

2025年8月28日

各報道機関 御中

国立大学法人 山梨大学

国立大学法人 豊橋技術科学大学

世界初、脳の細胞「外」カルシウム動態を“非標識”で可視化することに成功

新型 CMOS カルシウムイメージセンサ誕生

### 【概要】

山梨大学医学部薬理学講座 小泉修一教授及びパラジュリ ビージェイ特任助教並びに、豊橋技術科学大学次世代半導体・センサ科学研究所 澤田和明教授及び土井英生特任助教の研究チームは、「CMOS カルシウムイメージセンサ」という新しいイメージングデバイスを開発し、非標識で、神経細胞やグリア細胞の活動に伴って生じる細胞外カルシウム ( $\text{Ca}^{2+}_o$ ) のダイナミックな変化を可視化することに成功しました。

カルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) は、神経伝達物質やホルモンの放出、筋肉の収縮、遺伝子発現等、細胞の機能制御で不可欠な役割を担っています。これら  $\text{Ca}^{2+}$  は、生理的刺激条件下、病態時等に、細胞内で劇的に上昇することで様々な細胞機能を惹起するため、これまでのほとんどすべての研究は、細胞「内」カルシウム ( $\text{Ca}^{2+}_i$ ) の時空間動態に注目したものでした。従って  $\text{Ca}^{2+}_i$  測定のための、有機化学的な蛍光プローブ、遺伝的にコードした  $\text{Ca}^{2+}$  蛍光蛋白質など、莫大な数、多様性に富んだ、高度な可視化技術が次々と開発され、バイオロジー分野の研究を大きく発展させてきました。一方、 $\text{Ca}^{2+}$  は細胞外にも存在するものの、「細胞「外」カルシウム ( $\text{Ca}^{2+}_o$ )」にはこれまで殆ど注目が集まらず、その解析手法も限られた特殊な技術にとどまっていました。

こうした背景のもと、本研究チームは、最先端の半導体技術で広く用いられている CMOS (相補型金属酸化膜半導体) 集積回路技術を基盤とし、 $\text{Ca}^{2+}$  選択性イオノフォアを塗布した「 $\text{Ca}^{2+}$  イメージセンサ」を世界で初めて開発し、脳科学への応用に成功しました。その結果、神経細胞やグリア細胞の活動に伴って、脳細胞周囲の  $\text{Ca}^{2+}_o$  が予想を大きく上回って低下すること、この低下が波のように空間的に広がる現象が起こること、が明らかとなりました。さらにこの  $\text{Ca}^{2+}_o$  低下の分子メカニズムに、NMDA 受容体が重要な役割を果たしていることも明らかにしました。 $\text{Ca}^{2+}_o$  の変動は、非常に大きくダイナミックで、その程度は脳部位により異なってお

り、さらにそれが周辺にシグナルのように伝わっていきました。従って、 $\text{Ca}^{2+}_o$  そのものが、全く新しい「シグナル」として、神経細胞やグリア細胞の機能を調節している可能性が示唆されました。このように、CMOS- $\text{Ca}^{2+}$ イメージセンサによる脳の  $\text{Ca}^{2+}_o$  の解析により、新しい脳の調節機構や、脳疾患の新しい原因が明らかになることが期待されます。

この研究の結果は、2025年6月27日付で *Biosensors and Bioelectronics* 誌上にオンライン版が掲載されました。

### 【論文情報】

論文タイトル: Development of a label-free  $\text{Ca}^{2+}$  image sensor to visualize extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics in biological samples

著者: Bijay Parajuli<sup>#</sup>, Hideo Doi<sup>#</sup>, Eiji Shigetomi, Hideaki Suzuki, Kozo Saito, Kazuaki Sawada\* & Schuichi Koizumi\*

\*責任著者、#同一貢献

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2025.117729>

掲載誌: *Biosensors and Bioelectronics* (IF=10.5)

### 【研究内容】

#### 「背景」

細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}^{2+}_i$ ) は、神経伝達物質やホルモンの放出、筋肉の収縮、遺伝子発現等、多岐にわたる細胞機能を担う最も重要な分子として良く知られています。特に、神経細胞における  $\text{Ca}^{2+}_i$  上昇は、シナプス伝達、記憶・学習といった高次脳機能に密接に関与していることから、これまで世界中の非常に多くの研究者が  $\text{Ca}^{2+}_i$  の解析を精力的に行ってきました。その過程で、様々な  $\text{Ca}^{2+}_i$  イメージング技術が開発され、脳機能の理解が大きく進展しました。

$\text{Ca}^{2+}_i$  の濃度変化は、細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入および小胞体などの内部ストアからの放出の結果として生じる現象であり、 $\text{Ca}^{2+}_o$  はその供給源として極めて重要です。神経活動の亢進に伴い、細胞外から細胞内へ  $\text{Ca}^{2+}$  が流入し、結果として局所的な  $\text{Ca}^{2+}_o$  濃度が低下すると考えられますが、これまで  $\text{Ca}^{2+}_o$  の動態には殆ど注目が集まりませんでした。その背景には、

細胞外空間は広いために  $\text{Ca}^{2+}$  はほとんど変化しないという誤解や、 $\text{Ca}^{2+}$  の時空間ダイナミクスを可視化する手法が存在しなかったことが挙げられます。最近、 $\text{Ca}^{2+}$  の変動そのものが神経細胞やグリア細胞に「細胞外環境の変化」として認識され、新たな細胞間シグナルとして機能する可能性が指摘されています。さらに、脳卒中やてんかん発作、片頭痛の発症過程では、局所的な  $\text{Ca}^{2+}$  低下が神経細胞の興奮性変化や、病的なシナプス再編成の引き金となることが示唆されています。

従来 of  $\text{Ca}^{2+}$  解析手法には多くの制約がありました。例えば  $\text{Ca}^{2+}$  感受性のマイクロ電極では、測定は単一部位に限られ、空間的な変動情報が得られません。また灌流液中の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を測定する方法では時間分解能が不十分であり、 $\text{Ca}^{2+}$  の時間ダイナミクスを解析することは困難でした。

このような課題を踏まえ、本研究チームは  $\text{Ca}^{2+}$  イメージセンサを開発し、ラベルフリーでマウス海馬における  $\text{Ca}^{2+}$  の濃度変化を高い時間・空間解像度で可視化することに世界で初めて成功しました。本技術は、正常時及び疾患時の脳内  $\text{Ca}^{2+}$  ダイナミクス解析を可能とするものであり、これによりこれまでに無い視点から脳機能や脳疾患の理解が進むことが期待されます。

## 「研究成果」

### (1) $\text{Ca}^{2+}$ イメージセンサの開発と特徴

本研究では、CMOS 技術を基盤とする電荷移動型イオンイメージセンサーに  $\text{Ca}^{2+}$  選択性イオノフォアを塗布することで、 $\text{Ca}^{2+}$  イメージセンサを開発しました。本  $\text{Ca}^{2+}$  イメージセンサは、 $\text{Ca}^{2+}$  がセンサ表面の膜内に拡散し、イオン感受性表面に到達することで変化する表面電位をリアルタイムに検出し、それを動的な画像として可視化できます(図 1)。特に、センサ表面に塗布した  $\text{Ca}^{2+}$  選択性イオノフォアにより、ナトリウムやカリウム、マグネシウムといった他の金属イオンには反応せず、 $\text{Ca}^{2+}$  に対して高い選択性と特異性を持っている点が特徴です。今回開発した  $\text{Ca}^{2+}$  イメージセンサは、時間分解能 33 ミリ秒、空間分解能 23.55  $\mu\text{m}$  という非常に高い時空間分解能を備えており、細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化をリアルタイムで高精細に可視化できます。また  $\text{Ca}^{2+}$  蛍光色素など、 $\text{Ca}^{2+}$  イメージングで頻用されるような特別な標識は不要で、ラベルフリーで  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングするという大きな特徴を有しています。

### (2) $\text{Ca}^{2+}$ イメージセンサによる海馬領域特異的 $\text{Ca}^{2+}$ 動態の可視化

今回開発した  $\text{Ca}^{2+}$  イメージセンサにより、脳組織の  $\text{Ca}^{2+}$  変動を、極めて高い時空間分解能

で可視化することが可能となりました。具体的には、マウス急性海馬スライス標本を切り出し、栄養液とともに  $\text{Ca}^{2+}$  イメージセンサの上に置き、神経細胞の興奮を人工的に起こし(興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸刺激)、 $\text{Ca}^{2+}$  の変化をイメージングしました。海馬は、解剖学的にも生理的にも異なる領域から構成されていることがわかっていますが、グルタミン酸刺激による  $\text{Ca}^{2+}$  変動は、脳領域ごとに異なっていました。例えば、CA1 領域および歯状回(DG)ではグルタミン酸刺激に伴い  $\text{Ca}^{2+}$  は約50%も低下しました。さらにこの  $\text{Ca}^{2+}$  低下は、周辺に波のように伝播していきことがわかりました。一方、CA3 領域では  $\text{Ca}^{2+}$  の低下は比較的軽度でした(図2)。

$\text{Ca}^{2+}$  は、主に AMPA 型および NMDA 型グルタミン酸受容体 (AMPA 受容体、NMDA 受容体) を介して神経細胞外から細胞内へ流入します。そこで NMDA や AMPA 受容体の拮抗薬の作用を検討したところ、グルタミン酸刺激による  $\text{Ca}^{2+}$  の減少は NMDA 受容体拮抗薬によってほぼ完全に抑制されましたが、AMPA 受容体拮抗薬では抑制されませんでした(図 3)。この結果は、興奮性のシナプス伝達により、神経細胞の NMDA 受容体が開口し、 $\text{Ca}^{2+}$  が細胞外から細胞内に流入することにより、 $\text{Ca}^{2+}$  低下が起こることを示唆するものです。また、海馬の脳領域特異的な  $\text{Ca}^{2+}$  低下の違いは、各領域における NMDA 受容体の発現量や分布の違いに起因している可能性が高いと考えられます。

今回の発見により、神経細胞やグリア細胞の活動に伴って、脳内では  $\text{Ca}^{2+}$  だけでなく、 $\text{Ca}^{2+}$  も大きくダイナミックに変化すること、この変化が脳領域ごとの細胞構造や分子分布に依存した高度に調節された現象であること、がわかりました。これは、 $\text{Ca}^{2+}$  変化そのものが、特定の脳部位におけるシグナルとして機能している可能性を示唆するものです。従って、 $\text{Ca}^{2+}$  変動は、「脳の新しいシグナル」として、今後の脳研究・脳疾患研究の発展に大きな役割を果たすことが期待されます。

## 「今後の展開」

$\text{Ca}^{2+}$  イメージセンサにより、特定の脳領域、特定の神経回路の興奮に伴う  $\text{Ca}^{2+}$  変化及びその伝播を高い時空間分解能で観察・解析することができるようになりました。 $\text{Ca}^{2+}$  は、 $\text{Ca}^{2+}$  への  $\text{Ca}^{2+}$  供給源として重要であるだけでなく、**その変動そのものが生理的な「シグナル」**である可能性が高くなってきました。本  $\text{Ca}^{2+}$  イメージセンサは、ラベルフリーで  $\text{Ca}^{2+}$  のイメージングができることから、非ヒト霊長類やヒト組織といった遺伝子改変が困難な標本にも適用可能です。

今後、種々の刺激、脳部位で  $\text{Ca}^{2+}$  と脳機能との関連性を明らかにすること、さらに種々の

疾患モデルにおける  $Ca^{2+}$  変動の時空間ダイナミクスを解析することで、脳の新しいシグナルとして「 $Ca^{2+}$ 」の生理的・病態生理的な役割が解明され、新たな脳機能制御や疾患の分子病態の解明に繋がることが期待されます。

本研究は、文部科学省 科学研究費助成事業 学術変革領域研究(A) (20H05902)、新学術領域研究(18H05121)、基盤研究(A) (21H04786; 24H00583; 23H00182)、基盤研究(C) (23K05976)、若手研究(24K17322)、挑戦的研究(萌芽) (21K19309; 23K18162)、AMED-CREST (JP20gm131000)、AMED-ASPIRE (23jf0126004h000)、JST-CREST (JPMJCR14G2)、ABiS (22H04926)、Moonshot(24zf0127012)、武田科学振興財団、文部科学省次世代 X-nics 半導体創生拠点形成事業(JPJ011438)及び山梨大学による支援を受けて行われました。

【図及び説明】

図 1

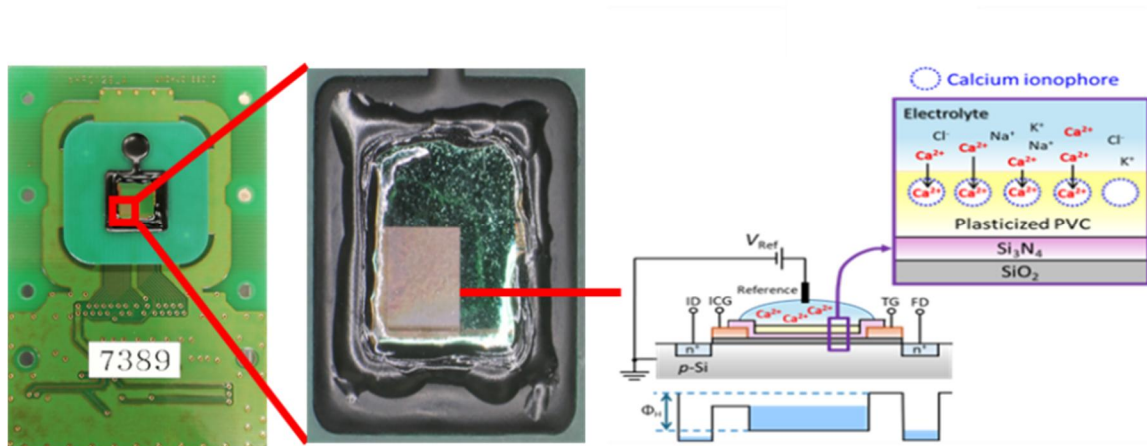


図1  $\text{Ca}^{2+}$ イメージセンサの全体像と原理。

左： $\text{Ca}^{2+}$ イメージセンサの全体像。赤い四角がセンシングエリアである。 $\text{Ca}^{2+}$ イメージセンサのセンシングエリアは、 $128 \times 128$  ピクセルで構成され、各ピクセルの検出領域は  $23.55 \times 23.55 \mu\text{m}^2$  である。この領域の電位変化を 33 ミリ秒毎に計測できる。つまり  $23.55 \mu\text{m}$  の空間分解能、33 ミリ秒の時間分解能で  $\text{Ca}^{2+}$  の変化が計測可能である。

右： $\text{Ca}^{2+}$ イメージセンサの原理。可塑化 PVC (Polyvinyl chloride) 膜にカルシウム選択的イオノフォア (calcium ionophore) を埋め込むことで  $\text{Ca}^{2+}$  感応膜を形成した。この  $\text{Ca}^{2+}$  感応膜により、脳標本の細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  を選択的にトラップし、そのシグナルが窒化ケイ素 ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ) 膜表面に伝わり、各ピクセルの  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化を電子量変化に変換することでイメージングが可能となる。

図2

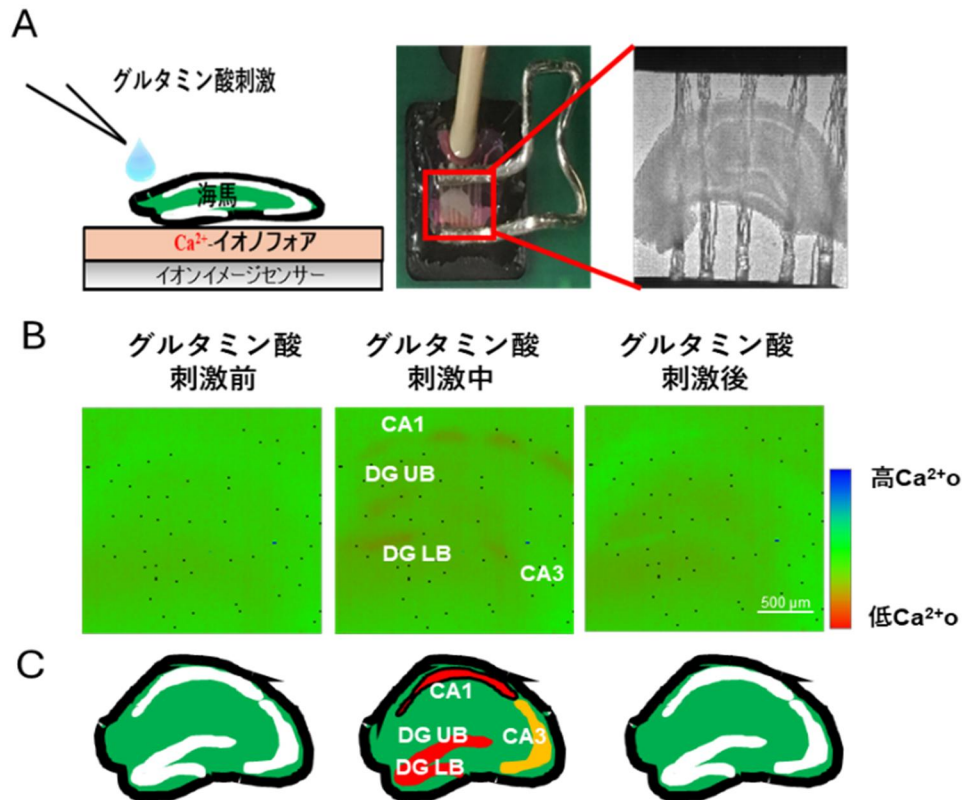


図2  $\text{Ca}^{2+}$ イメージセンサによる海馬スライスにおけるグルタミン酸刺激に伴う  $\text{Ca}^{2+}$ o 濃度の動態解析

- 実験の概略図(左)と、実際の海馬組織を  $\text{Ca}^{2+}$ イメージセンサに乗せた写真(中央及び右図)
- グルタミン酸刺激前、刺激中及び刺激後の  $\text{Ca}^{2+}$ o の変化。グルタミン酸刺激により、海馬 CA1 及び DG で先ず  $\text{Ca}^{2+}$ o 濃度が約50%低下し、これは波のように他の脳部位へ伝播した(赤)。
- 海馬領域ごとの  $\text{Ca}^{2+}$ o の低下の模式図。CA1 や DG(赤)と比較すると、CA3(黄色)領域では、 $\text{Ca}^{2+}$ o 低下は小さく、またオンセットも遅かった。同じ海馬内でも、 $\text{Ca}^{2+}$ o 変化の時空間ダイナミクスは大きく異なる。





## 【用語説明】

1. CMOS: 電子回路の作り方の一種で、Complementary Metal Oxide Semiconductor の略。低消費電力であり、カメラ、スマホ、パソコンなど身の回りの電子機器に、最も汎用に用いられている半導体技術である。カメラでは、各ピクセルで感知した光(光子)をその強度に応じた電気信号に変えることで画像を作るが、Ca<sup>2+</sup>イメージセンサは各ピクセルにおいてCa<sup>2+</sup>を感知してそれを電気信号に変えることでCa<sup>2+</sup>のイメージングを行う。CMOS イメージセンサ技術により、センサの省エネ化、小型化、高精度化が可能となる。

2. 海馬: 海馬は脳の一部で、記憶・学習機能を司る重要な役割を担う。また海馬も、いくつかの解剖学的及び機能的に異なる部位か、歯状回(DG)、海馬 CA1、CA2、と CA3 等から構成されている。

3. NMDA 型グルタミン酸受容体(NMDA 受容体): NMDA 型グルタミン酸受容体(NMDA 受容体)はグルタミン酸受容体の一種。主に神経細胞に主に発現している。NMDA 受容体は、イオンチャネルを内蔵しており、グルタミン酸を受容すると陽イオンを細胞内に透過させるが、特に Ca<sup>2+</sup> を通すチャネルとして知られている。NMDA 受容体は、比較的強い刺激が入力されたときに活性化して Ca<sup>2+</sup>流入を引き起こすと考えられており、記憶や学習が成立に必須であることから、特に注目されている受容体である。

4. AMPA 型グルタミン酸受容体(AMPA 受容体): AMPA 受容体は、グルタミン酸受容体の一種。イオンチャネルを内蔵しており、グルタミン酸を受容すると、主にナトリウムイオン(Na<sup>+</sup>)を透過させる。通常時には、グルタミン酸によるシナプス伝達は、主に AMPA 受容体を介して行われていると考えられている。

【発表者・研究者情報】

山梨大学 大学院総合研究部医学域(医学部薬理学講座/山梨 GLIA センター)

教授 小泉 修一(共同責任著者)

特任助教 パラジュリ ビージェイ

教授 繁富 英治

助教 齋藤 光象

医学科学生(研究当時) 鈴木 秀明(現 山梨県立中央病院 初期研修医)

豊橋技術科学大学 次世代半導体・センサ科学研究所

教授 澤田 和明(共同責任著者)

特任助教 土井 英生

本件に関する問い合わせ先

<研究について>

山梨大学 大学院総合研究部医学域基礎医学系薬理学講座/GLIA センター

教授 小泉 修一(コイズミ シュウイチ)

TEL:055-273-9503 携帯:090-7849-8987

E-mail: [skoizumi@yamanashi.ac.jp](mailto:skoizumi@yamanashi.ac.jp)

豊橋技術科学大学 次世代半導体・センサ科学研究所

教授 澤田和明(サワダ カズアキ)

E-mail: [kazuaki.sawada@tut.jp](mailto:kazuaki.sawada@tut.jp)

<広報に関すること>

国立大学法人山梨大学 総務企画部総務課広報・渉外室

TEL:055-220-8005, 8006

E-mail: [koho@yamanashi.ac.jp](mailto:koho@yamanashi.ac.jp)

国立大学法人豊橋技術科学大学 総務課広報・地域連携室広報係

TEL:0532-44-6506

E-mail: [kouho@office.tut.ac.jp](mailto:kouho@office.tut.ac.jp)