

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700316

研究課題名(和文) 大脳皮質自発活動における自発的ベシクル放出の役割の解明

研究課題名(英文) The role of spontaneous vesicular release during spontaneous activities of cerebral cortex

研究代表者

関谷 敬 (Sekiya, Hiroshi)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40511374

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：覚醒時も睡眠時も脳は常に活動しており、この自発活動は脳機能に重要であるが、まだ十分には解明されていない。本研究では、自発活動の1つである除波振動に注目し、この仕組みの解明を目的とした。マウス大脳皮質に徐波振動を誘導し、電気生理学的手法や蛍光カルシウムイメージング法を用いて徐波振動を捉えるとともに、蛍光グルタミン酸イメージング法を応用した。これにより、除波振動において大脳皮質がSilent状態からActive状態へ移行するメカニズムに重要だと考えられている細胞外グルタミン酸濃度を捉え、その細胞外動態を解析した。

研究成果の概要(英文)：The brain is continuously active during sleep and wakefulness even in the absence of external stimuli. Although the spontaneous activities are thought to play key roles in working memory and sensory processing, it remains elusive how these activities are generated. One of the most prominent and widely studied spontaneous activities is slow oscillation. In this project we challenged to elucidate the mechanism of slow oscillation. We induced slow oscillation in cerebral cortex of mice. Using glutamate imaging method in combination with electrocorticography and calcium imaging, we have succeeded in detecting the dynamics of extracellular concentration of glutamate in the cerebral cortex when the neurons of the cortex switch between silent and active states.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

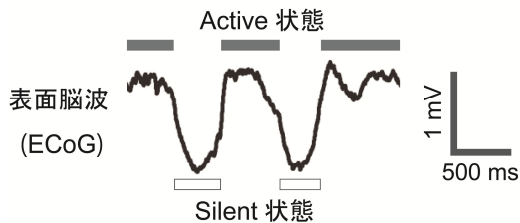
キーワード：大脳皮質 自発活動 ニューロン グルタミン酸

1. 研究開始当初の背景

外界からの刺激によらず、脳が活発な自発活動を行うことは、脳波などの研究から古くより知られている。従来は、この自発活動は意味を持たないノイズと解釈されてきた。しかし、レム睡眠中の自発活動が、海馬に蓄えられた記憶を大脳皮質に書き込むことや、視覚刺激を与えた際の脳の活動と同じ活動が、自発活動中にも見られることなどから、現在では、自発活動は脳の重要な働きであり、自発活動の機序を解明することが、脳機能の解明に重要であると考えられている。

最もよく研究されている自発活動は、ノンレム睡眠中および麻酔下でみられる徐波振動(Slow Oscillation)である⁽¹⁾。この徐波振動は、大脳皮質内から発生することが知られ、全ての神経細胞が活動電位を出さない Silent 状態と、多くの神経細胞が活動電位を出す Active 状態を 0.2 ~ 1 Hz 程度の周期で交互にとる(図1)。この Active 状態が、覚醒時の

図1: 徐波振動 (Slow Oscillation)



自発活動と似た特性を持つため、Active 状態への移行が解明されれば、覚醒時の自発活動の機序の解明にも繋がると考えられる。しかしながら、大脳皮質の神経細胞は自発的に活動電位を出す特性を持たないにもかかわらず、外部からの入力がなくとも徐波振動は起こるため、神経細胞の活動電位によるシナプス出力が、次の神経細胞に活動電位を起こすという現在の知見では、全ての神経細胞が活動電位を出さない Silent 状態から、Active 状態に一斉に移行することは説明できない。

この問題に対し、シナプスにおける、活動電位によらない自発的神経伝達物質放出(ミニチュア)によるグルタミン酸放出が Active 状態への移行を担うことが提唱されてきた⁽²⁾。しかしながら、電気生理学的手法では、非常に限られた数の神経細胞でしかミニチュアを測定できず、また、多数の細胞を捉える蛍光 Ca^{2+} イメージング法では、神経終末の細胞内カルシウム濃度が上昇しないミニチュアは測定が難しいなどの理由により、徐波振動における Active 状態への移行の仕組みはまだ十分には明らかにされていない。

- 1) Crunelli.V. et al. (2010) Nat. Neurosci.
- 2) Bazhenov.M. et al. (2002) J. Neurosci.

2. 研究の目的

本研究では、徐波振動における Active 状態への移行の仕組みの解明を目的とした。マウス大脳皮質に徐波振動を誘導し、電気生理学的手法や蛍光 Ca^{2+} イメージング法を用いて

徐波振動を捉えるとともに、蛍光グルタミン酸イメージング法を応用することで、大脳皮質が Silent 状態から Active 状態へ移行する際の細胞外グルタミン酸濃度が、どのようにに変化するかを解析した。

3. 研究の方法

(1) 脳波による徐波振動の計測
マウスの大脳に固定したネジ電極により表面脳波を捉え、徐波振動時の Active 期への移行タイミングを捉える。

(2) 持続的な徐波振動を誘導
麻酔薬 Ketamine をシリンジポンプを用いて持続的に皮下投与することにより、数時間にわたり徐波振動を安定して誘導する。

(3) 神経活動を捉え、徐波振動を可視化
神経細胞に導入した Ca^{2+} インジケータの蛍光強度の変化を、蛍光実体顕微鏡 M165FC (Leica) および二光子励起顕微鏡 LSM7MP (Carl Zeiss)を用いて可視化し、大脳皮質における徐波振動を捉える。

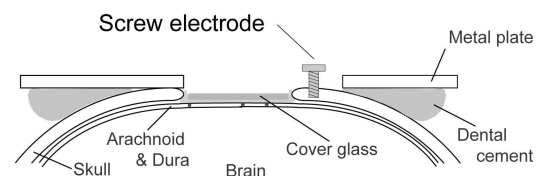
(4) 徐波振動時のグルタミン酸動態の可視化
徐波振動時の大脳皮質にグルタミン酸インジケータを導入し、細胞外グルタミン酸動態を可視化する。

(5) 脳波とイメージングの同時計測
マウス大脳において、脳波用電極と、イメージング用観察窓を共存させることで、脳波とイメージングの同時計測を行う。これにより、脳波により Active 状態への移行タイミングを捉えておき、 Ca^{2+} イメージングによる神経活動や、グルタミン酸イメージングによる細胞外グルタミン酸動態を比較する。

4. 研究成果

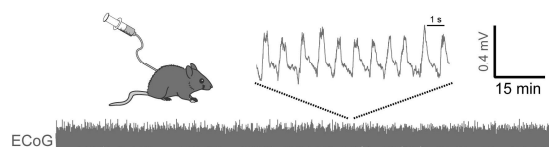
(1) 脳波による徐波振動の計測
M0.5x0.6 の微小ネジを用いたマウス大脳における手術法および脳波計測法を確立した(図2)。

図2: 微小ネジ電極による脳波計測



(2) 持続的な徐波振動を誘導
麻酔薬 Ketamine の腹腔投与と皮下投与を

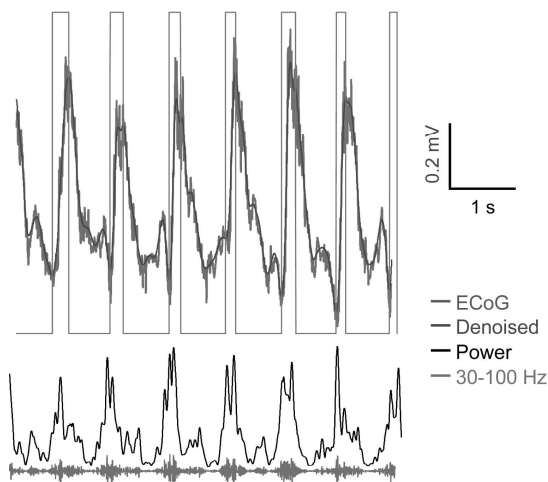
図3: 安定した徐波振動



組み合わせることで、数時間にわたり安定した徐波振動を誘導する麻薬持続注入システムを確立した(図3)。

徐波振動が安定することにより、簡易なプログラムによる自動認識等を行うことが出来るようになり、従来自発活動では難しかった加算平均等を用いた詳細な解析を行うことに成功した(図4)。

図4：徐波振動の状態検出

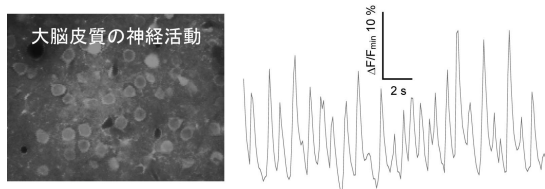


(3) 神経活動を捉え、徐波振動を可視化

大脳皮質に誘導した徐波振動を、神経細胞に導入した Ca^{2+} インジケータの蛍光強度変化により、二光子励起顕微鏡 LSM7MP (Carl Zeiss)を用いて可視化した(図5)。

これにより、大脳皮質各 Layer における神経細胞の Ca 活動を高い空間解像度で捉える事ができるようになった。

図5：Cal-520 による徐波振動の可視化



(4) 徐波振動時のグルタミン酸動態の可視化

従来のグルタミン酸インジケータ⁽³⁾を改良し、徐波振動の測定に最適化することに成功した。インジケータの導入を神経細胞膜上に選択的に結合するタンパク質を用いて行うことで、組織ダメージを低減し、かつ簡便に行うことが可能になった。さらにインジケータにポリエチレングリコール構造を付加する PEG 化を行うことで、大脳皮質においてインジケータが安定化し、長時間の測定が可能になるという結果が得られた。

3) Namiki.S. et al. (2007) Eur J Neurosci.

(5) 脳波とイメージングの同時計測

脳波を捉えながら同時にイメージングを行うことで、Active 状態への移行タイミングでの Ca^{2+} イメージングによる神経活動や、グ

ルタミン酸イメージングによる細胞外グルタミン酸動態の可視化に成功した。

感覚刺激時等の覚醒時の大脳皮質では、 Ca^{2+} シグナルと細胞外グルタミン酸動態は一致する結果が得られているが、徐波振動時における Active 状態への移行タイミングでは、 Ca^{2+} シグナルと細胞外グルタミン酸動態は一致しておらず、 Ca^{2+} シグナルが遅れてピークを迎えるという結果が得られた。

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1件)

Kanemaru K, Kubota J, Sekiya H, Hirose K, Okubo Y and Iino M. Calcium-dependent N-cadherin up-regulation mediates reactive astrogliosis and neuroprotection after brain injury. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (査読有り) 110, 11612-11617, 2013.

DOI: 10.1073/pnas.1300378110

〔学会発表〕(計8件)

北島 奈美、関谷 敬、金丸 和典、田中 謙二、飯野 正光、大脳皮質における血管平滑筋 Ca イメージング、第 87 回日本薬理学会年会、2014 年(平成 26 年)3 月 21 日、東北大学川内萩ホール、仙台国際センター(宮城県)

佐藤 要、関谷 敬、瀧川 健司、坂本 寛和、有吉 哲郎、並木 繁行、田中 謙二、廣瀬 謙造、飯野 正光、大脳皮質における細胞外 ATP の in vivo 蛍光イメージング、第 87 回日本薬理学会年会、2014 年(平成 26 年)3 月 19 日東北大学川内萩ホール、仙台国際センター(宮城県)

北島 奈美、関谷 敬、金丸 和典、田中 謙二、飯野 正光、大脳皮質における血管平滑筋 Ca イメージング、平成 25 年筋生理の集い、2013 年(平成 25 年)12 月 21 日、慈恵医大・高木会館(東京都)

関谷 敬、北島 奈美、佐藤 要、田中 謙二、飯野 正光、蛍光 Ca プローブを発現するトランスジェニックマウスを用いた脳血流制御機構の可視化解析、第 23 回日本循環薬理学会、2013 年(平成 25 年)12 月 6 日、福岡大学メディカルホール(福岡県)

佐藤 要、関谷 敬、瀧川 健司、坂本 寛和、並木 繁行、廣瀬 謙造、飯野 正光、大脳皮質における細胞外 ATP の in vivo 蛍光イメージング、第 129 回日本薬理学会関東部会、2013 年(平成 25 年)10 月 19 日、順天堂大学本郷キャンパス(東京都)

関谷 敬、坂本 寛和、並木 繁行、廣瀬 謙

造、飯野 正光、大脳皮質におけるグルタミン酸蛍光イメージング、生理研研究会「超階層シグナル伝達研究の新展開」、2012年（平成24年）10月2日、岡崎コンファレンスセンター（愛知県）

関谷 敬、坂本 寛和、並木 繁行、廣瀬 謙造、飯野 正光、大脳皮質におけるグルタミン酸蛍光イメージング、第86回日本薬理学会年会、2013年（平成25年）3月21日、福岡国際会議場（福岡県）

関谷 敬、坂本 寛和、並木 繁行、廣瀬 謙造、飯野 正光、大脳皮質におけるグルタミン酸蛍光イメージング、第127回日本薬理学会関東部会、2012年（平成24年）10月20日、東京国際フォーラム（東京都）

〔その他〕

東京大学大学院医学系研究科細胞分子薬理学教室ホームページ

<http://calcium.cmp.m.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関谷 敬 (Sekiya Hiroshi)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40511374

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし