

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790184
 研究課題名 (和文) 2光子励起レーザー顕微鏡を用いた障害モデルマウスにおける神経・グリア細胞の観察
 研究課題名 (英文) *In vivo* imaging of neuron・glia during the recovery from infarction by using two-photon laser microscopy
 研究代表者
 高鶴 裕介 (TAKATSURU YUSUKE)
 生理学研究所・発達生理学研究室・特別協力研究員
 研究者番号：30446265

研究成果の概要：

2光子励起レーザー顕微鏡を用いた *In vivo* imaging の技術を用いることで、障害回復期における、健常側相同部位の神経細胞突起 (スパイン) の形態的变化の臨界期を確定することが出来た。また、その前後で機能回復とそれに伴う神経回路変化が想定される実験結果を得ることが出来た。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	390,000	3,490,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学 (含体力医学・栄養生理学)

キーワード：環境生理学、2光子励起レーザー顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

近年の科学技術の発展は、タンパク・遺伝子レベルでの脳機能の解明および各種病態における変化・原因の理解に大きく貢献した。また、神経伝達における可塑的变化は、電気生理学的手法や分子生物学的手法により多くのことが明らかになりつつある (Malinow and Malenka, *Ann. Rev. Neurosci.*, 2002)。これらの報告の多くは技術的特徴から *In vitro* における標本 (培養細胞、固定標本を用いた実験など)、または *In vitro* における評価系 (スライス標本を用いた電気生理学の実験、免疫組織学的実験など) を用いたも

のである。

一方、生活環境などの外的要因や疾病などの内的要因による長期変化を評価するためには、*In vitro* では不可能な、同一個体における経時的観察が不可欠である。特に、行動、記憶、感覚などの個体の脳機能発現の基盤となる神経回路は、発達期や成熟期のみならず、障害後の脳機能回復にもなって大きく変化することが予想される。

しかしながら現在までに、脳回路を *In vivo* で長期間観察することは技術的に不可能であり、前述した *In vitro* での研究成果から個体における変化を推測することを余儀なくされていた。したがって、内外の環境変化

によって大きく影響を受けるであろう発達/回復期の脳回路可塑性を、同一個体で連続的に観察する新たな戦略が必要であると考えられる。

2. 研究の目的

2 光子励起レーザー顕微鏡は、深部領域の観察を低侵襲的に行うことが可能であり、こと *In vivo* での同一固体の長期的観察に優れている。このことを有効に活用し、神経細胞やグリア細胞に蛍光物質を発現させた遺伝子改変マウス (Thy1-EYFP マウス (H-line)、Feng et al., Neuron, 2000 ; B6;D2-Tg(S100B-EYFP)1Wjt/J マウス、Zuo Y, et al., J.Neurosci., 2004) を用いて、局所虚血障害モデルマウスを作成し、障害回復期における神経細胞およびグリア細胞の形態学的動態について長期的に観察を行うことを目標とする。また、障害からの回復において有効なアプローチについても検討する。

(1) 安定した局所虚血障害モデルの構築

安定した局所虚血障害モデルの構築を目指し、ロースベンガルの光感受性による内皮障害に由来する血栓形成を利用した局所梗塞モデル (Yao et al., Stroke, 2006) を応用して、より局所で、かつ 2 光子励起レーザー顕微鏡の観察下領域に脳障害を起こす実験モデルマウスの開発を行う。

(2) *In vivo* での形態観察

観察下において、虚血障害前後での神経細胞・グリア細胞の形態変化について、同一個体の観察を長期的に行い、その形態変化を評価する。

(3) 他の実験技術 (電気生理学的手法など) と組み合わせて病体生理の総合的評価を行うことで、その解明を目指すのみならず、新たな治療法の創出に寄与する研究手法を画策する。

3. 研究の方法

(1) ローズベンガルを注入したのち光刺激により人工的に作成した局所梗塞モデルマウス (片側半球の体性感覚野全域を破壊。図 1 参照) を用いて、障害回復期のさまざまな段階における神経細胞の形態変化を 2 光子励起レーザー顕微鏡を用いた *In vivo* imaging の手法を用いて観察した。

(2) 局所梗塞に伴う機能変化を放射性同位体標識グルコース (FDG) 取り込み試験 (図

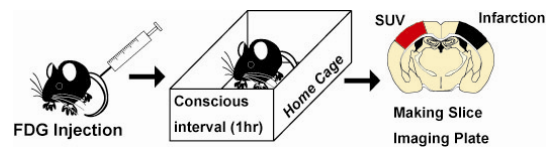
2 参照) や電気生理学的手法 (図 3 参照) を組み合わせることにより観察した。

(3) 行動実験により局所梗塞による機能障害の程度と、その回復の有無を推定した。

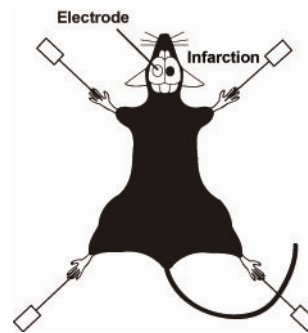
観察部位 障害部位 (白色)



(図 1: 脳梗塞モデル。簡便な方法により再現性の高い局所梗塞を作成することが可能になった)



(図 2: FDG 取り込み試験の概略図。覚醒下に FDG を注入し、1 時間ホームケージに放置した後、麻酔下に切片を取り出し、脳組織の活動に応じて取り込まれた FDG が放出する放射線量を測定する。この方法により、より生理的条件に近い脳組織の活動性の評価が行える。)



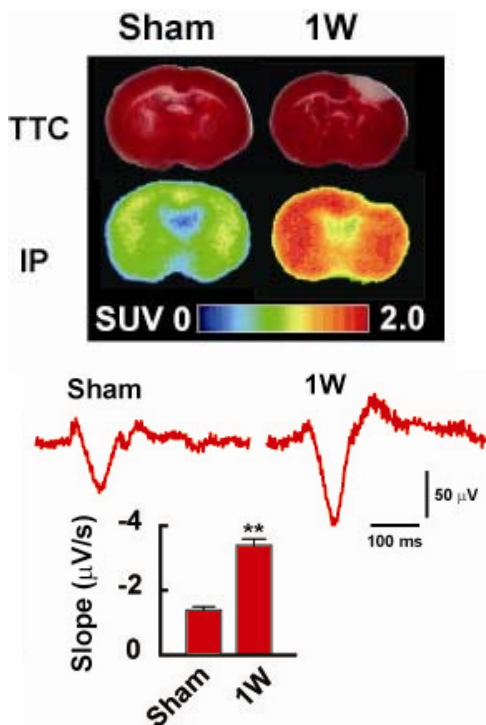
(図 3: 電気生理学の実験の概略図。In vivo の状態で大脳皮質に電極を刺し、末梢刺激により誘導される電流 - Cortical field potential: CFP を記録した)

4. 研究成果

2 光子励起レーザー顕微鏡を用いた生きた個体の脳組織の観察、及び局所梗塞モデルマウスの作成が安定して行えるようになった。当初予定していたグリア細胞、特にアストロサイトの観察は入手したマウスにおいて、大脳皮質での蛍光タンパクの発現が不

十分であり、観察に不適切であることがわかった。一方、神経細胞の観察は有効に行うことが出来た。その過程で、当初想定していなかった現象が、健常側相同領域で発見された。

(1) 障害を受けていない健常側相同部位の活動亢進が梗塞後2日~1週間で見られることがFDG取り込み試験(イメージングプレート;IPによる取り込み放射線の検出)により観察された。これは、本来障害側に入力する末梢からの刺激が、健常側に多く入力するようになったことが原因であることが電気生理学的実験を通じて推定された(図4)。



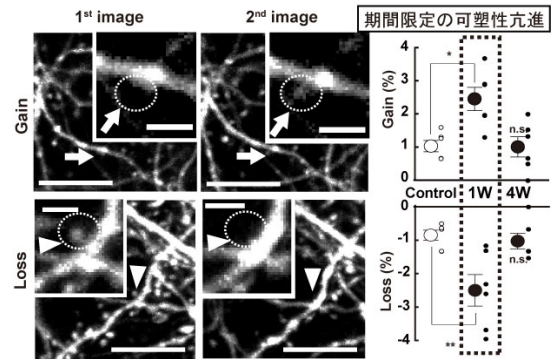
(図4: 脳梗塞後の脳機能亢進と、その原因と思われる患肢側刺激の健常側領野への投射の増加。多くの放射性同位体標識グルコースの取り込み増加が見られた領域ほどSUV(standardized uptake value)値が高い。Slopeが大きいほど、より多くの入力が投射していることを示す。)

(2) この活動亢進の期間が終わる1週間目で特異的に神経細胞突起(スパイン)の形態的が変化するという、形態変化の臨界期が存在することが、2光子励起レーザー顕微鏡を用いた*In vivo* imagingを通じてわかった(図5)。

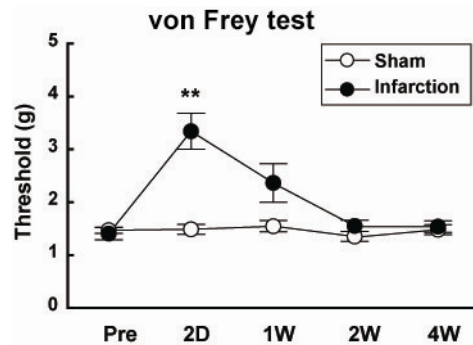
(3) 神経細胞突起(スパイン)変化の臨界期を過ぎた後に体性感覚機能の回復がみら

れた(図6)。

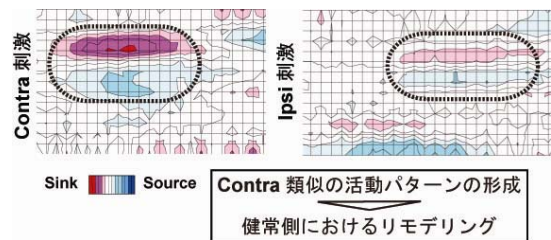
(4) 体性感覚機能の回復を可能にした神経回路再編が原因と推定される電気生理学的所見が得られた(図7)。



(図5: 脳梗塞後1週間目に特異的な神経細胞突起(スパイン)可塑性の亢進。通常は安定型でほとんど変化しないMushroom-typeのスパインの増減が脳梗塞後1週間目で活発に起こっていた。)



(図6: 機能回復。von Frey testでは数値が大きいかほど機能低下。脳梗塞後2日目では機能低下を認めるが、1週間目より回復傾向となり、2-4週間目で完全に回復した)



(図7: 神経回路再編の所見。電気生理学的実験を元に、脳組織の活動パターンを算出したもの。)

以上の結果より、脳梗塞後の障害回復期において、健常側の神経回路再編が時期特異的に起こり、患肢からの情報も処理できるようにすることによって機能代償を行っていることが推測された。

本研究成果は、臨床的に言われている早期リハビリテーションが奏効する理由の一端を説明すると考えられる。また、可塑性の臨界期を明らかにしたことで、この臨界期を有効に利用したリハビリテーションプログラムの作成を期待できると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)
(現在投稿中)

[学会発表] (計 1 件)

① 高鶴裕介、根本知己、鍋倉淳一、The dendritic spine of layer V pyramidal neuron in contralateral area of focal ischemia was actively remodeling in somatosensory cortex. Neuroscience2008、2008年11月、ワシントンDC

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高鶴 裕介 (TAKATSURU YUSUKE)

生理学研究所・発達生理学研究室・特別協力研究員

研究者番号：30446265

(2) 研究分担者

(なし)

(3) 連携研究者

(なし)