

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：12612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25750400

研究課題名(和文) 成長過程における神経・グリア・血管の連携メカニズムの獲得とその神経修飾作用の解明

研究課題名(英文) Understanding the neurovascular coupling mechanisms and its neural effects

研究代表者

正本 和人 (MASAMOTO, KAZUTO)

電気通信大学・情報理工学(系)研究科・准教授

研究者番号：60455384

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：蛍光標識を施したグルコースの誘導体2-NBDGを用いて血中から脳組織への輸送現象を定量化するための画像解析法について検討した。まず、血管内、血管壁、組織の各領域における2-NBDGの濃度変化について評価した。次に、グラフ解析の手法を用いて各コンパートメント間における2-NBDGの移行量と蓄積量を求めた。その結果、血中から壁への移行および血中から壁と組織への移行に関しては、動脈と静脈との間で有意な差はみられなかったが、血中から組織への移行に関しては静脈よりも動脈の方が有意に大きい結果が得られた。さらに麻酔下と覚醒下で比較した結果、麻酔下では輸送担体を介さない移行経路が主要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We developed an in vivo imaging method for glucose transportation from blood circulation to brain cells using fluorescent glucose analogue and two-photon microscopy in the awake and anesthetized rodents. The fluorescent glucose was intravenously injected to the animals, while the three-dimensional fluorescent images of the brain cells and vasculatures were captured up to depths of 0.3 mm in the cortex. We found that the fluorescent glucose was slowly transferred to the tissue, and this transportation pathway differs between the awake and anesthetized animals. Our results indicate that the isoflurane anesthesia may open the blood-brain barrier, which enhance the tissue leakage of the intravenously-injected fluorescent glucose.

研究分野：脳計測科学

キーワード：神経血管連関 グリア 蛍光グルコース誘導体 レーザースペックル血流計

1. 研究開始当初の背景

脳は神経・グリア・血管の多彩な細胞群のネットワークによって構成されている。そして、細胞間の連携によって脳内の恒常性が維持されている。例えば、神経細胞の発火に対しグリア・血管が連携し、活性部位の血流が上昇する (for review: Attwell Nature 2010)。この血流上昇には何らかの機能的役割があると考えられているが、血流上昇の神経学的な意義については明らかにされていない。

従来、脳活動に伴う脳血流の上昇は神経活動によって要求されるエネルギー需要を満たすために必要であると考えられていた。しかし、神経活動によって亢進するエネルギーの需要は、必ずしも血流の増加を必要としない程度の上昇率であることが明らかになり、脳血流の上昇がエネルギー需要を満たすために必要であるという仮説は否定された (Mintun et al., PNAS 2001)。

一方で、認知症や筋委縮性側索硬化症などの神経変性疾患に関する最近の知見では、神経障害の発症前にグリア及び血管に障害が惹起されることが明らかにされている (Zlokovic, 2008; Zacchigna et al., 2008)。これらの知見は、神経・グリア・血管の連携による脳血流の上昇には、神経の可塑性に必要な成長因子の供給や細胞環境などを介した神経修飾メカニズムがある事を示唆する。

2. 研究の目的

本研究では、『脳活動時の血流上昇は、神経の可塑性を促進する神経修飾メカニズムを有する』という仮説を検証する目的で研究を開始した。

3. 研究の方法

実験には、遺伝子導入技術によって細胞特異的に蛍光タンパクを発現させた 2 種類の遺伝子改変マウス (Tie2-GFP: 血管内皮細胞に緑色蛍光タンパク GFP を発現、及び GCaMP3: 神経細胞にカルシウム感受性蛍光タンパクを発現) を用いた。生後 7 週齢以降の遺伝子改変マウスに慢性頭窓法 (Tomita et al., JCBFM 2005) を施し、「神経・グリア・血管」の 3 次元形態の経時的な変化を二光子顕微鏡 (SP5-MP, Leica Microsystems) を用いて計測した。また観察対象と反対側のマウスのほぼ髭に機械刺激を与え、神経活動に対する血流上昇を誘発した。さらに、薬理学的手法を用いて脳賦活に対する血流増強の阻害実験を行った。

4. 研究成果

成長に伴うエネルギー代謝の変化を計測するための画像化手法を確立するため、まず実験動物および画像解析の手法を用いた。実験には、蛍光標識を施したグルコースの誘導体 (2-NBDG, ペプチド研究所) をマウスの尾静脈

より投与し、脳組織および脳血管での蛍光輝度の変化を二光子顕微鏡を用いたタイムラプスイメージングによって評価した (図 1)。

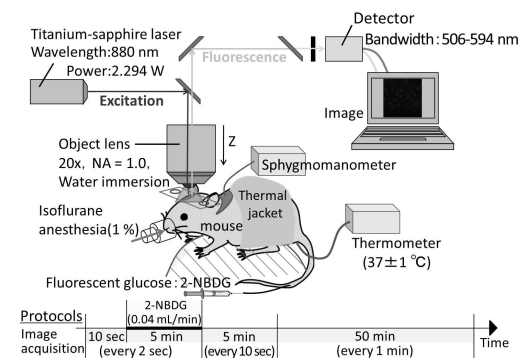


図 1 蛍光グルコース誘導体 (2-NBDG) の投与によるマウス大脳での二光子顕微鏡イメージング (励起波長 880 nm) と撮像プロトコル

2-NBDG (2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-D-glucose) は、デオキシグルコースの第 2 位に蛍光基ニトロベンゾジアゾール基 (NBD 基) を付加したグルコースの誘導体である。分子量は 342.26 とグルコースの分子量 180.16 よりも大きい。グルコース輸送タンパクと結合し細胞内に取り込まれ、また細胞内ではリン酸化されることなどが先行研究によって確認されている (Yoshioka et al., 1996)。

まず、血管内、血管壁、組織領域を画像上で特定し、それぞれの領域における 2-NBDG の濃度変化について計測した (図 2)。ここで計測された画像輝度データを蛍光グルコースの濃度値に換算するため、あらかじめマウス組織を模擬したファントムモデルにおいて蛍光輝度-濃度に関する校正曲線を作成し、計測された蛍光輝度を校正曲線に従い蛍光標識グルコース誘導体の濃度に換算した。

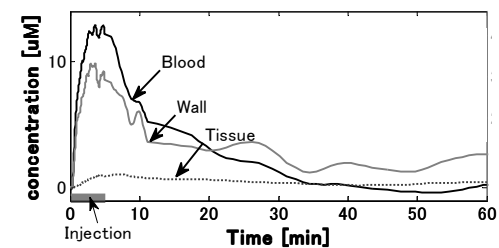


図 2 蛍光グルコース誘導体 (2 mM, 0.2 mL) をマウスの尾静脈より 5 分間投与した際のマウス大脳における血中 (Blood)、血管壁 (Wall)、組織 (Tissue) での濃度時間変化

次に、コンパートメント解析の簡便法のひとつである Gjedde-Patlak 法を用いて、血中-血管壁及び血管壁-組織の 2 つのコンパートメント間における 2-NBDG の移行量と蓄積量に関して評価を行った。

その結果、血中から壁への移行および血中から壁と組織への移行に関しては、動脈と静脈との間で有意な差はみられなかった。一方、血中から組織への移行に関しては、静脈よりも動脈の方が有意に大きい結果となった。この結果は、動脈と静脈における血管の運動や拍動の違いによると考えられる。そこで撮像中の血管径の変化率を計算したところ、動脈(n=12)においては血管径の変化率が $17 \pm 11\%$ 、静脈(n=10)においては $6.9 \pm 2.6\%$ であった。このことから、動脈では血管径の変化による対流拡散の促進で組織への輸送効率が向上したと考えられる。

さらに、動物の状態による影響について検討するため、麻酔下(イソフルラン1%)と覚醒下での比較を行った。その結果、麻酔下ではグルコース輸送担体を介さない移行経路が主要な輸送経路であることが示唆される結果がえられた。この結果は、輸送量と動物の血中グルコース濃度との間に有意な相関が認められなかったことにも裏付けられる。最後に、蛍光標識グルコースの輸送に関してシミュレーションモデルを用いた数値解析を行った結果、測定された蛍光薬剤の濃度変化が蛍光標識グルコースの分子量に基づいて見積もられた脳組織での拡散係数とよく一致する結果が得られた。

次に血行動態を観察するために 2-NBDG (2 mM in saline) をマウスの尾静脈から繰り返し投与し、脳表血管での蛍光試薬の通過時間について解析した。本実験ではより広い領域を観察するため、5 倍の対物レンズを用いて計測した。撮像開始から 15 秒後に蛍光試薬 20 μL をシリンジポンプを用いて 3.3 mL/s の速度で投与し、10 秒毎に 5 回計 100 μL 投与した。1 画像のサンプリングレートは 20.4-76.9Hz (49-13 ms/frame)とした。

画像内のピクセル毎に蛍光輝度-時間曲線を求め、任意の時間範囲における輝度時間曲線の重心時刻を求めた。つぎに画像内に基準位置を設定し注目ピクセルまでの距離と重心時刻の差を求めた。これを基準位置から注目ピクセルまでの蛍光試薬の移動にかかる距離 ΔL と移動時間 ΔT と定めて、 $\Delta L/\Delta T$ を基準位置から注目ピクセルまでの平均血流速度として算出した。血管内の各領域に対して同様の処理を施し、血管内の平均速度の分布を画像化した(図3)。得られた血流速度は、 $7.2 \pm 1.8 \text{ mm/s}$ であった。

先行研究ではマウスの脳血流速度は血管径 10~60 μm の動脈において 5~18 mm/s、静脈において 1~5 mm/s と報告されている(Santisakultarm et al., 2012)。したがって、本研究で求めた血流速度は、動脈血管の血流速度に関する従来報告の値の範囲内であった。したがって本手法によって多数の血管における血流速度分布に関する画像化が可能であると考えられる。

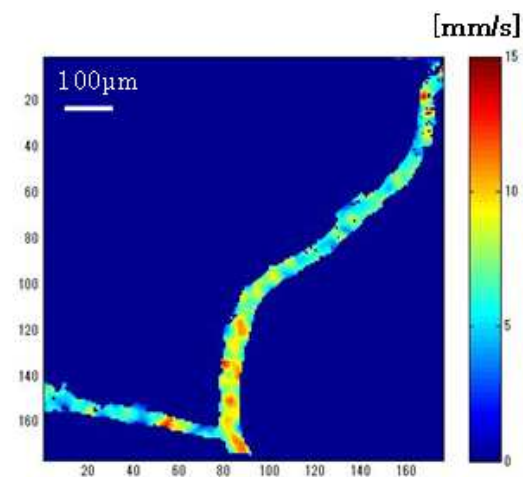


図3 マウス大脳における血流速度の分布

最後に脳賦活時の血流反応を抑制するための薬理実験を行った。本実験では、特定の細胞を賦活するために光感受性タンパクであるチャンネルロドプシンを遺伝子組み換えで導入したマウス(Tanaka et al., 2012)を用いた。チャンネルロドプシンへの光刺激に対する脳血流の反応はレーザースペックル法を用いて評価した(図4)。

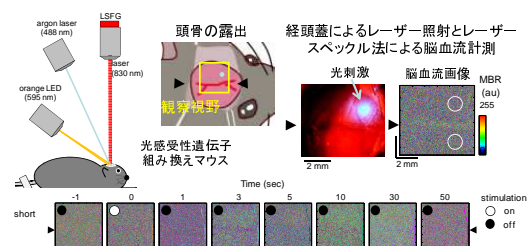


図4 光感受性チャンネルタンパク質を導入したマウスにおける脳血流反応の計測実験

光刺激によるチャンネルの開閉によって細胞の膜電位が変化する。このとき、光刺激部位において脳血流の有意な上昇が認められた(Masamoto et al., in press)。さらにこの脳血流の反応は塩化バリウム (0.1 mM) によって抑制されたことから、チャンネルの開口による細胞からのカリウムイオンによる伝達で血管が拡張したことが示唆された。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計5件)

1. Masamoto K, Unekawa M, Watanabe T, Toriumi H, Takuwa H, Kawaguchi H, Kanno I, Matsui K, Tanaka KF, Tomita Y, Suzuki N: Unveiling astrocytic control of cerebral blood flow with optogenetics. Sci Rep (in press) 査読有
2. Murata R, Takada Y, Takuwa H, Kawaguchi H, Ito H, Kanno I, Tottori N, Yamada Y, Tomita Y, Itoh Y, Suzuki N, Yamada K, Masamoto K. Vessel specific imaging of glucose transfer with fluorescent glucose analogue in anesthetized mouse cortex. Adv

Exp Med Biol 812:241-246 (2014) 査読有
3. Sugashi T, Yoshihara K, Kawaguchi H, Takuwa H, Ito H, Kanno I, Yamada Y, Masamoto K. Automated image analysis for diameters and branching points of cerebral penetrating arteries and veins captured with two-photon microscopy. Adv Exp Med Biol 812:209-215 (2014) 査読有
4. Masamoto K, Takuwa H, Ito H, Kanno I: Hypoxia-induced adaptation of cerebral microvasculature. Microvascular Reviews and Communications 6, 13-18 (2014) 査読有
5. Masamoto K, Takuwa H, Seki C, Taniguchi J, Itoh Y, Tomita Y, Toriumi H, Unekawa M, Kawaguchi H, Ito H, Suzuki N, Kanno I. Microvascular sprouting, extension, and creation of new capillary connections with adaptation of the neighboring astrocytes in adult mouse cortex under chronic hypoxia. J Cereb Blood Flow Metab 34(2):325-331. (2014) 査読有

[学会発表] (計 23 件)

[1] 村田 滂, 鈴木秀明, 田桑弘之, 川口拓之, 菅野 巖, 富田 裕, 鈴木則宏, 山田勝也, 正本和人: 蛍光グルコース誘導体を用いたマウス大脳血管壁におけるグルコース輸送に関する生体光イメージング 日本機械学会 第 27 回バイオエンジニアリング講演会 (2015. 01. 10) 朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター (新潟)
[2] 正本和人: 二光子レーザー顕微鏡法による神経血管連関の可視化と光による介入 第 16 回先進レーザー応用技術セミナー「医療・バイオ分野における計測・イメージング技術」(2014. 11. 28) 慶應義塾大学理工学部 矢上キャンパス (横浜)
[3] Masamoto K: In vivo optical imaging of structural and functional plasticity of neurovascular unit. 第 26 回日本脳循環代謝学会総会 -Translational Research の実践- (2014. 11. 21) 岡山コンベンションセンター (岡山)
[4] Hiroaki Maeda, Masahiro Nitta, Takuma Sugashi, Hiroshi Kawaguchi, Hiroyuki Takuwa, Hiroshi Ito, Iwao Kanno, Kazuto Masamoto: Segmented analysis of astrocytic restructuring induced by chronic hypoxia in the adult mouse cortex. Society for Neuroscience (2014. 11. 15) Washington DC, USA
[5] 渡部竜志, 正本和人, 畝川美悠紀, 結城浩弥, 新夕雅啓, 鳥海春樹, 田桑弘之, 川口拓之, 菅野巖, 松井広, 田中謙二, 富田裕, 鈴木則宏: アストロサイト賦活による局所脳血流反応の空間伝播の解析 第 26 回日本脳循環代謝学会総会 -Translational Research の実践- (2014. 11. 21) 岡山コンベンションセンター (岡山)

[6] 正本和人, 畝川美悠紀, 渡部竜志, 結城浩弥, 田桑弘之, 川口拓之, 菅野巖, 松井広, 田中謙二, 富田裕, 鈴木則宏: 光遺伝学による脳血流の操作 レーザー学会第 467 回研究会「ニューロフォトニクス」(2014. 11. 7) 北海道大学北キャンパス創成科学研究棟 (北海道)

[7] 正本和人: 脳血管の metabolic control: 低酸素環境と脳血管のリモデリング. 第 24 回脳血管シンポジウム 脳血管研究 update (2014. 9. 13) 千里ライフサイエンスセンター (大阪)

[8] R. Hosihikawa, T. Sugashi, H. Kawaguchi, H. Takuwa, H. Ito, Y. Tomita, N. Suzuki, I. Kanno, K. Masamoto: Two-dimensional velocity imaging of cortical surface vasculature in the anesthetized mouse exposed to chronic hypoxia. International Society on Oxygen Transport to Tissue (2014. 7. 1) London, UK

[9] K. Masamoto, I. Kanno: Astrocytic adaptation during cerebral angiogenesis follows the new vessel formation induced through chronic hypoxia in adult mouse cortex, Proc. SPIE 8928, Optical Techniques in Neurosurgery, Neuro-photonics, and Optogenetics, (2014. 2. 4) San Francisco, USA

[10] 鳥取直友, 村田 滂, 高田優季, 田桑弘之, 川口拓之, 伊藤 浩, 菅野 巖, 山田幸生, 山田勝也, 正本和人: 蛍光標識グルコースを用いたマウス大脳におけるグルコースの取り込みに関する動態解析. 日本機械学会 第 26 回バイオエンジニアリング講演会 講演論文集 (2014. 1. 11) 東北大学 (宮城)

[11] 星川 椋, 須賀拓馬, 川口拓之, 田桑弘之, 伊藤 浩, 菅野 巖, 正本和人: 蛍光輝度-時間曲線を用いたマウス脳表血管血流速度画像法の開発. 日本機械学会 第 26 回バイオエンジニアリング講演会 講演論文集 (2014. 1. 11) 東北大学 (宮城)

[12] 前田裕昭, 須賀拓馬, 関口優太, 田桑弘之, 川口拓之, 伊藤浩, 菅野巖, 正本和人: 生体二光子顕微鏡法によって撮像したマウス脳アストロサイトに関する形態的特徴量の抽出. 日本機械学会 第 26 回バイオエンジニアリング講演会 講演論文集 (2014. 1. 12) 東北大学 (宮城)

[13] R. Murata, Y. Takada, H. Takuwa, H. Kawaguchi, H. Ito, I. Kanno, N. Tottori, Y. Yamada, Y. Tomita, Y. Itoh, N. Suzuki, K. Yamada, K. Masamoto: Cellular-scale imaging of glucose transfer in cerebral microvasculature with fluorescent glucose analogue in anesthetized mouse cortex. The 41st Annual ISOTT meeting (2013. 6. 24-28) The EPR center of the Geisel School of Medicine at Dartmouth College, Hanover NH (米国)

[14] T. Sugashi, K. Yoshihara, H.

Kawaguchi, H. Takuwa, H. Ito, I. Kanno, Y. Yamada, K. Masamoto: Cortical depth-dependent morphology of cerebral microvasculature revealed with automated image analysis of two-photon microscopic data. The 41st Annual ISOTT meeting (2013.6.24-28) The EPR center of the Geisel School of Medicine at Dartmouth College, Hanover NH (米国)

[15] 正本和人, 安部貴人, 田桑弘之, 鳥海春樹, 富田裕, 畝川美悠紀, 伊藤義彰, 谷口順子, 田島洋佑, 川口拓之, 伊藤浩, 鈴木則宏, 菅野巖: マウス大脳虚血辺縁部における脳微小血管とアストロサイトの時空間展開: 永久閉塞と再灌流モデルでの比較, 第25回日本脳循環代謝学会総会 (2013.11.2) 京王プラザホテル札幌 (北海道)

[16] 渡部竜志, 正本和人, 畝川美悠紀, 鳥海春樹, 谷口順子, 田桑弘之, 川口拓之, 伊藤浩, 菅野巖, 松井広, 田中謙二, 富田裕, 鈴木則宏: Optogeneticsを用いたアストロサイト賦活による脳血流反応, 第25回日本脳循環代謝学会総会 (2013.11.2) 京王プラザホテル札幌 (北海道)

[17] 田桑弘之, 西野明日香, 川口拓之, 正本和人, 松浦哲也, 菅野巖, 伊藤浩: 覚醒マウス脳表における神経活動および脳血流変化の同時計測システムの構築, 第2回ニューロフォトンクス研究会 (2013.11.29) 市ヶ谷 (東京)

[18] 正本和人, 菅野巖: NIRSの基礎となる神経血管カップリング: 脳活動時の酸素ダイナミクスと血管反応【特別講演】, 第20回医用近赤外線分光法研究会 (2013.10.12) 東京ステーションコンファレンス (東京)

[19] 正本和人: 脳の神経活動時の微小循環ダイナミクス解析【特別講演】, 第27回呼吸研究会 (2013.9.20) 電気通信大学 (東京)

[20] 正本和人, 菅野巖: Microscopic optical imaging of neurovascular coupling dynamics【オーガナイズドセッション】, 計測自動制御学会ライフエンジニアリング部門シンポジウム「光による脳機能計測」 (2013.9.12) 慶應義塾大学 (神奈川)

[21] 正本和人, 菅野巖: 慢性的な低酸素負荷に対する脳微小血管の可塑性【オーガナイズドセッション】, 酸素ダイナミクス研究会 (2013.8.3) 弘前大学 (青森)

[22] 須賀拓馬, 吉原光一, 前田裕昭, 菅野巖, 伊藤浩, 山田幸生, 正本和人: マウス大脳皮質微小血管に関する二光子顕微鏡画像の半自動定量解析, 酸素ダイナミクス研究会 (2013.8.3) 弘前大学 (青森)

[23] 正本和人, 菅野巖: NIRSの信号原理を支える神経血管カップリング【シンポジウム講演】, 第15回日本ヒト脳機能マッピング学会 (2013.7.5) 東京大学 (東京)

正本 和人 (Masamoto Kazuto)

電気通信大学大学院情報理工学研究科知能機械工学専攻・准教授

研究者番号: 60455384

6. 研究組織

(1) 研究代表者