

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 16 日現在

機関番号：32696

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500368

研究課題名（和文） 膜電位イメージング法と生体染色を用いた胎生期脊髄内神経回路網の機能形成過程の追跡

研究課題名（英文） Optical analysis of functional development of the spinal cord neural circuits

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）：

我々はこれまでに、個体発生過程の中樞神経系において、中樞神経系全体に広がる脱分極波が自発性に引き起こされることを見いだしてきた。本研究では、膜電位の光学的イメージング法を発生過程の鶏胚中樞神経系に適用して、その起源について解析を行った。その結果、自発性脱分極波はまず上部頸髄/下部延髄の限られた領域から発生し、個体発生が進むに従って、その起源が脊髄全体に広がっていくことを見いだした。このことから、神経の興奮性の時空間的違いが、脱分極波発現の背景にあることを示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Spontaneous correlated neuronal activity during early development spreads like a wave by recruiting a large number of neurons and is considered to play a fundamental role in neural development. One important and yet unresolved question is where the activity originates, especially at the earliest stage of wave expression. In other words, which part of the brain differentiates first as a source of the correlated activity, and how does it change as development proceeds. We assessed this issue by examining the spatiotemporal patterns of the depolarization wave, the optically-identified primordial correlated activity, using the optical imaging technique with voltage-sensitive dyes. We surveyed the region responsible for the induction of the evoked and spontaneous depolarization waves in chick embryos and traced its developmental changes. The results showed that the wave initially originated in a restricted area near the obex and was generated by multiple regions at later stages. We suggest that the upper cervical cord/lower medulla near the obex is the kernel which differentiates first as the source of the correlated activity, and that regional and temporal differences in neuronal excitability might underlie the developmental profile of wave generation in early chick embryos.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	231,000	1,331,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	921,000	4,321,000

研究分野：神経生理学、神経機能発生学

科研費の分科・細目：神経科学、神経・筋肉生理学

キーワード：光学イメージング、膜電位感受性色素、中樞神経系、機能発生、embryo、脊髄

1. 研究開始当初の背景

個体発生の過程において、中枢神経系を構成するニューロン群が神経回路網を形成していくプロセスは、神経系の機能的構築を理解する上で、最も基本的な問題点の一つである。脊髄は、中枢神経系の中では比較的単純な細胞構築からなるが、機能的には、脊髄神経を介する入力と上位中枢からの入力、さらに central pattern generator (CPG) と呼ばれる脊髄内在歩行リズム中枢からの自発興奮が、複雑に絡み合い・統合されている極めて高度な機能構造体である。この脊髄の機能形成過程について、これまでの研究は、後根や延髄を刺激したときの応答、あるいは自発興奮活動を、前根からの集合電位（または電流）として記録する方法が主流で、脊髄内でのニューロン活動パターンそのものについては、通常 black box のまま議論されてきた。これは、発生初期の脊髄を構成する神経細胞が小さく脆弱で、微小電極を適用することが困難であるばかりでなく、従来の電気生理学的測定法では、標本内の多数領域からニューロン応答を同時記録しその機能マッピングを行うことが不可能であったことが原因と考えられる。

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、膜電位感受性色素を用いたニューロン活動の光学的イメージング法を発生初期胚に適用し、脳神経刺激に対する脳幹内での応答あるいは自発興奮活動について、三次元的機能構築という観点から解析を行ってきた。この光学的イメージング法は、未分化で脆弱なニューロンの電位活動を非侵襲的に多数領域から同時記録し、その機能マッピング/機能イメージングを行えるという他の測定法にはない利点を有している。これまでに、鶏胚、ラット胎仔の脳幹摘出標本を用いて、自律感覚系入力（舌咽神経、迷走神経）、体性感覚系入力（嗅神経、視神経、三叉神経、内耳神経）に関して、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。脊髄に関しては、鶏胚の脊髄スライス標本を用いて、脊髄神経刺激によって脊髄内に誘発される光学応答を測定し、その興奮伝搬パターンをイメージング化してシナプス応答の機能発生過程を解析することに成功している。

2. 研究の目的

本研究は、このような神経系機能発生に関する我々の実績と、光学的測定における新しい技術開発を背景に、発生過程に伴う脊髄内神経回路網の機能形成過程を明らかにするとともに、種による相違点を解明する目的で計画された。本研究では、膜電位感受性色素を用いて、脊髄神経・上位中枢などからの複数の入力、出力パターンが、個体発生とともにどのように形成されていくのかを明らかにする。さらに、CPG の自発活動のマッピングを同時に行い、刺激によって誘発されるニューロン活動と、自発興奮によって生じるニューロン活動との相互作用について、中枢神経系内における情報処理という観点から、その発達のプロセスを明らかにする。

3. 研究の方法

①実験材料

孵卵 3.5 日～8 日の鶏胚を用いた。まず、麻酔下に鶏胚を取り出し、実体顕微鏡下で脳幹-脊髄インタクト標本を作製した。

②光学計測

a) 膜電位イメージングシステム: 測定には、我々の研究室で独自に作成した、光学的 1020 チャンネル同時測定システムを用い、脳幹内の 1020 ヶ所の領域からニューロン電位活動を光学的変化として同時記録した。

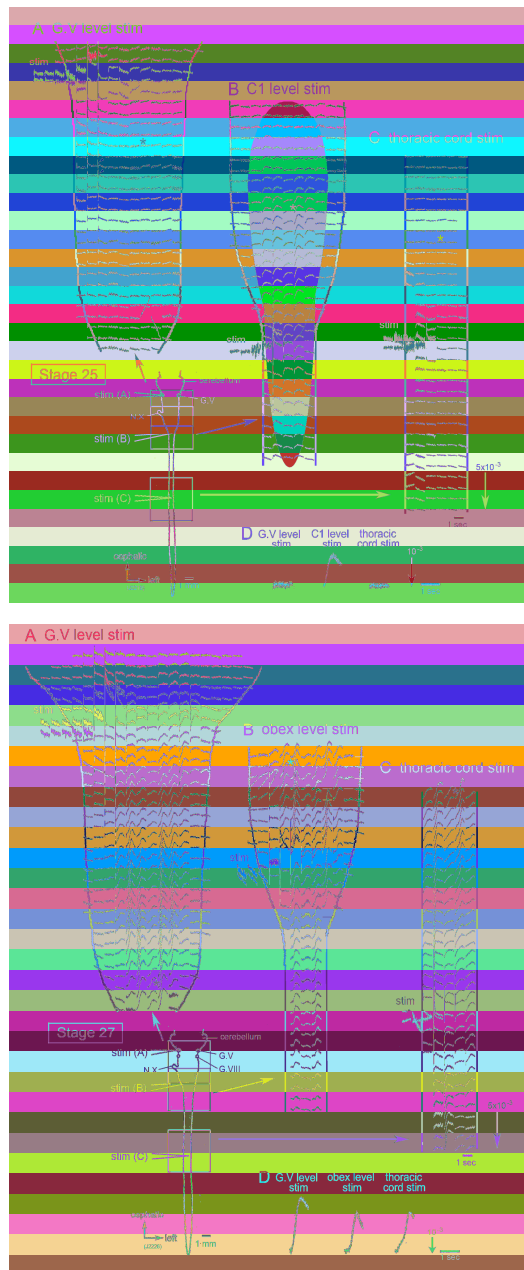
b) 膜電位感受性色素による染色法: 標本を膜電位感受性色素 0.1-0.2mg/ml を含むリンゲル液に約 5-20 分間浸し染色した。膜電位感受性色素としては、メロシアニン・ローダニン系の NK2761 を用いた。我々はこれまでの経験から、この NK2761 が embryo の神経系では ①刺激に対する反応が大きく、②褪色が少なく、しかも、③毒性が少ないことを確認している (Momose-Sato et al.: J. Memb. Biol. 144, 1995)。

4. 研究成果

(1) 中枢神経系の電気刺激による脱分極波の誘発

これまでの我々の研究から、発生期の中枢神経系を直接電気刺激すると、中枢神経系全

体に脱分極波が誘発されることが分かっている。図1は、H-H stage25 (孵卵 4.5日) 及び 27 (孵卵 5.5日) の記録例である。



(図1) 電気刺激による脱分極波の誘発

図1において、Stage27 では三叉神経のレベルから腰髄のレベルまで、どこを刺激しても脱分極波が誘発されたのに対して、Stage25 では、頸髄のレベルを刺激したときにだけ脱分極波が誘発された。

(2) 中枢神経系の電気刺激により誘発される脱分極波の起源との個体発生に伴う変化

次に、各発生段階の鶏胚脳幹-脊髄イン

タクト標本を作製し、各部位を刺激したときに脱分極波が誘発されるかを調べた (図2)。

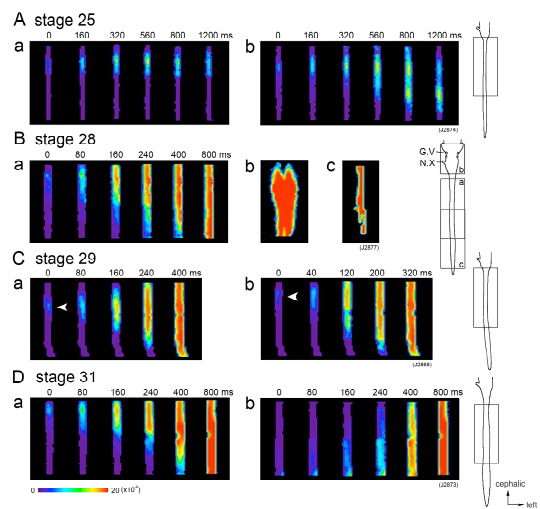
Hatchling Day	Stage	Preparation	Flora	N.V	N.VIII	N.X	obex	C1	C6	C13	T	LS
Day 25	Stage 25	J2185			X	X	X					
		J2223			X	X	X	X	X			
Day 25	Stage 25	S2191										
		S2192			X	X	X	X	X	X		
		S2193										
Day 25	Stage 25	S2194										
		S2195										
		S2196										
		S2197										
		S2198										
Day 25	Stage 25	J2112		X	X	X	X	X	X	X	X	X
		J2113		X	X	X	X	X	X	X	X	X
		J2110		X	X	X	X	X	X	X	X	X
		J2222		X	X	X	X	X	X	X	X	X
Day 25	Stage 25	S2199										
		S2190										
		S2191										
		S2192										
Day 25	Stage 25	S2193		X	X	X	X	X	X	X	X	X
		S2194		X	X	X	X	X	X	X	X	X
		S2195		X	X	X	X	X	X	X	X	X
		S2196		X	X	X	X	X	X	X	X	X
Day 25	Stage 25	S2229										
		S2230										
		S2231										
		S2232										

(図2) 誘発性脱分極波の個体発生に伴う変化

図2から、①誘発性脱分極波は、Stage24 の発生段階から記録されること、②Stage24 及び 25 では、脱分極波は obex から上部頸髄を刺激したときにだけ誘発され、その拡がりは、下部延髄から上部頸髄に限られること、③個体発生が進むに従って、脱分極波の拡がりは中枢神経系全体に拡がり、どこを刺激しても誘発されるようになること、が明らかとなった。

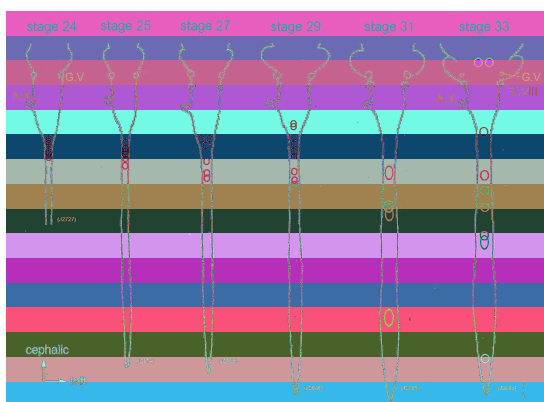
(3) 自発性脱分極波の起源と個体発生に伴う変化

これまでの我々の研究から、脱分極波は電気刺激によって誘発されるだけでなく、自発性にも起こることが分かっている。そこで、自発性脱分極波の起源がどこにあるのか、それは個体発生に伴い変化するのかを調べた。図3は自発性脱分極波の膜電位イメージングの例である。



(図3) 自発性脱分極波の膜電位イメージング

図3において、自発性脱分極波の起源は、個体発生に伴って変化することが分かる。そこで、Stage24 から 33 までの発生段階において、自発性脱分極波の起源を模式図にまとめた(図4)。



(図4)自発性脱分極波の起源の個体発生に伴う変化

この図から、①自発性脱分極波は Stage24 から観察され、その起源は obex から上部頸髄のレベルに発生すること、②発生が進むに従って、脱分極波の起源は脊髄全体に広がっていくこと、が明らかとなった。

以上の誘発性及び自発性脱分極波の拡がり起源の結果から、神経の興奮性の時空間的違いが、脱分極波発現の背景にあることを示唆された。

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 8 件)

- ① 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. (査読有)
- ② 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. (査読有)
- ③ Inaji, M., Sato, K., Momose-Sato, Y. and Ohno, K. (2011) Voltage-sensitive dye imaging analysis of functional development of the neonatal rat corticostriatal projection.

NeuroImage 54, 1831-1839. (査読有)

- ④ Momose-Sato, Y. and Sato, K. (2011) The embryonic brain and development of vagal pathways. **Respiratory Physiology and Neurobiology** 178, 163-173. (査読有)
- ⑤ Momose-Sato, Y., Nakamori, T. and Sato, K. (2011) Functional development of the vagal and glossopharyngeal nerve-related nuclei in the embryonic rat brainstem: Optical mapping with a voltage-sensitive dye. **Neuroscience** 192, 781-792. (査読有)
- ⑥ Mullah, S. H.-E.-R., Inaji, M., Nariai, T., Momose-Sato, Y., Sato, K. and Ohno, K. (2012) Optical analysis of developmental changes in synaptic potentiation in the neonatal rat corticostriatal projection. **Neuroscience** 201, 338-348. (査読有)
- ⑦ Momose-Sato, Y., Nakamori, T. and Sato, K. Spontaneous depolarization wave in the mouse embryo: origin and large-scale propagation over the CNS identified with voltage-sensitive dye imaging. **European Journal of Neuroscience**, in press. (査読有)
- ⑧ Momose-Sato, Y., Nakamori, T. and Sato, K. Pharmacological mechanisms underlying the switching from the large-scale depolarization wave to segregated activity in the mouse CNS. **European Journal of Neuroscience**, in press. (査読有)

[学会発表] (計 23 件)

- ① 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.
- ② 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.
- ③ 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.

- ④ 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.
- ⑤ Maehara, T., Inaji, M., Nariai, T., Sato, K. and Ohno, K. Functional distribution of the palm sensory area using intraoperative intrinsic optical imaging. 29th International Congress of Clinical Neurophysiology October 28-November 1, 2010, Kobe, Japan.
- ⑥ Momose-Sato, Y. and Sato, K. Developmental changes in the spontaneous depolarization wave in the mouse embryo: mechanisms underlying spatial segregation. Society for Neuroscience 40th Annual Meeting November 13-17, 2010, San Diego, USA.
- ⑦ Momose-Sato, Y., Nakamori, T. and Sato, K. Dual switching in the pharmacological nature of the large-scale depolarization wave in the mouse embryo. Society for Neuroscience 41st Annual Meeting November 12-16, 2011, Washington DC, USA.
- ⑧ Sato, K., Glover, J. C. and Momose-Sato, Y. (2009) 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.
- ⑨ Momose-Sato, Y. and Sato, K. (2009) Optical imaging of large-scale depolarization waves in the developing CNS. **Journal of Physiological Sciences** 59 suppl., 338.
- ⑩ 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.
- ⑪ 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.
- ⑫ 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.
- ⑬ 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.
- ⑭ Sato, K. and Momose-Sato, Y. (2010) Large-scale rhythmic depolarization wave in the embryonic avian and mammalian neural circuits. **Journal of Physiological Sciences** 60 suppl. 1, S39.
- ⑮ Momose-Sato, Y. and Sato, K. (2010) Spontaneous depolarization waves in the developing mouse CNS: optical imaging with a voltage-sensitive dye. **Journal of Physiological Sciences** 60 suppl. 1, S132.
- ⑯ Momose-Sato, Y. and Sato, K. (2010) Voltage-sensitive dye analysis of spontaneous depolarization waves in the developing mouse CNS. **Neuroscience Research** 68 suppl. 1, e136.
- ⑰ Momose-Sato, Y. and Sato, K. (2011) Spontaneous depolarization wave in the mouse embryo: spatial segregation with development and its mechanism. **Journal of Physiological Sciences** 61 suppl. 1, S168.
- ⑱ Sato, K., Komuro, R. and Momose-Sato, Y. (2011) Screening of fluorescent voltage-sensitive dyes for detecting neural activity in the embryonic brain. **Journal of Physiological Sciences** 61 suppl. 1, S168.
- ⑲ Momose-Sato, Y., Nakamori, T. and Sato, K. (2011) Spontaneous depolarization wave in the embryonic mouse CNS: disappearance of the wave with development and its mechanism. **Neuroscience Research** 71 suppl. 1, e245.
- ⑳ Sato, K., Komuro, R., Nakamori, T. and Momose-Sato, Y. (2011) Screening of voltage-sensitive fluorescence dyes for imaging embryonic neural activity. **Neuroscience Research** 71 suppl. 1, e245.
- ㉑ Nakamori, T., Sato, K., Tanaka, K. and Ohki-Hamazaki, H. (2011) NR2B-dependent neural activation is indispensable for visual imprinting. **Neuroscience Research** 71 suppl. 1, e276.
- ㉒ Momose-Sato, Y., Nakamori, T. and Sato, K.

(2012) Pharmacological nature of the depolarization wave in the mouse CNS -Dual switching and its developmental significance- **Journal of Physiological Sciences** 62 suppl. 1, S98.

②③ Sato, K., Nakamori, T. and Momose-Sato, Y. (2012) Optical survey of polysynaptic pathway formation in the embryonic rat vagal system. **Journal of Physiological Sciences** 62, suppl. 1, S106.

[図書] (計 2 件)

① Momose-Sato, Y., Sato, K. and Kamino, K. (2010) Monitoring population membrane potential signals during functional development of neuronal circuits in vertebrate embryos. In: **Membrane Potential Imaging in the Nervous System: Methods and Applications**. Eds. Canepari, M. & Zecevic, D. Springer-Verlag, New York, 83-96. (査読有)

② Momose-Sato, Y. and Sato, K. Spreading synchronized activity in the embryonic brainstem and spinal cord. In: **Comprehensive Developmental Neuroscience**. Eds. Rubenstein, J. & Rakic, P. Elsevier, USA, in press. (査読有)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<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 (MOMOSE-SATO YOKO)

関東学院大学・人間環境学部・教授

研究者番号 : 70251501