

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：32666

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670115

研究課題名(和文)近赤外発光による脳深部のin vivo光イメージングシステムの構築

研究課題名(英文)Development of in vivo imaging system from the deep brain using near infrared light.

研究代表者

飯島 典生(iijima, norio)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00285248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,300,000円

研究成果の概要(和文)：ラット脳深部からのルシフェラーゼ発光をAka Lumineを基質としてIVISによる非侵襲的にイメージングすることを目指したが、in vivoはもとより摘出した脳の上部からの検出もできなかった。代ってGFPを特定の神経細胞で発現するトランスジェニックラットを用いて、脳内に挿入した光ファイバー束(200 μ m 直径、3000本)を介してGFP発現細胞のイメージングに成功した。

研究成果の概要(英文)：I was aiming in vivo imaging of rat deep brain in which luciferase was expressed in particular neurons using In Vivo Imaging System (IVIS) with Aka Lumine as a substrate of luciferase. Luciferase-expressing neurons were located in the hypothalamus (10 mm depth from the brain surface). However, no image of luciferase-expressing neurons was able to be captured even if from the top of removed brain. I needed to change experimental plan. I developed a new method for imaging of deep brain using bundle optical fibers (200 mm diameter, 3000 thin fibers were bundled). Clear images of GFP-expressing neurons in the deep brain were able to be captured. The bundle optical fiber was fixed with the cranium, which enable images of GFP-expressing neurons to be retained under free moving condition for several hours. In addition, related to in vivo imaging, I was trying several kinds of experiments, for example anesthetic effect on luciferase-expression in the deep brain.

研究分野：神経解剖学 神経内分泌学

キーワード：in vivoイメージング 脳深部 光ファイバー 無麻酔・非拘束

1. 研究開始当初の背景

脳深部の遺伝子発現や細胞移動の in vivo 光イメージングは神経内分泌、自律神経機能のモニタリングに大きな飛躍をもたらす技術である。しかし従来の D-ルシフェリンを発光基質とする青色～黄緑色発光イメージングでは光の組織透過性が低く、脳深部への適応は困難であった。最近、組織透過性の高い近赤外発光基質(Aka lumine)が開発され、申請者は脳深部への適用を思い至った。

2. 研究の目的

脳深部における神経活動(遺伝子発現など)や注目する物質の動態を、In vivo imaging system (IVIS)を用いて非侵襲的にモニタリング、イメージングすることを目的とした。

3. 研究の方法

時計遺伝子 Per2 プロモーター誘導性の易分解性ルシフェラーゼを発現させたトランスジェニックラット(Per2-dLuc ラット)を用いて、概日時計の中核である視交叉上核(脳表層より約 1cm の深さ)におけるルシフェラーゼ発現を In vivo imaging system (IVIS)を用いて検出を試みた。

4. 研究成果

ラット脳深部(脳表層より約 1 cm 深さ)からのルシフェラーゼ発光を、Aka Lumine を基質として非侵襲的に検出・イメージングすることを目指したが in vivo はもとより、摘出した脳、さらに分割した脳からでも上部からの検出もできなかった。やむなく IVIS による検出を断念して、代って GFP を特定の神経細胞で発現するトランスジェニックラットの脳内に挿入した光ファイバー束(200 μm 直径、3000 本)を介して GFP 発現細胞の蛍光イメージ検出を行った。この手法により単細胞レベルの蛍光イメージングに成功した。無麻酔、非拘束(頭蓋に固定した光ファイバー束を別として)のラットでも一度捕捉した神経細胞の蛍光イメージは、ラットの運動により失われることなく 5 時間ほど安定してイメージングを継続することができた。また in vivo からのイメージングを念頭に、ペプチドホルモンの脳組織への結合、麻酔による脳深部におけるルシフェラーゼ発現の変化等に関する探索研究を行った。

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 9 件)

1. Nagamoto S, Iijima N, Ishii H, Takumi K, Higo S, Aikawa S, Anzai M, Matsuo I, Nakagawa S, Takashima N, Shigeyoshi Y, Sakamoto A, Ozawa H.

Establishment of an in vitro cell line experimental system for the study of inhalational anesthetic mechanisms. *Neurosci Lett.* 620:163-8. doi: 10.1016/j.neulet.2016.04.005., 2016.

2. Higo S., Honda S., Iijima N., Ozawa H. : Mapping of kisspeptin receptor mRNA in the whole rat brain and its co-localization with oxytocin in the paraventricular nucleus. *Journal of Neuroendocrinology*, doi: 10.1111/jne.12356, 2016.
3. Matsuo I., Iijima N., Takumi K., Higo S., Aikawa S., Anzai M., Ishii H., Sakamoto A., Ozawa H. : Characterization of sevoflurane effects on Per2 expression using ex vivo bioluminescence imaging of the suprachiasmatic nucleus in transgenic rats *Neuroscience Research*, pii: S0168-0102(15)00290-4. doi: 10.1016/j.neures.2015.11.010., 2015.
4. Li S., Takumi K., Iijima N., Ozawa H. : The increase in the number of spines on gonadotropin-releasing hormone neuron across pubertal development in rats. *Cell and Tissue Research*, 364(2):405-14. doi: 10.1007/s00441-015-2335-0., 2015.
5. Iijima N., Takumi K., Matsumoto K., Ozawa H. : Visualization of kisspeptin binding to rat hypothalamic nucleus. *Acta Histochem Cytochem.*, 48(6):179-84. doi: 10.1267/ahc.15017, 2015.
6. Takumi K., Shimada K., Iijima N., Ozawa H. : Maternal high-fat diet during lactation increases Kiss1 mRNA expression in the arcuate nucleus at weaning and advances puberty onset in

- female rats. *Neuroscience Research* 100, 21-28, doi: 10.1016/j.neures.2015.06.004. 2015.
7. Higo S., Aikawa S., Iijima N., Ozawa H.: Rapid modulation of hypothalamic Kiss1 levels by the sucking stimulus in the lactating rat. *Journal of Endocrinology*. 227, 105-115, doi: 10.1530/JOE-15-0143. 2015.
8. Kunimura Y., Iwata K., Kobayashi M., Iijima N., Ozawa H.: Effect of sex steroid hormones on the number of raphe nucleus. *Neurosci. Lett.*, 594, 127-132, doi: 10.1016/j.neulet.2015.03.060. 2015
9. Mori K, Iijima N., Higo S, Aikawa S, Matsuo I, Takumi K, Sakamoto A, and Ozawa H. :Epigenetic Suppression of Mouse Per2 Expression in the Suprachiasmatic Nucleus by the Inhalational Anesthetic, Sevoflurane. *PLoS ONE* 9(1): e87319. doi:10.1371/journal.pone.0087319,

〔学会発表〕(計 21 件)

国際学会
シンポジウム

1. Iijima N.: In vivo and real-time monitoring of the deep brain neurons in free moving animals by laser apparatus with optical fiber. The International Congress of Neuroendocrinology 2014, Satellite Symposium, 2014.8 (Sydney)

一般発表

1. Iijima N., Matsumoto K., Ueta Y., Ozawa H.: In vivo and real-time monitoring of GFP-expression neuron in the rat hypothalamus via optical fiber.: The International Congress of Neuroendocrinology 2014. 2014.8 (Sydney)
2. Higo S., Aikawa S., Iijima N., Ozawa H.: Acute modulation of the kiss1 expression in the lactating rat hypothalamus mediated by the suckling stimulus and prolactin.: The International Congress of

Neuroendocrinology 2014. 2014.8 (Sydney)

3. Kunimura Y., Iwata K., Ikehara M., Iijima N., Ozawa H.: Interactions between kisspeptin neurons and hypothalamic tuberoinfundibular dopaminergic neurons in aged female rats.: The International Congress of Neuroendocrinology 2014. 2014.8 (Sydney)
4. Matsuo I., Higo S., Iijima N., Sakamoto A., Ozawa H.: A GABAergic mechanism is necessary for Per2-suppressing effect in the rat SCN by sevoflurane.: The International Congress of Neuroendocrinology 2014. 2014.8 (Sydney)

国内学会・研究会
シンポジウム

1. 飯島典生、託見健、松本恵介、小澤一史。無麻酔・非拘束動物への光ファイバー顕微鏡の適用可能性について。日本顕微鏡学会 第40回関東支部講演会 2016.2 (東京)
2. 飯島典生、坂本篤裕、小澤一史：麻酔と体内時計-麻酔中に体内時計はどのように時を刻むのか-：第41回日本神経内分泌学会学術集会 2014.10 (東京)

ワークショップ

1. 飯島典生：無麻酔、非拘束動物からの脳深部神経活動のリアルタイムモニタリング-光ファイバーを介した新システムの開発-：第55回日本組織細胞化学学会総会・学術集会 2014.9 (松本)

一般発表

1. 飯島典生、松本恵介、上田陽一、小澤一史。非拘束・無麻酔動物からのバソプレシン神経細胞の活性計測-光ファイバーを介した蛍光強度のモニタリングシステムの開発。第26回バソプレシン研究会 2016.1 (東京)
2. 永本盛嗣、飯島典生、相川優子、石井寛高、肥後心平、託見健、安齋めぐみ、坂本篤裕、小澤一史。株化細胞を用いた in vitro 吸入麻酔薬作用解析実験系の確立。第42回日本神経内分泌学会 第23回日本行動神経内分泌研究会 合同学術集会 2015.9 (仙台)

3. 飯島典生、松本恵介、託見健、小澤一史：Development of in vivo and real-time imaging of the deep brain neurons in free moving animals via optical fiber：第 38 回日本神経科学大会 2015.7 (神戸)
4. 肥後心平、飯島典生、小澤一史：Distribution of the Kiss1r mRNA expression in the adult female rat brain：第 38 回日本神経科学大会 2015.7 (神戸)
5. 小澤一史、岩田衣世、國村有弓、肥後心平、託見健、村川裕子、飯島典生：新規生理活性神経ペプチド「Kisspeptin」による HPG 軸への統合制御調節システム：第 88 回日本内分泌学会学術総会 2015.4 (東京)
6. 肥後心平、相川優子、飯島典生、小澤一史：Molecular and histochemical analysis on acute modulation of the kiss1 expression in the lactating rat hypothalamus mediated by the suckling stimulus：第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2015.3 (神戸)
7. 松尾いづみ、肥後心平、飯島典生、坂本篤裕、小澤一史：A GABAergic mechanism is indispensable for Per2-suppression effect in the rat SCN by sevoflurane：第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2015.3 (神戸)
8. 永本盛嗣、飯島典生、石井寛高、託見健、坂本篤裕、小澤一史：Establishment of an in vitro experimental system using a cell line to investigate the mechanisms of anesthesia：第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2015.3 (神戸)
9. 李松子、託見健、飯島典生、小澤一史：Morphological analysis of spines of the GnRH neuron through pubertal development：第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2015.3 (神戸)
10. 肥後心平、相川優子、飯島典生、小澤一史：ラット泌乳期における急性的な Kiss1 遺伝子発現変化に関する分子組織化学的解析：第 41 回日本神経内分泌学会学術集会 2014.10 (東京)
11. 李松子、託見健、飯島典生、小澤一史：発達に伴う GnRH ニューロンのスパインの形態変化、特に思春期前後の比較において：第 41 回日本神経内分泌学会学術集会 2014.10 (東京)

12. 託見健、嶋田耕育、飯島典生、小澤一史：授乳期の高脂肪食が仔の思春期発動とキスペプチンの発現に及ぼす影響：第 55 回日本組織細胞化学会総会・学術集会 2014.9 (松本)
13. 國村有弓、岩田衣世、池原大烈、飯島典生、小澤一史：老齡ラット視床下部背側弓状核におけるキスペプチンニューロンとドーパミン作動生ニューロンに関する組織化学的研究：第 55 回日本組織細胞化学会総会・学術集会 2014.9 (松本)
14. 友利裕二、飯島典生、日沼州司、石井寛高、託見健、高井信朗、小澤一史：リポソームの細胞内に関する形態学的解析-培養細胞内での局在解析から-：第 55 回日本組織細胞化学会総会・学術集会 2014.9 (松本)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 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
飯島 典生 (IIJIMA, Norio)
日本医科大学 医学部 准教授
研究者番号：00285248

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：