

氏 名 高橋 泰伽

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2337 号

学位授与の日付 2022 年 3 月 24 日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻  
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Large-scale two-photon imaging of living mouse brain  
utilizing hydrophilized fluoropolymer nanosheet

論文審査委員 主 査 北城 圭一  
生理科学専攻 教授  
根本 知己  
生理科学専攻 教授  
吉村 由美子  
生理科学専攻 教授  
曾我 公平  
東京理科大学 先進工学部 教授

(Form 3)

## Summary of Doctoral Thesis

Name in full Takahashi, Taiga

Title Large-scale two-photon imaging of living mouse brain utilizing hydrophilized fluoropolymer nanosheet

*In vivo* imaging using two-photon microscopy in animal brains with a broad field of view has revealed functional connectivity between brain regions. For observation of mouse brains, the “open skull method” was employed to create a cranial window, in which the mouse skull is completely removed and replaced with a high transparent material such as a glass coverslip. However, bleeding at the brain surface is inevitable to remove the submillimeter-thick cranial skull, which results in deterioration of fluorescent signals due to the optical absorption of hemoglobin. In addition, the open skull method is usually employed for a small cranial window (2 - 4 mm in diameter) to avoid injury in large vessels and unnecessary bleeding. Generally, the size of cranial windows using a flat glass coverslip has been restricted to a maximal 5 mm in diameter to avoid pressure on the brain tissue. To overcome the restriction, methods with large cranial windows have been proposed utilizing novel sealing materials such as curved-glass or soft-polymer. These methods can avoid pressing the brain surface as the sealing materials are designed to fit the curvature of the living brain surface. However, these sealing materials were thick with a high refractive index, resulting in various optical aberrations.

In this study, I proposed the novel cranial window utilizing polymer thin film, also known as nanosheet, as a sealing material for *in vivo* two-photon imaging with a broad field of view (FOV). Nanosheets with a thickness in the order of 10–100 nm have unique properties, including high adhesion strength, flexibility, and transparency. Previously,

biocompatible nanosheets composed of poly (L-lactic acid) were developed to effectively stop bleeding on the organs including liver and skin as a glue-free wound dressing.

To apply a nanosheet to a living mouse brain, I employed a polyethylene-oxide coated CYTOP (PEO-CYTOP) nanosheet with a thickness of ~130 nm. I chemically hydrophilized a single-side surface of the sheet by modification with polyethylene oxide (PEO) to reduce inflammatory reactions. As a sealing material of a cranial window in the open skull method, PEO-CYTOP nanosheets were confirmed to firmly adhere to brain surfaces resulting in suppression of the bleeding from superficial veins. Next, I made such a larger cranial window as the approximately whole parietal region by utilizing the PEO-CYTOP nanosheet by taking advantage of the flexibility of PEO-CYTOP nanosheets. The window realized *in vivo* two-photon imaging of neural structure with a broad FOV at a high spatial resolution on the parietal region of Thy1-EYFP-H transgenic mouse. To demonstrate wide-field imaging on the whole parietal region, I achieved  $\text{Ca}^{2+}$  imaging by epi-fluorescent microscopy in G7NG817 transgenic mouse that expressed a  $\text{Ca}^{2+}$  indicator G-CaMP7 in mainly astrocytes. To verify long-term availability, a small cranial window with a PEO-CYTOP nanosheet was covered with a glass coverslip as a protector of the brain surface against foreign substances and injury. Up to 9 weeks after the surgery, the transparency of the cranial window was kept, and *in vivo* two-photon  $\text{Ca}^{2+}$  imaging at a single-cell resolution was achieved through the cranial window in G7NG817 transgenic mice.

Furthermore, I improved the method to make the cranial window combined with the PEO-CYTOP nanosheet and UV curable resin (NIRE, Nanosheet Improved by light curable REsin). In this method, I laminated UV curable resin on the upper surface of the PEO-CYTOP nanosheet to seal the cranial window. During curing the resin by UV irradiation, harmful heat productions were suppressed by the irradiation time and the light power optimized by a handmade programmable irradiation system. As a result,

NIRE method successfully visualized various neural structures in multi-scale ranging from the whole parietal region to single dendritic spines of the neuron in Thy1-EYFP-H transgenic mouse. Furthermore, NIRE method realized *in vivo* multi-scale  $\text{Ca}^{2+}$  imaging for neural activities from a population of several hundred neurons to single dendritic spines in jRCaMP7 expressing mouse brains. In addition, this method suppressed the motion artifact. Noticeably, the cranial window kept the transparency over 166 days probably due to suppression of inflammatory reactions. Finally, NIRE method successfully demonstrated *in vivo* 3D imaging of Thy1-EYFP-H transgenic mouse through such a large cranial window from the cerebral cortex to the cerebellum.

In conclusion, I utilized the PEO-CYTOP nanosheet as a sealing material of cranial windows to achieve *in vivo* imaging with a broad FOV in the mouse brain. In addition, I proposed NIRE method to achieve *in vivo* multi-scale and long-term imaging of neural structures and neural activities in mouse brains. This method promotes the understanding of the brain functions based on the coordinated activities across multiple cortical regions in living animals.

## 博士論文審査結果

Name in Full  
氏名 高橋 泰伽Title  
論文題目 Large-scale two-photon imaging of living mouse brain utilizing hydrophilized fluoropolymer nanosheet

脳機能の全容を解明するためには、局所領域の単一神経細胞の活動から、広範囲の神経ネットワーク全体の活動までを多層的に計測する必要がある。細胞の局在と機能を同時に可視化できる「二光子顕微鏡」を用いて、マウス生体脳深部を高解像度で観察するためには、光の散乱・吸収の原因となる頭蓋骨を除去し、観察対象領域の直上にカバーガラスによる透明な観察窓を作成するための外科手術を実施する必要がある。しかし、一般的な本手法の適用領域は直径数 mm 程度であった。これは、広範囲の頭蓋骨を除去する場合、脳の出血、炎症等が生じやすくなるためである。また、一般的に使用される平坦なカバーガラスは脳の曲率に対応できないため、広範囲観察窓の素材として使用した場合は生体脳を強く圧迫する。これにより、血液や脳脊髄液等の体液循環に障害を及ぼすことも問題であった。

出願者は、上記の課題に対して、新規生体適合性ナノ材料であるナノシートをマウスの頭蓋骨の代替物として活用する広範囲観察窓の作成法を考案した。ナノシートとは高分子を素材とする厚さ 100 nm 前後の薄膜である。出願者は、マウス生体脳への接着性を高めた PEO-CYTOP ナノシートを、観察窓の素材として活用した。PEO-CYTOP ナノシートは、優れた光学特性を有する CYTOP を主な構成素材とし、さらに生体組織への接着力を高めるために、polyethylene oxide (PEO) を用いて接着面の親水化処理を行ったものである。出願者は、PEO-CYTOP ナノシートが生体脳表面に強く接着し、出血を抑制することを実証した。また、PEO-CYTOP ナノシートを頭頂域全体に渡る広範囲観察窓の作成に応用することで、大域的な  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングに成功した。さらに、広範囲かつ脳深部の神経細胞の形態イメージングを行った。取得した形態の情報を三次元再構成することによって、PEO-CYTOP ナノシートを用いた広範囲観察窓においては、脳を圧迫していないことを実証した。

上述の PEO-CYTOP ナノシートを用いた広範囲観察窓には、ナノシートの柔軟性ゆえに、覚醒下マウスの観察時に視野ブレが生じることと、外部からの異物等から長期的に観察窓を維持できないという問題点があった。出願者は、これらの課題を解決するために、新しい観察窓作成手法である NIRE 法 (Nanosheet Improved by light curable REsin) を考案した。NIRE 法は、PEO-CYTOP ナノシートを脳に貼り付けたのち、UV 硬化性樹脂でナノシートをコーティングすることで観察窓を作成する手法である。出願者は、この新規手法によって、覚醒下マウスの観察時に生じる視野ブレの低減および、長期的な脳組織の保護が可能であることを実証した。また、NIRE 法を用いた観察窓を利用し、同一個体の脳内において、神経細胞の形態および  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングを領野サイズから樹状突起スパ

インサイズまでマルチスケールに取得することに成功した。さらに、本手法の適用領域を拡張することによって、大脳皮質、中脳、小脳に位置する神経細胞を、同一個体においてイメージングが可能な広範囲観察窓の作成に、世界に先駆けて成功した。

出願者の研究によって開発された観察窓作成手法は、**MRI**等によるマクロな領野レベルの機能計測手法と、光学顕微鏡によるミクロな細胞および分子レベルの活動を計測する手法の隙間を埋める方法論である。本手法は、多層的に実現されている高次脳機能を解明に大いに貢献することが期待される。

以上の理由から、審査委員会は、本論文が学位の授与に値すると判断した。