

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 12 日現在

機関番号：22303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430067

研究課題名(和文) 光酸化を用いた大脳皮質 - 視床フィードバック経路の選択的抑制

研究課題名(英文) Selective destruction of the portico-thalamic feedback pathway by use of photo-oxidation technique

研究代表者

今村 一之 (Imamura, Kazuyuki)

前橋工科大学・工学部・教授

研究者番号：30203326

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：第一次視覚野から外側膝状体へのフィードバック経路の機能を研究する為に、この経路を特異的に破壊する方法を検討した。特に眼優位可塑性への影響を調べるために、感受性期後期のロングエバンス系ラットを用いて外側膝状体を電気生理学的にマッピングし、適切な部位にクロリンe6を微量注入した。このトレーサーが逆行性に第一次視覚野へ輸送されるタイミングで第一次視覚野にレーザー照射を行い、光酸化により皮質から視床へ投射する第6層のニューロンを選択的に破壊することに挑戦した。今後、最適なトレーサー量とレーザーの照射量を決定することが必要であるが、特異的に皮質-視床路を除去する道が開かれた。

研究成果の概要(英文)：We have developed a new activity mapping method to study the ocular dominance (OD) plasticity by applying c-Fos immunohistochemistry. This is a powerful method to apply to rats with smaller binocular regions. To investigate the functional roles of feedback projection from the primary visual cortex to the dorsal lateral geniculate nucleus (LGN), we challenged to apply the photo-oxidation induced apoptosis (i.e. targeted apoptosis). First, we electrophysiologically mapped the LGN and injected choline e6 into the appropriate region. After waiting retrograde transport of chlorin e6 to the layer 6 neurons in V1, the laser irradiation was applied to the cortex. We found that the target was damaged by photo-oxidation induced mechanism, although the best conditions of the amount of chlorin e6 and irradiation were remained to be elucidated. By use of this technique, we first succeeded to pave the way to study the roles of V1-LGN feedback system in the regulation of OD plasticity.

研究分野：神経科学

キーワード：眼優位可塑性 両眼視 大脳視覚野 外側膝状体 光酸化 フィードバック投射 逆行性標識 ラット

1. 研究開始当初の背景

網膜神経節細胞は、外側膝状体(LGN)を経由して大脳第一次視覚野(V1)へ投射する。V1の第6層のニューロンは、LGNにフィードバック投射する。このフィードバック投射の眼優位可塑性における機能的意義については、これまで明らかにされていない。フィードバック投射の機能阻害のためにV1のクレンジングや破壊等の実験操作が行われてきたが、いずれもその特異性に問題があった。分担研究者によって、クロリン e6 を逆行性輸送させた後にレーザ光線を照射することで標識ニューロンを選択的に破壊できること (Targeted Apoptosis) が示されていた。

2. 研究の目的

Targeted Apoptosis 法を用いて、V1 から LGN に投射するフィードバックニューロンを選択的に破壊する方法を検討する事を目的とした。さらに、この経路を遮断した動物で眼優位可塑性がどのように修飾されるかについて明らかにすることを目標として開始された。

3. 研究の方法

感受性期内の Long-Evans 系ラットを用いて、麻酔下で一側の LGN にクロリン e6 を注入する。注入3日目に再度麻酔して、目的とする V1 を覆う頭蓋骨を薄く削り、その部位へ 500mW の赤色レーザー光を 20 分間照射する。その後直ちに一側の眼瞼縫合遮蔽術を施し、単眼遮蔽する。その単眼遮蔽の効果を報告者らが開発してきた c-Fos Activity Mapping 法 (cFos-AM 法) を含め神経科学的手法を用いて評価する。以上により、V1-LGN フィードバック投射の眼優位可塑性への関与について検討する。

4. 研究成果

(1) 基礎検討結果：方法論の確立

ラットにおける眼優位可塑性の感受性期プロフィールはすでに電気生理学的方法を用いて確立されており、生後4週齢がそのピークであることが報告されている。そこで、自家繁殖させた Long-Evans ラット (4週齢) を用いて、まずは、クロリンのキャリアーとなる Latex Microsphere (逆行性標識の解剖学的トレーサー) を LGN へ注入する実験を繰り返した。成獣の脳地図が利用できないこと、生後4週齢では、侵襲的な注入手術後の回復が悪く、注入後に次の実験のステップに進行できる確率が極めて低かったため、できるだけ成長した段階でトレーサー注入を行うことが重要であることがわかった。そこで、感受性期の終了時期に近いとされる生後7週齢のラットを用いて、眼優位可塑性が作動しているかを調べた。その結果、生後7週齢においても2週間にわたる単眼遮蔽により、感受性期のピークである生後4週齢のラットにおいて認められる眼優位可塑性に匹敵す

る変化が惹起されることを cFos-AM 法を用いて明らかにすることができた (図1)。

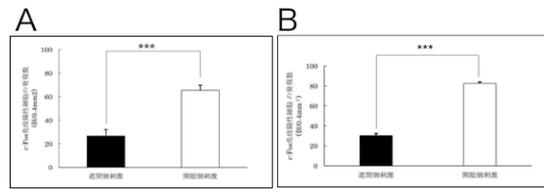


図1 4週齢(A)、7週齢(B)ラットの眼優位可塑性の発現レベル 黒カラムは遮蔽眼刺激により誘導される刺激眼同側 V1 第4層における c-Fos 免疫陽性細胞数。白カラムは、同様に正常に視体験をした眼の刺激により誘導された細胞数。いずれの週齢においても遮蔽眼の刺激により誘導される c-Fos 陽性細胞は、有意に低下しており、眼優位可塑性が同様のレベルで発現していることがわかる。

また、c-Fos 免疫陽性細胞数を計測するターゲット領域である刺激眼と同側 V1、Oc1B 領域の第4層の境界を簡便に、かつ再現性良く検出するために、アセチルコリンエステラーゼ (AChE) を組織化学的に染色した (図2)。

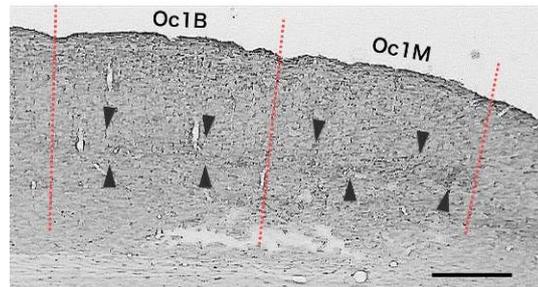


図2 V1のアセチルコリンエステラーゼ染色像 やじりの先は第4層の境界を示す。赤点線で示すように第4層の AChE の特徴的な染色性の相違から両眼視領域 (Oc1B) と単眼視領域 (Oc1M) を容易に分離することができた (赤点線)。スケールバーは、500µm を示す。

(2) V1 ニューロンの逆行性標識

V1 から LGN へ投射するフィードバックニューロンを選択的に標識するために、生後7週齢ラットをケタミン・メドトミジンで麻酔し、脳定位固定した状態で、LGN の座標を決定した。そのために、金属電極 (エノレード絶縁電気鍼) を用いてフラッシュ光刺激に対する複合活動電位反応を記録して、トレーサーを注入すべき部位を決定した (図3)

一度電極を抜いてからトレーサーを充填した微小ガラス管 (先端径 50 µm) を同一部位から刺入し電気生理学的反応が記録できた深さまで進めた。その部位で 0.5 µl の蛍光ビーズ (Fluorescent Latex Microsphere) を注入した。注入後5分間静置してガラス管を抜いた。3日後に4%パラホルムアルデヒド溶液で経心灌流固定して、抜脳、30%シュウクロース液に浸漬した。後頭極から LGN までの凍結切片 (50 µm 厚) を作成し、スライドガラスに伸展、乾燥させた後に蛍光顕微鏡にて

観察した (図4)。

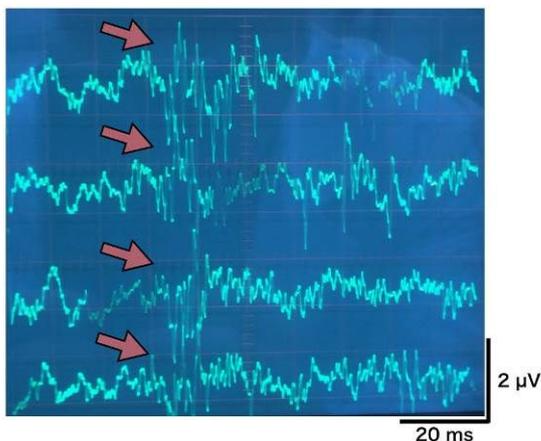


図3 LGN ニューロンのフラッシュ光に対する反応

脳表面から刺入した電極が LGN に到達するとフラッシュ光刺激に対して図のような複合活動電位反応 (赤矢印) が記録される。

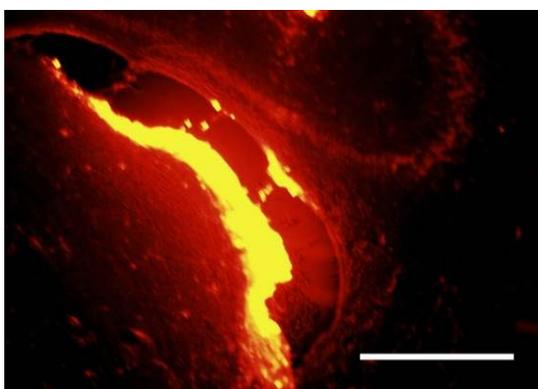


図4 LGN に注入された逆行性蛍光ビーズ・トレーサー (Fluorescent Latex Microsphere)

脳表面から刺入した微小ガラス管を通して蛍光ビーズが注入され、灌流後取り出した脳切片から LGN 背側部に確実にトレーサーが注入されたことを確認できた。この例では LGN 中央部に蛍光が認められた。画像右が外側、上が背側であり、スケールバーは 500 μm を示す。

LGN 注入に成功したラットの V1 を調べた結果、第 6 層に蛍光標識された一群のニューロンが認められた (図5)。注入後ラットは順調に回復を見せたことから、本方法により V1 から LGN へのフィードバックニューロンを選択的に標識する方法論を確立することができた。

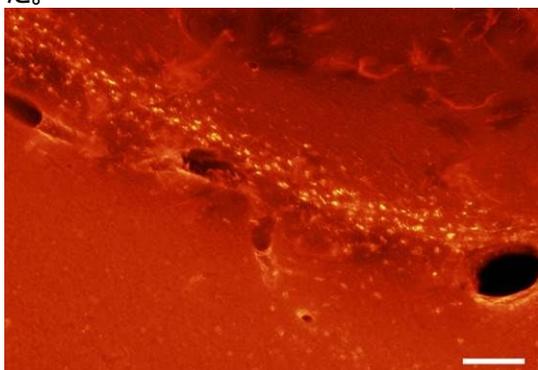


図5 LGN に注入された逆行性蛍光ビーズ・トレーサー (Fluorescent Latex Microsphere) によって標識された V1 ニューロン

標識されたニューロンは、V1 の第 6 層に認められた。スケールバーは 100 μm を示す。

(3) 光酸化による標識ニューロンの除去

同様な方法でクロリン e6 を LGN へ注入し、3 日後に再度麻酔を施し、脳定位固定を行った。V1 の上部の頭蓋骨を薄く削り、その上部からレーザー光 (670 nm, 500 mW) を約 20 分間照射した (図6)。

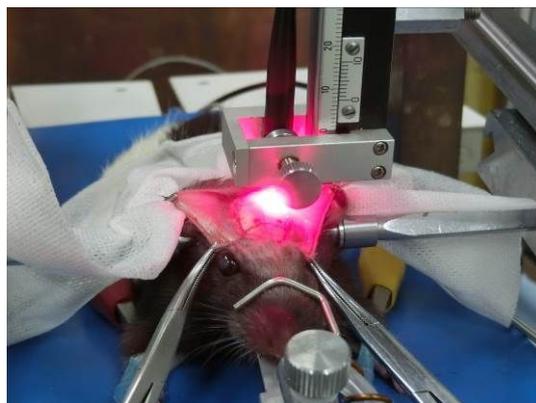


図6 クロリン e6 を LGN に注入 3 日後に V1 にレーザー光を照射

ラットの左 V1 をレーザー照射して光酸化による Targeted Apoptosis の誘導をはかった。

これにより標識されたニューロンの光酸化による細胞死を誘導した。クロリン e6 の LGN 注入を受け、その後レーザー照射を受けたラットの後頭葉は肉眼的にも変形している事が確認できた (図7)。このような肉眼的変化は、クロリン e6 を注入せず、レーザー照射のみを行ったコントロールラットには、認められなかった。また、クロリン e6 の代わりに通常の蛍光ビーズを注入したラットにも見られなかったことから、このような変化は、光酸化による細胞死によって生じたものであると結論された。

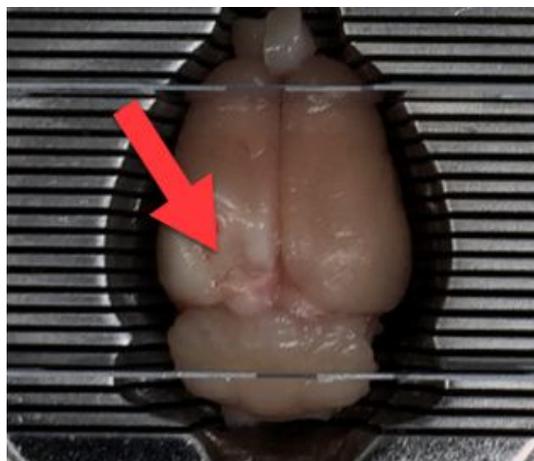


図7 クロリン e6 とレーザー照射によって V1 を含む後頭葉領域に生じた肉眼的変化 (ブレインマトリックスのスリット間隔は 1 mm)

ニッスル染色により、第一次視覚野を調べたところ、皮質下層部が破壊されたことが明らかになった(図8)。

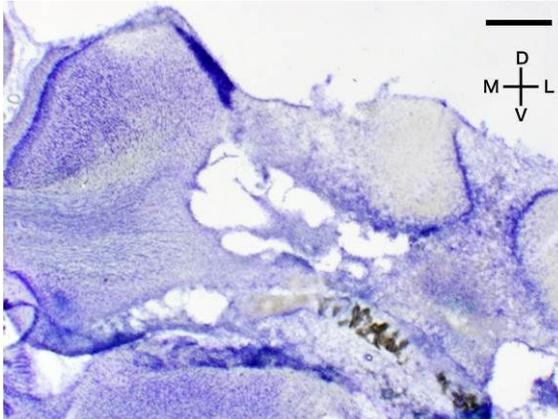


図8 クロリン e6 とレーザー照射によって V1 生じた破壊層を示すニッスル染色像 スケールバーは 500 μ m を示す。D, V, M, L はそれぞれ背側、腹側、内側、外側の方向を示す。

レーザー照射と同時に片眼瞼縫合遮蔽術を施行し、2週間後に正常眼の視覚刺激による c-Fos AM を実施した。暗順応後の右眼の単眼視覚刺激により、上丘において、c-Fos 陽性細胞の明瞭な左右差が認められ、単眼視覚刺激が確実に実行されていることがわかった(図9)。

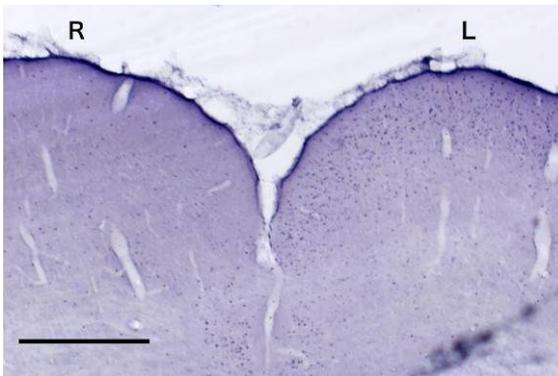


図9 右眼の光刺激により誘導された上丘の c-Fos 陽性細胞 刺激眼と対側に多くの免疫陽性細胞が認められる。スケールバーは 500 μ m を示す。

クロリン e6 の代わりに逆行性蛍光ビーズ・トレーサーを注入した対照ラットの V1 は、同様にレーザーを照射したにもかかわらず、大脳視覚野は全く正常であり、それぞれの半球に c-Fos 陽性細胞の分布に特徴的な差異が確認され、眼優位可塑性が作動していたことが推測された。

(4) 今後の課題と展望

本研究により、V1-LGN フィードバック経路を選択的に除去するための基本的な手法は確立できた。今回の一連の実験では、皮質が大きく破壊されてしまい、レーザー照射のパラメータを十分に検討することができなかった。今後、最適なレーザー照射の条件を決定することが重要である。また、網膜神経節細胞

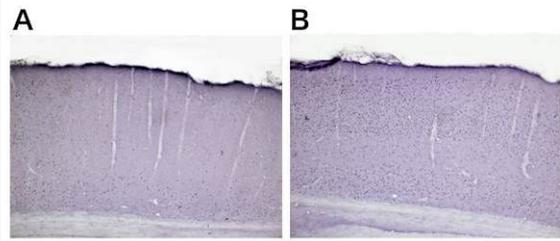


図10 単眼視覚刺激(正常眼)による V1 における c-Fos 免疫陽性細胞 スケールバーは 500 μ m を示す。A, B はそれぞれ右(同側)と左(対側)の視覚野を示す。

胞に対するクロリン e6 の LGN 注入についてさらに検討する必要がある。眼優位可塑性への影響を詳細に検討するためには、i) 網膜が正常であること、ii) V1 の6層以外のニューロンが正常に機能していること、が前提条件となる。今後も実験を継続していく必要があるが、本研究により実験系はほぼ確立することができたものと考えられる。

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 11 件)

1. Yang, Y., Zhong, N., Imamura, K., Lu, S., Li, M., Zhou, H., Li, H., Yang, X., Wan, Z., Wang, G., Hu, B., Li, K. (2016) Task and resting-state fMRI reveal altered salience responses to positive stimuli in patients with major depressive disorder. PLOS ONE. 11(5): e155092, doi: 10.1371/journal.pone.0155092. eCollection 2016.
2. Sasaki, K.S., Kimura, R., Ninimiya, T., Tabuchi, Y., Tanaka, H., Fukui, M., Asada, Y.C., Arai, T., Inagaki, M., Nakazono, T., Baba, M., Kato, D., Nishimoto, S., Sanada, T.M., Tani, T., Imamura, K., Tanaka, S., Ohzawa, I. (2015) Supranormal orientation selectivity of visual neurons in orientation-restricted animals. Nature, Sci. Rep. 5, 16712; doi: 10.1038/srep16712.
3. Zhong, N., Yang, Y., Imamura, K., Lu, S., Li, M., Zhou, H., Wang, G., Li, K. (2015) Self-regulation of aversive emotion: a dynamic causal model, advances in computational psychophysiology, Science, Science Supplement, 350 (6256, Supple): 25-27.
4. Yang, Y., Hu, C., Imamura, K., Yang X., Li, H., Wang, G., Feng, L., Hu, B., Lu, S., and Zhong, N. (2015) Morphologic and functional connectivity alteration in patients with major depressive disorder. Springer LNAI 9250, 33-42.
5. Yoshioka, M., Zhu, C., Imamura, K., Wang, F., Yu, H., Duann, F., and Yan, Y. (2014) Experimental design and signal selection for construction of a robot control system based on EEG signals. Robotics and Biomimetics, 1:22 (doi:10.1186/s40638-014-0022-3)
6. Yang, Y., Tosaka, E., Yang, X., Imamura, K., Lei, X., Wang, G., Hu, B., Lu, S., and Zhong, N. (2014) Shift of brain-state during recovery form discomfort induced by aversive pictures. Brain Informatics and Health (Proceedings of 2014 International Conference of Brain Informatics and Health), LNAI 8609 (eds. Słezak D.

- et al.), pp. 45-56, Springer (Warsaw, Poland).
7. Yamato, M. and Kataoka, Y. Fatigue-like behavior following peripheral viral infection is likely triggered by neuroinflammation. *Neural Regen. Res.*, 10, 203-204 (2015). DOI: 10.4103/1673-5374.152369
 8. Cui, Y., Toyoda, H., Sako, T., Onoe, K., Hayashinaka, E., Wada, Y., Yokoyama, C., Onoe, H., Kataoka, Y., and Watanabe, Y. A voxel-based analysis of brain activity in high-order trigeminal pathway in the rat induced by cortical spreading depression. *NeuroImage*, 108, 17-22 (2015). doi:10.1016/j.neuroimage.2014.12.047
 9. Cui, Y., Kataoka, Y., and Watanabe, Y. Role of cortical spreading depression in the pathophysiology of migraine. *Neurosci. Bull.* 30, 812-822 (2014). DOI: 10.1007/s12264-014-1471-y
 10. Nakatomi, Y., Mizuno, K., Ishii, A., Wada, Y., Tanaka, M., Tazawa, S., Onoe, K., Fukuda, S., Kawabe, J., Takahashi, K., Kataoka, Y., Shiomi, S., Yamaguti, K., Inaba, M., Kuratsune, H., Watanabe, Y. Neuroinflammation in patients with chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis: a 11C-(R)-PK11195 positron emission tomography study. *J. Nucl. Med.*, 55: 945-950 (2014).
 11. Yamato, M., Tamura, Y., Eguchi, A., Watanabe, Y., and Kataoka, Y. Brain interleukin-1beta and the intrinsic receptor antagonist control peripheral toll-like receptor 3-mediated suppression of spontaneous activity in rats. *PLOS ONE*, 9: e90950 (2014). DOI: 10.1371/journal.pone.0090950

〔学会発表〕(計 20 件)

1. 今村一之, ミラーニューロンの文献的考察 第8回神経機能回復セミナー, 50~51, (2015年9月18日)
2. 大野洋一, 間中勇輝, 今村一之, パーキンソンモデルラットにおける前肢運動機能の定量的解析の試み第8回神経機能回復セミナー, 15, (2015年9月18日)
3. 緑内障モデル動物確立のための基礎検討, 佐藤文一, 今村一之, *Vision Science Forum 2015*, O1-3, (Aug. 19, 2015)
4. Y. Ohno and K. Imamura, Study of forepaw function and posture using the reaching task of Parkinson's disease model rats. The 93rd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, 2P-145, (March, 23, 2016)
5. 片岡洋祐, 田村泰久, 大和正典, 久米慧嗣, 中野真行 中枢神経炎症と疲労に関する動物モデル研究 第10回日本疲労学会 (大阪・コングレコンベンションセンター)平成26年5月30-31日 (シンポジウム)
6. 久米慧嗣, 大和正典, 宮繁志治, 中野真行, 江口麻美, 田村泰久, 片岡洋祐 水浸疲労負荷モデル動物の肝臓における疲労代謝回路の活性化と組織炎症 第10回日本疲労学会 (大阪・コングレコンベンションセンター)平成26年5月30-31日 (ミニシンポジウム)
7. 竹田昂司, 西口英司, 大和正典, 片岡洋祐, 金田明 Anti-GBM 腎炎抑制のための照射パラメータ検討 第26回日本レーザー治療学会(東京・ステーションコンファレンス万世橋)平成26年6月28-29日(シンポジウム)
8. 大和正典, 金田明, 片岡洋祐 近赤外低反応レベルレーザー照射による腎炎抑制効果 第26回日本レーザー

- 治療学会(東京・ステーションコンファレンス万世橋)平成26年6月28-29日(シンポジウム)
9. 金田明, 大和正典, 片岡洋祐 LLLT 研究の現状と将来 第26回日本レーザー治療学会(東京・ステーションコンファレンス万世橋)平成26年6月28-29日(シンポジウム)
 10. 片岡洋祐, 中野真行, 大和正典, 田村泰久 中枢神経組織前駆細胞による局所環境制御と神経機能維持 第120回日本解剖学会・第92回日本生理学会合同大会(神戸・神戸国際会議場)平成27年3月21-23日(シンポジウム)
 11. 田村泰久, 江口麻美, 中野真行, 久米慧嗣, 宮繁志治, 大和正典, 片岡洋祐 毛包前駆細胞の発光イメージングを用いた毛周期モニタリング 第9回日本分子イメージング学会総会(豊中・千里ライフサイエンスセンター)平成26年5月22-23日(ポスター発表)
 12. 中野真行, 田村泰久, 江口麻美, 大和正典, 久米慧嗣, 宮繁志治, 片岡洋祐 遺伝子改変ラットを用いた中枢神経前駆細胞のマルチモダルイメージング技術の確立 第9回日本分子イメージング学会総会(豊中・千里ライフサイエンスセンター)平成26年5月22-23日(ポスター発表)
 13. 大和正典, 久米慧嗣, 金光華, 宮繁志治, 中野真行, 江口麻美, 田村泰久, 片岡洋祐 エネルギー代謝の低下に着目した疲労動物モデルの作製と評価 第10回日本疲労学会 (大阪・コングレコンベンションセンター)平成26年5月30-31日 (ポスター発表)
 14. 片岡洋祐, 田村泰久, 大和正典, 久米慧嗣, 中野真行 中枢神経炎症と疲労に関する動物モデル研究 第10回日本疲労学会 (大阪・コングレコンベンションセンター)平成26年5月30-31日 (ポスター発表)
 15. 大和正典, 久米慧嗣, 金光華, 宮繁志治, 中野真行, 田村泰久, 江口麻美, 片岡洋祐 エネルギー代謝の低下に着目した疲労動物モデルにおける脳内神経炎症の関連 第37回日本神経科学大会(横浜・パシフィック横浜)平成26年9月11-13日 (ポスター発表)
 16. 田村泰久, 中野真行, 江口麻美, 大和正典, 久米慧嗣, 宮繁志治, 片岡洋祐 NG2 細胞選択的除去は脳室拡大および神経障害を誘導する 第37回日本神経科学大会(横浜・パシフィック横浜)平成26年9月11-13日 (ポスター発表)
 17. 中野真行, 田村泰久, 江口麻美, 大和正典, 久米慧嗣, 宮繁志治, 片岡洋祐 NG2 グリア脱落における TNF 経路を介した海馬神経細胞死誘導 第37回日本神経科学大会(横浜・パシフィック横浜)平成26年9月11-13日 (ポスター発表)
 18. 佐久間理香, 中込隆之, 河原麻衣子, 笠原由紀子, 田口明彦, 田村泰久, 片岡洋祐, 松山知弘 脳虚血障害後 NG-2 陽性ペリサイトは中枢神経系におけるすべての構成成分に分化する 第37回日本神経科学大会(横浜・パシフィック横浜)平成26年9月11-13日 (ポスター発表)
 19. Yamato, M., Kume, S., Jin, G., Miyashige, Y., Nakano, M., Tamura, Y., Eguchi, A., Kataoka, Y. Neuroinflammation is possibly involved in prolonged suppression of rat spontaneous activity induced by monofluoroacetate, an inhibitor for TCA cycle. *Society for Neuroscience 2014* (Washington DC, USA), November 15-19, 2014. (Poster)

20. Nakano, M., Tamura, Y., Eguchi, A., Yamato, M., Kume, S., Miyashige, Y., Kataoka, Y. Ablation of NG2 glial cells induced neuronal cell death in the hippocampus through apoptotic pathway. Society for Neuroscience 2014 (Washington DC, USA), November 15-19, 2014. (Poster)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.maebashi-it.ac.jp/~imamurak/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今村 一之 (IMAMURA, Kazuyuki)
前橋工科大学工学部・教授
研究者番号：30203326

(2) 研究分担者

片岡 洋祐 (KATAOKA, Yosuke)
国立研究開発法人理化学研究所・細胞機能
評価研究チーム・チームリーダー
研究者番号：40291033

(3) 連携研究者

()

研究者番号：