

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 10 月 20 日現在

機関番号：84404

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560230

研究課題名(和文) 神経マイクロマシンと遺伝学的多次元蛍光イメージングによる自律神経細胞動態の解明

研究課題名(英文) A development of neural micromachine and genetic multicolor fluorescent imaging of autonomic nervous system to identify cellular neural dynamics

研究代表者

神谷 厚範 (KAMIYA, ATSUNORI)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・上級研究員

研究者番号：30324370

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：自律神経系は、あらゆる臓器の機能調節や生体恒常性に重要な役割を果たしているが、計測技術の不備のため、神経動態の理解は十分ではない。本研究では、神経マイクロマシン(微小電極アレイ型の神経物理インターフェイス)を試作開発し、末梢神経束内の神経線維個々の電気活動の記録に取り組み、実際に、頸部迷走神経から心臓支配迷走神経活動を記録した。また、臓器内の自律神経活動の記録するための自律神経の遺伝学的な多次元蛍光イメージング技術を試作開発し、実際に、骨格筋内の交感神経活動を生動物(麻酔下)において2光子イメージングし、その神経終末活動を単一神経線維レベルで可視化した。

研究成果の概要(英文)：Although the autonomic nervous system has an critical role in the regulation of functions of any organs and in the maintenance of homeostasis, its dynamics remain unclear because of a lack of measurement technology. In this study, we developed a neural micromachine, a neural physical interface with microelectrode array, challenged to measure an electrical activity of each neural fiber in the peripheral nerve and actually recorded cardiac vagal nerve activity from cervical nerve. In addition, we developed genetic multicolor fluorescent imaging of autonomic nervous system to measure its intra-organic activity, and actually visualized the neural ending activity of each neural fiber of muscle sympathetic nerve in vivo by two-photon microscope imaging technology.

研究分野：複合領域

キーワード：自律神経 生体情報・計測

## 1. 研究開始当初の背景

自律神経系は生命に必須であり、多様な臓器内の生体情報を感知して脳へ送り(神経求心路)、脳情報処理を経て全身の臓器の機能を調節して(神経遠心路)、循環・エネルギー代謝・免疫等の生体恒常性を維持する。一方このため、自律神経系の異常は、多様な難治性疾患と密に関わる。研究チームはこれまでに、多臓器を支配する自律神経(心臓・腎臓・血管等)の電気的同時記録技術を開発し(Circulation 2004 等)、また制御工学のシステム同定を生体に適用した生体システム同定を進め、実際に、循環調節における自律神経の機能構造を工学解析し、さらに自律神経をシステム制御するような自動医療を創出してきた。

ところが小動物における末梢神経の理解には、次のような問題点がある。まず、生きた生体において、臓器特異的な神経活動が一体どのようなものであるかについては、一部の臓器を除いて、理解が不十分である。末梢神経は複数臓器を支配する求心性神経線維や遠心性神経線維の束であるのに、従来の神経測定技術では、神経束全体の記録か、あるいは神経束を切断単離しての記録であるため、線維構成が単一な一部の神経しか記録できない。この技術的な制限のために、一部の臓器を除いて、臓器毎の自律神経活動については理解が不十分である。

次に、各臓器内における神経線維の実際の活動については、ほとんど理解されていない。従来の神経測定技術では、臓器の外で神経活動を測定しているために、臓器の内部における神経活動や、臓器内で神経と神経以外の細胞の関わりの実態については、理解が遅れている。このため、各臓器内における求心性神経の生体情報感知や、遠心性神経の効果器細胞の調節の実像は捉えられていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、これまでの神経測定技術では十分に捉えることの出来なかった、臓器毎の自律神経活動や、臓器内の自律神経活動の測定を目指して、次の研究を目的とする。

神経マイクロマシンによる自律神経の線維別電気活動解析

MEMS 技術を駆使した世界最小レベルのピッチのタングステン微小電極針アレイを神経保護チューブに複数装填した神経物理インターフェイス(神経マイクロマシン)を開発する共に、これを生きた動物の末梢神経に装着し、神経束内の神経線維の個々の活動を記録することを目指す。従来法では記録が困

難だった臓器の自律神経活動(心臓の迷走神経等)の記録に取り組む。

遺伝学的多次元蛍光イメージングによる自律神経の可視化解析

従来の神経測定技術ではまったく測定できていない、各臓器内における神経線維の実際の活動を測定することを目指して、臓器内の自律神経活動を可視化解析する実験系の構築に取り組む。自律神経特異的に遺伝子操作できるラットを独自に開発すると共に、Ca 濃度依存性に緑蛍光を発する Ca プローブタンパク(GCaMP3 等)を自律神経特異的に遺伝子発現させ、臓器内における神経終末の Ca 活動を単一神経線維レベルで可視化することに挑む。

## 3. 研究の方法

神経マイクロマシンによる自律神経の線維別電気活動解析

SD ラット(体重 300-500g)を対象に、吸入麻酔下(ハロセン等)に、頸部皮膚を切開し、頸部の右迷走神経を剖出し、その右迷走神経に微小神経電極アレイ装置(神経マイクロマシン)を装着した。また、右鼠径部皮膚を切開し、右大腿動脈を剖出し、血圧測定用の細径カテーテルを挿入して留置した(ヘパリン処理)。さらに、右大腿静脈を剖出して、薬液投与用の細径カテーテルを挿入して留置した(ヘパリン処理)。その後、切開部分を縫合し、麻酔から覚醒させた。数日後、覚醒下において、頸部迷走神経活動と血圧、心拍数を測定した。さらに、大腿静脈から昇圧剤(フェニレフリン)を投与して、血圧変化に対する迷走神経活動の応答を測定した。

遺伝学的多次元蛍光イメージングによる自律神経の可視化解析

交感神経特異的な遺伝子操作を可能とする遺伝子改変ドライバーラット(DBH-TaCre)を作成した。これを、Ca プローブタンパク(GCaMP3 等)を発現するレポーターラットと交配させて、交感神経特異的に神経 Ca 活動が緑蛍光を発するような動物を作成した。

この動物を対象として、吸入麻酔下(ハロセン等)に、右鼠径部皮膚を切開して右大腿静脈を剖出して、血流を可視化するために、赤色蛍光色素(Texas red 標識デキストラン, Molecular Probes)を適量静脈投与した。さらに、左下肢皮膚を切開して下肢筋を剖出した。2光子顕微鏡(オリンパス)の対物レンズ下に動物を設置して、下肢筋を安定に設置し、イメージング実験を行った。

#### 4. 研究成果

##### 神経マイクロマシンによる自律神経の線維別電気活動解析

頸部迷走神経の活動の大半は、求心性神経に由来すると推察される活動であった。一部に、脈拍同期性のある活動があり、心臓を支配する遠心性の迷走神経活動だと推察された。この活動は、覚醒下において、すべての脈拍に同期しており、また内因性の血圧変化に鋭敏に反応していた。すなわち、血圧が増加すると心臓迷走神経活動は増加し、逆に、血圧が低下すると心臓迷走神経活動は低下した。

次に、昇圧剤（フェニレフリン）を静脈投与すると、平均血圧は150 mmHg以上に増加し、心臓迷走神経活動はこれとほとんど位相遅れなく直ちに増加した。数分して、血圧は低下して基礎値に回復したが、これと平行して心臓迷走神経活動も低下して基礎値に戻った。

心臓迷走神経活動は、心不全では低下するとされ、その神経刺激が治療に有効であるという報告がある。ところが、心臓迷走神経活動を実際に記録したという例はほとんどなく、その実体の理解は遅れている。本研究により、これが予想以上に血圧値と平行した一致した活動動態であることが分かり、循環器病の神経治療の発展に役立つ成果であると思われる。

##### 遺伝学的多次元蛍光イメージングによる自律神経の可視化解析

下肢筋の微小循環の血管の近傍に、緑蛍光の明滅する交感神経活動を測定した。交感神経の単一線維終末の活動は、脈拍同期性があった。交感神経の単一線維終末活動は、驚くべきことに、線維毎に発火時相が異なっており、ある線維は10秒間程度発火し続けて止み、別の線維が発火を始めるといった具合であった。骨格筋を支配する交感神経活動については、これまで臓器外での記録がヒトや動物で行われてきたが、これは（一部を除いて）数千本の線維の総体としての活動であり、また、臓器内で神経活動が記録された前例はない。本研究は、世界ではじめて、臓器内における交感神経の神経終末の活動を可視化したものであり、複数の単一線維終末レベル神経活動の臓器内における時空間動態を記録した。今後の、自律神経科学の発展に寄与する成果である。

#### 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)

すべて査読有り

1. Sata Y, Kawada T, Shimizu S, Kamiya A, Akiyama T, Sugimachi M. Predominant role of neural arc in sympathetic baroreflex resetting of spontaneously hypertensive rats. *Circ J*. 2015;79(3):592-9. doi: 10.1253/circj.CJ-14-1013. (査読有)
2. Yamamoto H, Kawada T, Shimizu S, Kamiya A, Turner MJ, Miyazaki S, Sugimachi M. Acute effects of intravenous nifedipine or azelnidipine on open-loop baroreflex static characteristics in rats. *Life Sci*. 2015 Apr 1;126:37-41. doi: 10.1016/j.lfs.2015.01.024. Epub 2015 Feb 21. (査読有)
3. Sata Y, Kawada T; Shimizu, S, Kamiya, A, Akiyama T. Sugimachi M. Sympathetic Baroreflex Resetting of Spontaneously Hypertensive Rats-Analysis of Open-loop Baroreflex Equilibrium Diagram. *Circ J*. 2015;79(3):592-9. doi: 10.1253/circj.CJ-14-1013. (査読有)
4. Shimizu S, Kawada T, Akiyama T, Turner MJ, Shishido T, Kamiya A, Shirai M, Sugimachi M. Guanfacine enhances cardiac acetylcholine release with little effect on norepinephrine release in anesthetized rabbits. *Auton Neurosci*. 2015 Jan;187:84-7. doi: 10.1016/j.autneu.2014.11.010. (査読有)
5. Shimizu S, Kawada T, Une D, Shishido T, Kamiya A, Sano S, Sugimachi M. Hybrid stage I palliation for hypoplastic left heart syndrome has no advantage on ventricular energetics: a theoretical analysis. *Heart Vessels*. 2014 Nov 29.
6. Kamiya A, Kawada T, Sugimachi M. Systems physiology of the baroreflex during orthostatic stress: from animals to humans. *Frontier Physiol*. 2014 Jul 8;5:256. (査読有)
7. Shimizu S, Akiyama T, Kawada T, Kamiya A, Turner M, Yamamoto H, Shishido T, Shirai M, Sugimachi, M. Medetomidine suppresses cardiac and gastric sympathetic nerve activities but selectively activates cardiac vagus nerve. *Circ J*. 2014;78(6):1405-13. (査読有)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神谷 厚範 (KAMIYA ATSUNORI)  
国立研究開発法人国立循環器病センター  
研究所 上級研究員  
研究者番号：30324370

(2) 研究分担者

杉町 勝 (SUGIMACHI MASARU)  
国立研究開発法人国立循環器病センター  
研究所 部長  
研究者番号：40250261

(3) 連携研究者

小林 和人 (KAZUTO KOBAYASHI)  
公立大学法人福島県立医科大学  
生体情報伝達研究所生体機能研究部門  
教授  
研究者番号：90211903