

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 21 日現在

機関番号：32696

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500466

研究課題名(和文)膜電位イメージングと生体染色による脳幹神経回路網形成における脱分極波の役割の解明

研究課題名(英文)Optical analysis of significance of the depolarization wave to the brainstem neural circuit formation

研究代表者

佐藤 勝重 (Sato, Katsushige)

駒沢女子大学・公立大学の部局等・教授

研究者番号：80291342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：個体発生過程において、中枢神経系の神経回路網が形成されるプロセスは、神経系の機能的構築を理解する上で、重要な問題である。我々は、膜電位の光学的イメージング法をマウス胎仔の脳幹 脊髄標本に適用し、大脳から脊髄にいたる中枢神経系に広範に伝播する脱分極波が自発性に起こることを見いだした。この自発性脱分極波は中枢神経系においてリズムカルに出現し、そのペースメーカーの位置および数が個体発生に伴ってダイナミックに変化することが明らかとなった。脱分極波は、中枢神経系のシナプス伝達を開始され、神経回路網が成熟していく時期に一致して特異的に出現することから、神経回路網形成に重要な役割を果たしていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Spontaneous embryonic movements, called embryonic motility, are produced by correlated spontaneous activity in the cranial and spinal nerves, which is driven by brainstem and spinal networks. Using optical imaging with a voltage-sensitive dye, we have revealed previously in the chick and rat embryos that this correlated activity is a widely propagating wave of neural depolarization, which we termed the depolarization wave. One important consideration is whether a depolarization wave with similar characteristics occurs in other species, especially in different mammals. Here, we provide evidence for the existence of the depolarization wave in the mouse embryo by summarizing spatiotemporal characteristics and pharmacological natures of the widely propagating wave activity. The findings show that a synchronized wave with common characteristics is expressed in different species, suggesting its fundamental roles in neural development.

研究分野：神経生理学

キーワード：optical recording voltage-sensitive dye brainstem functiogenesis depolarization wave neural circuit formation embryo spontaneous activity

1. 研究開始当初の背景

個体発生の過程において、中枢神経系を構成するニューロン群が神経回路網を形成していくプロセスは、神経系の機能的構築を理解する上で、最も基本的な問題の一つである。脳幹は、体性・自律性感覚系、体性・自律性運動系、さらに循環・呼吸に関連した自発活動など、生命活動に関わる多くの情報が直接入・出力し、処理・統合される重要な領域である。これまでの解剖学的・組織学的解析により、脳幹内には数多くの神経核が同定され、それらの間の構造的なつながりもかなり明らかになってきている。しかしながら、これらの神経回路網が、機能的にはどのように形成され成熟していくのかは、あまり解明されていない。脳幹では、末梢からの情報の伝達回路と、脳幹に内在する自発興奮の伝達回路とが混在しており、これらは互いに影響をおよぼし合いながら機能的に形成・調節されていることが推察される。中枢神経系では、発生過程において、シナプス結合はいったん過形成され、後に refinement されることが知られているが、この過程に自発興奮が重要な役割を果たしていることが示唆されており、脳幹内神経回路網の機能形成過程を明らかにすることは、中枢神経系における神経回路網形成の基本原則を明らかにすることにつながると考えられる。

我々は、脳幹の機能的構築・形成過程を明らかにする目的で、膜電位の光学的イメージング法を発生初期胚に適用し、脳神経刺激に対する脳幹内での応答あるいは自発興奮活動について、三次元的機能構築という観点から解析を行ってきた。この光学的イメージング法は、未分化で脆弱なニューロンの電位活動を非侵襲的に多数領域から同時記録し、その機能マッピング/機能イメージングを行えるという他の測定法にはない利点を有している。これまでに、鶏胚、ラット胚の脳幹標本、あるいは全脳一脊髄標本を用いて、自律感覚系入力（舌咽神経、迷走神経）、体性感覚系入力（嗅神経、視神経、三叉神経、内耳神経）に関して、一時中継核や二次中継核を同定し、それらの developmental な機能形成過程を明らかにしてきた。これまでに得られた成果は、海外学術誌からの依頼により総説としてまとめられている（Momose-Sato et al.: Prog. Neurobiol. 63, 2001; Momose-Sato and Sato: Auto. Neurosci. 126-127, 2006; Sato and Momose-Sato: Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 35, 2008; Glover, Sato and Momose-Sato: Dev. Neurobiol. 68, 2008; Momose-Sato et al.: Membrane Potential Imaging in the Nervous System, 2010; Momose-Sato and Sato: Resp. Physiol. Neurobiol, 2011, Frontiers Cell. Neurosci.,

2013）。

一方その研究過程で、鶏胚中枢神経系において脳神経・脊髄神経を介した外来性入力、あるいは中枢神経系内に内在する自発興奮活動によって、大脳から脊髄にいたる中枢神経系のほぼ全領域にわたって広範に伝播するユニークな脱分極波 (depolarization wave) が誘発され、それに引き続き、Ca wave が引き起こされることを見いだした。この depolarization wave は、脳幹において神経核内のシナプス伝達を開始され、神経回路網が成熟していく時期に一致して特異的に出現することから、脳幹回路網形成に重要な役割を果たしていると考えられる。またこれまでの研究で、自発性脱分極波が中枢神経系においてリズムカルに出現すること、そのペースメーカーの位置および数が個体発生に伴ってダイナミックに変化することが明らかとなった（Momose-Sato et al.: Eur. J. Neurosci. 25, 2007）。さらに、この depolarization wave は、鶏胚に限ってみられる現象ではなく、ラット胚やマウス胚においても観察されることが明らかとなって（Momose-Sato et al.: J. Neurophysiol. 94, 2005）、その機能解明に遺伝子改変動物が使えるなど、これからまさに新しい展開を迎えるに至っている。

2. 研究の目的

中枢神経機能の理解の進展のためには、ひとつひとつの神経細胞、シナプスの機能の解明を解明し、中枢神経全体の理解につなげることが不可欠であるが、このようなミクロな構成要素からの要素還元論的理解に加えて、神経回路全体を見渡したマクロな観点からの理解が当研究の目的の一つである。本研究では、光学的イメージング法を主な手法として、複雑な神経回路網の機能を個体発生学的側面にそって、比較的単純な系から複雑な系へ解析を行い、「機能発生・形成」を新たな観点から解明することを目的としている。具体的には研究対象を鳥類から哺乳類に広げ、光学的イメージング法を用い、脳幹神経回路網の形成の時空間的ダイナミズムの解明と、depolarization wave の神経回路網形成における役割の解明を2つの中心課題として研究を推進してきた。このうち、本研究では、主に に関して集中的に解析を進めた。

3. 研究の方法

(1)実験材料：哺乳類胚（ラット・マウス）での解析を中心に、必要に応じて鶏胚を用いた系に立ち戻り比較を行った。具体的には、ラット胚（胎生 12～17 日）およびマウス胚（胎生 10～15 日）を主な対象とし、各脳神経をつけたままの脳幹標本および摘出全脳一脊髄標本を作成した。

(2)膜電位感受性色素による染色法：我々がこれまでに行った色素のスクリーニングで、初期胚神経系の活動を記録するには、親水性色素 NK2761 が最適であることを見だしている。本研究でも、NK2761 を含む溶液中に標本を浸して、標本全体を染色した。

(3)生理学的計測：光学的計測には、現有の光学的 464/1020 チャンネル同時測定システムを用い、脳幹内の 464~1020 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。集合活動電位の電気生理学的測定では、脳神経(主に N. X)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 (Bioelectric Amplifier) を経て、コンピュータに記録した。

(4)形態学的観察：カーボシアニン系蛍光色素によるニューロンの標識をおこなった。具体的には、標本を paraformaldehyde で固定した後、各脳神経に Dil 等の色素の小結晶を埋め込むか、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ーで切片を作製し、蛍光顕微鏡で検鏡した。

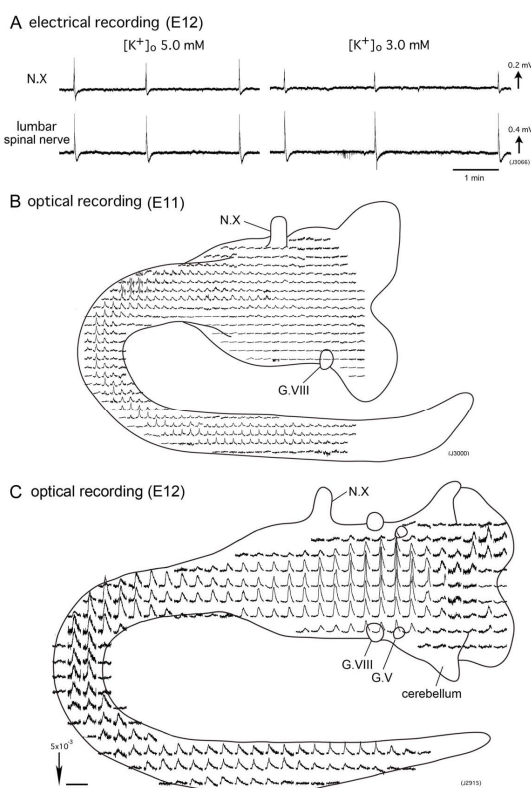
4. 研究成果

主な研究成果である、マウス胎仔の中枢神経標本を用いた depolarization wave の解析結果について報告する。

(1) 広範囲に広がる自発性神経活動の検出

広範囲に伝搬する脱分極波が、マウス胎仔においても自発性に起こるかを、まず集合活動電位の電気生理学的測定法を用いて検討した。図 1A は 12 日目のマウス胎仔から作成した脳幹-脊髄標本において、迷走神経と腰部脊髄神経からの集合活動電位を同時記録した例である。外液のカリウムイオン濃度を 5.0mM にした場合も 3.0mM にした場合にも、両神経からは同期した神経活動が記録された。これは、両神経にまたがる広範囲に広がる神経活動が存在することを示唆している。

次に、広範囲に広がる自発性の神経活動が存在することをさらに確かめるために、光学的測定法を用いて実験を行った。図 1B および C は、それぞれ 11 日および 12 日目のマウス胎仔から作成した脳幹-脊髄標本を、吸光膜電位感受性色素 NK2761 (0.2mg/ml) で 10 分間染色し、1020 チャンネル同時測定システムを用いた自発性興奮の記録例である。どちらの発生段階においても、脳幹から脊髄の広範囲に広がる自発性の神経活動が記録された。同様の神経活動は、13 日目のマウス胎仔から作成した脳幹-脊髄標本においても記録された。



【図 1】11 および 12 日目のマウス胎仔から作成した脳幹-脊髄標本において、広範囲に記録された自発性神経活動の測定例。A では電気生理学的測定法、B では光学的測定法を用いた。

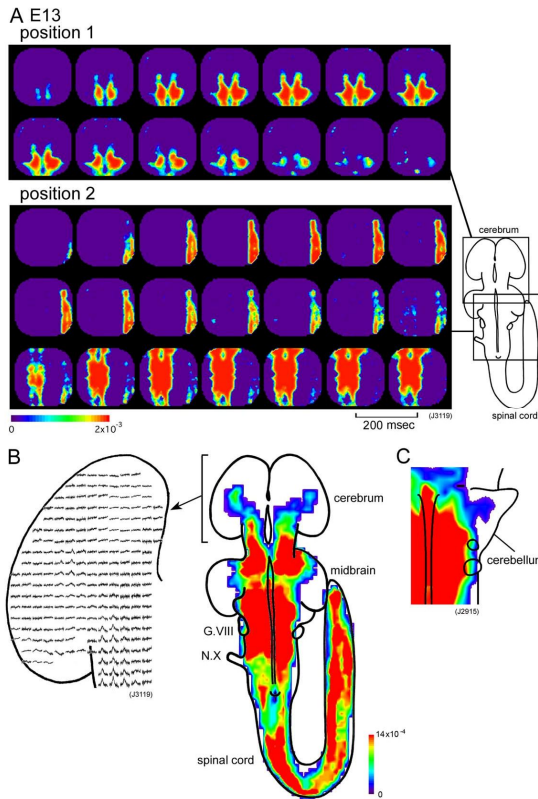
(2) 自発性神経活動の伝搬

広範囲に記録された自発性の神経活動の伝搬パターンをみるために、光学シグナルの大きさをコンピュータで計測し、疑似カラー表示した。図 2 は胎仔 13 日目のマウス脳幹-脊髄標本において記録された自発性神経活動を疑似カラー表示した例である。シグナルの大きさの大きい領域を赤色、小さい領域を青色で示した。

この図から、広範囲に記録された自発性の神経活動は、大脳、小脳から脳幹、脊髄に至る中枢神経系全体で観察され、全領域が一度に同時に活動し始めるのではなく、ある領域から始まって中枢神経系全体に伝搬していくことが明らかとなった。同様の現象は、胎仔 11 および 12 日目のマウス脳幹-脊髄標本においても観察された。このことから、マウス胎仔の脳幹-脊髄標本で広範囲に記録された自発性の神経活動は、伝搬性であることが示された。我々は、これを spontaneous depolarization wave と名付けた。

(3) 自発性神経活動の起源の同定

次に、spontaneous depolarization wave の起源の同定を行った。図 3 は胎仔 12 日目のマウス脳幹-脊髄標本において記録された自発性神経活動を疑似カラー表示し、その伝搬パターンを時系列で示した図である。



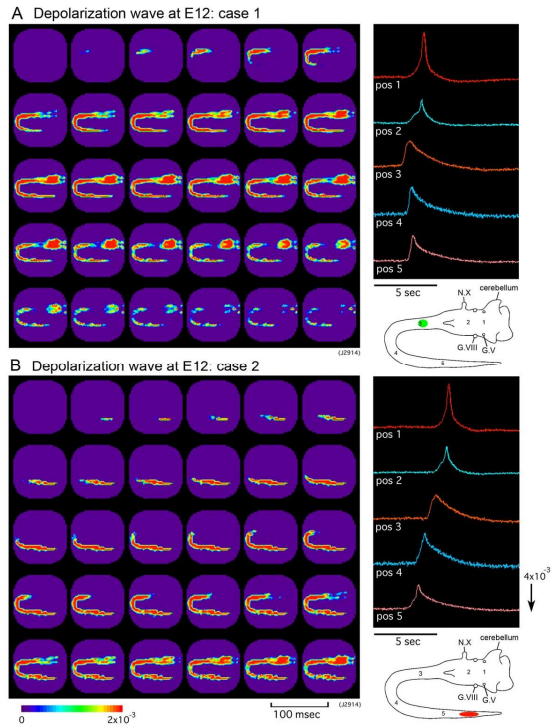
【図2】胎仔13日目のマウス脳幹-脊髄標本において記録された自発性神経活動の疑似カラー表示。Aでは、四角で囲んだ標本上の2カ所の領域で光学計測を行い、疑似カラー表示した。Bでは中枢神経系全体での疑似カラー表示と大脳領域での光学シグナルの波形を示した。Cでは小脳領域でのシグナルの広がり拡大して表示した。

図3のA, Bは同じ標本からの記録であるが、A(case 1)では、spontaneous depolarization waveは頸髄から起きているのに対して、B(case 2)では、腰髄から起きていることが示された。この様に、光学シグナルの大きさを疑似カラー表示することによって、depolarization waveの起源を同定することが可能であった。

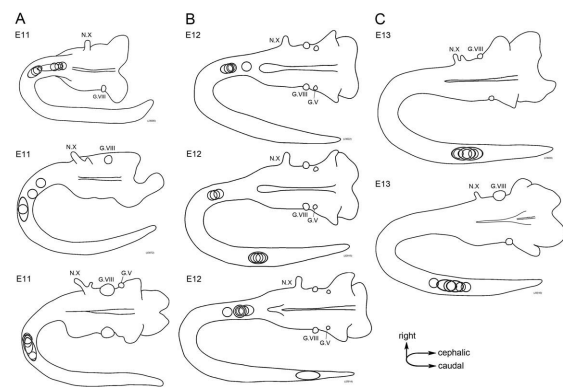
(4) 自発性神経活動の起源の個体発生に伴う変化

マウスの各発生段階における spontaneous depolarization waveの起源を同定し、その変化を解析した。図4は、胎仔11-13日目のマウス脳幹-脊髄標本において記録された spontaneous depolarization waveの起源をマッピングした図である。

各発生段階において、標本ごとに多少差異はみられたが胎仔11日目の標本では、waveは頸髄から起こり、胎仔12日目の標本では、waveは頸髄と腰髄の両方から発生し、胎仔13日目の標本では、すべて腰髄から起こるようになった。このことから、spontaneous depolarization waveの起源は個体発生に伴ってダイナミックに変化することが明らかとなった。これまでの鶏胚やラット胎仔で行っ



【図3】胎仔12日目のマウス脳幹-脊髄標本において記録された spontaneous depolarization waveの疑似カラーマッピング。シグナルの伝搬パターンを時系列で示した。それぞれの図の右側には、標本上の5カ所で得られた光学シグナルを拡大表示してある。A(case 1)では、spontaneous depolarization waveは頸髄(緑色の部位)から起きているのに対して、B(case 2)では、腰髄(赤色の部位)から起きている。



【図4】胎仔11-13日目のマウス脳幹-脊髄標本において記録された spontaneous depolarization waveの起源のマッピング。胎仔11, 12, 13日目の発生段階で、それぞれ3, 3, 2例のマッピングを表示した。各標本において、waveの起源を丸で示してある。

た実験でも同様の傾向が観察されており、これは種を超えた現象であることが示唆された。

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 12 件)

- (1) Mullah, S. H.-E.-R., Inaji, M., Nariai, T., Momose-Sato, Y., Sato, K. and Ohno, K. (2012) Optical analysis of developmental changes in synaptic potentiation in the neonatal rat corticostriatal projection. **Neuroscience** 201, 338-348. (査読有)
- (2) Momose-Sato, Y., Nakamori, T. and Sato, K. (2012) Spontaneous depolarization wave in the mouse embryo: origin and large-scale propagation over the CNS identified with voltage-sensitive dye imaging. **European Journal of Neuroscience** 35, 1230-1241. (査読有)
- (3) Momose-Sato, Y., Nakamori, T. and Sato, K. (2012) Pharmacological mechanisms underlying the switching from the large-scale depolarization wave to segregated activity in the mouse CNS. **European Journal of Neuroscience** 35, 1242-1252. (査読有)
- (4) 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)
- (5) Nakamori, T., Maekawa, F., Sato, K., Tanaka, K. and Ohki-Hamazaki, H. (2013) Neural basis of imprinting behavior in chicks. **Development Growth and Differentiation** 55, 198-206. (査読有)
- (6) Momose-Sato, Y. and Sato, K. (2013) Optical imaging of the spontaneous depolarization wave in the mouse embryo: Origins and pharmacological natures. **Annals of the New York Academy of Sciences** 1279, 60-70. (査読有)
- (7) Momose-Sato, Y. and Sato, K. (2013) Large-scale synchronized activity in the embryonic brainstem and spinal cord. **Frontiers in Cellular Neuroscience** 7, Article 36, 1-15. (査読有)
- (8) Mullah, S. H.-E.-R., Komuro, R., Yan, P., Hayashi, S., Inaji, M., Momose-Sato, Y., Loew, L. M. and Sato, K. (2013) Evaluation of voltage-sensitive fluorescence dyes for monitoring neuronal activity in the embryonic central nervous system. **Journal of Membrane Biology** 246, 679-688. (査読有)
- (9) Momose-Sato, Y. and Sato, K. (2014) Maintenance of the large-scale depolarization wave in the embryonic chick brain against deprivation of the rhythm generator. **Neuroscience**, 266, 186-196. (査読有)
- (10) Momose-Sato, Y. and Sato, K. (2014) Optical survey of initial expression of synaptic function in the embryonic chick trigeminal sensory nucleus. **Neuroscience Letters** 570, 92-96. (査読有)
- (11) 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)
- (12) 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 (5 pages). (査読有)

〔学会発表〕(計 24 件)

- (1) Sato, K. and Momose-Sato, Y. Voltage-sensitive dye imaging of the spontaneous depolarization wave in the embryonic mouse CNS: Origins and pharmacological natures. Cellular and Network Functions in the Spinal Cord. May 22-25, 2012, University of Wisconsin-Madison, USA. [An invited speaker of the conference organized by Ziskind-Conhaim, L.]
- (2) Momose-Sato, Y., Tashiro, Y., Nakamori, T., Mullah, S. H.-E.-R. and Sato, K. Effects of *in ovo* blockade of the spontaneous depolarization wave on functional synaptogenesis in the embryonic brainstem nucleus. Society for Neuroscience 42nd Annual Meeting. October 13-17, 2012, New Orleans, USA.
- (3) Mullah, S. H.-E.-R., Inaji, M., Nariai, T., Urmay, J., Momose-Sato, Y., Ohno, K. and Sato, K. Developmental changes in the LTP in the neonatal rat corticostriatal projection: Optical imaging with a voltage-sensitive dye. Society for Neuroscience 42nd Annual Meeting October 13-17, 2012, New Orleans, USA.
- (4) Momose-Sato, Y. and Sato, K. Membrane potential imaging during functional development of neuronal circuits in vertebrate embryos. XXXVII International Congress of Physiological Sciences (IUPS 2013) July 21-26, 2013, Birmingham, UK.
- (5) Sato, K. and Momose-Sato, Y. Large-scale correlated wave in the embryonic mouse CNS: Development, origins and pharmacological natures. XXXVII International Congress of Physiological Sciences (IUPS 2013) July 21-26, 2013, Birmingham, UK.
- (6) Mullah, S. H.-E.-R., Komuro, R., Yan, P., Inaji, M., Urmay, J., Momose-Sato, Y., Loew, L. M. and Sato, K. Evaluation of voltage-sensitive fluorescence dyes for monitoring neuronal activity in the embryonic CNS. Society for Neuroscience 43rd Annual Meeting November 9-13, 2013, San Diego, USA.
- (7) Nakamori, T., Sato, K., Kinoshita, M., Tanaka, K. and Ohki-Hamazaki, H. Visual imprinting in chicks requires activation of highly-expressed NR2B-containing NMDA receptors in the neural circuit of the hyperpallium. Avian Model Systems March 5-8, 2014, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, USA.
- (8) Sato, K. and Momose-Sato, Y. Optical survey of initial expression of synaptic function in the embryonic chick trigeminal sensory nucleus. Society for Neuroscience 44th Annual Meeting November 15-19, 2014, Washington DC, USA.
- (9) Momose-Sato, Y. and Sato, K. Maintenance of the large-scale depolarization wave in the embryonic chick brain against deprivation of the rhythm

- generator. Society for Neuroscience 44th Annual Meeting November 15-19, 2014, Washington DC, USA.
- (10) Momose-Sato, Y., Nakamori, T., Mullah H.-E-R. S. and Sato, K. (2012) From embryonic correlated activity to the respiratory and locomotor rhythms: pharmacological mechanisms underlying the switching. The 35th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society Abstract, P4-c06.
- (11) Sato, K., Mullah H.-E-R. S., Inaji, M., Nariai, T., Momose-Sato, Y. and Ohno, K. (2012) Optical analysis of developmental changes in the LTP in the neonatal rat corticostriatal projection. The 35th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society Abstract, P4-c08.
- (12) Nakamori, T., Kinoshita, M., Sato, K., Tanaka, K. and Ohki-Hamazaki, H. (2012) NR2B activation is a first phase of juvenile learning. The 35th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society Abstract, P3-a10.
- (13) Momose-Sato, Y., Tashiro, Y., Nakamori, T., Mullah H.-E-R. S. and Sato, K. (2013) Effects of *in ovo* blockade of the spontaneous depolarization wave on functional synaptogenesis in the embryonic NTS. Journal of Physiological Sciences 63 suppl. 1, S127.
- (14) Sato, K., Mullah H.-E-R. S., Inaji, M., Nariai, T., Momose-Sato, Y. and Ohno, K. (2013) Developmental changes in the LTP in the neonatal rat corticostriatal projection: Optical imaging with the voltage-sensitive dye. Journal of Physiological Sciences 63 suppl. 1, S127.
- (15) Momose-Sato, Y., Tashiro, Y. and Sato, K. (2013) Effects of *in ovo* blockade of the spontaneous depolarization wave on functional synaptogenesis in the developing CNS. The 36th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society Abstract, P1-2-44.
- (16) Nakamori, T., Nagashima, R., Ohki-Hamazaki, H. and Sato, K. (2013) Mechanism of feeding regulation by glucose in the ventromedial hypothalamic nucleus in chick. The 36th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society Abstract, P1-2-143.
- (17) Sato, K. and Momose-Sato, Y. (2014) Optical survey of initial expression of synaptic function in the embryonic chick trigeminal sensory nucleus. Journal of Physiological Sciences 64 suppl. 1, S146.
- (18) Momose-Sato, Y. and Sato, K. (2014) Homeostatic maintenance of the large-scale depolarization wave in the developing central nervous system. Journal of Physiological Sciences 64 suppl. 1, S142.
- (19) Sato, K. and Momose-Sato, Y. (2014) Voltage-sensitive dye imaging of neural activities in the embryonic central nervous system. Journal of Physiological Sciences 64 suppl. 1, S87.
- (20) Sato, K. and Momose-Sato, Y. (2014) Optical identification of initial expression of synaptic function in the embryonic chick trigeminal sensory nucleus. The 37th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society Abstract, P2-099.
- (21) Momose-Sato, Y. and Sato, K. (2014) Homeostatic maintenance of the large-scale depolarization wave in the developing CNS. The 37th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society Abstract, P2-100.
- (22) Nakamori, T., Sato, K., Kinoshita, M., Tanaka, K. and Ohki-Hamazaki, H. (2014) NR2B-dependent neural plastic changes constitute the initial step of juvenile learning. The 37th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society Abstract, P1-267.
- (23) Momose-Sato, Y. and Sato, K. (2015) Optical mapping of vagus nerve-related brainstem nuclei in the mouse embryo. Journal of Physiological Sciences 65 suppl. 1, S130.
- (24) Sato, K. and Momose-Sato, Y. (2015) Functiogenesis of the embryonic CNS revealed by multiple-site optical recording with a voltage-sensitive dye. Journal of Physiological Sciences 65 suppl. 1, S77.
- 〔図書〕(計 1 件)
- (1) Momose-Sato, Y., Sato, K. and Kamino, K. 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 & Bernus, O. Springer-Verlag, New York, in press.
- 〔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