

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 17 日現在

機関番号：32704

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22650165

研究課題名（和文）光学的イメージング法の導入による高血圧発症メカニズムの解析の新展開

研究課題名（英文）Analyses of the mechanism of hypertension by means of optical imaging

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（和文）：

高血圧発症のメカニズムについて、循環調節機能の異常という観点から解析を行った。E14～E16 の正常ラットおよび自然発症高血圧ラットの胎仔から、迷走神経、舌咽神経をつけた脳幹標本を作製し、神経刺激に対する脳幹内応答の光学的イメージングを行った。光学的シグナルの波形解析から、迷走神経、舌咽神経に関連した運動核、感覚核（孤束核）を同定した。孤束核におけるシナプス伝達機能の発現過程には、正常ラットと SHR との間で明らかな差異は見られなかった。

研究成果の概要（英文）：

We studied the mechanism of hypertension in view of functional abnormality of the cardiovascular center. Brainstem preparations with the vagus and glossopharyngeal nerves attached were dissected from E14-E16 control and spontaneous hypertensive rat (SHR) embryos. Neural responses to vagus or glossopharyngeal nerve stimulation were detected by means of multiple-site optical imaging. From the analysis of signal waveforms, we identified motor and sensory nuclei related to the vagus and glossopharyngeal nerves. In the nucleus of the tractus solitarius, developmental processes of the excitatory postsynaptic potential (EPSP) were similar between the control and SHR embryos.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	800,000	0	800,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,300,000	450,000	2,750,000

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：高血圧、循環中枢、光学計測、膜電位感受性色素、機能構築、ラット胚

1. 研究開始当初の背景

高血圧症に基づく心臓・血管系の病変は、常に死亡原因の上位を占め、社会問題とし

ても重要な疾患の一つである。この高血圧発症の原因については、多因子が複雑に絡み合っていることが想定されているが、未だ不明な点が多い。考えられる要因のひとつとして、循環器系の神経性調節機能の異常が想定され、心臓・血管系の調節中枢、すなわち循環中枢の関与が、最も重要な factor として注目を集めている。しかしながら、循環中枢に関するこれまでの研究は、成体の動物を実験対象として、脳内における解剖学的な位置の同定や、単一神経細胞からの記録にとどまっており、機能的なシステムとしての実体は、正常な個体においてさえ、いまなお black box のまま残されている。この背景には、循環中枢の機能的構成が、高度にシステム化されたダイナミックな複雑系であり、その複雑さが我々の解析を拒んでいるという現状がある。

複雑な中枢神経系を解析する一つのストラテジーとして、単純な系から複雑な系へ、すなわち、発生過程の未熟な系を解析して外挿的に複雑な系を理解するという方法が、非常に有効なアプローチの手段として考えられている。しかしながら、発生初期の中枢神経系は、細胞が小さく、機械的にも脆弱であり、従来解析で威力を発揮してきた電気生理学的研究法も、その適用範囲が限られるという困難があった。このような状況の中で、これまでとは全く異なる新たな視点からの研究法が渴望されてきた。

われわれは、細胞電位活動の光学的イメージング法に注目し、この測定法を、病態メカニズムの個体発生的アプローチに適用できるのではないかとこの着想に至った。この方法は、膜電位変化を光学的変化に変換する物質、すなわち膜電位感受性色素で細胞を染色し、細胞電気活動を光学シグナルとして捉えイメージングする方法であるが、従来電気生理学的方法と異なり、ニューロン活動の時空間応答パターンを非侵襲的に三次元イメージングとして解析できるという利点を有している。われわれは、鶏胚脳幹標本で電気刺激に伴うシグナル伝達のイメージングに成功しており、この方法を疾患モデル動物に適用して、病態発症メカニズムの解析に応用できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究は、上記のような背景のもとに、光学的イメージング法の適用の可能性につい

て検討し、高血圧発症に関与する循環中枢の役割について明らかにすることを目的として計画された。本研究では、個体発生過程の正常ラットと病態モデルラット（自然発症高血圧ラット）の心臓・血管系調節中枢の機能応答特性を比較して、高血圧発症のメカニズムについて、循環調節機能の破綻という新観点から検証を行う。

3. 研究の方法

(1) 実験材料・標本

正常ラットと自然発症高血圧ラット (spontaneous hypertensive rat: SHR) のそれぞれにおいて、個体発生過程における延髄循環中枢の機能マッピングを行い、正常ラットと病態モデルラットとの相違について比較検討した。

麻酔下にラット胎仔を取り出し、実体顕微鏡下で第 IX 脳神経（舌咽神経）と第 X 脳神経（迷走神経）を付けたままの脳神経-脳幹インタクト標本を作製した。スライス標本は、舌咽・迷走神経の根部を含むようにして、脳幹を厚さ 1~2 mm 程度にスライスして作成した。

(2) 光学計測

実験には、我々が独自に開発した光学的 1020 チャンネル同時測定システムを用い、脳幹内の 1020 ヶ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。

膜電位感受性色素としては、メロシアン・ローダニン系の NK2761 が embryo の神経系ではもっとも適していることを確認しており、本研究でもこの色素を用いた。標本を膜電位感受性色素 0.2 mg/ml を含む液に約 20 分間浸し染色した。

4. 研究成果

図 1、図 2 は、E14 および E16 の control ラット脳幹インタクト標本で、迷走神経刺激に応じて得られた光学的シグナルの記録である。E14 のシグナルは、fast signal とよばれる時間経過の速いシグナルからなり、脳幹の内側域と外側域の 2 カ所から検出された（図 1）。形態学的解析との比較から、これらの領域は、それぞれ迷走神経背側運動核および孤束核に相当することがわかった。一方 E16 の脳幹では、fast signal のほかに、slow signal と呼ばれる時間経過の遅いシグナルが同定された（図 2、図 3）。この slow signal は、孤束核における興奮性シナプス後

電位 (EPSP: excitatory postsynaptic potential) に由来し、薬理的な解析から、グルタミン酸を伝達物質とすることが明らかとなった。

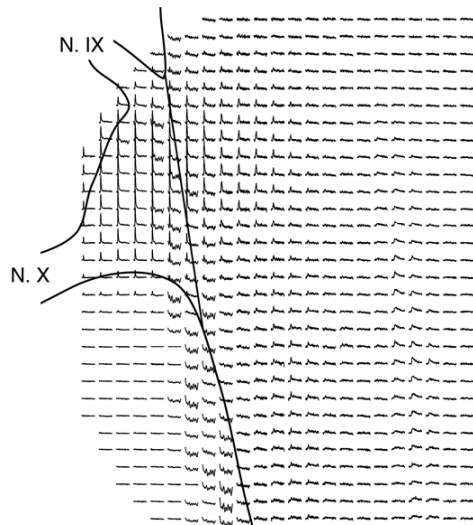


図1 E14の control rat における迷走神経刺激に対する脳幹内応答

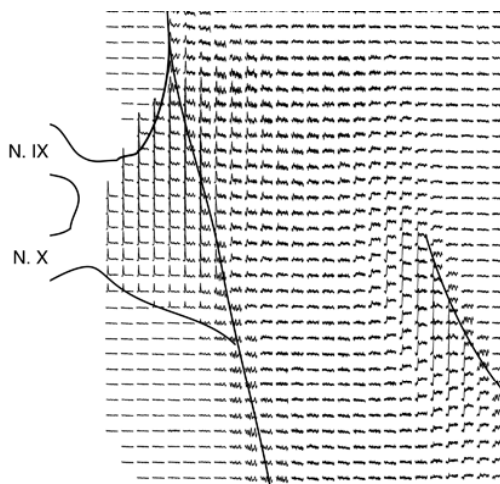


図2 E16の control rat における迷走神経刺激に対する脳幹内応答

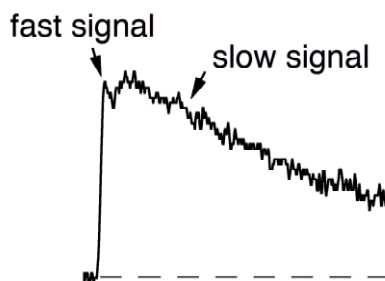


図3 E16の孤束核で得られた光学的シグナル。Fast signal と slow signal の2成分から成る。

グルタミン酸受容体には、NMDA 型と non-NMDA 型のイオンチャネル型グルタミン酸受容体が存在する。これらの受容体の阻害剤である APV と CNQX を標本に投与すると、シナプス後電位は、APV を投与したときも CNQX を投与したときも、ともに部分的に抑制されたが、その抑制効果には違いがみられ、APV を投与したときにはシグナルの主として遅い方が、逆に CNQX を投与したときはシグナルの速い方の成分が抑制された。これらの結果から、孤束核では、NMDA 型と non-NMDA 型の両成分が存在しており、NMDA 型はシナプス後電位の主として遅い成分、non-NMDA 型はシグナルの主として速い成分に参与していることが明らかとなった。

E14~E16 の control ラットで、孤束核における EPSP の発現過程を解析すると、EPSP は E15 以降の発生段階では著明に認められたが、E14 では非常に小さいか検出限界レベル以下 (fractional change <math><10^{-4}</math>) であった (図4)。しかしながら、E14 の発生段階でも、外液 Mg^{2+} を 0 mM にし、NMDA 型グルタミン酸受容体への Mg^{2+} block を除去してやると、明らかな slow signal が検出されるようになった。このことから、孤束核におけるシナプス伝達機能は、E14 の発生段階ですでに形成されているが、NMDA 型グルタミン酸受容体への Mg^{2+} block によって抑制された状態にあることがわかった。

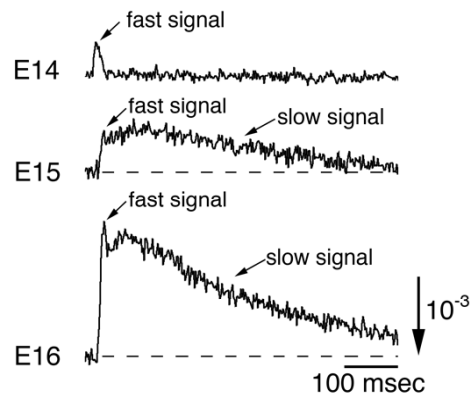


図4 孤束核におけるシナプス伝達機能の発現過程

脳幹-舌咽神経標本を用いて同様の解析を行うと、迷走神経孤束核と重なるが、わずかに頭側・外側に寄った領域に、舌咽神経孤束核が同定された。舌咽神経からのシナプス伝達機能は、迷走神経と同様に、E15 の発生段階以降で明瞭に観察された。

次に、SHR を用いて迷走神経・舌咽神経応

答の解析を行った。図5、図6は、E16の脳幹スライス標本で、迷走神経および舌咽神経を刺激したときに得られた光学的シグナルの記録である。SHRにおいても、脳幹外側部の孤束核に相当する領域から、fast signalとslow signalの両シグナルが検出され、薬理学的特性から、それぞれ感覚神経終末における活動電位、グルタミン酸依存性のシナプス後電位であることがわかった。図5、図6に見られるように、E16の脳幹ではすでに明らかなシナプス後電位のシグナルが検出され、このことから、機能的シナプスがこの発生段階までにすでに十分形成されていると考えられた。シグナルの波形、出現領域には、control ratとSHRの間で明らかな差は認められなかった。

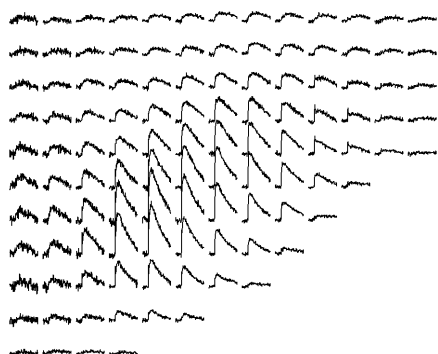


図5 E16のSHR孤束核における迷走神経応答

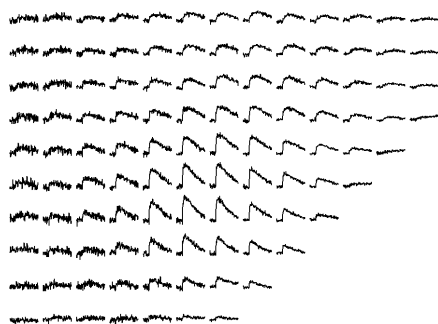


図6 E16のSHR孤束核における舌咽神経応答

E14のSHRでは、シナプス後電位は非常に小さいか検出限界レベル以下 (fractional change $< 10^{-4}$) であったが、外液 Mg^{2+} を 0 mM にすると、明らかなslow signalが検出されるようになった(図7)。このことから、孤束核におけるシナプス伝達機能の発現過程は、control ratと同様であることが明らか

となった。

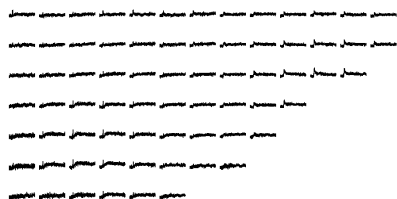


図7 E14のSHRで外液 Mg^{2+} を 0 mM にしたときに孤束核で誘発されたシナプス後電位

脳幹孤束核は、循環調節に関連した末梢からの入力処理される一次神経核である。この研究で得られた結果から、少なくともE14~E16の発生段階においては、control ratとSHRの間で、孤束核における情報処理機能の発現過程に明らかな差異は認められなかった。迷走神経・舌咽神経に関連した脳幹内での応答に関しては、孤束核からさらに高次神経核にいたるシナプス回路網の同定にも成功しており (Neuroscience Letters 535: 140-145, 2013)、今後はこれらも含めたより詳細な解析を行っていきたい。

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3件)

- ① Momose-Sato, Y., Nakamori, T., Mullah, S. H.-E.-R. and Sato, K. (2013) Optical survey of vagus nerve-related neuronal circuits in the embryonic rat brainstem. Neuroscience Letters 535: 140-145. (査読有) DOI: 10.1016/j.neulet.2012.12.013
- ② Momose-Sato, Y., Nakamori, T. and Sato, K. (2011) Functional development of the vagal and glossopharyngeal nerve-related nuclei in the embryonic rat brainstem: optical mapping with a voltage-sensitive dye. Neuroscience 192: 781-792. (査読有) DOI: 10.1016/j.neuroscience.2011.06.019
- ③ Momose-Sato, Y. and Sato, K. (2011) The embryonic brain and development of vagal pathways. Respiratory Physiology and Neurobiology 178: 163-173. (査読有) DOI: 10.1016/j.resp.2011.01.012

[学会発表] (計1件)

- ① 佐藤勝重、中森智啓、佐藤容子: 胎生期ラット迷走神経回路網の光学的探索. 2012年3月29-31日 第89回日本生理学会 (松本)

[図書] (計1件)

① Momose-Sato, Y., Sato, K. and Kamino, K. (2010) Monitoring population membrane potential signals during functional development of neuronal circuits in vertebrate embryos. In: Membrane Potential Imaging in the Nervous System, Eds. Canepari, M. and Zecevic, D., Springer, New York, pp83-96. (査読有)

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)
駒沢女子大学・人間健康学部・教授
研究者番号：80291342