

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23700496

研究課題名（和文）

全方向スパイン計測解析法の開発と前頭前野神経細胞スパインの解析

研究課題名（英文）

Development of 3D spine analysis method and analysis of spines in prefrontal cortex

研究代表者

向井 秀夫（MUKAI HIDEO）

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：20534358

研究成果の概要（和文）：

スパイン（シナプス後部）は神経ネットワークにおいて中心的な役割を担っている。研究代表者らが開発したプログラムは膨大な数のスパインの解析を可能とした。困難だった 3 次元的な解析について、蛍光の褪色を大幅に改善し、3 次元的な解析を行うための決め手となる方法を見出した。以上を多くの研究者に役立つ手段とするプログラムの整備を行った。また前頭前野を含むオキシトシン定量法を確立し、前頭前野スパインの機能解析の基盤を構築した。

研究成果の概要（英文）：

We have developed a mathematical analysis program to handle vast numbers of dendritic spines in the mammalian brain, providing a better way of spine analysis for many researchers. To further enable three-dimensional analysis, we examined a number of fluorescent reagents and found a candidate substance with robust anti-fading properties suitable for confocal imaging. We also established a method for precise quantification of oxytocin in the brain and made a multi-electrode measuring system for oxytocin effects on the spines in the prefrontal cortex.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・融合脳計測科学

キーワード：シナプス スパイン 樹状突起 大脳皮質 前頭前野 辺縁系 情動 オキシトシン

1. 研究開始当初の背景

スパイン（シナプス後部）は脳の神経細胞ネットワークにおいて中心的な役割を担っている。この棘構造は約 1 世紀前に発見されて以来、記憶を担う可塑性の主演と目され、統合失調症などの精神疾患でも変化してい

ることが明らかになってきており、世界中で研究が重ねられている。スパインの形態変化は脳のネットワーク機能の発揮において中心的な役割を担っている。NMDA 受容体や AMPA 受容体などのグルタミン酸受容体が多く存在しており、主として興奮性刺激の入

力の場合となっていることが分かってきており、その構造・機能について精力的に研究が進められている。

スパインは直径や形状によって機能が分化していることが示唆されている。単一の神経細胞に蛍光色素を注入して可視化すると、共焦点顕微イメージングを用いることで1時間程度で急性的にスパインの数や形態が変動する様子が高感度で観察でき、ホルモンや薬物の作用などを詳細に調べることができる。しかし、その莫大な数ゆえに、計数・解析作業は熟練した研究者の手作業にほぼ頼っており、多数の神経細胞に及ぶ研究は阻まれてきた。

以上の難局面を打開すべく、申請者らによって開発されたスパイン自動解析プログラム Spiso はスパインの計測解析を手作業からコンピュータの自動作業に変えることに実用的なレベルで世界で初めて成功しつつあり、さらに3次元的に完全なスパインの解析法の確立が多くの研究者に待ち望まれている状況である。

一方、オキシトシンは神経経済学の分野で相手への信頼度が上昇すること（大胆な投資行動に動くなど）や精神神経疾患との関わりが古くから知られているが、最近では自閉症との関わりが注目を集めている。

2．研究の目的

全方向スパイン解析法の開発を行うため、プログラムの整備と共に、解析対象のデータの質の向上を目指す。共焦点顕微鏡法で難点であったZ軸方向の撮像の間隔が十分とれないのは、主に蛍光物質の褪色が原因であった。そこでこの問題を解決すべく、褪色が非常に少ないと考えられる、今まで用いられていない新規な色素を導入し検討した。レーザーの

繰り返し照射による褪色が防げれば、Z軸方向の撮像ステップが十分細かく刻めるので、神経細胞の3次元スパイン像を正確に捉えることができる方法が確立できる。

前頭前野を含み、オキシトシンの効果を明らかにできれば、自閉症などの現代社会で緊急の課題に対してその原因を解明し治療薬の開発の手がかりとなる知見を提供できるなど、社会的意義は非常に大きい。しかしながら多様な脳機能に関わっている可能性のある内在性のホルモンであるにも関わらず、現時点では効果の紹介のみが先行しており、オキシトシンの脳内の濃度の正確な定量は未だにされていない。ヒトでの実験でも、唾液濃度を測定すれば中枢の濃度が推定できるとして多くの実験が行なわれているが、実際には非常に問題の大きい測定法が用いられている。本研究でオキシトシンの生体内濃度が確かなものとできれば、非常に意義のあるフィードバックが得られると考えられた。

3．研究の方法

神経スパインのデータ取得方法の深化を目指し、プログラムの整備を行いつつ、神経細胞の可視化手段にとって重要である量子ドット・有機金属色素等の検討を行った。

オキシトシン分子の脳内での量を明らかにすることを試みた。前頭前野の神経細胞スパインとオキシトシンに関する研究の実行過程において、前項で述べたように問題の大きい方法が内在性および外部から投与したオキシトシンの濃度が定量できなければ、オキシトシンの効果を見定めることは難しい。よって、まずオキシトシンの定量法の開発と確立に努めた。

さらに、前頭前野神経スパインの機能解析を試みた。前頭前野の一部である帯状回のスライス標本作製し、神経リズムを発振する

条件を探索した。またスパインが変化した結果、シナプス機能が変化することが前頭前野の機能発現上非常に重要と考えられる。スパイン形態の変化は神経機能の長期的変化にも深い関連を持っていると考えられるので、多電極でシナプス活動による局所電場電位を測るための測定系を構築した。

4. 研究成果

スパインの計測解析を手作業からコンピュータの自動作業に変えるプログラムを世界に提供する基盤の構築を行った。成果を多くの脳科学の研究者に役立つ新たな計測解析手段として提供することを目的として、プログラムの整備を行い、成果を国際的な欧文誌である *Cerebral Cortex* 誌に研究代表者を筆頭著者とする論文として投稿し、査読を経て掲載に至らせた。この論文は発行号において Editor's Choice(編集者推薦論文) に選ばれ、また掲載後海外からの問い合わせも相次ぐなど高い関心を集めている。

神経細胞の可視化手段にとって重要である量子ドット・有機金属色素等の検討を行った。量子ドットを専門とする研究者にも相談するなど探索を広範囲に進めた。しかしながら、使用を想定していた量子ドットが予想に反して十分な発光が得られなかった等の問題があった。さらに検討を重ね、発光の特性が共焦点顕微鏡の観察・測定に適している種類のものを見出した。現在までにこれを用いて神経細胞の可視化を検討してきており、今後克服すべき課題も見出された。近い将来解決可能と思われ、3次元可視化のための新規な方法として論文を準備中である。

前述のように実はオキシトシンの脳実質内濃度はよくわかっていないことが研究を進める過程で判明した。詳細に検討すると、

驚くべきことに現在までに用いられている唾液中のオキシトシン測定法自体が相当に危ういものであった。よってオキシトシンの定量法の開発に努めこれに成功した。具体的にはトリチウムで放射性標識されたオキシトシンを免疫的検出法と併用することにより、定量作業中に失われる分を考慮したオキシトシンの正確な濃度を決定する方法の確立に成功した。適用対象は動物に留まらずヒト試料にも適用可能なので、波及効果も大きいと考えられ、現在論文を投稿準備中である。

前頭前野の一部である帯状回のスライス標本作製し、カイニン酸投与により安定的に神経リズムを発振する条件を見出した。多電極でシナプス活動による局所電場電位を測るための測定系を構築し、予備的な結果を得た。年度末での研究代表者の転任により再構築が必要であるが、オキシトシンによるシナプス機能の変化の測定を重ね、さらに発展させる予定である。

以上のような本研究の成果によって、スパインの3次元可視化の道筋がつくと共に、オキシトシンの測定法を確立した。これにより、高次の脳に対するオキシトシン等の効果に対する根拠がより明瞭になり、脳機能の変化や、自閉症・うつ病など、精神神経疾患の改善等の社会的課題に対し、治療薬の開発の基となる知見を提供できるなど、波及効果は非常に大きいと期待される。

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4件)

1. Ooishi Y, Kawato S, Hojo Y, Hatanaka Y, Higo S, Murakami G, Komatsuzaki Y, Ogiue-Ikeda M, Kimoto T, Mukai H
“Modulation of synaptic plasticity in the hippocampus by hippocampus-derived

estrogen and androgen”

The Journal of steroid biochemistry and molecular biology 131(1-2) 37-51 doi: 10.1016/j.jsbmb.2011.10.004 2012年8月 (査読有り)

2. Komatsuzaki Y, Hatanaka Y, Murakami G, Mukai H, Hojo Y, Saito M, Kimoto T, Kawato S

“Corticosterone induces rapid spinogenesis via synaptic glucocorticoid receptors and kinase networks in hippocampus”

PLoS One 7 e34124 doi: 10.1371/journal.pone.0034124 2012年4月 (査読有り)

3. Ooishi Y, Mukai H, Hojo Y, Murakami G, Hasegawa Y, Shindo T, Morrison JH, Kimoto T, Kawato S

“Estradiol rapidly rescues synaptic transmission from corticosterone-induced suppression via synaptic/extranuclear steroid receptors in the hippocampus”

Cerebral Cortex 22(4) 926-936 doi: 10.1093/cercor/bhr164 2012年4月 (査読有り)

4. Mukai H, Hatanaka Y, Mitsuhashi K, Hojo Y, Komatsuzaki Y, Sato R, Murakami G, Kimoto T, Kawato S

“Automated analysis of spines from confocal laser microscopy images: application to the discrimination of androgen and estrogen effects on spinogenesis”

Cerebral Cortex 21(12) 2704-2711 doi: 10.1093/cercor/bhr059 2011年12月 (査読有り)

[学会発表](計4件)

1. Mukai H., Hatanaka Y., Mitsuhashi K., Murakami G., Hojo Y., Kawato S.

“Mathematical and automated analysis of dendritic spines from confocal laser microscopy images”

The 42th annual meeting of the Society for Neuroscience (第42回北米神経科学学会年会) 2012年10月13-17日、ニューオーリンズ国際会議場、アメリカ

2. 向井秀夫、畑中悠佑、三橋賢司、村上元、北條泰嗣、川戸佳

『新規な神経スパイン解析プログラム』
第50回日本生物物理学会年会、2012年09月

24日、名古屋大学

3. 向井秀夫、篠崎吏那、村越隆之
『前部帯状回皮質における神経振動の誘導法の検討』

2012年度包括脳夏のワークショップ、2012年07月24-27日、仙台国際センター

4. 向井秀夫、畑中悠佑、三橋賢司、北條泰嗣、川戸佳

“Automated analysis of spines from confocal laser microscopy images: application to the discrimination of androgen and estrogen effects on hippocampal neurons”

第34回日本神経科学大会、2011年9月14-17日、パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

向井 秀夫 (MUKAI HIDEO)
埼玉医科大学・医学部・助教
研究者番号：20534358

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし