

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659648

研究課題名(和文)探索的脳研究に寄与する脳深部蛍光イメージング法の開発

研究課題名(英文) Newly developed intravital fluorescence imaging in deep brain regions for translational research

研究代表者

山本 清二 (Yamamoto, Seiji)

浜松医科大学・メディカルフォトンクス研究センター・教授

研究者番号：60144094

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：脳の情報処理や病態を研究する場合、個体レベル(in situ)での実験が必要であるが、脳深部のin situイメージングは未だ困難である。本研究では、個体レベルでリアルタイムな信号伝達の評価が可能になる生体内蛍光イメージング法を開発するために、観察法および蛍光ラベル法の研究を行い、脳室カニューラによるin situ lipofection法により、蛍光蛋白をアダルトラット脳で発現させ、ファイバー共焦点顕微鏡により脳深部の任意の場所の蛍光像を観察することが可能になった。これにより、培養細胞レベルの知見を個体の脳で生きたままリアルタイムに検証でき、探索的研究を発展させることができる。

研究成果の概要(英文)：Intravital fluorescence imaging is useful to study the brain function. However, the fluorescence imaging, in situ, in the deep brain regions still remains difficult. In the present study we tried to develop the intravital fluorescence imaging technique. We employed an imaging fiber bundle (1.0 mm outer diameter) including 20,000 fibers coupled to the microlens-attached Nipkow-disk scanner (CSU-21, Yokogawa, Japan) equipped with 10x objective lens. This fiber-coupled confocal microscope is capable to observe the confocal images in the deep brain regions. We also developed in situ lipofection method. After placing a ventricular cannula in adult rats, plasmid DNA and Lipofectamine were slowly injected twice a day. 48 hours after the injection, fluorescent protein was diffusely and well observed in the brain. The fiber-coupled confocal microscope and in situ lipofection method can be useful to examine the intravital signaling, and be a powerful tool for translational brain research.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：バイオイメージング 脳神経疾患 探索的研究 共焦点顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

脳の情報処理はニューロンとグリアの相互関連に依存し、脳血流も脳の情報処理に大きく影響する。従って脳の情報処理や病態を研究する場合、個体レベル (in situ) での実験が必要である。一方、イメージングは有力なツールであるが、現状では個体レベルで分子生物学的知見をリアルタイムイメージングにより検証すること、特に脳深部の in situ イメージングは未だ困難である。新たな治療法や診断法を開発し臨床に応用する橋渡しとするためには、脳深部の蛍光イメージングを可能にする必要がある。本研究では、個体レベルでリアルタイムな信号伝達の評価が可能になる生体内蛍光イメージング法を開発するために、観察法および蛍光ラベル法の研究を行った。

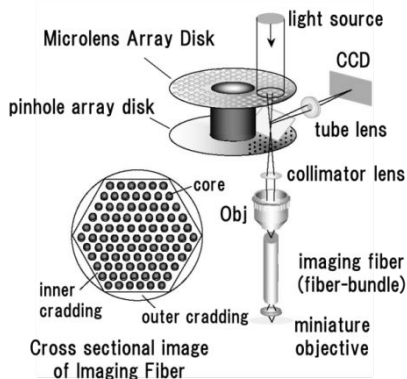
2. 研究の目的

本研究ではこれまでの我々の研究 (Neurosurg 67:118,2010) を発展させ、1) 脳の任意の部位の共焦点蛍光像を観察する方法を開発し動物での実用性を確認する; 2) 脳の任意の部位に蛍光蛋白を発現させる方法を開発し動物での実用性を確認することを目的とし、本研究期間終了時には、脳表と脳深部を問わず任意の場所に蛍光色素や蛍光蛋白により細胞や細胞内器官に蛍光ラベルし、共焦点蛍光像を観察することを可能にする。これにより、培養細胞レベルの知見を個体の脳で生きたままリアルタイムに検証できることになり、臨床応用を念頭に置いた基礎研究をさらに発展させることができる。

3. 研究の方法

3-1. 観察法の開発

図に示すように、硬性ファイバーの先端にミニレンズを装着したファイバー共焦点顕微鏡の可能性を検討した。先端に装着するレンズの選定にあたっては、焦点距離 60 μm 以内を目標とした。先端にレンズを装着する理由は、レンズがないとファイバー直下の共焦点像が撮影できるが、それよりさらに少し奥の破壊されていない部分からの蛍光を効率よ



Sakurai T, Yamamoto S. et al. Proc of SPIE 6088:03-1, 2006 より一部改変

く集め、ファイバー直下に集光することにより明るい共焦点像を実現できる可能性があるからである。

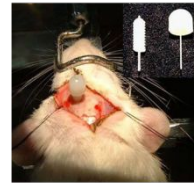
3-2. 蛍光ラベル法の開発

3-2-1. In Situ Lipofection 法

アダルトラットの脳室内に脳室カニュラ (Plastic One Cannula) を設置し、1週間後に脳室内にプラスミドおよび Lipofectamine を投与し、脳内に蛍光蛋白を発現させる最適法 (プラスミド濃度、Lipofectamine 量、

注入速度、注入回数) を選定することを試みた。

In Situ Lipofection Method



脳室カニュラを留置
Plasmid DNA 注入

48h後観察

3-2-2. Electroporation 法

アダルトラットの脳内に電極を刺入し Electroporation による蛍光蛋白発現法を検討した。

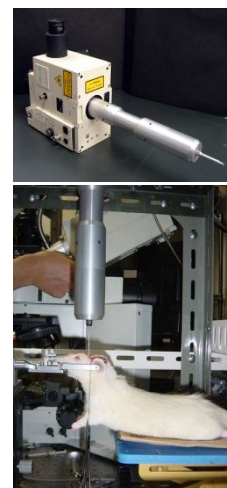
3-2-3. 蛍光色素投与法

Pressurized Bolus Injection による蛍光色素の注入 (PNAS 2003; 100:7319-7324) を検討した。

4. 研究成果

4-1. ファイバー共焦点顕微鏡による観察

先端に装着する焦点距離 60 μm 以内のレンズの選定を検討した。理論的には、ガラスの屈折率を 1.5 とすると、焦点距離 = 1.5r となり、仮にファイバーの先端に直径 0.2 mm のボールレンズを置くと仮定すると、 $f = 1.5 \times 0.1 = 0.15 \text{ mm}$ となり、ボールの中心から焦点までの距離は、 $0.15 - 0.1 = 0.05$ となり、この場合に初めて先端から対象物までの距離が、生体内を共焦点顕微鏡で観察可能な距離と考えられる 60 μm より小さくなる。それよりも焦点距離が大きいと、生体内での散乱により適切な焦点を結ばせることができない。以上より、適切なレンズが無い場合、まず先端レンズなしの硬性ファイバー共焦点顕微鏡 (写真) でラット海馬領域の虚血再灌流時の蛍光イメージングを行った。

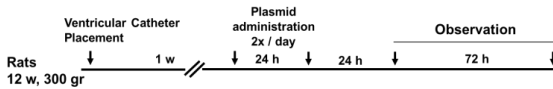


4-2. In Situ Lipofection 法

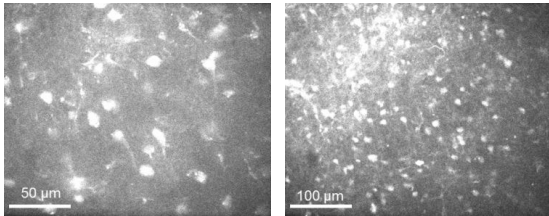
方法 (1 回分、ラット 300 g BW の場合)

投与量：DNA として 16.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (BW) = 5 $\mu\text{g}/300\text{g rat}$
 エッペンチューブに DNA 2.5 μg を入れ、P3000 reagent 5 μL を加えてよく混ぜる。
 さらにリポフェクトアミン 3000 = 3.75 μL を加えて混ぜる。
 室温で 5 分インキュベート。
 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ で脳室内投与を行う。
 脳室内投与：2 回/日
 脳室内投与開始 48 時間（脳室内投与終了後 24 時間）後に観察する。

代表的投与法



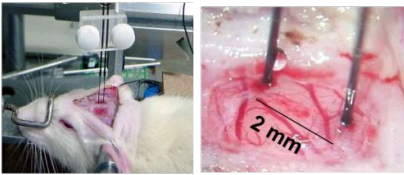
UCP-4 (ミトコンドリア蛋白) が発現すると赤色蛍光も同時に発現し観察できるレポーターベクターである UCP-4 promote-赤色蛍光タンパク質 tdTomato レポーターベクターを SHR ラット (体重 300 g、オス) に脳室内投与した後 48 時間後に観察した大脳皮質の蛍光像



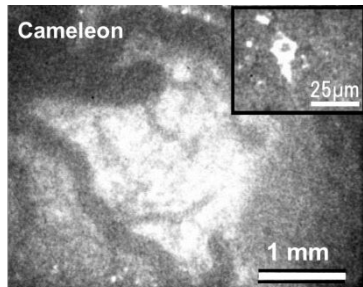
4-3. Electroporation 法

アダルトラットの脳内に電極を刺入

Electroporation (電極を脳に刺入)



Electroporation により蛍光蛋白 (Cameleon) を発現した大脳皮質の蛍光像。

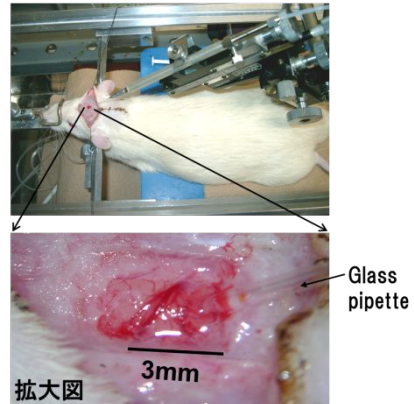


4-4. 蛍光色素投与法

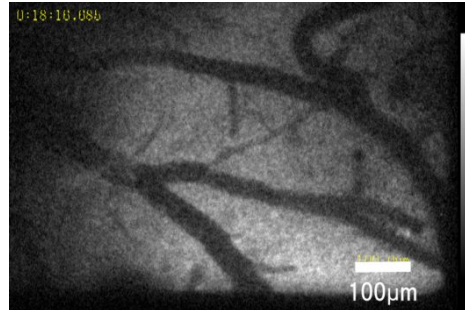
Pressurized Bolus Injection による蛍光色素の注入 (PNAS 2003; 100:7319-7324)

蛍光色素をガラスピペットに取り、硬膜を開けて脳内に刺入し、窒素ガスで圧をかけて注入。1 回注入量は 2.5 ~ 5 μL 、注入後、30 分間ピペットを静置

蛍光色素投与システム全体像



Pressurized Bolus Injection により蛍光色素の注入した大脳皮質の蛍光像



4-5. 応用例：生体内蛍光イメージングによる病態観察 生体内 $\cdot\text{OH}$ (OH ラジカル) 産生の観察

【方法】

アダルト SD ラット (体重 300g) に全身麻酔下で 4 血管閉塞による 10 分間の一過性前脳虚血を負荷。

海馬 CA1 領域に Hydroxyphenyl Fluorescein (HPF)、 $\cdot\text{OH}$ の蛍光指示薬を pressurized bolus injection 法により投与。

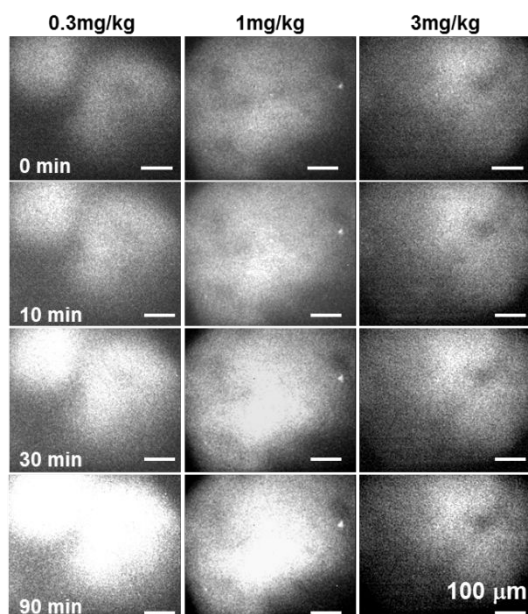
ファイバー共焦点レーザー顕微鏡 (外径 1mm のイメージングファイバー 20,000 本を束ねたものを multi-pinhole scanner [CSU-21、横河] とカップルさせたもの) で脳深部の蛍光像を観察。

HPF の蛍光像を 10 分間の虚血と 80 分間の再灌流においてタイムラプスで観察。 $\cdot\text{OH}$ radical scavenger である edaravone 投与 (0.3, 1, and 3 mg/kg iv) し、 $\cdot\text{OH}$ 産生に及ぼす影響を生体内で観察した。

【結果】

10 分間の虚血中は蛍光強度の増加はあまり見られない (虚血そのもので Hb の吸収は低下するので、蛍光強度はわずかに上昇する)。

edaravone の濃度 (0.3, 1, and 3 mg/kg) に依存して蛍光強度の増加が抑制される。再灌流による $\cdot\text{OH}$ の産生が著明である。



4-6. まとめ

観察法としては、ファイバー共焦点顕微鏡により、二光子顕微鏡では到達できないような任意の脳深部の観察が可能であった。先端に装着する適切な微小レンズを選択できなかった。

蛍光ラベル法としては、In Situ Lipofection 法、Electroporation 法、Pressurized Bolus Injection による蛍光色素を試み、いずれも脳内に蛍光ラベルできるが、蛍光蛋白発現は In Situ Lipofection 法で、蛍光色素は Pressurized Bolus Injection で、細胞の状態が良い適切なラベルができた。

生体内蛍光イメージング法により、一過性前脳虚血・再灌流時の海馬 CA1 領域の $\cdot\text{OH}$ の蛍光イメージングができた。

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 1 件)

1. Yamaguchi S, Fukushi Y, Kubota O, Itsuji T, Yamamoto S, Ouchi T. Terahertz spectroscopy and detection of brain tumor in rat fresh-tissue samples. Proc. of SPIE Vol. 9321 932100:1-7, 2015

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Yamamoto S et al. Cerebellar fastigial nucleus stimulation up-regulates brain specific mitochondrial protein and induces neuroprotection against ischemia. The 14th

Asian Australasian congress of Neurological Surgeons. 2015.4.15-18, Jeju, Korea

2. 山本清二 他. kATP チャンネルの開放は脳特異的なミトコンドリア蛋白を誘導する. 第 36 回日本神経科学大会. 第 56 回日本神経化学大会. 第 23 回日本神経回路学会大会 合同大会. 2013.6.20-23. 京都市
3. Yamamoto S et al. kATP-channel opening up-regulates neuroprotective mitochondrial protein. The 43rd annual meeting of the Society for Neuroscience USA. 2013.11.09-13. San Diego, CA, USA
4. 山本清二. アストロサイトは遅発性神経細胞死に対して神経保護的に働く. Neurovascular Unit 研究会 2015(招待講演) 2015.1.31. 東京都

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 清二 (YAMAMOTO SEIJI)

浜松医科大学・メディカルフォトンクス研究センター・教授

研究者番号 : 60144094

(2) 研究協力者

福司 康子 (FUKUSHI YASUKO)

浜松医科大学・メディカルフォトンクス研究センター・特任研究員

研究者番号 : 50722683