

平成22年6月14日現在

研究種目：特定領域研究  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20021013  
 研究課題名（和文） 脳幹神経回路網の機能形成過程と脱分極波による制御機構の光学的解析  
 研究課題名（英文） Optical analysis of functional formation of the brainstem neural circuit and its regulation by the depolarization wave  
 研究代表者  
 佐藤 勝重（SATO KATSUSHIGE）  
 駒沢女子大学・人間健康学部・教授  
 研究者番号：80291342

## 研究成果の概要（和文）：

胎生期中枢神経系において、我々は広範囲に伝播する脱分極波(depolarization wave)が発現していることを発見したが、この脱分極波による中枢神経系、特に脳幹の神経回路網の機能発生制御機構解明するために、まずその特性について解析した。鶏胚およびラット胎仔の中枢神経系摘出標本に膜電位感受性色素を用いた光学的イメージング法を適用し、脱分極波は種を超えた現象で、感覚刺激だけでなく自発性にも引き起こされ、その起源は発生とともに変化することなどが分かった。これは、脱分極波が中枢神経系の発生に重要な役割を果たしていることを示唆している。

## 研究成果の概要（英文）：

In the developing central nervous system (CNS), immature neural networks generate spontaneous correlated activity in a wide range. Using the optical imaging technique with voltage-sensitive dyes, we found a widely-spreading wave in the rat and chick embryos, which was termed the depolarization wave. One novelty of the depolarization wave was that it traveled over a wide region of the CNS including the brainstem, spinal cord, cerebellum, and part of the cerebrum. Another outstanding feature was that it was non-specifically triggered by various types of sensory inputs as well as endogenous spontaneous activity. These profiles suggest that the wave may not serve as a simple regulator of specific neuronal circuit formation, but might play a more global role in CNS development. The depolarization wave was mediated by multiple neurotransmitters and gap junctions, and the dominant transmitter switched from acetylcholine to glutamate with development. Surveillance of the origin of the depolarization wave showed that the wave initially originated in the upper cervical cord/lower medulla near the obex and was generated by multiple regions at the later stages. This network possibly works as a self-distribution system that maintains the correlated activity in the developing CNS.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20年度	3,500,000	0	3,500,000
21年度	3,500,000	0	3,500,000
年度			
年度			
年度			
総計	7,000,000	0	7,000,000

研究分野：神経科学、神経生理学

科研費の分科・細目：特定領域研究、統合脳、神経回路機能

キーワード：depolarization wave、光学計測、膜電位感受性色素、embryo、gap junction、脳幹、中枢神経系、神経回路網

### 1. 研究開始当初の背景

脳幹は、生命活動に関わる多くの情報が直接入・出力し、処理・統合される重要な領域である。脳幹では、末梢からの情報の伝達回路と、脳幹に内在する自発興奮の伝達回路とが混在しており、これらは互いに影響をおよぼし合いながら機能的に形成・調節されていることが推察されている。我々は、脳幹の機能的構築・形成過程を明らかにする目的で、膜電位の光学的イメージング法を embryo の脳幹に適用し、脳神経刺激に対する脳幹内での応答のマッピングを行い、一時中継核や二次中継核を同定し、それらの developmental な機能形成過程を明らかにしてきた。一方その研究過程で、脳神経・脊髄神経を介した外来性入力、あるいは中枢神経系内に内在する自発興奮活動によって、大脳から脊髄にいたる中枢神経系のほぼ全領域にわたって広範に伝播する脱分極波(depolarization wave)が誘発されることを発見した。本研究では、①脳幹神経回路網の形成の時空間的ダイナミズムの解明と、②depolarization wave の神経回路網形成における役割の解明に焦点をあて、研究を計画した。

### 2. 研究の目的

膜電位の光学的イメージング法を胎生期中枢神経系、特に脳幹に適用し、その神経回路網の機能的構築過程を明らかにするとともに、発生初期の中枢神経系において特異的に発現する広範囲伝播性脱分極波(depolarization wave)の神経回路網形成における役割、自発性脱分極波の特徴および機能的意義を解明する。

### 3. 研究の方法

孵卵 5-11 日の鶏胚、および胎生 15-17 日のラット胎仔から、脳神経・脊髄神経をつけたままの脊髄-全脳標本を取り出し、標本を膜電位感受性色素 (NK2761) の溶液に浸して染色する。染色後、外液中の色素を洗い流し、脳神経・脊髄神経の刺激あるいは自発興奮によって誘発されるニューロン電位活動を、光学的変化としてイメージング

する。測定には、我々の研究室で独自に設計し、従来用いてきた光学的 144/1020 チャネル同時測定システムを用い、中枢神経系内における脱分極波の伝播パターンについて解析を行う。脱分極波の時空間パターンを同定後、各種神経伝達物質受容体の antagonist を外液に投与し、脱分極波がどのような影響を受けるのかを調べる。さらに gap junction も modulator として関与している可能性があり、これらの役割についても検討を行う。得られた結果から、脱分極波の伝播を司るニューロンネットワークの実体を明らかにする。

### 4. 研究成果

鶏胚およびラット胎仔中枢神経系を実験対象として、誘発性および自発性脱分極波の特性に関して解析を行ない、以下のことが明らかとなった。

#### (1) 誘発性脱分極波

①吸光膜電位感受性色素(NK2761)で染色した孵卵 8 日の鶏胚および胎生 16 日のラット胎仔の中枢神経摘出標本において、脳神経や脊髄の電気刺激より、脳幹、脊髄、中脳、小脳、間脳、大脳など、中枢神経系内の広範囲にわたって伝播する脱分極波が観察された。中枢神経系内での時空間分布パターンは、鶏胚とラット胎仔で同様であった。

②脱分極波は、体性感覚系・自律神経系を問わず、脳神経・脊髄神経を介する感覚性入力や直接刺激によって誘発され、その分布パターンは刺激によらずほぼ同じであった。

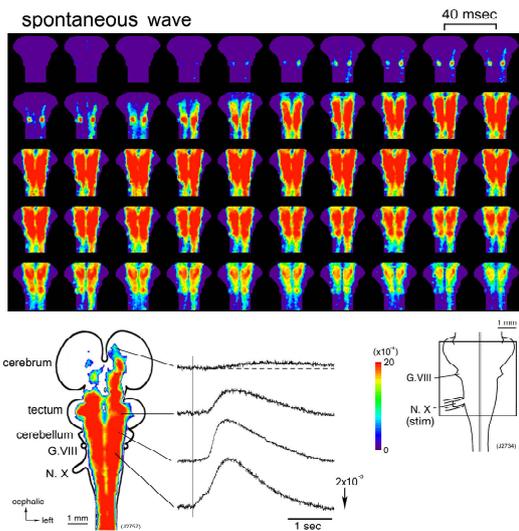
③鶏胚およびラット胎仔の両方において、脱分極波に引き続いて Ca wave が引き起こされ、その出現パターンは脱分極波の出現パターンとほぼ同一であった。

④脱分極波は、シナプス伝達を抑制する  $\text{Cd}^{2+}$  によって完全に抑制された。また、NMDA 受容体、nicotinic Ach 受容体、GABA<sub>A</sub> 受容体、Glycine 受容体の blocker によって部分的に抑制され、その抑制の様式には部位による差が見られた。また、脱分極波は、octanol や 18  $\beta$ -glycyrrheticin

acid によっても抑制され、gap junction が関与していることが示された。これは、免疫染色法を用いた形態学的観察によって、この時期のラット胚中枢神経系に connexin 26 および 32 が広範に発現していることから裏付けられた（東京女子医科大学解剖学教室：佐々木宏教授、本多祥子講師との共同研究による）。

(2) 自発性脱分極波

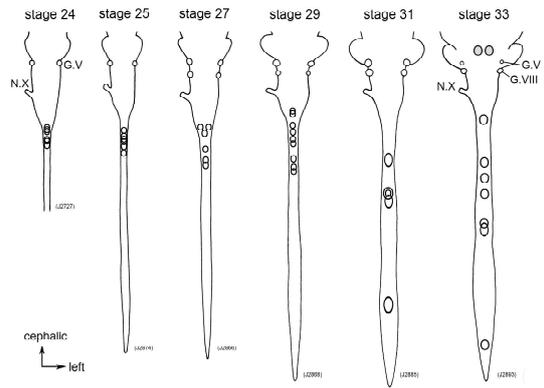
①自発性脱分極波にはリズムが存在し、誘発性の場合と同様に wave は中枢神経系の広範囲に伝播した。その時空間的分布パターンは誘発性の場合と同様であった（下図）。



②自発性脱分極波は、外液の Ca イオンを取り除いた状態、あるいは、神経伝達物質の antagonist が存在する状態でも観察され、non-synaptically な情報伝達機構が発現過程の中枢神経系には存在することが示唆された。

③brainstem-spinal cord 標本を用い、自発性脱分極波の origin について解析した。鶏胚では、wave は、孵卵 4 日目(stage 24)にはじめて obex 近傍の下部延髄～上部頸髄に発生し、個体発生が進むにしたがって、その origin が中枢神経系内で広く分布するようになることがわかった（右図）。一方、ラット胎仔では、E15 では、wave は頸髄から上部腰髄の多数の領域から起こったが、E16 では、ほとんどが腰仙髄から起こるようになった。また、脊髄のない標本では脳幹内の焦点が活性化され、橋背内側、延髄背内側、延髄腹外側の領域から wave が起こった。このことから、自発性脱分極波は、脊髄を中心とする中枢神経系の広い領域に分布する焦点から起こること、それらは自律分散システムとして発生期中枢神経系に

おける correlated activity の発現維持に寄与していることが示唆された。



④自発性脱分極波の発現および伝播には、発生初期には acetylcholine が、後期には glutamate が重要な役割を果たしていることがわかった。GABA は発生初期、後期ともに wave の発現および伝播に深く関与していた。glycine は発生初期、後期ともに wave の発現に関与していたが、伝播には初期だけ重要な働きをしていることがわかった。Serotonin は、発生初期、後期ともに wave の発現のみに関与し、伝播には関与していなかった。

当初、鶏胚中枢神経系で見いだされた脱分極波は、ラット胎仔においても観察され、種を超えた現象であることが確認された。脱分極波は、脳神経や脊髄神経を介した外来性入力、あるいは中枢神経系内に内在する自発興奮活動によって、中枢神経系内の広範囲にわたって伝播し、発生のある一時期に特異的に出現することが明らかとなった。また、脱分極波に引き続いて Ca wave が引き起こされ、多数のニューロンの同期した脱分極のほかに、細胞内 Ca<sup>2+</sup> 上昇による metabotropic な効果が、神経系の発生・分化を制御していることが示唆された。この事実は、脱分極波が個体発生における重要なシグナルとして機能している可能性を示す結果である。これまでの研究で、発生期中枢神経系、特に脊髄、脳幹、あるいは大脳皮質において、ニューロン群の同期した発火現象、いわゆる"correlated neural activity"が報告され、これらは限局した領域の特定のニューロン群/シナプスにおける現象として捉えられてきたが、この研究で見いだされた脱分極波は、こうした従来の activity-dependent developmental regulation の概念を覆す、新たな発見であるといっても過言ではない。発生途中で脱

分極波をブロックしたときに中枢神経系の形態・機能形成にどのような影響が現れるかは、現在のところまだ結論を得るのに十分なデータは得られておらず、今後の課題である。

#### 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 6 件)

- ① Sato, K. and Momose-Sato, Y. (2008) Optical analysis of neural circuit formation in the embryonic brain. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology** 35, 706-713.
- ② Glover, J. C., Sato, K. and Momose-Sato, Y. (2008) Using voltage-sensitive dye recording to image the functional development of neuronal circuits in vertebrate embryos. **Developmental Neurobiology** 68, 804-816.
- ③ Wang, S., Sato, K., Giurfa, M. and Zhang, S. (2008) Processing of sting pheromone and its components in the antennal lobe of the worker honeybee. **Journal of Insect physiology** 54, 833-841.
- ④ Momose-Sato, Y., Mochida, H. and Kinoshita, M. (2009) Origin of the earliest correlated neuronal activity in the chick embryo revealed by optical imaging with voltage-sensitive dyes. **European Journal of Neuroscience** 29, 1-13.
- ⑤ Mochida, H., Sato, K. and Momose-Sato, Y. (2009) Switching of the transmitters that mediate hindbrain correlated activity in the chick embryo. **European Journal of Neuroscience** 29, 14-30.
- ⑥ Nakamori, T., Sato, K., Atoji, Y., Kanamatsu T., Tanaka, K. and Ohki-Hamazaki, H. (2010) Demonstration of a neural circuit critical for imprinting behavior in chicks. **Journal of Neuroscience** 30, 4467-4480.

[学会発表] (計 23 件)

- ① Sato, K., Kinoshita, M. and Momose-Sato, Y. (2008) Development of vagal afferent projections circumflex to the obex in the embryonic chick brainstem: optical imaging with voltage-sensitive dyes. **Journal of Physiological Sciences** 58 suppl., S131.
- ② Momose-Sato, Y., Mochida, H., Kinoshita, M. and Sato, K. (2008) Origin of the depolarization wave at an initial stage of wave expression revealed by optical imaging. **Journal of Physiological Sciences** 58 suppl., S132.
- ③ Sato, K. (2008) Optical approaches to functional neural circuit formation in the

embryonic brainstem. **Journal of Physiological Sciences** 58 suppl., S29.

- ④ Sato, K., Kinoshita, M. and Momose-Sato, Y. (2008) Optical recording of vagal afferent projections circumflex to the obex in the embryonic chick brainstem. **Neuroscience Research** 61 suppl 1., S87.
- ⑤ Momose-Sato, Y., Mochida, H., Kinoshita, M. and Sato, K. (2008) Origin of the correlated wave activity at an initial stage of wave expression revealed by optical imaging. **Neuroscience Research** 61 suppl 1., S87.
- ⑥ Kinoshita, M., Momose-Sato, Y. and Sato, K. (2008) Regional differences in neuronal excitability of the hindbrain in chick embryo. **Neuroscience Research** 61 suppl 1., S161.
- ⑦ Sato, K., Glover, J. C. and Momose-Sato, Y. Functional development of auditory and vestibular neural circuits in the embryonic chick brainstem revealed by voltage-sensitive dye imaging. **Journal of Physiological Sciences** 59 suppl., 338.
- ⑧ Momose-Sato, Y. and Sato, K. Optical imaging of large-scale depolarization waves in the developing CNS. **Journal of Physiological Sciences** 59 suppl., 338.
- ⑨ Nakamori, T., Sato, K., Tanaka, K. and Ohki-Hamazaki, H. (2009) A telencephalic neural circuit critical for visual imprinting in chicks. **Journal of Physiological Sciences** 59 suppl., 181.
- ⑩ Sato, K. and Momose-Sato, Y. (2009) Functional development of the N. IX and N. X-related nuclei in the embryonic rat brainstem: Optical mapping with voltage-sensitive dyes. **Neuroscience Research** 65 suppl. 1, S80.
- ⑪ Momose-Sato, Y., Mochida, H. and Sato, K. (2009) Switching of the transmitters that mediate the depolarization wave in the embryonic chick CNS. **Neuroscience Research** 65 suppl. 1, S79.
- ⑫ Nakamori, T., Sato, K., Tanaka, K. and Ohki-Hamazaki, H. (2009) Activation of a telencephalic circuit is critical for visual imprinting in chicks. **Neuroscience Research** 65 suppl. 1, S50.
- ⑬ Kinoshita, M., Momose-Sato, Y. and Sato, K. Regional gradient of neuronal excitability to generate spontaneous activity in the hindbrain of the chick embryo. 6th FENS Forum of European Neuroscience. July 12-16, 2008, Geneva, Switzerland.
- ⑭ Sato, K. and Momose-Sato, Y. Functional organization of the glossopharyngeal and vagus nerve-related nuclei in the embryonic rat brainstem: Optical mapping with voltage-sensitive dyes. Society for

Neuroscience 38th Annual Meeting. November 15-19, 2008, Washington DC, USA.

⑮ Momose-Sato, Y., Mochida, H. and Sato, K. Switching of the transmitters that mediate hindbrain correlated activity in the chick embryo. Society for Neuroscience 38th Annual Meeting. November 15-19, 2008, Washington DC, USA.

⑯ Kinoshita, M., Momose-Sato, Y. and Sato, K. Neuronal excitability to generate spontaneous activity in the medulla and spinal cord of the chick embryo.

Society for Neuroscience 38th Annual Meeting November 15-19, 2008, Washington DC, USA.

⑰ Maehara, T., Inaji, M., Nariai, T., Sato, K. and Ohno, K. Application of intraoperative intrinsic optical imaging in epilepsy surgery.

American Epilepsy Society 62nd Annual Meeting. December 5-9, 2008, Seattle, USA.

⑱ Sato, K., Glover, J. C. and Momose-Sato, Y. Functional development of auditory and vestibular neural circuits in the embryonic chick brainstem revealed by voltage-sensitive dye imaging. XXXVI International Congress of Physiological Sciences. July 27-August 1, 2009, Kyoto, Japan.

⑲ Momose-Sato, Y. and Sato, K. Optical imaging of large-scale depolarization waves in the developing CNS. XXXVI International Congress of Physiological Sciences. July 27-August 1, 2009, Kyoto, Japan.

⑳ Nakamori, T., Sato, K., Tanaka, K. and Ohki-Hamazaki H. A telencephalic neural circuit critical for visual imprinting in chicks. XXXVI International Congress of Physiological Sciences. July 27-August 1, 2009, Kyoto, Japan.

㉑ Momose-Sato, Y. and Sato, K. Spontaneous depolarization waves in the mouse embryo revealed by optical imaging with a voltage-sensitive dye. Society for Neuroscience 39th Annual Meeting. October 17-21, 2009, Chicago, USA.

㉒ Sato, K. and Momose-Sato, Y. Optical imaging of neuronal activities: From embryos to human brain. The 4th Asian and Pacific Rim symposium on biophotonics. May 27-29, 2009, Jeju island, South Korea. [An invited speaker of the symposium organized by Beop-Min, Kim and Byeong Ha Lee.]

㉓ Sato, K. and Momose-Sato, Y. Spontaneous depolarization wave revealed by voltage-sensitive dye imaging. 3rd Viktor Hamburger Symposium on Motor System Development "Development of Motor Circuits: At the Crossroads of Genes and Activity". October 15-16 2009, Renaissance Hotel, Chicago, USA. [An invited speaker of the symposium organized by Joel C. Glover.]

[図書] (計 1 件)

① Momose-Sato, Y., Sato, K. and Kamino, K. Monitoring population membrane potential signals during functional development of neuronal circuits in vertebrate embryos. In: **The Voltage Imaging Book**. Eds. Canepari, M. & Zecevic, D. Springer, USA, in press.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

該当なし

○取得状況 (計 0 件)

該当なし

[その他]

ホームページ:

<http://square.umin.ac.jp/optical/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤 勝重 (SATO KATSUSHIGE)

駒沢女子大学・人間健康学部・教授

研究者番号: 80291342

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

佐藤 容子 (SATO YOKO)

関東学院大学・人間環境学部・教授

研究者番号: 70251501