

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590203

研究課題名(和文) 活動依存的脳血流調節における皮質細血管の役割と分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanisms and roles of cortical thin vessels on regulation of activity-dependent cerebral blood flow changes.

研究代表者

山田 勝也(YAMADA KATSUYA)

弘前大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：40241666

研究成果の概要：

脳血流は、神経活動に応じて局所的に調節されるが、この調節を司る脳内細血管のタイプと時間的な血流変化の関係などの詳細はわかっていない。血管平滑筋型 ATP 感受性カリウム ( $K_{ATP}$ ) チャネルのサブユニット Kir6.1 を欠失させたマウスの実験から、神経活動に対応する脳血流調節に脳内の特定の細動脈の拡張が関わることがわかり、更に議論のあった Kir6.1 の脳内局在についても mRNA レベルでは一定の結論が得られた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：脳血流調節、活動依存性、ATP、K チャネル

## 1. 研究開始当初の背景

脳活動のエネルギーを支える血流は個々の脳領域の活動レベルに応じて局所的に調節され、実際この原理を利用した PET や機能的 MRI 等はヒト高次脳機能の解明に向け多くの重要な知見を提供している。しかし、脳深部において、どの部位にあるどのような太さ

の脳血管が、具体的にどのような時間経過で神経活動に応答するかなどの詳細、および分子機構は十分明らかでない。本現象を明らかにしていくことはこれまで得られた脳の高次機能の解釈や今後の脳研究手法の開発方向にも影響する可能性がある。

## 2. 研究の目的

神経活動依存的な脳局所血流調節には様々な分子の関与が考えられている。中でもK<sup>+</sup>チャネルの関与の有無は歴史的争点のひとつとなってきた。そこで本研究では細胞内代謝レベルを反映して開閉する血管平滑筋型ATP感受性カリウム(K<sub>ATP</sub>)チャネルのサブユニットKir6.1を欠失させた(KO)マウスを用いた実験から、同チャネルの神経活動依存的脳局所血流調節への関与について調べることを目的として研究を開始した。

具体的にEGFPにより脳血管を選択的に可視化したマウスを作成し、神経興奮領域近傍の細動脈および毛細血管拡張を高速シングルポイントスキャンリアルタイム共焦点顕微鏡を用いた3次元観察により定量化し、血流応答における各血管の寄与を知ることを目標に研究をおこなった。

またこれまでの研究により種々の生理学的所見および生化学的所見が得られたが、同チャネルの脳内局在については、アストロサイトに発現するという説と、血管平滑筋にあるとする説とが並列し、決着しておらず機能の解釈が困難である。特にK<sub>ATP</sub>チャネルのチャネルポアを形成するサブユニットにはKir6.1の他にKir6.2があり、KOマウスによる検証に耐えうる信頼できる抗体は現在なお存在しない。そこで血管平滑筋型K<sub>ATP</sub>チャネルのKir6.1サブユニットを特異的に認識する特異抗体の作成やmRNA解析により、Kir6.1の脳血管系における分子局在を組織学的に明らかにすることを目標に研究をおこなった。

なお抗体作製では、通常のGSTフュージョンによるポリクローナル抗体作製のほかに、ヘテロサブユニットで構成される膜蛋白など通常の方法での抗体作製が難しい分子を標的とした遺伝子免疫法も検討する。

## 3. 研究の方法

(1) Kir6.1欠損(KO)マウスと野生型マウスを用いて、ウレタンによる深麻酔下(1.6g/kg)、マウスのひげを5Hzで2秒、4秒、30秒間、機械刺激しながら対側の皮質バレル野においてレーザーダブル法を

用いたin vivo脳局所血流計測実験を行った。

(2) 血管平滑筋に発現する $\alpha$ Smooth Muscle Actin(SMA)に対する抗体を用いた全脳のイムノプロット、ならびに冠状断ならびに水平断連続切片を作製しての免疫組織化学をおこない、画像データをnormalizeした後、粒子解析により定量化し、KOマウスと野生型マウスで比較した。

(3) EGFPを発現させた野生型由来のマウスを用いてマウス脳血管の選択的可視化をおこなった上、KOマウスでなおかつ血管のみを可視化したものを作製、生きた脳スライスを用いてリアルタイム共焦点顕微鏡で両者の血管を3次元的に比較した。またライカ社製リアルタイムレーザー共焦点顕微鏡のガルバノステージ上に、総重量120g以下というガルバノ動作の為の重量制約のもとで、脳白質刺激用の3次元可変超軽量マイクロ刺激電極マニピュレーターを設計、試作して搭載した。さらに、記録用の3次元可変超軽量マイクロ刺激電極マニピュレーターを新規に設計、作製して搭載した。

(4) 同ステージは温度可変型とし、33度に加熱し、更に前加熱した灌流液superfusion用dish holderを装着し、各種サーミスタ等により温度をフィードバック制御し、灌流中プラスマイナス0.5度の精度を実現した。更に本システムにおいて、大脳皮質白質を電気刺激し、II/III層-V層で血管変化を3次元的に観察すると共に、Field Potentialを記録し、神経活動と血管変化と関係について検討を試みた。

(5) in situ hybridizationによりKir6.1 mRNAの局在をKOマウスと野生型マウスで比較した。特に血管およびアストロサイトへの局在の有無を焦点とするため、それぞれ抗GLUT1抗体ならびに抗3-PGDH抗体をマーカーとした二重ないし三重局在解析を実施した。

(6) コンベンショナルなGST fusion法、ならびに金粒子にプラスミドDNAを付着させGene gunで脱毛した皮膚の数箇所へ粒子をガス圧により打ち込む遺伝子免疫法の二つ

の方法により、Kir6.1 抗体の作製を繰り返しおこなった。遺伝子免疫法では Lewis Rat 3 匹を用いて、1 $\mu$ g を 1 週間のインターバルで 6 回繰り返し免疫した。本作業全体（約 4 ヶ月）を二回繰り返しした（計 8 ヶ月）。なお対照には Kir6.2 を用いた。また作製した抗体で K0 ならびに野生型の脳を繰り返し染色し、共焦点顕微鏡ならびに免疫電顕による検討、全脳によるイムノブロットでの検証をおこなった。遺伝子免疫の評価は部分採血した免疫前血清と免疫後血清をフローサイトメトリーにより比較し、抗体産生の有無を検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) Kir6.1 の分子局在解析

###### in situ hybridization

平成 19 年度から様々なプローブを設定して radio isotope を用いてトライしたが、野生型と K0 マウスで差のある反応を認めることができなかった。感度の問題を考慮して 20 年 1 月に DIG 標識 cDNA プローブで蛍光発色させる non-R1ish をおこなったところ、野生型マウスの脳血管に反応が認められた。

そこで血管内皮細胞のマーカーとして GLUT1 を、アストロサイトのマーカーとして 3-PGDH をそれぞれ用いて二重染色をおこなった。その結果、Kir6.1 mRNA は血管に存在し、アストロサイトに存在しないことを強く示唆する結果が得られた。

###### 抗 Kir6.1 抗体作製 (GST フュージョン)

当初アダルトマウスを用いて抗体の作製を続けたが、野生型と K0 マウスとで明瞭な差の見られる抗体は度重なるトライにも関わらず得られなかった。しかし平成 19 年 3 月に、初めて両方で差の見られる抗体が得られた。二重染色標本を共焦点顕微鏡観察したところ、本抗体は血管を認識し、アストロサイトを認識しないことが判明した。ただしニューロンとみられる非特異反応が含まれることもわかり、これは K0 マウスと野生型マウス共通にみられたことから、この部分については評価から除外した。

同抗体を用いて全脳の post nuclear

supernatant でイムノブロットをおこなったところ、想定される分子量である 50kDa 付近において、2 ペアと同腹マウスのいずれにおいても野生型が K0 マウスよりも明らかに強いシグナルを呈した。

そこで更に超遠心をおこなって膜分画のイムノブロットをおこなったところ、結果は再現された。また K0 マウスで見えていた 50kDa のバンドはかなり薄くなった。一方、対照として Kir6.2 と野生型の組み合わせも並べて流したところ、こちらは濃さが全く等しく、更に Kir6.1 の野生型と同程度であった。このため 50kDa 付近に見られるバンドの共通部分はニューロンに見られた非特異反応に対応するものと考えた。この解釈が正しいと仮定すると、本抗体が野生型に存在し K0 マウスに存在しない Kir6.1 分子を認識している可能性を示唆される。

そこで光学顕微鏡レベルでの免疫組織多重染色では、生後の大脳で血管の細動脈などへの分化が進行する生後 7 日前後と、コントロールとして生後 14 日前後の同腹マウスペアを灌流固定し、陽性シグナルを検索した。

血管内皮細胞のマーカーとして GLUT1、アストロサイトマーカーとして 3-PGDH を使い、3 重免疫染色を行ったところ、染色像にアストロサイトとの共在はないようであった。また血管内皮との共在の有無については免疫電顕が必要であることが判明した。

ただししらみつぶしに精細に観察すると本抗体は K0 マウスの一部の血管を認識するようである。従って、非特異反応にはニューロンのほかに一部の血管も含まれるようである。

免疫電顕では、暗調の内皮細胞を取り囲むように存在する外側の明調の細胞質を持つ細胞の Lumen 側膜面に陽性信号が見られ、このパターンは K0 マウスには見られなかった。細胞膜上の反応は、血管内皮側とその反対側いずれにも認められた。

これらの結果から、本抗体は正しく認識している成分を含んでいるように思われるが、非特異成分も多く含有する。今後純

度の向上を目指すべきかが大きな課題となる。

#### 遺伝子免疫

20年度は目的とするKir6.1をコードする遺伝子を発現ベクターの形でgene gunで皮膚に打ち込む遺伝子免疫にも2度挑戦した。Facsによる解析から気になる抗体が上がってきたため、現在追加免疫をおこなって再現性を確かめている。サポニンで穴を開けた後に抗体処理をおこなうか、サポニンと一次抗体を同時に入れるかでも差異が生じている可能性もあり、検討を続けている。

今後抗体産生が確認されれば、K0マウスの免疫組織化学、in situ hybridizationとの比較により、特異性を検証する。次いでKir6.1の脳内局在を明らかにする。

#### (2) 血管可視化マウスを用いた生きた脳スライスを用いたリアルタイム血管観察

19年度、EGFPにより脳血管を選択的に可視化したマウスならびに $K_{ATP}$ チャンネルを欠失し、かつ血管を可視化したマウスの作成に成功し、生きた脳スライスを用いた血管の3次元観察に成功した。

そこで20年度、高速シングルポイントスキャンリアルタイム共焦点顕微鏡により、神経興奮領域近傍の細動脈および毛細血管拡張を計測し、神経活動依存的な細血管動態の観察を目指した。

生きた脳スライスを用いた血管の3次元観察にはいくつかの壁があった。まず血管平滑筋型 $K_{ATP}$ チャンネル欠損マウスは

が生後6週前後までに死亡することと、何段階かの掛け合わせにより初めて血管可視化K0マウスが得られるため、K0マウスでかつ血管が可視化されたマウスの作成効率が極端に低く、実験に使用できるアダルトマウスの供給にはやはり困難を伴った。

血管観察が可能なマウスが得られた場合にも、自由な位置の刺激と記録には次の問題をクリアする必要があった。まず、本実験はガルバノステージと呼ばれる高速にZ軸方向にスキャンする(250フレーム/秒)小さな顕微鏡ステージ上の灌流チ

ャンバーに載せた脳スライスを用いて行った実験であるため、刺激電極および記録電極をZ軸方向に0.2ミクロンステップで高速に移動し続けるステージ上に載せることが必要となっている。

その際、同ステージ上に載せる全ての機器の総重量を120g以内に押さえなければならぬ制約があり、極小の電極ホルダープロトタイプを作成して実際に刺激と記録を試みたが、ステージ上の設置場所の制約や、コンデンサの存在により、リンク部が多くなり、また手動であるため刺入時に電極がゆれることにより組織を傷害してしまうことがわかった。また構造上、可動範囲の制約が大きく、偶然表面に平行に走る血管を見つけても、その血管周囲を興奮させる位置に刺激および記録電極を自由に運ぶことが難しかった。

そこで改めて極小のマニピュレーターを設計試作している。スライド機構の改善やその他の工夫により、安定かつ広範囲に電極を刺入できるマニピュレーターを製作し、白質刺激と直上の灰白質からの細胞外記録を目指した改良を引き続き試みている。成功すれば同時に記録部位近傍の血管の3次元的变化を経時的に観察し、野生型とK0マウスで比較することとなる。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計10件)

Miura, E., Matsuda, K., Morgan, JI., Yuzaki, M., Watanabe, M. Cbln1 accumulates and colocalizes with Cbln3 and GluR2 at parallel fiber-Purkinje cell synapses in the mouse cerebellum. *Eur. J. Neurosci.* 29:693-706, 2009, 査読有.

Fukaya, M., Uchigashima, M., Nomura, S., Hasegawa, Y., Kikuchi, H., Watanabe, M. Predominant expression of phospholipase Cb1 in telencephalic principal neurons and cerebellar interneurons, and its close allocation with related signaling molecules in somatodendritic neuronal elements. *Eur. J. Neurosci.* 28:1744-1759, 2008, 査読有.

Yamamoto, T., Nishiuchi, Y., Teshima, T., Matsuoka, H., and Yamada, K. Synthesis of 2-NBDLG, a fluorescent derivative of L-glucosamine; the antipode of D-glucose tracer 2-NBDG. *Tetrahedron Lett.* 49:6876-6878, 2008, 査読有.

山田勝也 「脳とブドウ糖～蛍光分子を用いたグルコース輸送研究の新展開～」 *Priming Biomedicine*. 3:13-24, 2008, 査読無.

Takasaki, C., Okada, R., Mitani, A., Fukaya, M., Yamasaki, M., Fujihara, Y., Shirakawa, T., Tanaka, K., Watanabe, M. Glutamate transporters regulate lesion-induced period plasticity in the developing somatosensory cortex. *J. Neurosci.* 28:4995-5006, 2008, 査読有.

Tomioka, Y., Miyazaki, M., Taharaguchi, S., Yoshino, S., Morimatsu, M., Uede, T., Ono, E., Watanabe, M. Cerebellar pathology in transgenic mice expressing the pseudorabies virus immediate-early protein IE180. *Eur. J. Neurosci.* 27:2115-2132, 2008, 査読有.

Nishiyama, H., Fukaya, M., Watanabe, M., Linden, D. Axonal motility and its modulation by activity are branch-type specific in the intact adult cerebellum. *Neuron*. 56:472-487, 2007, 査読有.

Sakai, H., Tanaka, Y., Tanaka, M., Ban, N., Yamada, K., Matsumura, Y., Watanabe d., Sasaki, M., Kita, T., Inagaki, N. ABCA2 deficiency results in abnormal sphingolipid metabolism in mouse brain. *J. Biol. Chem.* 282:19692-19699, 2007, 査読有.

Miyake, A., Yamada, K., Kosaka, T., Miki, T., Seino, S., Inagaki, N. Disruption of Kir6.2-containing ATP-sensitive potassium channels impairs maintenance of hypoxic gasping in mice. *Eur. J. Neurosci.* 25:2349-2363, 2007, 査読有.

Uchigashima, M., Narushima, M., Fukaya, M., Katona, I., Kano, M., Watanabe, M. Subcellular arrangement of molecules for 2-arachidonoyl-glycerol-mediated retrograde signaling and its physiological contribution to

synaptic modulation in the striatum. *J. Neurosci.* 27:3663-3676, 2007, 査読有.

[学会発表](計20件)

Watanabe, N., Yamada, K., Suga, S., Yamada, M., Yamamoto, Y. Ultrastructural localization of glycine transporters in the substantia nigra pars reticulata of the rat. 114th Annual Meeting of The Japanese Association of Anatomists. 28-30 Mar 2009, Okayama, Japan.

Yamada, K. Neocortical thin arteriogenesis and activity-dependent cerebral blood flow increase. The 11th Meeting of Hirosaki International Forum of Medical Science, Satellite Workshop, 28-29 Mar 2009, Naqua Shirakami Hotel & Resort, Ajigasawa, Aomori, Japan.

Yamada, K. A new method for imaging glucose transport in live cells. The 11th Meeting of Hirosaki International Forum of Medical Science, 27-28 Mar 2009, Communication Center of Hirosaki University School of Medicine, Hirosaki, Aomori, Japan.

山田勝也 「脳とブドウ糖の関係を解き明かす夢に」 第14回遺伝子実験施設シンポジウム、2008年11月21日、弘前大学、青森県弘前市。

山田勝也 「蛍光グルコース：グルコース輸送研究の有望なツールとして」 トランスporter研究会ワークショップ in 鶴岡、慶應義塾大学先端生命科学研究所センター棟隣接東北公益文科大学院ホール、2008年11月15-16日、山形県鶴岡市。

山田勝也 「蛍光法によるグルコース輸送研究の新たな展開」 第41回東北生理談話会、2008年10月18日、弘前大学医学部コミュニケーションセンター、青森県弘前市。

山田勝也 「蛍光グルコースとメタボリックウェーブ」 バイオ分子センサー連携研究プロジェクトレクチャーコース、2008年10月6-7日、自然科学研究機構コンファレンスセンター、愛知県岡崎市。

山本欣郎、渡邊菜の子、山田美鈴、菅熟知子、山田勝也 「中脳黒質におけるグリシン作動性システムの形態学的基盤」 日本獣医解剖学会、2008年9月24-25日、宮崎大学、宮崎県。

山田勝也 「中脳黒質の酸素・ブドウ糖感知能と神経・グリア情報伝達ならびに歩行・筋緊張・咀嚼制御」 第98回神経内科勉強会、2008年9月4日、秋田脳血管研究センター講堂、秋田県。

Yamada, K., Matsumura, Y. A tight spatio-temporal coupling of cortical thin penetrating arterioles and neuronal activity-dependent local cerebral blood flow increase. The 36th Annual Conference International Society on Oxygen Transport to Tissue (ISOTT2008), 3-7 Aug 2008, Sapporo Prince Hotel, Hokkaido, Japan.

山田勝也 他 「高純度蛍光指示グルコース誘導体 2-NBDG のニューロンへの適用」 第31回日本神経科学大会、2008年7月9-11日、東京国際フォーラム、東京都。

山田勝也 「ATP、glucose、O<sub>2</sub>、Bloodflow-脳活動を支えるもの」 ペプチド研究所セミナー、2008年7月8日、彩都研究所、大阪府茨木市。

山田勝也 他 「大脳皮質細動脈の可視化と神経活動依存的皮質血流調節の研究戦略」 第50回日本平滑筋学会総会、2008年7月2-4日、ホテルニューキャッスル、青森県弘前市。

Yamada, K. Imaging glucose uptake into single, living mammalian cells. NIPS-JST 国際ワークショップ-From photon to mind-, 18-19 Apr 2008, Okazaki Conference Center, Aichi, Japan.

山田勝也、菅世智子、山本欣郎 「成熟黒質網様部 GABA 作動性ニューロンのグルコース応答とグリシン応答」 第85回日本生理学会、2008年3月25-27日、新宿京王プラザ、東京都。

山田勝也 「脳神経活動に応じて適切に脳血流を供給する脳内機構の研究戦略」 地域イノベーションフォーラム in 北東北「脳科学と未来」、2008年2月18日、秋田キャッスルホテル、秋田県。

山田勝也 「脳神経活動に応じて適切に脳血流を供給する脳内機構の研究戦略」 第4回産学官金連携フェア、2007年11月7日、シティ弘前ホテル、青森県弘前市。

山田勝也、菅世智子、山本欣郎 「中脳黒質網様部 GABA 作動性ニューロンの低グルコース応答とグリシン応答」 第40回東北生理談話会、2007年10月19-20日、東北大学大学院医学系研究科 星陵

キャンパス、宮城県仙台市。

山本欣郎、菅世智子、山田勝也 「中脳黒質における Glycine Transporter 1 および Glycine Transporter2 の分布」 第53回解剖学会東北・北海道連合支部学術集会、2007年9月29-30日、北海道医療大学、札幌サテライトキャンパス、北海道札幌市。

山田勝也、武尾照子、高綱将史、菅世智子 「蛍光グルコーストレーサを用いた黒質網様部のリアルタイムグルコース取り込み可視化」 第30回日本神経科学大会、第50回日本神経化学学会大会、第17回日本神経回路学会大会、2007年9月10-12日、パシフィコ横浜、神奈川県。

#### 〔産業財産権〕

出願状況（計1件）

名称：D-グルコース細胞内への特異的な取り込みを評価するための方法

発明者：山田勝也、豊島正、山本敏弘、松岡英明

権利者：同上

種類：特願

番号：2008-205708

出願年月日：2008.8.8

国内外の別：国内

取得状況（計1件）

名称：小動物用心拍・呼吸数検出機能付き体温保持装置及びそれを用いた小動物用心拍・呼吸数測定システム

発明者：佐藤伸一、山田勝也、稲垣暢也

権利者：同上

種類：特許

番号：第4015115号

取得年月日：2007.9.21

国内外の別：国内

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

山田 勝也 (YAMADA KATSUYA)

弘前大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：40241666

##### (3) 研究分担者

渡辺 雅彦 (WATANABE MASAHIKO)

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：70210945

(2008年度から連携研究者)

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：