unmodulated power)

【図6】 アデノ随伴ウイルス (rAAV2-retro) を心臓に注入後、ラベルされた神経線維と神経節のまとめ



Retrograde labeling in nerve and ganglia with heart-injected rAAV2-retro. Three constructs were injected: (A) Syn-Chronos-eGFP, injected in ChAT-tdTomato transgenic mice. eGFP expression (green) was observed in ChAT-positive (tdTomato, red) and ChAT-negative axons throughout the vagus nerve, and in neurons of the nodose ganglion. (B) Syn-ChR2(h134R)-eGFP (green). eGFP expression is found in axons of the cervical vagus and nodose ganglia neurons, as well as in neurons of the SCG (C) CAG-ChR2(h134R)-tdTomato. tdTomato reporter expression (red) is observed in cervical vagus nerve and nodose ganglia, in a similar expression pattern. (all scale bars are 30 μ m)

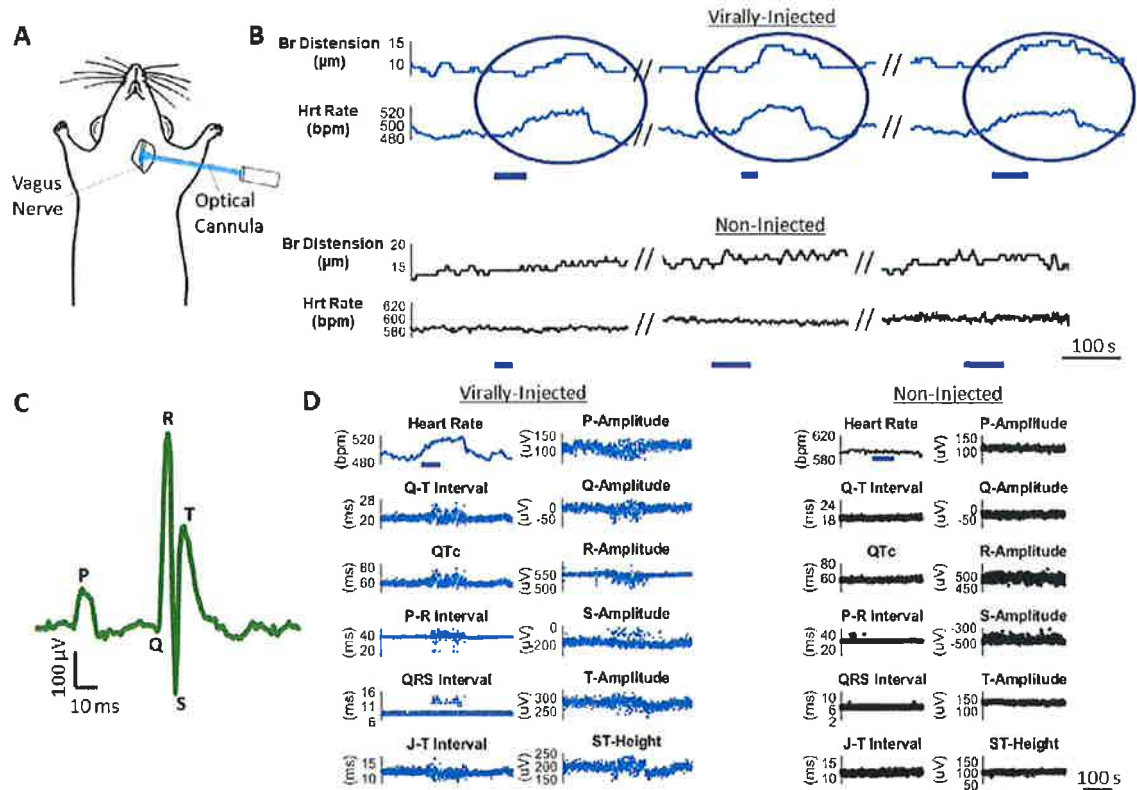
【図7】 アデノ随伴ウイルス (rAAV2-retro) を心臓に注入後、延髄における陽性細胞のまとめ



Retrograde viral reporter labeling in the dorsal brainstem. (A) Representative confocal image showing eGFP in axonal processes (green) in the NTS in mice infected with AAVrg-Syn-ChR2(h134R)-eGFP. Cholinergic neurons of the dorsal motor nucleus of the vagus (DMV) were immunolabeled with ChAT-AlexaFluor594 (red). CC: central canal (scale bar, 100 μ m) (B) Virally transduced neurons expressing eGFP within NTS were also observed. *Left:* At least two neurons (white asterisks) as well as axons (arrows) are positively labeled with eGFP. *Middle:* ChAT antibody stains the eGFP-positive neurons. *Right:* Merged image along with Hoechst stain (blue) shows the co-labeled cholinergic neurons (yellow) and non-co-labeled axons (green) (scale bar, 20 μ m).

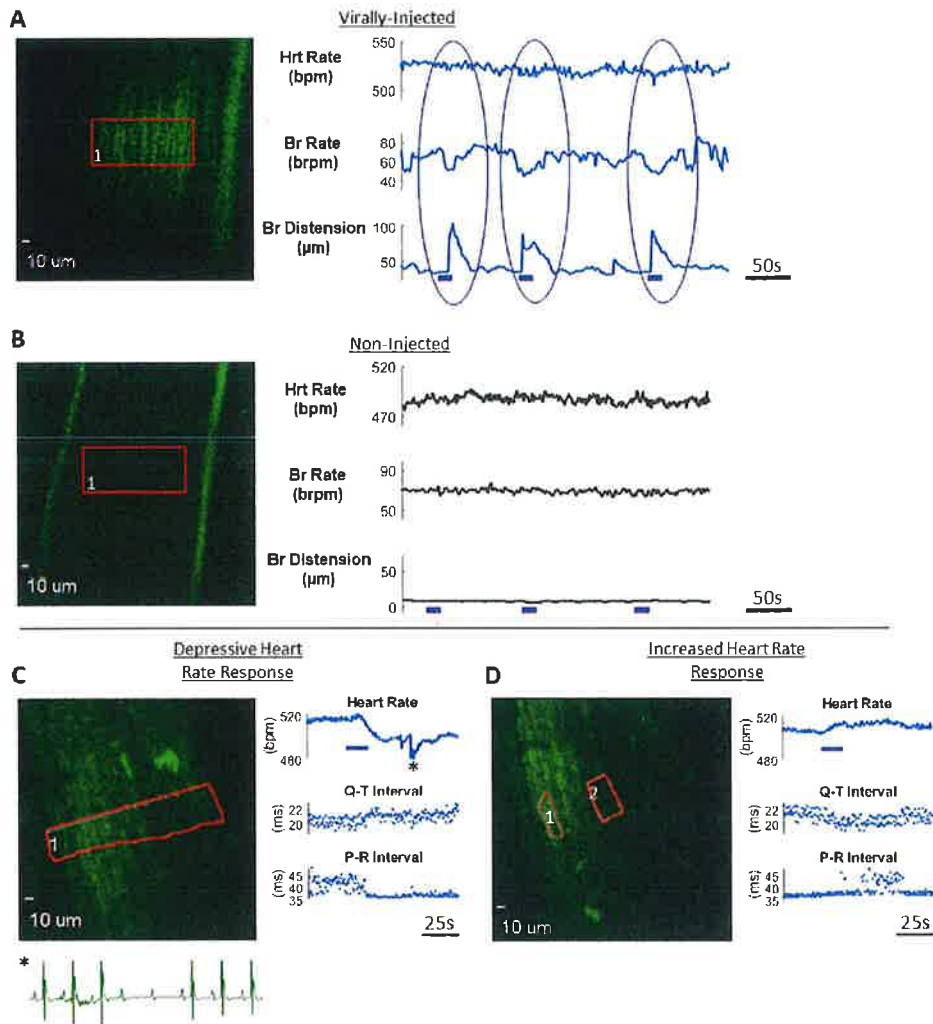
課題2として疫組織化学染色：心臓、脳幹および nodose ganglion に存在する ChAT や c-Fos 等の免疫染色、顕微鏡観察を行った。【図6】【図7】はそれらのまとめである。

【図 8】頸部迷走神経を光刺激したときの心電図パラメータのまとめ。正常時心電図と比較して乱れる様子が観察された。



1-Photon stimulation of the cervical vagus nerve perturbs vitals and ECG parameters. (A) Schematic of photostimulation in the anesthetized mouse. The left vagus nerve is exposed and illuminated with a 473nm laser, delivered through an optical fiber/cannula. (B) Three consecutive photostimuli (blue bar) cause increases in heart rate and breath distension in a virally-injected (AAVrg-Syn-Chronos-eGFP) mouse while no changes occur in the non-injected control mouse. Note that the vertical axes in panels B and D show a limited range of values. (C) Representative ECG waveform (average of 4 beats). (D) Waveform parameters are modulated following stimulus onset through the duration of heart rate excursion in the virally-injected mouse while parameters are unmodulated in non-injected controls. (Blue bar: 473nm, 5ms pulses, 20Hz, 10mW unmodulated power) (E) Quantification of ECG parameters during the pre-stimulus state (Pre), the period in which heart rate is perturbed > 1% from baseline (Stim), and the period following the heart rate perturbation (Post).

【図9】 アデノ随伴ウイルス (rAAV2-retro) を心臓に感染させたマウスの頸部迷走神経に2光子ホログラフィック光刺激を行ったときの応答



2-Photon holographic photostimulation in the cervical vagus nerve in mice infected with rAAV2-retro. (A) 920 nm photoexcitation (red ROI) in AAVrg-CAG-ChR2(h134R)-tdTomato-injected mouse elicited robust response in breath rate and distension. (B) Same photoexcitation in non-injected control mouse did not evoke any respiratory or cardiac responses. (C&D) 1040 nm photoexcitation in AAVrg-Syn-Chronos-eGFP-injected mouse elicited differential heart response with spatially distinct photoexcitation regions (red ROIs). The broad photoexcitation region in panel C caused a depressive heart rate response that led to heart block (asterisk, see inset) while the excitation profile in panel D caused an increase in heart rate and opposing ECG parameter changes. (blue bar: 20Hz pulses, 5 ms pulse duration).

課題3・組織透明化：心臓および脳幹組織を透明化し組織の立体構造を解析した。

【図10】組織透明化システム CLARITY を利用した脳組織の透明化

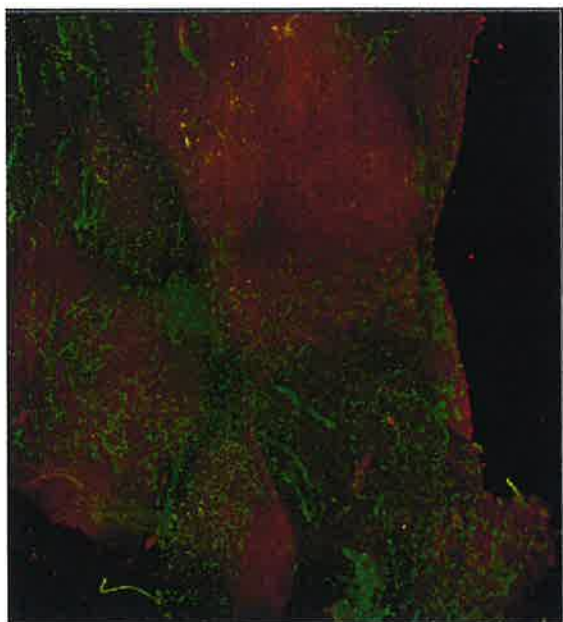


ホルマリン溶液中の脳組織

透明化開始から約1か月後

約2か月後

【図11】透明化した脳組織に免疫組織化学染色を施し、結果を3Dに再構築した例
写真は、延髄の一部である。赤：ChAT-tdTomato、緑：Syn - Chronos - eGFP



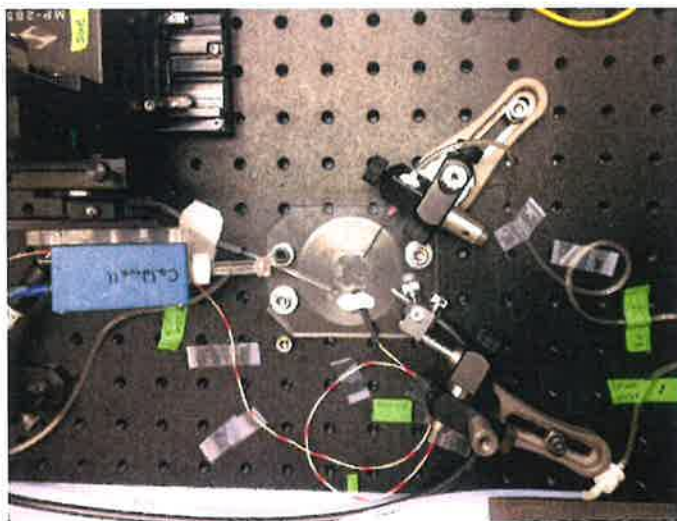
1-2) Holographic stimulation project (Lab project)

1-2-2) 課題 (研修と担当課題)

- ・ 3光子顕微鏡下で Patch clamp を可能にする技術の Set up
- ・ AVV ウイルスの注入および注入後組織を使用したパッチクランプ技術の確立

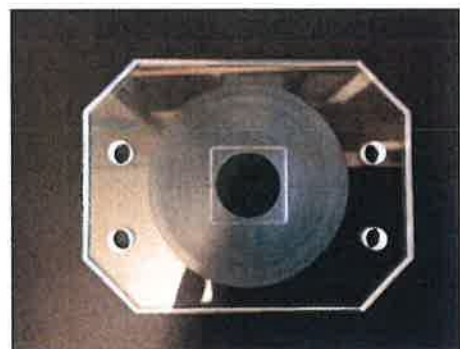
これらの手法によって、遺伝子改変動物もしくは、例えばアデノ随伴ウイルス (AVV) をマウス脳内に注入し、GCaMP などのタンパク質で出来たカルシウムセンサーを興奮性神経細胞に特異的に発現させた組織と組み合わせることでこれまでより詳細に神経活動をとらえることができるようになる。GCaMP 陽性細胞は興奮すると光るようになるのであるが、実際にその陽性細胞にパッチクランプをした後、レーザーでその陽性細胞だけを光刺激して、陽性細胞から得られた応答をカルシウムイメージング、パッチクランプ記録で同時に観察するシステムを作成することに携わった。以下に成果をまとめる。

【図 12】 パッチクランプ用セットアップ



【図 13】 組織用チャンバー

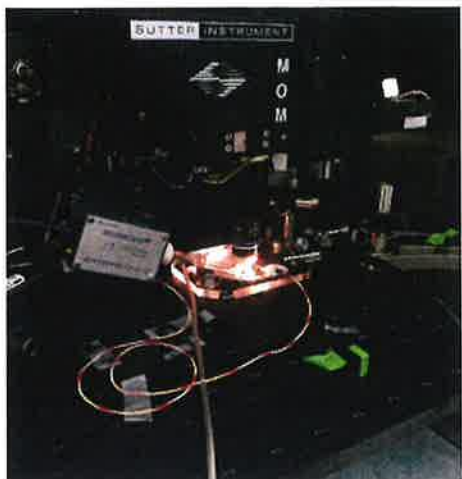
(報告者が設計し、実用化した)



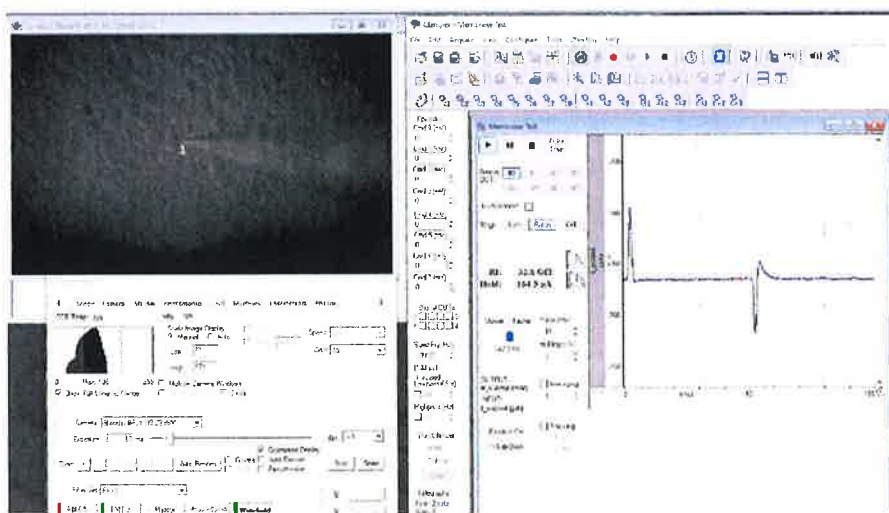
【図 14】 パッチクランプ用 組織片 (スライス) セットアップ (報告者がセットアップした)



【図15】パッチクランプ設備の稼働時の一部分



【図16】パッチクランプ稼働時の記録画面（写真左上が細胞にガラス電極をシールしたときの画像、右がメンブレンテスト時の記録画像になっている）



AVV ウイルスを実験動物（マウス）へ注入する技術を学んだ。それに並行して、注入後組織を使用した3光子顕微鏡下でのパッチクランプ技術の確立を目指した。

研修期間中、論文作成最小限の研究のみならず、それ以外のプロジェクトにも参加でき、経験を積むことができた。

その他の結果として、学部生のラボローテーション・プログラムでラボ所属となった学生とのディスカッションを行う経験を得た。

4. まとめ

1) 研修期間内の成果

- ①医学研究施設において、医学全般に重要な脳神経システムについて研究することができた。
- ②留学先は他分野との共同研究が盛んであることから、最新の手法の発想から実行まで、手法のみならず考え方も学ぶことができた。
- ③医学部研究機関に留学したことで、多国籍かつ多職種と交流し、さまざまな視点から問題解決へのアプローチを行う方法を学ぶことができた。この経験は、多様化する社会のニーズに対応する力を強化することに貢献すると考える。
- ④下記、貴重な先端実験技術の経験を得ることができた。
 - ・ Grin Lens の取り扱い方法を学ぶことができた。本学既存設備と組み合わせる際に、懸念される事項解決のヒントを得ることができた。
 - ・ 組織透明化システムと免疫組織化学染色を組み合わせ、さらに Light Sheet 顕微鏡という特殊装置を使い、本学既存設備では実施することができない 3 次元立体構築を行うことができた。
 - ・ Patch Clamp system と 3 光子顕微鏡を組み合わせる先端技術のセットアップに貢献することができた。
 - ・ AVV ウイルスの実験動物への注入技術および組織のパッチクランプへの応用技術を経験することができた。

2) 本学の教育に寄与する点

- ①多国籍かつ多職種と交流し、さまざまな視点から問題解決へのアプローチを行う方法を学ぶことができた。この経験は、多様化する社会のニーズに対応する力を強化することに貢献すると考える。

3) 本学の研究に寄与する点

- ①将来的に University of Colorado Anschutz Medical Campus Department of Cell and Developmental Biology および Rocky Mountain Taste & Smell Center あるいは多講座間での共同研究の実現が示唆される。

5. 謝辞

稿を終えるにあたりまして、留学期間中ご指導を頂戴しましたコロラド大学 **Diego Restrepo 教授**に深く感謝の意を表します。また、本研究および研修を遂行するにあたり、多大なるご援助を賜りました教室および関連プロジェクトメンバーの諸先生、博士研究員、スタッフおよび大学院生の方々に感謝申し上げます。

本海外研修の実現に向けて多大なるご尽力をいただきました、コロラド大学 Amy Bello 様をはじめとしたスタッフの皆様、明海大学歯学部の事務課の皆様、薬理学分野 **安達 一典 教授**、生理学分野 **村本 和世 教授**、草間 薫 学部長、安井 利一 学長、宮田 淳 理事長に厚く御礼申し上げます。