

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460335

研究課題名(和文) 蛍光Caプローブを発現する新規マウスを多種類用いた、脳血流制御機構の可視化解析

研究課題名(英文) Analysis of cerebral blood flow regulation using in vivo fluorescence imaging

研究代表者

関谷 敬 (Sekiya, Hiroshi)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・助教

研究者番号：40511374

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：脳はエネルギー要求性が高く、豊富な血流を必要とするが、情報処理時にはさらなる血流を消費する。この神経活動依存的な血流増加は非常に重要な現象であるが、そのメカニズムは不明な点が多い。本研究では、マウス大脳皮質において、神経細胞・アストロサイト・血管平滑筋の活動をイメージングで捉え、血流増加時に制御に関わる細胞の時空間動態を解析した。さらに、細胞間シグナル伝達経路の解明のため、薬理的な阻害実験も行った。これらより、神経細胞とアストロサイトが、動脈平滑筋を弛緩させ、脳局所の血流増加を引き起こすことを明らかにした。また、脳血流制御において、ノルアドレナリンも重要な働きを持つことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The brain requires a lot of energy even in a resting state. During information processing, the brain requires extra blood flow. This increase of blood flow during neuronal activities is a fundamental phenomenon. The mechanisms of cerebral blood flow regulation, however, remain to be elusive. To clarify the regulation mechanism, we performed in vivo calcium imaging of neurons, astrocytes and vascular smooth muscle cells in the cerebral cortex of mouse and analyzed spatiotemporal dynamics of activities of these cells. In addition, to investigate the signal pathways among these cells, we performed pharmacological experiments combined with fluorescence imaging. The results of these experiments show that activities of neurons and astrocytes lead to relaxation of arterial smooth muscle cells, which causes the increase of blood flow, and that noradrenaline, as an extracellular signaling molecule, plays a key role in the regulation of blood flow dynamics.

研究分野：神経科学

キーワード：血管平滑筋 脳血流 カルシウムシグナル 蛍光イメージング アストロサイト

### 1. 研究開始当初の背景

中枢神経系において、血流供給は非常に重要である。脳は、わずかな血流低下でも不可逆的なダメージを受けるなど、高いエネルギー要求性を示す。さらに、中枢神経ネットワークが情報処理を行なう際には、供給血流量の増加を必要とする。この神経活動に伴う血流供給の増加は、古くから知られた現象で、fMRI の BOLD シグナルとして、神経活動の検出にも用いられるなど、様々な分野に応用されている。また、神経活動が血流増加を引き起こすメカニズムについては、これまでさまざまな仮説が提唱されてきた。脳実質内の血管は全てアストロサイトの足突起に覆われるという組織学的な構造から、神経活動をアストロサイトが検出し、このアストロサイトが血管拡張のシグナルを出すことで、活動した神経細胞周囲における血流増加を引き起こす、という仮説が広く受け入れられている(図1)。しかしながら、神経活動に引き続いて起こる血流増加は、反応が非常に迅速であるのに対し、アストロサイトの活動は緩徐であるため、アストロサイトは神経細胞から血管へのシグナル伝達に関与しないといった報告があることや、神経細胞周囲の血流を増加させるために、どのような位置関係にある血管を拡張させているかが不明である、といったメカニズムに関する問題もあり、十分な解明はされていなかった。

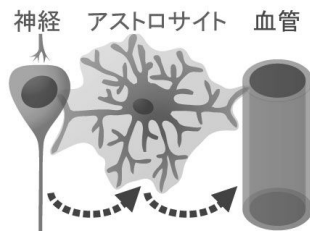


図1：従来のシグナル仮説

これらのシグナル伝達経路や空間的な血流制御についての研究が十分には進んでいなかった理由には、血流制御に関与すると考えられる細胞種には、アストロサイトなどの活動電位を示さない非興奮性細胞が含まれることや、神経活動や血流の動態などの理解には、時空間的な情報が重要であり、神経科学における強力な解析手法である電気生理学的手法を応用することが難しいことがあげられる。そのため、これら問題に対し、近年急速に発展している蛍光  $Ca^{2+}$  イメージング法を応用することを考えた。研究開始当初を含む現在では、 $Ca^{2+}$  イメージングは、様々な技術革新により、格段に扱いやすい技術となっている。細胞内  $Ca^{2+}$  イオンを検出するインジケータは、特にタンパク質型のインジケータの改良が進んでおり、明るく高い S/N 比でのイメージングが実現できる<sup>(1)</sup>。また、細胞種選択的にインジケータを発現できるトランスジェニックマウスにおいても様々な改良が進み、高 S/N 比につながる大量発現が可能となった<sup>(2)</sup>。さらに、マウス個体における蛍光イメージング法も確立されるなど<sup>(3)</sup>、脳血流制御機構を、蛍光イメージング法を用いて解析できる基盤が整った。

<sup>(1)</sup> Horikawa K, et al. (2010) Nat Methods

<sup>(2)</sup> Tanaka KF, et al. (2012) Cell Rep.

<sup>(3)</sup> Holtmaat A, et al. (2009) Nat. Protoc.

### 2. 研究の目的

本研究では、神経活動により脳血流が増加する際の、アストロサイトの血流制御機構における働きと、細胞間のシグナル伝達経路を解明することを目的とした。脳血流制御に関わる神経細胞・アストロサイト・血管平滑筋などに対し、蛍光  $Ca^{2+}$  イメージング法を用いて活動を捉え、血流動態との関連を明らかにする。さらに、これらの細胞種間でのシグナル伝達にもイメージングを応用することで、神経活動依存的な血流制御機構を明らかにする。

脳の血流制御は、情報処理に重要であるばかりでなく、その機能不全が多くの神経疾患において報告されるなど、病態生理への関りも深い。そのため、血流制御メカニズムの解明は、病態解明や治療法の開発などにも重要な意義を持つ。

### 3. 研究の方法

(1) 血流制御に関わる各種細胞の活動解析のため、細胞特異的に蛍光  $Ca^{2+}$  インジケータを発現させたマウスを作製する。

(2)  $Ca^{2+}$  インジケータを発現させたマウスの大脳皮質において、二光子励起顕微鏡を用いて、神経細胞・アストロサイト・血管平滑筋の蛍光イメージングを行い、細胞活動を捉える(図2)。



図2：二光子イメージング

(3) 神経活動依存的な血流増加時の、各種細胞の活動動態と血流制御を比較解析する。このため、蛍光イメージングを行いながら、マウスに感覚刺激を入力し、大脳皮質感覚野に、神経活動および血流増加を惹起する。

(4) 各種細胞の活動動態をイメージングで捉えながら、細胞外シグナルの受容体阻害薬等を用いて、シグナル伝達経路の解明を行う。

### 4. 研究成果

(1) 各種ドライバマウスとの交配により、細胞特異的に蛍光  $Ca^{2+}$  インジケータを発現することに成功した。

(2) 神経細胞・アストロサイト・血管平滑筋の  $Ca^{2+}$  シグナル可視化に成功した(図3)。また、この過程で行ったアストロサイトの詳細な  $Ca^{2+}$  イメージングにより、アストロサイトの新しい細胞内  $Ca^{2+}$  シグナルの発見につながったため、先に論文として発表した(論文)。

(3) 神経活動依存的な血流増加が起きる際の、神経細胞・アストロサイト・血管平滑筋の活動動態を捉えた。感覚野における血流増加は、ヘモグロビン吸光を用いて血流動態を評価し、確認した。各種細胞の活動動態の比較から、神経細胞による動脈平滑筋の弛緩が血流増加に重要であるが、アストロサイトも血流制御に関わることが明らかになった。静脈平滑筋は、血流増大にはほとんど関与していないことも示唆された。

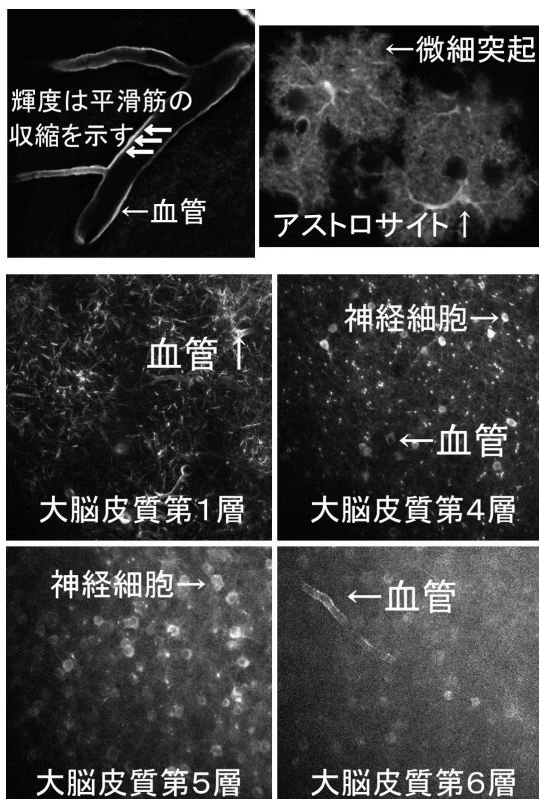


図3: マウス大脳皮質での神経細胞・アストロサイト・血管平滑筋における  $Ca^{2+}$  イメージングデータ発現

(4) 蛍光イメージングと同時にシグナル伝達物質合成酵素阻害薬を用いた薬理実験を行い、神経細胞による動脈平滑筋の弛緩には、一酸化窒素が重要なシグナル分子であることが示唆された。また、アストロサイトの活動は、細胞外シグナルの受容体阻害薬を用いた薬理実験を併用することで、ノルアドレナリンシグナルが重要な伝達物質であることが示唆された。

これらの結果から、神経活動に伴う血流制御では、神経細胞やアストロサイトにより引き起こされる、動脈平滑筋の弛緩が重要であることが明らかとなった。また、シグナル分子として、従来から指摘されているグルタミン酸に加え、ノルアドレナリンも血流制御において重要な働きを持つことが示唆された。

##### 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4件)

Promising techniques to illuminate neuromodulatory control of the cerebral cortex in sleeping and waking states. Kanda T, Ohyama K, Muramoto H, Kitajima N, Sekiya H. **Neurosci. Res.** (査読有り) 118, -, 2017. (In press)

DOI: 10.1016/j.neures.2017.04.009

Ventrolateral striatal medium spiny neurons positively regulate food-incentive, goal-directed behavior independently of D1 and D2 selectivity. Natsubori A, Tsutsui-Kimura I, Nishida H, Bouchekioua Y, Sekiya H, Uchigashima M, Watanabe M, de Kerchove d'Exaerde A, Mimura M, Takata N, Tanaka KF. **J Neurosci.** (査読有り) 37(10), 2723-2733, 2017.

DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3377-16.

Whisker experience-dependent mGluR signaling maintains synaptic strength in the mouse adolescent cortex. Kubota J, Mikami Y, Kanemaru K, Sekiya H, Okubo Y, Iino M. **Eur. J Neurosci.** (査読有り) 44(3), 2004-2014, 2016.

DOI: 10.1111/ejn.13285.

*In vivo* visualization of subtle, transient, and local activity of astrocytes using an ultrasensitive  $Ca^{2+}$  indicator. Kanemaru K, Sekiya H, Xu M, Satoh K, Kitajima N, Yoshida K, Okubo Y, Sasaki T, Moritoh S, Hasuwa H, Mimura M, Horikawa K, Matsui K, Nagai T, Iino M, Tanaka KF. **Cell Rep.** (査読有り) 8(1), 311-318, 2014.

DOI: 10.1016/j.celrep.2014.05.056

[学会発表](計18件)

Hiroshi Sekiya, Kenji Takikawa, Kaname Sato, Miki Takagi, Nami Kitajima, Toshiko Yamazawa, Hirokazu Sakamoto, Shigeyuki Namiki, Kazunori Kanemaru, Kenji F. Tanaka, Kenzo Hirose, Masamitsu Iino *In vivo* imaging analysis of astrocytic neuroprotective effects in cerebral infarction 第90回日本薬理学会 2017年3月17日 長崎ブリックホール(長崎県)

Nami Kitajima, Hiroshi Sekiya, Kazunori Kanemaru, Kenji F. Tanaka, Masamitsu Iino Astrocytes mediate blood flow regulation conducted by the locus coeruleus 第90回日本薬理学会 2017年3月15日 長崎ブリックホール(長崎県)

Hiroshi Sekiya, Nami Kitajima, Kazunori Kanemaru, Kenji F. Tanaka, Masamitsu Iino Cerebral blood flow regulation by the locus coeruleus via astrocytes 第21回グリア研究会 2016年12月3日 千里ライフサイエンスセンター(大阪府)

関谷 敬、北島 奈美、金丸 和典、田中 謙二、飯野 正光 アストロサイトを介した青斑

核による脳血流制御 第26回日本循環薬理学会 2016年12月2日 信州大学医学部附属病院 (長野県)

北島 奈美、関谷 敬、金丸 和典、田中 謙二、飯野 正光 生体内  $Ca^{2+}$  イメージングによるアストロサイトの脳血流制御機構解析 第64回 BloodVesselClub 2016年7月25日 東京大学医学部3号館 (東京都)

Hiroshi Sekiya, Nami Kitajima, Kazunori Kanemaru, Kenji F. Tanaka, Masamitsu Iino In vivo visualization of the glial assembly: Techniques and applications 第3回グリアアセンブリ WS 2016年7月15日 山形国際ホテル (山形県)

瀧川 健司、関谷 敬、佐藤 要、高木 美貴、北島 奈美、金丸 和典、坂本 寛和、並木 繁行、山澤 徳志子、田中 謙二、廣瀬 謙造、飯野 正光 大脳皮質における細胞外 ATP 動態を可視化する in vivo イメージング技術の開発 第89回日本薬理学会年会 2016年3月10日 パシフィコ横浜 (神奈川県)

北島 奈美、関谷 敬、金丸 和典、田中 謙二、飯野 正光 アストロサイトは、脳血流動態を安定化する 第89回日本薬理学会 2016年3月9日 パシフィコ横浜 (神奈川県)

Hiroshi Sekiya, Nami Kitajima, Kazunori Kanemaru, Kenji F. Tanaka, Masamitsu Iino Functions of astrocytes studied using in vivo  $Ca^{2+}$  imaging in non-anaesthetized mice 第20回グリア研究会 2015年12月5日 名古屋市立大学医学部研究棟 (愛知県)

北島 奈美、関谷 敬、金丸 和典、田中 謙二、飯野 正光 脳血流制御におけるノルアドレナリン作動性神経の働き 第25回日本循環薬理学会 2015年12月4日 東大寺総合文化センター金鐘ホール (奈良県)

金丸 和典、関谷 敬、北島 奈美、高木 美貴、田中 謙二、飯野 正光 生体内アストロサイトの微細で局所的なカルシウム活動を捉えるイメージング技術 第58日本神経化学会大会 2015年9月12日 大宮ソニックシティ (埼玉県)

瀧川 健司、関谷 敬、佐藤 要、北島 奈美、高木 美貴、金丸 和典、坂本 寛和、並木 繁行、田中 謙二、廣瀬 謙造、飯野 正光 大脳皮質における細胞外 ATP 動態を可視化する in vivo イメージングシステムの開発 第38回日本神経科学大会 2015年7月29日 神戸国際会議場 (兵庫県)

北島 奈美、関谷 敬、金丸 和典、田中 謙二、飯野 正光 脳血管平滑筋の生体内  $Ca^{2+}$  イメージングによるアストロサイトの脳血流制御機構解析 第132回日本薬理学会関東部会 2015年7月4日 明海大学浦安キャンパス (千葉県)

Kazunori Kanemaru, Hiroshi Sekiya, Junji

Suzuki, Kenji F. Tanaka, Masamitsu Iino New Calcium imaging methods for the visualization of local activities of astrocytes in vivo 19th International Symposium on Calcium Binding Proteins and Calcium Function In Health and Disease 2015年6月3日 ナッシュビル (米国テネシー州)

関谷 敬、北島 奈美、瀧川 健司、高木 美貴、佐藤 要、山澤 徳志子、金丸 和典、田中 謙二、廣瀬 謙造、飯野 正光 In vivo fluorescence imaging of the cerebral cortex: techniques and applications 第88回日本薬理学会年会 2015年3月20日 名古屋国際会議場 (愛知県)

北島 奈美、関谷 敬、金丸 和典、田中 謙二、飯野 正光 Astrocytic  $Ca^{2+}$  signals correlate with contraction of cerebral vascular smooth muscle cells 第88回日本薬理学会年会 2015年3月18日 名古屋国際会議場 (愛知県)

関谷 敬、金丸 和典、徐 明、佐藤 要、北島 奈美、吉田 慶太郎、大久保 洋平、佐々木 拓哉、森藤 暁、蓮輪 英毅、三村 将、堀川 一樹、松井 広、永井 健治、田中 謙二、飯野 正光 In vivo visualization of subtle, transient and local activity of astrocytes 国際シンポジウム VMT2014 2014年12月6日~7日 伊藤国際学術研究センター (東京都)

北島 奈美、関谷 敬、金丸 和典、田中 謙二、飯野 正光、脳血管平滑筋の生体内  $Ca^{2+}$  イメージングによるアストロサイトの脳血流制御機構解析 第24回日本循環薬理学会 2014年12月5日 山形テルサ (山形県)

〔その他〕  
東京大学大学院医学系研究科細胞分子薬理学教室ウェブサイト  
<http://calcium.cmp.m.u-tokyo.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

関谷 敬 (Sekiya Hiroshi)  
東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・助教  
研究者番号: 40511374

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

田中 謙二 (Tanaka Kenji)  
慶應義塾大学・医学部・准教授  
研究者番号: 30329700

### (4) 研究協力者

北島 奈美 (Kitajima Nami)  
東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・学部学生