

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21897

研究課題名（和文）癌組織等の末梢神経線維終末動態の生動物 2 光子イメージング・MEMS神経マシン解析

研究課題名（英文）A development of two-photon peripheral neuroimaging and neural recording in tissue

研究代表者

神谷 厚範（Kamiya, Atsunori）

岡山大学・医歯薬学域・教授

研究者番号：30324370

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000 円

研究成果の概要（和文）：自律神経は、脳と全身の臓器（内臓、器官）をつなぐケーブルであり、脳から個々の臓器へ向かって命令信号を電気信号として送って、臓器機能を調節します。本研究では、従来の方法では計測困難であった、自律神経の個々の線維の動態や、組織内部における神経の動態を理解するための神経計測技術を開発したり、神経を可視化解析することに挑戦したところ、自律神経を細胞レベルで捉えたり、目で見る事が出来ました。また、がんにも自律神経が分布する様子を観察しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自律神経系は、曖昧に捉えられがちですが、本研究では、自律神経系を、個々の神経細胞レベルで、自律神経を実体のあるものとして捉えました。自律神経系は、健康や生命を維持する役割を担い、病態とも深く関わります。従って、本研究で開発した、自律神経線維の活動を解析する方法は、健康を支える自律神経の働きをより深く理解したり、様々な病気の仕組み（病態生理）を解明する上においても、役に立つように期待されます。

研究成果の概要（英文）：The autonomic nerves are cables, that connect the brain with organs. They transmit command signals to individual organs and regulate their functions. In the present study, we have developed a new method to record individual nerve fiber activities and visualize neural dynamics in organs, and actually observed cellular-level autonomic neural structure and dynamics, which is difficult to be measured by existing methods. In addition, we also observed autonomic nerve innervations into cancer microenvironment.

研究分野：生体医工学

キーワード：自律神経

## 1. 研究開始当初の背景

人体は機能の異なる多数の臓器によって構成されており、この多数の多様な臓器が機能的に連関することによって初めて、個体レベルの機能を発揮することが出来る。自律神経系は、全身の臓器に分布し、身体各所の生体情報を感知して脳に送り（神経求心路）、各臓器の機能を調節して（神経遠心路）、多数の多様な臓器を機能的に連関させ、個体レベルの生体恒常性や生命を維持する要のひとつである。自律神経系は、閉ループのフィードバック制御系として動作する。例えば、循環調節においては、身体局所の動脈（頸動脈、大動脈弓など左右で4か所）に圧反射求心性神経が分布し、圧受容器（圧センサー）として、圧を機械的刺激（メカノ刺激）として感知する。圧反射求心性神経は、感知した圧情報、圧受容器求心性神経の電気的信号として、脳に伝達し入力する。脳は、その圧情報を受けて、他の生体情報等と併せて統合的に情報処理し、その瞬間的な状況において最適（と考えられるよう）な各臓器への命令信号を計算し、その命令信号を自律神経（交感神経と副交感神経）の電気信号として出力し、循環器系の各臓器（心臓、腎臓、血管等）に伝達する。すると、循環器系の臓器（心臓、腎臓、血管等）は、その命令信号に対して応答し、臓器機能を変化させる。例えば、交感神経が増加すると、心臓は心拍数を増して、心ポンプ機能を高める。腎臓は、レニンを分泌し、尿量を減らして体液量を増やす。血管は収縮して、血管抵抗を増やす。これらの末梢臓器の応答によって、体血圧が決定される。そして、その体血圧が、再び、局所動脈に位置する圧受容器（圧センサー）で感知されて、さらに、圧情報 - 圧受容器求心性神経活動（求心性） - 脳の統合的情報処理 - 自律神経活動（交感神経と副交感神経、遠心性） - 循環器系臓器（心臓、腎臓、血管等）の応答 - 体血圧 - 体血圧の感知へと、連綿と続く、閉ループのフィードバック制御系が働き続ける。

ところが、自律神経系の神経線維の活動を計測することは容易ではない。自律神経を含む末梢神経は、神経鞘に覆われており、その鞘の内側に、多数の多種多様な神経線維を含む。1本の神経は、複数の臓器に分布する、複数の種類（交感・迷走・求心性等）の神経線維を、その内部に含むような、神経線維の束である。このため、神経に巻き付けるような形状の汎用のワイヤ電極等を装着・使用すると、神経の鞘の内側に存在する多数の多様な神経線維に由来する、電気活動の総和のような活動が記録されてしまうのであって、特定の臓器に分布する特定の種類の神経活動（例、交感神経活動）を記録することは、一部の例外を除いて、出来ない（困難）と言える。この一部の例外とは、例えば、腎臓神経の場合、神経の鞘の内部に存在する神経線維の大半が交感神経線維であるために、神経の全体にワイヤ電極等を装着しても交感神経活動と見なせる活動を記録できたり、また、電極を装着した部分の末梢側で神経を切断することにより、一部存在する求心性活動を消失させることによって、交感神経活動を記録できたりすることである。しかしながら、全身の末梢神経の多くは、神経鞘内部に多数の多様な神経線維（複数の臓器に分布、複数の種類の神経線維）を含むため、神経にワイヤ電極を装着するような方法では、特定の臓器に分布する特定の神経種の活動を記録することは、交感神経活動の記録においても、大変に困難である。また、副交感神経活動の記録は、交感神経の記録よりも、さらに困難である。このように、従来の神経活動の電気的な計測方法は、神経束の全体記録等であるため、神経線維の個々の活動を計測することは難しい。

またさらに、上記のような従来法による神経の記録は、神経軸索に電極を装着させるため、臓器の外部における記録であって、臓器の内部における記録ではない。また、他の方法として、自律神経を体外で培養し、その活動を記録する方法があるが、これは培養細胞における記録であって、生きた動物体内の臓器の内部における記録ではない。このため、自律神経が、その分布する臓器や組織の内部において、実際にどのように活動するのか、どのように細胞機能を調節するのかは、計測技術の未発達のために、ほとんど理解されていないとも言えよう。また、自律神経が臓器や組織の内部においてどのように分布し局在しているかについても、十分には理解されてはいない。

自律神経系は、健康時においては、生体恒常性や生命を維持する役割を担うため、病態とも深く関わっている。従って、各臓器に分布する自律神経の線維活動動態を理解することは、病態生理を解明する上においても、重要な課題である。

## 2. 研究の目的

本研究は、自律神経の個々の線維の動態や、組織内部における神経の動態を理解するための神経計測技術を開発したり、神経を可視化解析することに挑戦することを目的とした。

### 3. 研究の方法

生動物 2 光子神経イメージングや MEMS 神経マイクロマシンなどの医工学融合の技術を使用・開発・改良して、末梢の自律神経を線維別に計測したり可視化したりすることに取り組んだ。

### 4. 研究成果

試作した世界最小ピッチタングステン微小電極針アレイによる MEMS 神経マイクロマシンを用いて、神経内の神経線維個々の電気活動を記録した。末梢神経は、複数の臓器に分布する、複数の神経種（交感・迷走・求心性等）の線維から成る線維の束である。従来の神経計測方法は、神経束の全体記録等であるため、神経線維の個々の活動は分かり得ない。しかし、この従来法では極めて計測が困難な、胸腹部臓器の一部に分布する末梢神経活動を記録した。

また、従来の自律神経の計測は、電気的な計測であるため、臓器の外部における記録や、体外に取り出した培養細胞としての記録に留まっており、自律神経が分布する組織の内部において、神経が、実際にどのように活動するのか、計測技術の未発達のために、ほとんど理解されていない。そこで、従来の電気的な計測ではなく、光学的なイメージングによって、組織内部の神経活動を記録する技術の開発に取り組んだ。まず、自律神経 Ca 活動が光るマウス（交感神経の活動が緑色に光るマウス TH-CreER/GCaMP6fflox, 迷走神経の活動が緑色に光るラット ChAT-Cre/GCaMP6fflox）を作成した。また、別途、交感神経に特異的に蛍光タンパクを発現させたマウス、交感神経に特異的に蛍光タンパクを発現させたマウスも作成した。この蛍光タンパクを発現させたマウスの、免疫組織化学的な解析を行い、自律神経を細胞レベル、神経線維レベルで顕微鏡下にイメージングすることが出来た。これにより、曖昧に捉えられがちな自律神経を、実体のある個々の細胞として捉えることが出来た。さらに、これら動物に麻酔をかけた上で、生きたままの状態、組織内部を 2 光子顕微鏡で観察し、組織内部の神経の動態をリアルタイムに計測することが出来た。また、正常組織だけでなく、がん組織にも自律神経が分布することを観察した。このがん組織に分布する交感神経の活動は、がんの増大や転移などにも影響するなど、がん病態に深く関わる可能性がある。

このようにして、生動物 2 光子神経イメージングなどの医工学融合の技術を使用・開発・改良して、末梢の自律神経を線維別に計測したり可視化したりすることが出来た。この技術は、おそらく世界でも稀（あるいは唯一）であろうと思われ、今後、自律神経の理解に資すると期待される。自律神経系は、生体恒常性や生命を維持する役割を担うため、各種の難治性疾患の病態に深く関わっている。従って、本技術は、様々な疾患において、自律神経動態やその異常を理解したり、病態生理を解明する上においても役立つように期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Uneda Atsuhito, Kurozumi Kazuhiko, Fujimura Atsushi, Fujii Kentaro, Ishida Joji, Shimazu Yosuke, Otani Yoshihiro, Tomita Yusuke, Hattori Yasuhiko, Matsumoto Yuji, Tsuboi Nobushige, Makino Keigo, Hirano Shuichiro, Kamiya Atsunori, Date Isao	4. 巻 9
2. 論文標題 Differentiated glioblastoma cells accelerate tumor progression by shaping the tumor microenvironment via CCN1-mediated macrophage infiltration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Neuropathologica Communications	6. 最初と最後の頁 29 ~ 29
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40478-021-01124-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Huang Rongsheng, Fujimura Atsushi, Nakata Eiji, Takihira Shota, Inoue Hirofumi, Yoshikawa Soichiro, Hiyama Takeshi, Ozaki Toshifumi, Kamiya Atsunori	4. 巻 557
2. 論文標題 Adrenergic signaling promotes the expansion of cancer stem-like cells of malignant peripheral nerve sheath tumors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 199 ~ 205
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.03.172	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------