

平成 21 年 6 月 17 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19500268
 研究課題名（和文） 胎児性自発興奮波から成体呼吸中枢リズム活動へのスイッチング機構
 研究課題名（英文） Optical imaging of the depolarization wave in the embryonic CNS
 -Mechanisms regulating the switching from primordial activity to
 the respiratory rhythm-
 研究代表者
 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

研究成果の概要：

発生初期の中枢神経系で見られる広範囲伝播脱分極波から、成体呼吸中枢リズム活動へのスイッチングがどのようなメカニズムで起こるのかを明らかにするために、光学イメージングによる解析を行った。発生の早い時期には obex から腰髄までの多数の領域から起こっていた自発性脱分極波は、発生の後期にはほとんどが腰仙髄から起こり、その後の広範囲伝播性の消失が契機となって呼吸中枢の自発的リズム活動が発現してくるものと考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：神経生理学

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：depolarization wave、自発活動、中枢神経系、発生、光学計測、膜電位感受性色素

1. 研究開始当初の背景

生命の維持に不可欠な中枢神経系の活動は、感覚性入力に加えて、神経細胞の自発興奮活動によって支えられている。この自発活動は、個体発生の非常に早い時期すでに、延髄・脊髄などで観察されることが知られている。これらは、成体での呼吸リズム、歩行リズムなどに対応する embryonic prototype であると考えられてきた。我々は、広範囲伝播脱分極波(depolarization wave)の研究の過程で、従来、延髄・脊髄などで別個の現象と

して解析が行われていた自発興奮活動が、実はひと続きの同一現象であり、しかも腰・仙髄の末端から大脳の一部にまでおよぶ、大興奮波のごく一部分を見ているのにすぎないということに気がついた (Momose-Sato et al., Neuroscience: 102: 245-262, 2001; J. Neurophysiol. 89: 600-614, 2003; Neuroscience 116: 407-423, 2003; J. Neurophysiol. 94: 1606-1622, 2005; Mochida et al., Eur. J. Neurosci. 14: 809-820, 2001)。この発見は、これまで発生初期胚で行われていた自発興奮活動の研究

が、脳神経や脊髄神経などからの単一集合電位の電氣的記録という static な手法であったのに対し、我々の用いた光学的イメージング法が、神経活動の三次元的時空間パターンを解析するのに優れた利点を有していたことに起因すると考えられる。

広範囲伝播脱分極波は成体ではみられず、このことから、発生のある一時期に一過性に出現し、次第に消失していくものと考えられる。しかし、脱分極派の消失と呼吸中枢などの生体リズム活動へのスイッチングがどのようなメカニズムで起こるのかは明らかにされていない。

2. 研究の目的

我々は上記のメカニズムとして、“脱分極波の活動パターンの変化が、呼吸中枢など成体でみられる自発性リズム活動の発現をコントロールしているのではないか”と考えた。本研究では、胎児性自発興奮波から成体呼吸リズム活動へのスイッチングがどのようなメカニズムでおこり、両者の間にどのような相互依存性があるのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 実験材料:

刺激誘発性の広範囲伝播性脱分極波 (depolarization wave) に関する我々のこれまでの解析は、主として鶏胚で行われてきたが (これは、V. Hamburger 以来の embryology, developmental neurobiology の研究が、鶏胚で数多くなされてきたことに起因する)、最近の研究で、ラット胚・マウス胚でも同様の脱分極波が観察されることが見いだされた。本研究では、embryo の摘出にともなう母体や同腹仔の犠牲をかんがみて、まず鶏胚を用いた系で基本的データを得、その結果をもとに哺乳類での解析を行う。

孵卵 4 ~ 9 日の鶏胚から全脳・脊髄標本を取り出し、自発興奮活動のダイナミズムを解析する。哺乳類での解析は、ラット胚 (胎生 15 ~ 17 日) を用いて、脱分極波・自発興奮波の解析を行う。

(2) 測定方法:

光学的計測 / イメージング

現有の 1020 チャンネル光学計測システムをベースに、長時間記録が行えるようにアナログ基盤とデジタルインターフェースを改造し、光学的計測 / イメージングを行った。摘出全脳・脊髄標本は、小脳と大脳の背側正中線を切り開いて扁平に展開し、膜電位感受性

色素 (NK2761) の溶液に約 5・20 分間浸して染色した。染色後、標本を顕微鏡ステージ上にセットし、ニューロン電位活動を光学的シグナルとして多領域から同時記録した。

集合活動電位の電気生理学的測定

脳神経あるいは脊髄神経の神経根をガラス吸引電極で吸引し、集合活動電位を光学的シグナルと同時計測した。ガラス吸引電極を介して detect された電気信号は、細胞外記録用増幅器を経て、コンピューターに記録した。

4. 研究成果

広範囲にわたるニューロン群のリズミカルな同期的活動を支配しているものは何なのかを明らかにするためには、その発生もと (origin) を同定することが不可欠である。

鶏胚の摘出全脳 脊髄標本において、自発性脱分極波の発現し始める H-H stage 24 (孵卵 4 日) 以降の各発生段階について、長時間の光学イメージングを行い、シグナルの時空間パターンの解析から、脱分極波の origin の同定を行った。脱分極波の origin は、stage 24 では obex ~ 上部頸髄にあり、発生とともに起源の数と位置が多様化していくことが明らかとなった (図 1)。

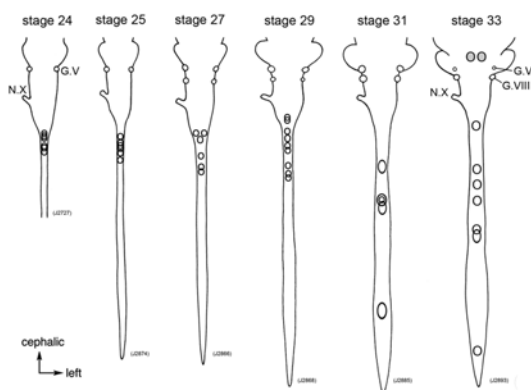


図 1 鶏胚における自発性脱分極波の origin

鶏胚における脱分極波は、stage 35 (孵卵 9 日) 以降、延髄領域では著明に減弱し、脱分極波の消失と入れ替わりに呼吸中枢の自発的リズム活動が発現してくる。この時期は、ラット胚では胎生 17・18 日に相当する。そこで、胎生 15・17 日のラット胚を用いて、自発性脱分極波の origin の解析を行った。

胎生 15 日のラットでは、自発性脱分極波は頸髄から上部腰髄の多数の領域から起こり (図 2A) 鶏胚の孵卵 7 日 ~ 8 日でのパターンと類似していた。胎生 16・17 日になると、自発興奮はほとんどが腰仙髄から起こり (図 2B) また発生初期には見られなかつ

た橋背内側、延髄背内側、延髄腹外側の領域からも、自発性脱分極波が起こることが明らかとなった(図3)。脊髓を切り落とした脳幹標本では、脳幹内のoriginが活性化され、より高い頻度で自発性脱分極波を誘起するようになった。

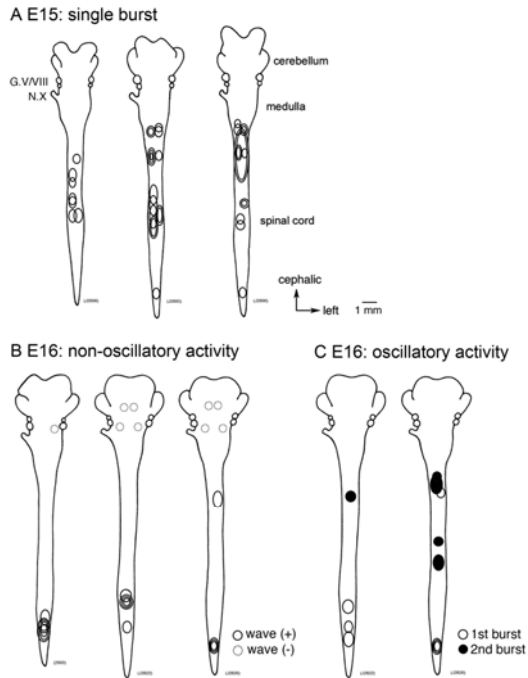


図2 ラット胚における自発性脱分極波のorigin

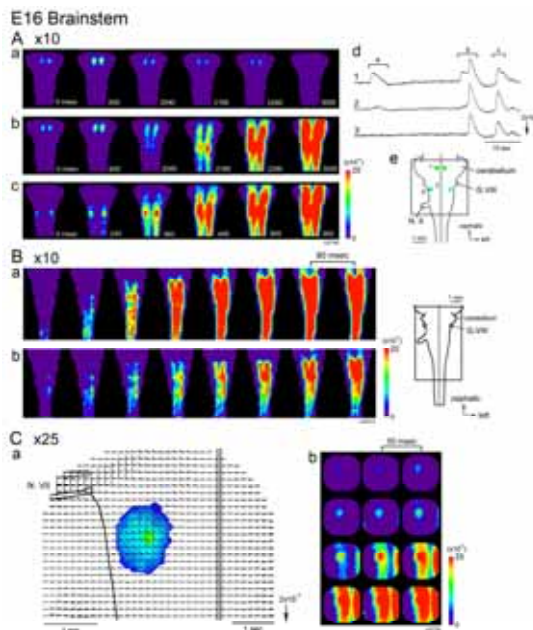


図3 ラット胚橋・延髄における自発性脱分極波のorigin

これらの結果から、我々は以下の仮説を提唱した。

1) 自発性広範囲伝播脱分極波のoriginは、発現初期には、obex~頸髄上部に限局しており、この領域が correlated activity の制御中枢として最初に分化する領域であると推定される。

2) 発生が進むにつれて、脱分極波のoriginは、延髄下部から腰仙髄の広い範囲に存在するようになる。これは、中枢神経系の広い範囲が、自発興奮波の制御中枢として等しく機能しうことを示唆している。

3) 発生がさらに進むと、自発活動のoriginは腰仙髄と橋・延髄とに分かれて存在するようになる。ラット胚では、胎生16・17日まで、両者はcoupleして広範囲伝播波を誘起しているが、それ以降になると、脊髓、橋、延髄のそれぞれの領域に限局した自発活動のみを誘起するようになる。

広範囲伝播性の消失メカニズムとして最も考えられるのは、伝播ネットワークへの抑制機構の発現である。脱分極波の伝播には、glutamate、acetylcholine、gap junctionのほかに、GABA、glycineによる脱分極(発生初期には、Cl⁻平衡電位の違いから過分極ではなく脱分極応答となる)が関与していることが明らかにされているが(Momose-Sato et al., J. Neurophysiol. 89: 600-614, 2003; J. Neurophysiol. 94: 1606-1622, 2005)、GABA、glycine 応答が脱分極から過分極側に変化することによって、興奮波の伝播が抑制されていくというメカニズムを想定することが出来る。また、脱分極波の発現にはNMDA型受容体のMg²⁺感受性が関与しており(Momose-Sato et al., Neuroscience 102: 245-262, 2001; Neuroscience 116: 407-423, 2003; Mochida et al., Eur. J. Neurosci. 14: 809-820, 2001)、Mg²⁺ blockの増大によって脱分極波が抑制されていく可能性も考えることが出来る。

今回の研究で明らかにされた自発性脱分極波のoriginのうち、延髄腹外側に存在するoriginは、呼吸中枢と想定されているpreBötzinger complexのごく近傍に位置しており、両者の関連性は今後より詳しく解析する必要があると思われる。

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9件)

Momose-Sato, Y., Mochida, H. and Kinoshita, M. (2009) Origin of the earliest correlated

neuronal activity in the chick embryo revealed by optical imaging with voltage-sensitive dyes. *European Journal of Neuroscience* 29, 1-13. (査読有)

Mochida, H., Sato, K. and Momose-Sato, Y. (2009) Switching of the transmitters that mediate hindbrain correlated activity in the chick embryo. *European Journal of Neuroscience* 29, 14-30. (査読有)

Sato, K. and Momose-Sato, Y. (2008) Optical analysis of neural circuit formation in the embryonic brain. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 35, 706-713. (査読有)

Glover, J. C., Sato, K. and Momose-Sato, Y. (2008) Using voltage-sensitive dye recording to image the functional development of neuronal circuits in vertebrate embryos. *Developmental Neurobiology* 68, 804-816. (査読有)

Momose-Sato, Y., Sato, K. and Kinoshita, M. (2007) Spontaneous depolarization waves of multiple origins in the embryonic rat CNS. *European Journal of Neuroscience* 25, 929-944. (査読有)

Sato, K., Kinoshita, M. and Momose-Sato, Y. (2007) Optical mapping of spatiotemporal emergence of functional synaptic connections in the embryonic chick olfactory pathway. *Neuroscience* 144, 1334-1346. (査読有)

Momose-Sato, Y., Kinoshita, M. and Sato, K. (2007) Development of vagal afferent projections circumflex to the obex in the embryonic chick brainstem visualized with voltage-sensitive dye recording. *Neuroscience* 148, 140-150. (査読有)

Momose-Sato, Y., Kinoshita, M. and Sato, K. (2007) GABA-induced intracellular Ca^{2+} elevation in the embryonic chick brainstem slice. *Neuroscience Letters* 411, 42-46. (査読有)

Momose-Sato, Y., Kinoshita, M. and Sato, K. (2007) Embryogenetic expression of glossopharyngeal and vagal excitability in the chick brainstem as revealed by voltage-sensitive dye recording. *Neuroscience Letters* 423, 138-142. (査読有)

[学会発表](計 19 件)

Sato, K. and Momose-Sato, Y. Functional organization of the glossopharyngeal and vagus nerve-related nuclei in the embryonic rat brainstem: Optical mapping with voltage-sensitive dyes. Society for Neuroscience 38th Annual Meeting. November 15-19, 2008, Washington DC, USA.

Momose-Sato, Y., Mochida, H. and Sato, K. Switching of the transmitters that mediate hindbrain correlated activity in the chick embryo. Society for Neuroscience 38th Annual Meeting. November 15-19, 2008, Washington DC, USA.

Kinoshita, M., Momose-Sato, Y. and Sato, K. Neuronal excitability to generate spontaneous activity in the medulla and spinal cord of the chick embryo. Society for Neuroscience 38th Annual Meeting November 15-19, 2008, Washington DC, USA.

Kinoshita, M., Momose-Sato, Y. and Sato, K. Regional gradient of neuronal excitability to generate spontaneous activity in the hindbrain of the chick embryo. 6th FENS Forum of European Neuroscience. July 12-16, 2008, Geneva, Switzerland.

佐藤勝重、木下雅恵、佐藤容子：鶏胚脳幹における迷走神経求心線維の機能発達過程の光学的解析。2008年7月9-11日 第30回日本神経科学学会(東京)

佐藤容子、持田啓、木下雅恵、佐藤勝重：光学的イメージングによる鶏胚中枢神経系における脱分極波のoriginの同定。2008年7月9-11日 第30回日本神経科学学会(東京)

木下雅恵、佐藤容子、佐藤勝重：鶏胚後脳における神経興奮性の部位差。2008年7月9-11日 第30回日本神経科学学会(東京)

佐藤勝重、木下雅恵、佐藤容子：鶏胚脳幹迷走神経回路網の機能発達過程の光学的解析。2008年3月25-27日 第85回日本生理学会(東京)

佐藤容子、持田啓、木下雅恵、佐藤勝重：鶏胚中枢神経系における脱分極波のoriginの同定：光学的イメージングによる解析。2008年3月25-27日 第85回日本生理学会

(東京)

Sato, K., Kinoshita, M. and Momose-Sato, Y.
Development of vagal afferent projections
circumflex to the obex in the embryonic chick
brainstem visualized with voltage-sensitive dye
recording. Society for Neuroscience 37th Annual
Meeting. November 3-7, 2007, San Diego, USA.

Momose-Sato, Y., Mochida, H., Kinoshita, M.
and Sato, K. The origin of the depolarization
wave at an early phase of the chick development
revealed by optical imaging with a
voltage-sensitive dye. Society for Neuroscience
37th Annual Meeting. November 3-7, 2007, San
Diego, USA.

Kinoshita, M., Momose-Sato, Y. and Sato, K.
Regulation of spontaneous rhythmic activities in
the caudal medulla by the spinal cord in the chick
embryo. Society for Neuroscience 37th Annual
Meeting. November 3-7, 2007, San Diego, USA.

佐藤勝重、Glover J. C., 佐藤容子：鶏
胚脳幹聴覚神経回路網の機能発達過程の光
学的解析。2007年9月10-12日 第30回日
本神経科学学会(横浜)

佐藤容子、佐藤勝重、木下雅恵：ラット
胚中枢神経系における自発興奮波の時空間
パターンと origin の同定：光学的イメージ
ングによる解析。2007年9月10-12日 第
30回日本神経科学学会(横浜)

稲次基希、佐藤勝重、成相直、百瀬-佐藤
容子、大野喜久郎：ラット皮質線条体におけ
る膜電位感受性色素による神経伝達イメー
ジング。2007年9月10-12日 第30回日本
神経科学学会(横浜)

Momose-Sato, Y., Kinoshita, M. and Sato, K.
Depolarization waves in the embryonic CNS
visualized with voltage-sensitive dye imaging.
7th IBRO World Congress of Neuroscience. July
12-17, 2007, Melbourne, Australia.

Inaji, M., Nariai, T., Sato, K., Momose-Sato,
Y., Maehara, T. and Ohno, K. Intraoperative
intrinsic optical imaging in brain tumor surgery.
6th Congress of the Asian Society for Stereotactic,
Functional and Computer Assisted Neurosurgery.
May 22-24, 2007, Fujiyoshida, Japan.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

佐藤 勝重 (SATO KATSUSHIGE)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・講師
研究者番号：80291342