

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15565

研究課題名(和文)カルシウム感受性蛍光タンパクを用いたスライス及びin vivo脊髄イメージング

研究課題名(英文)Calcium imaging in spinal cord slices and in vivo spinal cord using calcium-sensitive fluorescent protein

研究代表者

紙谷 義孝(Kamiya, Yoshinori)

新潟大学・医歯学総合病院・特任教授

研究者番号：90381491

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は脊髄後角における神経活動を二次元的に測定する目的で、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いて脊髄後角および後根神経節(DRG)にカルシウム感受性蛍光タンパク質を導入することを目的とした。髄腔内に接種したAAVベクターは、投与後1～2週間で、脊髄後角およびDRGにおいて標識タンパクであるTurboRFPを発現させる可能性があることを見出した。しかし、免疫組織学的技術の限界のために、導入遺伝子由来タンパクが脊髄後角およびDRGにおいて確実に発現されたという確認は困難だった。そのため、その先に計画した生理学的実験の結論は明らかにできなかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to introduce calcium-sensitive fluorescent protein into the spinal dorsal horn and/or dorsal root ganglia (DRG) using adeno-associated virus vector (AAV) to measure the neural activity in the spinal dorsal horn two-dimensionally. We found that the AAV vector inoculated intrathecal cavity seemed to express TurboRFP, which is a marker protein, both in the spinal cord dorsal horn and DRG 1 to 2 weeks after administration. However, due to limitations of immunohistological techniques, we could not be confirmed that the transgene-derived protein was definitely expressed in spinal dorsal horn and DRG. Therefore, it did not reach the result of the physiological experiment that was planned ahead.

研究分野：麻酔科学、神経科学

キーワード：カルシウムイメージング 遺伝子導入 疼痛メカニズム 脊髄後角 一次知覚神経

1. 研究開始当初の背景

末梢組織の炎症や傷害、また神経障害に伴う疼痛においては、一次知覚神経の中枢への投射先である脊髄後角で神経回路の再構成が生じることが免疫組織学的検討や電気生理学的検討から示唆されている。しかし、組織学的検討では時間分解能の点で、電気生理学的検討では空間分解能の点で問題があった。研究代表者の所属する研究室では、ラット脊髄スライスに対し、カルシウムイメージング法による2次元的な刺激伝達様式を捉えることに成功している(図1)。

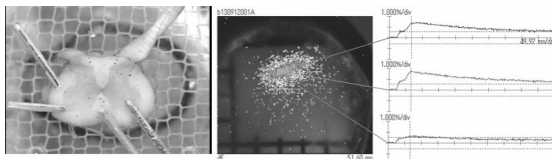


図1 ラット脊髄を用いたCa²⁺ imaging

また、新潟大学脳研究所システム生理学 渋谷らとの共同研究で、マウスの脊髄におけるフラビン蛋白蛍光イメージングによって、生きた状態でのマウス後肢に対する刺激に反応する脊髄分節の検出に成功している(図2)。

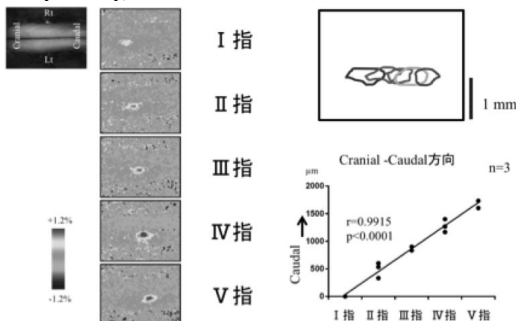


図2: フラビン蛋白蛍光イメージング法による脊髄分節の検出

しかし、脊髄後角における刺激の伝播様式の解明には、より空間分解能に優れた実験手法が必要である。

近年、ウイルスベクターを用いた神経細胞への遺伝子導入法が長足の進歩を遂げており、ウイルスの種類や血清型を変えることで、特定の神経細胞集団にのみ遺伝子を導入することが可能になっている。さらに、Green Fluorescent Protein (GFP) を皮切りとする蛍光発色タンパクの改良により、細胞内カルシウム濃度の変化に応じて蛍光を発するタンパク(カルシウム感受性蛍光タンパク)が開発され、細胞~生体レベルに至る神経活動のリアルタイムの計測が可能となっている。しかし、特にラットの脊髄においてカルシウム感受性蛍光タンパクを用いたカルシウムイメージング法は今まで行われていない。

2. 研究の目的

本研究では、炎症または末梢神経障害に伴う一次知覚神経の脊髄後角での神経伝達の変化を、高い空間的・時間的分解能を持って測定することを目標とする。そのために、カルシウム感受性蛍光タンパク(GCaMP6f, 6s)を細胞傷害性のないアデノ随伴ウイルス(AAV)を用いて一次知覚神経(後根神経節: DRG)細胞に発現させ、脊髄スライス(ラット)及び in vivo 脊髄標本(マウス)を用いた脊髄後角でのカルシウムイメージングを行う。これらの結果を、すでに一部取得している脊髄後角の2次ニューロンの活動の変化(図1,2)と比較し、脊髄における刺激伝播の変化の首座を(一次知覚神経か、二次知覚神経(または介在ニューロン)か)を明らかにする。

本研究はウイルスベクターを用いて、一次知覚神経といった細胞集団にカルシウム感受性タンパクを発現させ、in vitro, in vivoの2つの手法を用いてカルシウムイメージングを行うことを最終的な目的とした。国内の研究施設において、スライス脊髄標本を用いたカルシウムイメージングと in vivo 脊髄後角の生体イメージングの2つを同時に成功している研究室は当研究室以外にないため、我々の研究施設の特徴を最大限に活かせると考えた。本研究が成功することにより、ウイルスベクターを用いた一次知覚神経への遺伝子導入法が確立すると同時に、スライス標本を用いたパッチクランプ方や in vivo パッチクランプ法といった今までの生理学実験手法よりも空間的・時間的分解能に優れた、脊髄での刺激伝播様式を捉えられると考えた。

3. 研究の方法

AAVベクターを用いて一次知覚神経特異的に遺伝子導入を行う技術の確立

DRG細胞および脊髄後角神経細胞への遺伝子導入効率の検討を行う AAVベクター

(AAV5.CMV.TurboRFP.WPRE.rBG: AV-5-PV2177)ならびにカルシウム感受性蛍光タンパクをコードする AAVベクター

(AAV5.Syn.GCaMP6f.WPRE.SV40: AV-5-PV2822 及び AAV5.CAG.GCaMP6s.WPRE.SV40: AV-5-PV2833)は、ペンシルベニア大学 Vector Core Facility から購入した。

まず、AAV-5ベクターによる DRG への遺伝子導入効率の検討を行うため、赤色蛍光タンパク(TurboRFP)を組み込んだ AAV-5ベクター(AAV5.CMV.TurboRFP.WPRE.rBG)を用いて DRG への遺伝子導入を行い、組織学的検討を行った。

8週齢以上の C57BL/6 マウスを用い、イソフルラン(2~3%)を用いた全身麻酔を行

った上で、30G針を用いて皮膚より直接脊髄くも膜下腔に5 μ L (5.0¹⁰ viral vector genomes)を注入した。ウイルスを接種されたマウスは麻酔から回復させ、接種後1, 2, 3週間後に遺伝子の発現を(免疫)組織学的方法により確認した。

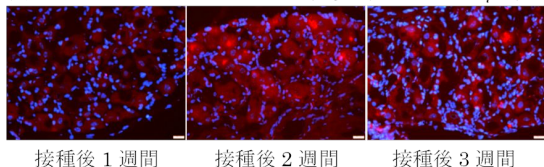
接種後1, 2, 3週間後のマウスをペントバルビタールによる深麻酔下に4%パラホルムアルデヒドを用いて経心臓的に灌流固定し、脊髄ならびにDRGを摘出、凍脊髄は10 μ m, DRGは5 μ mのスライス切片を作製、蛍光顕微鏡を用いて、ウイルスベクター接種後、どのタイミングでTurboRFPの発現が最強となるのか、DRGニューロンの健全性は保たれているのかを検討した。また、このベクターは蛍光色素が標識されているため、スライドガラスに貼付した組織切片は、バッファーで洗った後、DAPI入りの包埋剤を使用し観察した。

4. 研究成果

AAVベクターを用いた後根神経節および脊髄後角への遺伝子導入法の確立

脊髄くも膜下腔内に接種したAAVベクターにより、接種後2週間でDRGでのTurboRFPタンパクの発現が最大になることが示唆された(図3)。

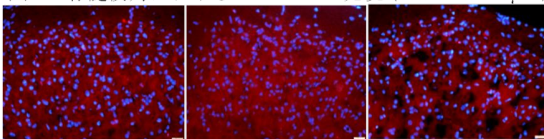
図3 DRGにおけるTurboRFP発現 (scale bar 20 μ m)



接種後1週間 接種後2週間 接種後3週間

また、脊髄後角では投与1週間後に多いようだが、2週間後・3週間後とあまり変化はないように思われた(図4)。

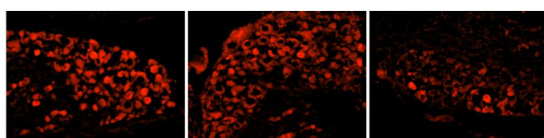
図4 脊髄後角におけるTurboRFP発現 (scale bar 20 μ m)



接種1週間後 接種2週間後 接種3週間後

しかし、使用したAAVベクターが導入する蛍光タンパク(TurboRFP)の蛍光が予想より弱かったことから、確認のためにTurboRFPを認識する抗体(anti-RFP)を1次抗体として用いる免疫組織学的手法によりTurboRFPの発現を確認した(図5)。

図5 DRGにおけるTurboRFPに対する免疫組織学的検出



接種1週間後 接種2週間後 接種3週間後

DRGではAAV投与後1週間後のDRGでRFP陽性細胞の数が多いように思われた。しかし、これはTurboRFPそのものの蛍光を検出した際の、2週間後がピークと思われた結果とは異なった結果となった。また、ネガティブコントロールとして使用したNaiveのDRG切片においても同様に染色した結果、わずかにanti-RFP陽性細胞の染色がみられた。(anti-RFP 1:400, Rhodamin 1:1000)

脊髄後角でのRFPタンパクに対する免疫染色については、Naiveの脊髄でのバックグラウンドが高かったため、切片を洗浄するバッファーやブロッキング剤をいくつか変更し検討を行っているが、思ったような染色像は得られなかった。

脊髄後角におけるin vivoイメージング法

AAVベクターを用いたDRGおよび脊髄後角における遺伝子導入法の確率と同時に、in vivoマウス脊髄標本を用いた脊髄後角のイメージング法の確立を行った。我々はフラビン蛋白蛍光イメージング法を用いた大脳一次知覚野および脊髄後角における神経活動の計測に成功しているが、それは大学院生が在籍していた新潟大学脳研究所システム脳生理学分野においてなされたものである。カルシウム感受性蛋白であるGCaMPを用いたカルシウムイメージングはフラビン蛋白蛍光イメージング法を行う際のセットアップで行うことができ、かつ蛍光強度がフラビン蛋白の蛍光強度に比べ遥かに強いいため、よりシグナルノイズ比が良い記録が可能であることがわかっている。AAVベクターを用いたDRG、脊髄後角における遺伝子導入法を確立することと並行して、当教室におけるin vivo脊髄後角イメージングのセットアップを行った。

基本的に新潟大学脳研究所システム脳生理学分野のセットアップをそのまま移植するだけだったのだが、解析ソフトが浜松ホトニクス社製のAquaCOSMOSからMolecular Devise社製のMetaMorphに変更したため、設定の最適化に時間を要したが、最終的には足底へのブラシ振動刺激に対するマウス脊髄後角でのフラビン蛋白蛍光イメージングに成功した。

具体的には、マウスをウレタンの腹腔内投与によって麻酔を行う。T13、L1の椎弓を切除し脊髄背面を露出する。硬膜は正常のままとして脊髄固定具(STS-A; Narishige)を用いて椎体を固定する。脊髄表面には2%アガロースを塗布し、呼吸性変動を抑制する。青色励起光(450-490nm)を脊髄表面に照射し、そこから放射される緑色自家蛍光(500-550nm)を冷却CCDカメラにより撮影する。1秒当たり9フレームの頻度で撮影する。50秒毎に繰り返して得られた画像データを30回施行分加算平均した後、5 \times 5マトリックスフィルターで平滑化して画質を向上させる。刺激直前の5

フレームの蛍光強度変化($\Delta F/F$)を算出する。足底刺激は刺激用のブラシを 50Hz、0.6 秒振動させることによって行った(図 6)。

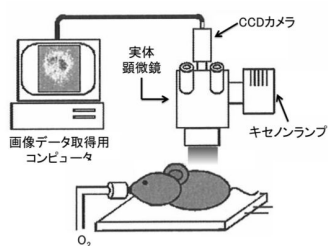


図6 蛍光イメージングの実験セット

後肢へのブラシ刺激に応じて刺激と同側の脊髄後角に 0.4 秒程度の潜時で 0.5 秒間程度のフラビン蛋白の蛍光強度の増強が認められた(図 7)。

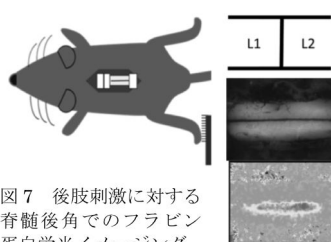


図7 後肢刺激に対する脊髄後角でのフラビン蛋白蛍光イメージング

AAV ベクターによるタンパク導入におおよそその目処が立ったことから、今後は GCaMP タンパクを DRG および脊髄後角に遺伝子導入したマウスを用いて、足底へのブラシ刺激に対する *in vivo* カルシウムイメージングを行っていく予定である。

脊髄スライス標本を用いた *in vitro* カルシウムイメージング法

脊髄スライス標本を用いたカルシウムイメージングにおいては、実験機器のセットアップをしていた実験室が閉鎖となり、他の実験室にセットアップを移植したが、実験室の湿度環境が大きく異なり、イメージング機器が結露するなどしたため、トラブルシューティングに終始し、再現性が取れていない状況である。本セットアップの再構築には時間がかかると考えられるため、*in vivo* マウス脊髄標本を用いた研究を優先させて行う予定とする。

本研究において、DRG および脊髄後角に AAV ベクターを用いた遺伝子導入によるタンパク発現の可能性は見いだせたものの、免疫組織学的検討での確証を得られるには至らなかった。そのため、生理学的イメージング(スライス標本およびマウスを用いた *in vivo* 脊髄標本におけるカルシウムイメージング)に関しては研究期間内で結果を出すことができなかつた。これらについては、研究協力者と連携しつつ、今後も継続して検討していく。

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 0 件)

[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

紙谷 義孝 (KAMIYA, Yoshinori)
新潟大学・医歯学総合病院・特任教授
研究者番号: 90381491

(2) 研究分担者

馬場 洋 (BABA, Hiroshi)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号: 00262436

渡部 達範 (WATANABE, Tatsunori)
新潟大学・医歯学総合病院・助教
研究者番号: 30748330

(3) 連携研究者

渋木 克栄 (SHIBUKI, Katsuei)
新潟大学・脳研究所・教授
研究者番号: 40146163

竹林 浩秀 (TAKEBAYASHI, Hirohide)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号: 60353439

(4) 研究協力者

佐々木 美佳 (SASAKI, Mika)