

平成 30 年 4 月 15 日現在

機関番号：32696

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06720

研究課題名(和文)膜電位イメージングによる胎生期の嗅覚神経回路網の機能発生・構築過程の追跡と展開

研究課題名(英文)Optical analysis of functional development of the olfactory neural circuit in the embryonic brain

研究代表者

佐藤 勝重 (Sato, Katsushige)

駒沢女子大学・人間健康学部・教授

研究者番号：80291342

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)：我々は、膜電位感受性色素と用いた光学的測定法を鶏胚嗅覚系に適用し、嗅球におけるシナプス伝達機能が孵卵6-7日の段階で発現することを示した。嗅神経刺激により嗅球に誘発される後シナプス応答は、孵卵6-8では1相性応答であったが、孵卵9日には多相性となり、末梢側ではoscillationが見られることもあった。個体発生に伴いoscillationの出現頻度と持続時間は次第に増加し、シグナル波形が複雑になった。孵卵12日には、oscillationが1分位続く現象も観察された。Oscillationの周波数は個体発生と共に増加したが、孵卵9-12日の段階ではoscillationの範囲内であった。

研究成果の概要(英文)：We applied optical imaging with a voltage-sensitive dye to the embryonic chick olfactory system and showed that functional synaptic transmission in the olfactory bulb was expressed at the embryonic 6-7-day stage. At the embryonic 6- to 8-day stages, postsynaptic response-related optical signals evoked by olfactory nerve stimulation exhibited a simple monophasic waveform that lasted for a few seconds. At the embryonic 9-day stage, the optical signal became multi-phasic, and the oscillatory event was detected in some preparations. The oscillation was restricted to the distal half of the olfactory bulb. As development proceeded, the incidence and duration of the oscillation gradually increased, and the waveform became complicated. In some cases at the embryonic 12-day stage, the oscillation lasted for nearly a minute. The frequency of the oscillation increased slightly with development, but it remained in the range of theta oscillation during the 9- to 12-day stages.

研究分野：発生神経生理学

キーワード：光学イメージング 膜電位感受性色素 機能発生 機能構築 嗅覚回路網 嗅球 胎生期 鶏胚

1. 研究開始当初の背景

地球上の生物は、多くの危険が渦巻く環境の中で安全に食物を摂取するために、嗅覚や味覚、視覚など様々な感覚機能を駆使し、食物になりうる物質の品質を評価、すなわち、目の前にある物質が摂取可能な物であるか否かを判断している。このような能力は、何も成体に限られた能力ではなく、一般に生物は、生後まもない時期から口に入れたものが自分にとって好ましいものであるか否かを識別する能力を未熟ながら備えている。これは、様々な感覚情報を処理する神経回路網が、出生時にはすでにある程度発達していることを示唆している。では、こうした食物の品質を評価する能力は、個体発生過程でどのようにして形成されるのだろうか？この命題に対する生理学的アプローチは、個体発生期中枢神経系を構成するニューロンが小さく、また機械的にも脆弱であるため、従来の電気生理学的方法を適用することが困難であるという方法論的制約から、まだ十分に進んでいるとは言えないのが現状である。

我々は、これまで、膜電位感受性色素を用いたニューロン電位活動の光学的イメージング法を発生初期胚の中枢神経系に適用し、視神経 (N. II)、三叉神経 (N. V)、内耳神経 (N. VIII)、舌咽神経 (N. IX) および迷走神経 (N. X) を中心に、その神経核を構成するニューロンの電位活動の時間的・空間的パターンを調べ、その発達過程を追跡してきた。この光学的イメージング法は、発生過程にある脆弱で小さいニューロンの電気的活動を、電極を刺入せずに測定できるうえ、標本上の非常に多数の微小分画領域からニューロン活動を同時記録できるという、他の測定法にはない大きな利点を有している。この測定法を駆使して、我々は、発生初期の鶏胚、ラット胎仔、マウス胎仔において、N. II, N. V, N. VIII, N. IX, N. X に関連した感覚核および運動核の領域を三次元的に同定し、その機能的構築過程を明らかにしてきた。

このような一連の研究の中で、次に問題として挙がってきたことは、様々な感覚情報が、どこでどのようにして統合されるのか、それは個体発生過程のどの時期から起こるのか、という命題である。この命題に対する答えを見いだすために、我々は、味覚と嗅覚の情報の統合に着目した。これまでの研究で、我々は味覚に関係する系として、孤束核など胎生期における N. IX, N. X 関連核及び神経回路網の機能発生・構築過程を詳細に解明してきた。一方、嗅覚系の機能形成・構築過程に関する研究については、標本作製や基本的なデータの取得には成功していたが、より詳細な解析が必要とされる状況にあった。

2. 研究の目的

以上述べた背景のもとに、本研究では、個体発生過程、特に胎生期の嗅覚神経回路網に焦点をあて、膜電位感受性色素を用いた神経活動の光学的イメージング法による機能的マッピングと、カーボシアニン系蛍光色素を用いた形態的マッピングとの比較から、(1) 嗅覚神経回路網の機能発生・構築過程のプロファイルを明らかにすることを目的とした。さらにその後の研究の展開を見据え、(2) 嗅覚と味覚の感覚情報の統合処理機構が、個体発生の過程でどのようにして形成されていくのか、という命題について、その解析法の開発と展開を試みた。ここでは、(1) の目的に対する成果について述べることにする。

3. 研究の方法

(1) 実験材料

孵卵 6 日～14 日の鶏胚を用いた。鶏胚は嗅神経の長さがラット/マウス胎仔に比べて長く、電気刺激実験での光学応答の基本的パターンの解析に適していた。麻酔下に鶏胚を取り出し、実体顕微鏡下で嗅神経を付けたままの「嗅神経—嗅球—終脳標本」作製した

(2) 光学計測

a) 膜電位イメージングシステム：測定には、光学的 464ch 同時測定システム (NeuroPDA) および、我々の研究室で独自に作成した、光学的 1020ch 同時測定システムを用い、脳内の 464/1020 ケ所の領域からニューロン電位活動を光学的変化として同時記録した。

b) 膜電位感受性色素による染色法：標本を膜電位感受性色素 0.2mg/ml を含むリンゲル液に 10-20 分間浸し染色した。膜電位感受性色素としては、Merocyanine-rhodanine 系の NK2761 を主に用いた。我々はこれまでの経験から、この NK2761 が embryo の神経系では刺激に対する反応が大きく、褪色が少なく、しかも、毒性が少ないことを確認している (Momose-Sato et al.: J. Memb. Biol. 144, 1995)。

(3) carbocyanine 系蛍光色素を用いた形態学的観察

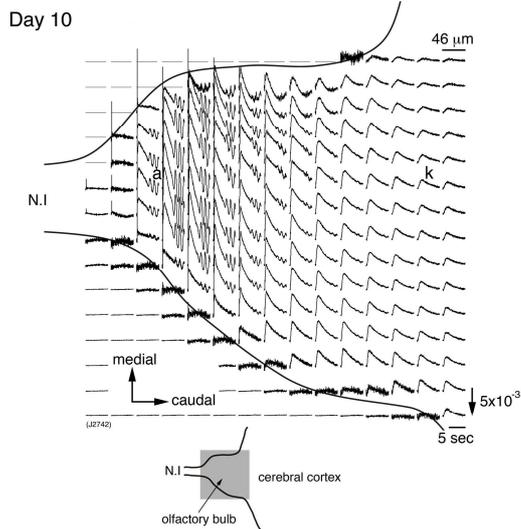
機能マッピングに用いた標本を、paraformaldehyde で固定した後、脳神経に DiI の色素の小結晶を埋め込むか、脳神経に色素を含むアルコール溶液をマイクロピペットで注入した。数日～数週間後にマイクロスライサで切片を作製し、蛍光顕微鏡で検鏡した。

4. 研究成果

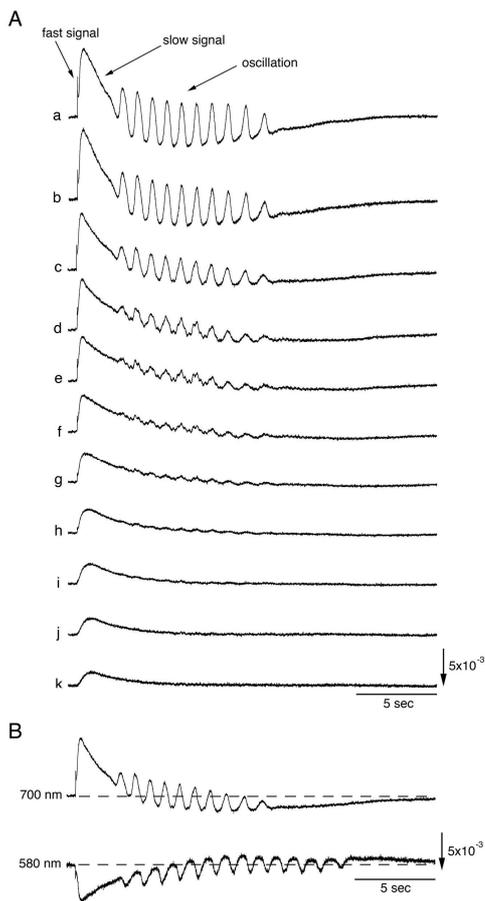
鶏胚「嗅神経—嗅球—終脳標本」を対象とした研究成果のうち、嗅球で記録された Oscillatory activity に関する成果をまとめて述べることにする。

(1) 孵卵 10 日の「嗅神経—嗅球—終脳標本」における oscillation の光学的記録

図 1 は孵卵 10 日の「嗅神経—嗅球—終脳標本」において、吸引電極を用いた嗅神経の電気刺激によって嗅球内に誘発された光学的シグナルを示したものである。記録には 1020ch 光学イメージングシステムを用い、嗅球の部分を抽出して表示した。

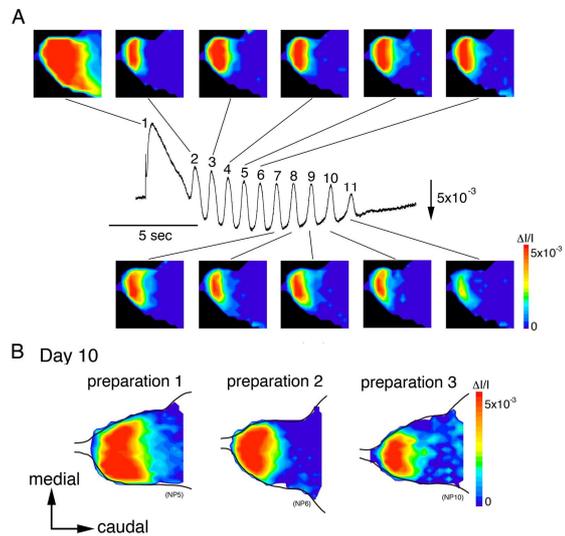


【図 1】 孵卵 10 日の嗅球において、嗅神経の電気刺激によって誘発された光学的シグナル。



【図 2】 図 1 の領域 a~k で記録された光学的シグナルの拡大 (A) と、光学的シグナルの波長依存性 (B)。

図 2 A は、図 1 の a~k の位置で記録された光学シグナルを拡大表示したものである。嗅神経に近い領域から記録された光学的シグナルは、spike 状の fast signal、時間経過の長い slow signal、oscillation の 3 成分からなるシグナルであったのに対して、嗅神経から離れた領域で記録された光学的シグナルには、oscillation は見られなかった。図 2 B に示す様に、fast signal、slow signal、oscillation とともに照射する光の波長 (700 nm、580 nm) によってその極性が反転し、この性質は NK2761 の波長スペクトルと一致した。従って、これら①~③の光学的シグナルは標本の揺れなどによるアーチファクトではなく、神経細胞の電位活動に基づく光学的シグナルであることが示された。



【図 3】 A : 図 1 で示した光学的シグナルの疑似カラー表示。Slow signal (1) と oscillation (2-11) をそれぞれ示した。B : 3 つの異なる孵卵 10 日の嗅球で記録された oscillation の出現領域の疑似カラー表示。

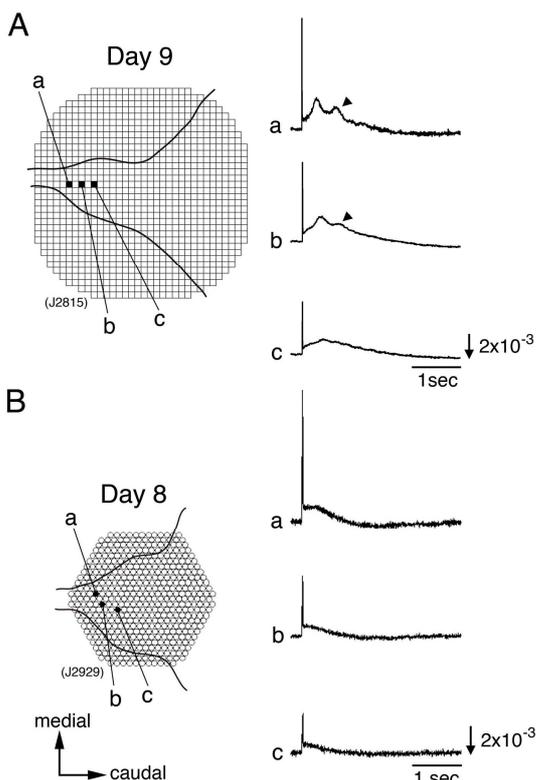
図 3 A は、図 1 に示した光学的シグナルの大きさを疑似カラー表示したものである。Slow signal (1) の出現領域は嗅球全体にわたったが、oscillation (2-11) の出現領域は嗅球の末梢側に限られた。Oscillation の出現領域は、それぞれのサイクルでほぼ一致していた。このような結果は、図 3 B に示す様に、他の孵卵 10 日の標本においても同じであった。

(2) 鶏胚嗅球における oscillation の個体発生の起源

図 4 は、孵卵 9 日 (A) および、8 日 (B) の鶏胚嗅球において、嗅神経刺激によって記録された光学的シグナルのうち、代表的な 3 領域からのシグナルを拡大表示したものである。孵卵 9 日 (A) の標本においては、嗅神経刺激によって slow signal に続いて notch 状のシグナル (矢頭) が誘発された。この notch

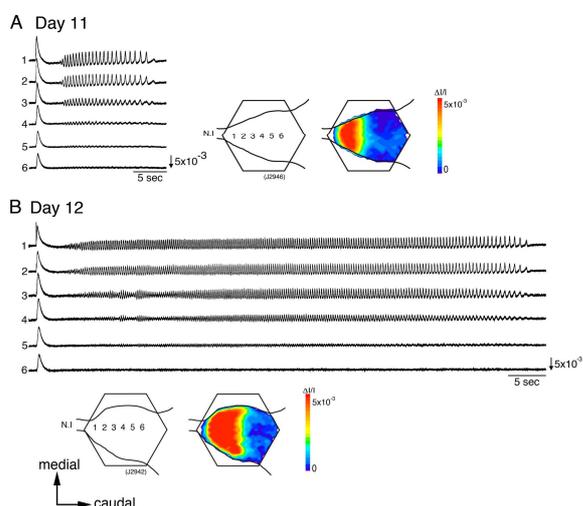
状のシグナルは、嗅球の末梢側に限って観察され、末梢側から中枢側に行くに従って、その大きさが次第に小さくなった。

一方、孵卵 8 日 (B) の標本においては、slow signal のみが誘発され、notch 状のシグナルは観察されなかった。これらの結果から、oscillation の個体発生的起源は孵卵 9 日であることが示された。



【図 4】 孵卵 9 日 (A) および、8 日 (B) の鶏胚嗅球において、嗅神経刺激によって記録された光学的シグナル。それぞれ、左側の図の a, b, c の領域で記録された光学的シグナルを、右側に示した。

(3) 孵卵 11、12 日の鶏胚嗅球で記録された oscillation

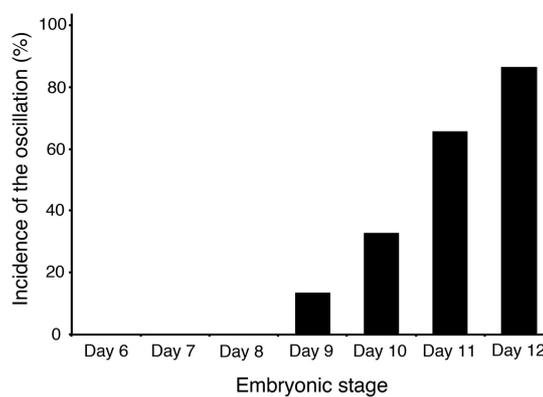


【図 5】 孵卵 11 日 (A) および、12 日 (B) の鶏胚嗅球において、嗅神経刺激によって記録された光学的シグナル。それぞれ 1-6 の 6 力所で記録された光学的シグナルと、oscillation の出現領域の疑似カラー表示を示した。

図 5 は、孵卵 11 日 (A) および、12 日 (B) の鶏胚嗅球において、嗅神経刺激によって記録された光学的シグナルのうち、代表的な 6 領域からのシグナルを拡大表示したものである。孵卵 10 日の鶏胚嗅球 (図 1) と同じように、孵卵 11、12 日の発生段階においても、嗅球の末梢側では oscillation が観察された。孵卵 10 日 (図 1) と比較して、oscillation の数は増加していた。また、孵卵 12 日の発生段階では、oscillation が約 1 分近く連続して記録された。

(4) 鶏胚嗅球で記録された oscillation の特性の個体発生に伴う変化

・ Oscillation の出現率



【図 6】 孵卵 6 ~ 12 日の鶏胚嗅球における oscillation の出現率の変化。

図 6 は、孵卵 6 ~ 12 日の鶏胚嗅球における oscillation の出現率の変化を示したものである。孵卵 6 ~ 8 日の鶏胚嗅球では、oscillation は全く観察されず、孵卵 9 日から観察された。oscillation の出現率は、孵卵 9 日の段階では約 10% であったが、発生に伴い次第に上昇し、孵卵 12 日の発生段階では、約 90% に達していた。

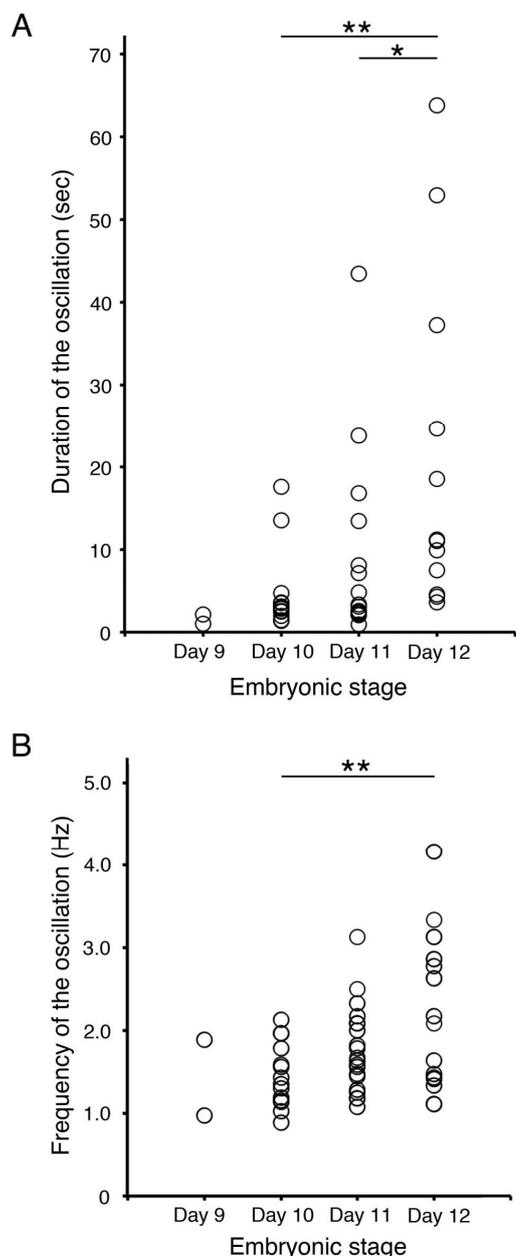
・ Oscillation の持続時間と周波数

図 7 は、孵卵 9 ~ 12 日の鶏胚嗅球において観察された oscillation の持続時間 (A) と周波数 (B) を示したものである。それぞれの図において、印は 1 つの標本から得られた結果を表している。

Oscillation の持続時間は、孵卵 9 日から 12 日へと個体発生が進むにつれて、有意に増加した。孵卵 12 日の発生段階では、約 1 分間続く oscillation も観察された。一方、oscillation の周波数は、孵卵 9 ~ 12 日の発生段階ではすべて波に属したが、発生が進むにつれて、増加する傾向が見られた。

以上のように、鶏胚嗅球で観察された

oscillation の特性(出現率、持続時間、周波数)は、個体発生に伴ってダイナミックに変化することが分かった。



【図7】 孵卵9～12日の鶏胚嗅球における oscillation の持続時間(A)および、周波数(B)の変化。1つの はそれぞれ、1つの標本から得られた結果を示している。

(5) 研究成果のまとめと今後の課題

本研究では、膜電位感受性色素を用いた神経活動の光学的多領域計測法を発生初期の鶏胚から作成した「嗅神経-嗅球-終脳標本」に適用し、嗅神経の電気刺激によって誘発される神経活動を光学的に測定することに成功した。得られた成果の中から、本報告書では、嗅球で観察された oscillation を取り上げて記載した。特に、鶏胚嗅球で観察された oscillation の出現領域、起源、特性の個体発生に伴う変化について詳細に述べた。

本研究をさらに発展させる課題としては、

嗅球から終脳全体に伝搬する光学的シグナルの解析や、嗅神経の自然刺激による光学的シグナルの検出と解析が挙げられる。今後の研究の継続により、これらの点を含めた「嗅覚神経系の機能発生・発達」が明らかになるものと期待された。

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8件)

- (1) Momose-Sato, Y. and Sato, K. (2015) Voltage-sensitive dye imaging during functional development of the embryonic nervous system: A brief review with special thanks to Prof. Larry Cohen. **Neurophotonics** 2, 021009 1-5. (査読有)
- (2) Nakamori, T., Sato, K., Kinoshita, M., Kanamatsu, T., Sakagami, H., Tanaka, K. and Ohki-Hamazaki, H. (2015) Positive feedback in activation of NR2B-containing NMDA receptors is the initial step of visual imprinting, a model for juvenile learning. **Journal of Neurochemistry** 132, 110-123. (査読有)
- (3) Sato, K., Hayashi, S., Inaji, M. and Momose-Sato, Y. (2016) Oscillations in the embryonic chick olfactory bulb: initial expression and development revealed by optical imaging with a voltage-sensitive dye. **European Journal of Neuroscience** 43, 1111-1121. (査読有)
- (4) Momose-Sato, Y. and Sato, K. (2016) Development of synaptic networks in the mouse vagal pathway revealed by optical mapping with a voltage-sensitive dye. **European Journal of Neuroscience** 44, 1906-1918. (査読有)
- (5) Momose-Sato, Y. and Sato, K. (2016) Development of spontaneous activity in the avian hindbrain. **Frontiers in Neural Circuits Research** 10, Article 63, 1-8. (査読有)
- (6) Sato, K. and Momose-Sato, Y. (2017) Functiogenesis of the embryonic central nervous system revealed by optical recording with a voltage-sensitive dye. **Journal of Physiological Sciences** 67, 107-119. (査読有)
- (7) Sato, K., Nariai, T., Momose-Sato, Y. and Kamino, K. (2017) Intraoperative intrinsic optical imaging of human somatosensory cortex during neurosurgical operations. **Neurophotonics** 4, 031205 1-5. (査読有)
- (8) Momose-Sato, Y. and Sato, K. (2017) Developmental roles of the spontaneous depolarization wave in synaptic network formation in the embryonic brainstem. **Neuroscience** 365, 33-47. (査読有)

[学会発表](計16件)

- (1) Sato, K. and Momose-Sato, Y. (2015) Optical analysis of developmental changes

- in oscillatory activity in the embryonic chick olfactory bulb. Society for Neuroscience 45th Annual Meeting. October 17-21, 2015, Chicago, USA.
- (2) Momose-Sato, Y. and Sato, K. (2015) Development of functional synaptic networks in the mouse vagal pathway revealed by voltage-sensitive dye imaging. Society for Neuroscience 45th Annual Meeting. October 17-21, 2015, Chicago, USA.
- (3) Sato, K. and Momose-Sato, Y. (2016) Optical imaging of widely-spreading wave activity in the embryonic chick forebrain induced by olfactory nerve stimulation. Society for Neuroscience 46th Annual Meeting. November 12-16, 2016, San Diego, USA.
- (4) Sato, K. and Momose-Sato, Y. (2017) Functional mapping of neuronal activity in the facial nucleus of the rat embryo: optical recording with a voltage-sensitive dye. Society for Neuroscience 47th Annual Meeting. November 11-15, 2017, Washington DC, USA.
- (5) Momose-Sato, Y. and Sato, K. (2017) *In ovo* blockade of the spontaneous depolarization wave inhibits the formation of synaptic networks in the embryonic brainstem. Society for Neuroscience 47th Annual Meeting. November 11-15, 2017, Washington DC, USA.
- (6) Momose-Sato, Y. and Sato, K. (2015) Development of functional synaptic networks in the mouse vagal pathway: optical mapping with a voltage-sensitive dye. The 38th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society Abstract, 1P-031.
- (7) Sato, K. and Momose-Sato, Y. (2015) Developmental changes in oscillatory activity in the embryonic chick olfactory bulb: Optical imaging with a voltage-sensitive dye. The 38th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society Abstract, 1P-032.
- (8) Nakamori, T., Ohki-Hamazaki, H. and Sato, K. (2015) The role of glucose and lactate in regulation of food intake in the ventromedial hypothalamic nucleus. The 38th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society Abstract, 2P-241.
- (9) Sato, K. and Momose-Sato, Y. (2016) Widely-spreading wave activity in the embryonic chick forebrain induced by olfactory nerve stimulation: Optical imaging with a voltage-sensitive dye. Journal of Physiological Sciences 66 suppl. 1, S102.
- (10) Sato, K. and Momose-Sato, Y. (2016) Voltage-sensitive dye imaging of widely-spreading wave activity in the embryonic chick forebrain induced by olfactory nerve stimulation. The 39th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society Abstract, P1-034.
- (11) Sato, K. and Momose-Sato, Y. (2017) Optical mapping of neuronal activity in the facial motor nucleus of the embryonic rat brainstem. Journal of Physiological Sciences 67 suppl. 1, S125.
- (12) Momose-Sato, Y. and Sato, K. (2017) Effects of *in ovo* blockade of the spontaneous depolarization wave on the formation of synaptic networks in the embryonic brainstem. Journal of Physiological Sciences 67 suppl. 1, S126.
- (13) Sato, K. and Momose-Sato, Y. (2017) Functional mapping of neuronal activity in the facial nucleus of the rat embryo with voltage-sensitive dye recording. The 40th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society Abstract, 2P-029.
- (14) Momose-Sato, Y. and Sato, K. (2017) *In ovo* blockade of the spontaneous depolarization wave inhibits the formation of synaptic networks in the embryonic brainstem. The 40th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society Abstract, 2P-028.
- (15) Sato, K. and Momose-Sato, Y. (2018) Optical analysis of functional development of the facial motor nucleus in the embryonic rat brainstem. Journal of Physiological Sciences 68 suppl. 1, S105.
- (16) Momose-Sato, Y. and Sato, K. (2018) Developmental role of the spontaneous depolarization wave transiently expressed in the embryonic brainstem. Journal of Physiological Sciences 68 suppl. 1, S105.
- 〔図書〕(計 1 件)
- (1) Momose-Sato, Y., Sato, K. and Kamino, K. (2015) Monitoring population membrane potential signals during development of the vertebrate nervous system. In: **Membrane Potential Imaging in the Nervous System and Heart**. Eds. Canepari, M., Zecevic, D and Bernus, O. Springer, New York, 213-242. (査読有)
- 〔産業財産権〕
- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)
- 〔その他〕
- ホームページ: <http://square.umin.ac.jp/optical/>
- 6 . 研究組織
- (1) 研究代表者
佐藤 勝重 (SATO KATSUSHIGE)
駒沢女子大学・人間健康学部・教授
研究者番号 : 80291342
- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
佐藤 容子 (MOMOSE-SATO YOKO)
関東学院大学・人間環境学部・教授
研究者番号 : 70251501