

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：32666

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23659125

研究課題名（和文） 光ファイバーを介した蛍光測光による脳深部遺伝子発現のリアルタイム
モニタリング研究課題名（英文） Real-time monitoring of GFP-expression in the rat hypothalamus
via optical fiber

研究代表者 飯島 典生 (IIJIMA NORIO)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00285248

研究成果の概要（和文）：

脳深部の遺伝子発現をリアルタイムでモニターすることを目的として、光ファイバーを介して脳内の GFP 発現細胞を探索し、GFP 蛍光を定量するためのレーザー発振・受光システムを開発した。このシステムでは、光ファイバーの一端はレーザー発振・受光器に接続され、他端は GFP トランスジェニックラットの脳内に挿入され、頭蓋骨に固定される。光ファイバーは捻じれに弱いため、無麻酔、非拘束のラットではラットの自発運動によって、容易に光ファイバーは捻じれ、断絶してしまう。そこでラットの運動による光ファイバーの振れを、ラットケージを回転させることによって、元に戻し、光ファイバーの断絶を回避する特殊ケージを開発した。これらにより、無麻酔・非拘束のラット脳内での GFP 発現量を蛍光強度としてリアルタイムで測定することができる。今回は視床下部室傍核で産生され、下垂体後葉に輸送・放出されるバソプレッシンに GFP を連結したトランスジェニックラット(Ueta *et al. Endocrinology*, 2005)を用いて、食塩水負荷による脱水過程、その後の通常水摂取による脱水からの回復過程におけるバソプレッシン産生変化をリアルタイムで4日間モニターすることに成功した。

研究成果の概要（英文）：

In vivo and real-time monitoring of gene expression in the deep structure of the brain could bring beneficial information for understanding neuroendocrine and autonomic nervous system. We developed the system which could monitor green fluorescent protein (GFP)-expression in the hypothalamus via optical fiber. One terminal of optical fiber was connected to blue semiconductor laser oscillators/ green fluorescent detector. The other terminal of it was inserted into the hypothalamus and fixed with the

cranium. This system enables real-time monitoring of GFP-expression with awake and unrestrained rat. However optical fiber is vulnerable to twist caused by rat's free moving. Therefore, we also developed the cage which turns the floor in response to turning of rat's head for relief of twist-stress of optical fiber between laser oscillator / fluorescent detector and the rat's head. We applied this system to the arginine vasopressin (AVP)-eGFP transgenic rats in which GFP was expressed in the paraventricular nucleus (PVN) and the supraoptic nucleus (SON) in the hypothalamus. Those rats show increase of GFP-expression in the PVN and the SON under salt-loading condition (Ueta *et al. Endocrinology*, 2005). Using this system, we monitored the change of AVP-expression in the hypothalamus *via* GFP-expression under dehydration and rehydration for one week. After monitoring *via* optical fiber, the brain were fixed and cut into slices for observation of the position of fiber-insertion. We are trying to monitor GFP-intensity in the PVN and the SON and that around the GFP-fibers in the hypothalamus. In this study, we show the new monitoring tool of gene expression in the deep structure of brain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,000,000	600,000	2,600,000

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：遺伝子発現リアルタイムモニタリング、脳深部、光ファイバー、GFP、レーザー、無麻酔・非拘束、バソプレシン

1. 研究開始当初の背景

生体における遺伝子発現をリアルタイムでモニターすることは、様々な生理現象、病態を理解するうえで有益な情報である。GFPおよびルシフェラーゼによる遺伝子発現をモニターする技術の発達により、*in vitro*においては、リアルタイムで様々な遺伝子発現の可視化・定量化が可能となっている。一方、*in vivo*においては、生体表層において発現するGFPあるいはルシフェラーゼの検出は汎用化されているものの、生体深部における遺

伝子発現のモニターは、ショウジョウバエ、線虫、ゼブラフィッシュなどモデル動物の胚における遺伝子発現を例外として、体外からリアルタイムモニタリングは難しい。特に脊椎動物の脳は頭蓋骨に覆われており、神経ペプチドの増減等の有益な情報もリアルタイムでの解析は現状では難しい。

2. 研究の目的

脳内、特に脳深部における遺伝子発現をGFPの蛍光量に置き換えて、光ファイバーを介し

て GFP 発現細胞を探索し、リアルタイムで GFP 蛍光量の変動をモニターできるシステムの開発を目的とする。このシステムによって、*in vivo*における生理現象に応じた脳深部での遺伝子発現の変化を検出し、個体レベルの応答と対応させることを目指す。

3. 研究の方法

①光ファイバーを介して励起光を照射し、GFP 発現細胞を探索して、蛍光量を測定するレーザー発振器・検出器を開発する。

②脳内に挿入し、GFP 発現細胞を効率よく捕捉できる光ファイバーの先端（プローブ）を開発する。またプローブが動物の運動によって動物から外れないような、標的である GFP 発現細胞から外れないように頭蓋骨への固定法を開発する

③光ファイバーの一端はレーザー発振・受光器に接続され、他端は GFP トランスジェニックラットの脳内に挿入され、頭蓋骨に固定される。光ファイバーは捻じれに弱いため、無麻酔、非拘束のラットではラットの自発運動によって、容易に光ファイバーは捻じれ、断絶してしまう。そこでラットの運動による光ファイバーの捩れを、ラットケージの床を回転させることによって、元により戻し、光ファイバーの断絶を回避する特殊ケージを開発する。同ケージ内で光ファイバーを頭蓋骨に固定した動物を数日以上飼育する。

4. 研究成果

視床下部室傍核・視索上核で産生され、下垂体後葉に輸送・放出されるバソプレッシンは

抗利尿ホルモンであり、その産生は血漿浸透圧を反映する。バソプレッシンに GFP を連結したトランスジェニックラット(Ueta *et al. Endocrinology*, 2005)を用いて、食塩水負荷による脱水過程、その後の通常水摂取による脱水からの回復過程におけるバソプレッシン産生変化をリアルタイムで4日間モニターすることに成功した。

しかし現在のプローブはレーザーをプローブ先端より厳密に直線上に照射するため、GFP 発現細胞の検出には限界があり GFP 発現細胞の捕捉の確度は高いとは言えない。プローブ先端の形状を改良し、レーザーの放射状の照射を可能としたい。また現在のレーザー発振・受光器では、より弱い発現を示す細胞の捕捉は困難であり、蛍光検出の感度を上げるための工夫も必要である。

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

1 飯島典生、松本恵介、上田陽一、小澤一史
光ファイバーを用いた脳深部での遺伝子発現のリアルタイムモニタリング：AVP-eGFP ラットを用いた試み。第 39 回日本神経内分泌学会学術集会 2012 年 9 月 28 日 小倉

2 飯島典生、松本恵介、上田陽一、小澤一史
GFP 蛍光を用いた脳深部での遺伝子発現モ

ニタリングシステムの開発：非拘束・無麻酔
の AVP-eGFP TG ラットを用いた試み。第
118 回日本解剖学会学術集会 2013 年 3 月
30 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯島典生 (IIJIMA NORIO)

日本医科大学 医学部 准教授

研究者番号：00285248

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：