

神経活動の光学的計測法による 脳機能発生・機能破綻に関する研究

Optical Analysis of Functional Development / Failure of the Brain

代表研究者： 東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 細胞生理学分野 講師 佐藤 勝重
Katsushige Sato, MD, PhD
Senior Assistant Professor, Department of Physiology
Tokyo Medical and Dental University Graduate School and Faculty of Medicine

共同研究者： 東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 細胞生理学分野 講師 佐藤 容子
Yoko Momose-Sato, MD, PhD
Senior Assistant Professor, Department of Physiology
Tokyo Medical and Dental University Graduate School and Faculty of Medicine

オスロ大学 医学部 生理学講座 ポストドクトラルフェロー 持田 啓
Hiraku Mochida, MD, PhD
Postdoctoral Fellow, Department of Physiology
University of Oslo School of Medicine

アブストラクト

神経細胞の病変・細胞死の過程は、個体発生の途中に引き起こされる自然発生的細胞死の過程と酷似していることが指摘されている。したがって、個体発生にともなう神経系の機能的形成過程を明らかにすることは、脳の機能発生の解明という側面のみでなく、脳の老化、神経細胞の変性のメカニズムを知る上でも極めて重要である。しかしながら、発生初期のニューロンは小さく脆弱なため、従来の電気生理学的測定法を適用することができず、このような発生学的アプローチは大きく立ち遅れてきた。

本研究では、まず研究の焦点を神経機能発生に定め、膜電位感受性色素によるニューロン電位活動の光学的計測法を発生初期の脳幹に適用し、第VIII脳神経関連核の個体発生過程について解析した。

Abstract

It has been suggested that a process of the neuronal cell death in the neuronal diseases resembles that of the naturally-occurring cell death during embryogenesis. Therefore, to explore complex mechanisms of the neuronal cell death, it is a powerful strategy to ontogenetically analyze how neural functions are formed during embryogenesis. One approach to such analyses is to examine developmental processes of neural circuit formation using morphological, histochemical and molecular biological techniques. Another approach is to trace how spatiotemporal patterns of electrical activity are generated within the morphologically organized neural circuits. In contrast with the large number of morphological investigations, electrophysiological studies in early embryonic nervous systems have been hampered because of the small size and fragility of the immature embryonic neurons. Optical recording techniques using fast voltage-sensitive dyes have made it possible to monitor electrical activities in small cells that are difficult or impossible to access by traditional electrophysiological means, and also facilitate the simultaneous recording of electrical activity from multiple sites in a living system. In this study, we applied this optical technique to the embryonic chick brainstem, and analyzed the functional development of the N. VIII-related nuclei.

1. 研究目的

老人性痴呆や、神経細胞の変性をともなう多くの疾患において、神経細胞の病変・細胞死の過程は、個体発生の途中に引き起こされる自然発生的細胞死 (Naturally occurring cell death) の過程と酷似していることが指摘されている。細胞死は、標的細胞由来の神経栄養因子の欠乏により引き起こされるが、老化にともなう神経細胞の変性脱落や学習能力の低下にも、この神経栄養因子が関与しているとの報告がある。また、老人性痴呆の15%は神経細胞内因型であり、老化にともなう細胞数減少の一部は、個体発生過程に見られるアポトーシスと同様の経過を経ることが知られている。したがって、個体発生にともなう神経系の機能的形成過程を明らかにすることは、脳の機能発生の解明という側面のみでなく、脳の老化、神経細胞の変性のメカニズムを知る上でも極めて重要である。しかしながら、発生初期のニューロンは小さく脆弱なため、従来の電気生理学的測定法を適用することができず、このような発生学的アプローチは大きく立ち遅れてきた。

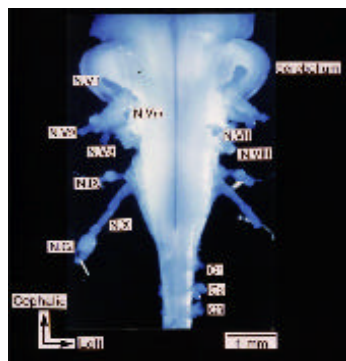
我々は、これまでに中枢神経系の機能的形成/構築過程を明らかにする目的で、膜電位感受性色素とニューロン電位活動の光学的多チャンネル計測法を発生初期胚に適用し、個体発生に伴う神経回路網の機能的システム構築と、それに関わる受容体の機能的発現過程について解析を行ってきた。この光学的計測法は、未分化で脆弱なニューロンの電気的活動を、非侵襲的に多数領域から同時記録し、その機能マッピングを行えるという他の測定法にはない利点を有している。我々は、脳幹、脊髄、および末梢神経標本を用いて、ニューロン電位活動を128-1020ヶ所の領域から同時記録することに成功し、ニューロン・シナプスの分化・形成期と、それに引き続く神経細胞死の期間におけるニューロン応答の機能発生過程を明らかにしてきた。

老化をはじめとする神経系の変性では、脳

皮質領域が侵されることが多く、植物状態にはなり得ても、脳幹領域が障害をうけて個体死に至ることはない。これは、脳幹と皮質との間で、神経栄養因子への依存性などをはじめとする機能的・器質的な特性に何らかの違いがあるためと考えられる。本研究プロジェクトの最終的な目的は、この仮説を検証するために、脳幹領域と皮質領域との機能発生過程を比較検討し、両者の間にどのような相違が見られるのかを明らかにすることであるが、まず、その一段階として、第VIII脳神経関連核とその回路網の個体発生過程に焦点を定め、膜電位感受性色素によるニューロン電位活動の光学的計測法を、発生初期の脳幹に適用し解析を試みた。

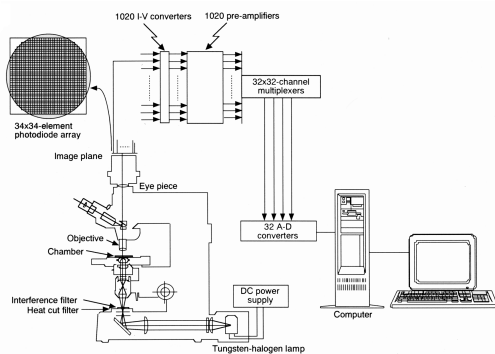
2. 研究経過

孵卵6-8日の鶏胚を麻酔下に取り出し、実体顕微鏡下で第VIII脳神経(前庭神経および蝸牛神経)を付けたままの脳幹インタクト標本作製した。標本を膜電位感受性色素NK2761 0.2mg/mlを含むリングル液に約20分間浸し染色した。



[図1] 膜電位感受性色素 NK2761 で染色した孵卵7日の脳幹インタクト標本。

光学的測定には、我々の研究室で独自に作成した、光学的144および1020チャンネル同時測定システムを用いた。前庭神経あるいは蝸牛神経刺激により脳幹内に誘発される光学シグナルを、144-1020ヶ所の領域から同時記録した。



[図2] 光学的 1020 チャンネル同時測定システムの模式図。

3. 研究成果

前庭神経を介する末梢（内耳前庭系）からの感覚性入力、まず前庭神経核（第VIII脳神経核）に終止し、シナプスを乗り換えたあと、動眼神経核（第III脳神経核）、滑車神経核（第IV脳神経核）、外転神経核（第VI脳神経核）に投射し、前庭 動眼反射を司る神経回路網を形成する。本研究における解析の結果、この神経回路網の機能形成過程について、以下のことが明らかとなった。

- 1) 孵卵 8 日（Hamburger-Hamilton stage 33-34）の鶏胚脳幹 前庭神経標本において、前庭神経を吸引電極で電気刺激すると、まず pre-synaptic action potential と excitatory post-synaptic potential (EPSP) からなる光学的シグナルが前庭神経核に誘発され、ついで潜時を伴った二次・三次応答が、動眼神経核、滑車神経核、外転神経核に誘発された。同じ標本で蝸牛神経（前庭神経と同じ第VIII脳神経の一つ）を刺激した場合には、Nucleus magnocellularis、Nucleus angularis、Nucleus laminalis などの聴覚系神経核において、同様の action potential と excitatory post-synaptic potential (EPSP) が観察されたが、動眼神経核、滑車神経核、外転神経核では光学的シグナルは観察されなかった。
- 2) 通常の Ringer 液中において、前庭神経核における EPSP は、孵卵 6 日 7 日の発生段階で観察された。また動眼神経核、滑車神

QuickTime[®]
 C*Uj eLIÉEVcEOÉaEA
 Ç™Ç±ÇÄEsENE EÉÇ%a@ÇEÇ Ç½Ç...ÇÖIKóvÇ-Ç+AB

[図3] 孵卵 8 日の鶏胚脳幹において前庭神経刺激によって得られる光学シグナルの時空間パターン。

経核では、孵卵 7 日の標本で EPSP が観察された。外転神経核における電気的応答は、他の神経核にやや遅れて孵卵 8 日の発生段階で発現した。

3) 前庭神経核におけるシナプス伝達は、グルタミン酸受容体の阻害剤である APV と CNQX の投与によって完全に消失し、NMDA 型、non-NMDA 型の両グルタミン酸受容体が関与していることが明らかとなった。外液を Mg²⁺-free 液に置換すると、NMDA 型受容体の活性が高まり、通常の Ringer 液中では EPSP が観察されない発生段階でも、EPSP が発現するようになった。すなわち、前庭神経核では孵卵 5 6 日、動眼神経核、滑車神経核では孵卵 6 7 日、外転神経核では孵卵 7 日から EPSP が観察された。

4) これらの結果は、前庭 動眼反射経路が、個体発生の非常に早い段階で機能的に形成されていることを示している。鶏胚脳幹の他の脳神経核におけるシナプス伝達機能の発現は、通常の Ringer 液中では孵卵 7 日、Mg²⁺-free 液中では孵卵 6 日頃であるとされているので、前庭神経系の機能的発達はそれよりも若干早いものと考えられる。

5) 同側の動眼神経核、滑車神経核、外転神経核の応答は、GABA-A 受容体の阻害剤である bicuculline によって消失することから、抑制性のシナプスを介していることが示された。一方、対側の動眼神経核、滑車神経核、外転神経核の応答は、グルタミン酸受容体の阻害剤である APV と CNQX の投与によって消失し、興奮性シナプスを介していることが示唆された。これらの結果から、興奮性、抑制性のシナプスを介する agonistic、antagonistic な反射経路が、この発生段階ですでに形作られ

ていることが明らかとなった。

個体発生の過程で、前庭神経系の電気的活動能がどの時点から発現するのかは、これまで全く不明であった。これは、発生初期の神経細胞が非常に小さく脆弱で、微小電極を用いた従来の電気生理学的測定法を適用することが困難であったことが一つの原因と考えられる。本研究において、我々はその機能的発現過程を明らかにすると同時に、ニューロン活動パターンの時空間的広がりを可視化、イメージング化することに、世界で初めて成功した。解析の結果から、前庭 動眼反射系の神経回路網が、個体発生の非常に早い段階で機能的に発現していることが明らかにされた。形態学的な解析では、前庭神経核をはじめとする各神経核のニューロンは、この時期にはまだ分化・成熟の途上にあることが示されており、形態形成と比較しても、「機能形成」の過程は従来考えられていたよりも格段に早いことがうかがわれる。

4．今後の課題と発展

本助成期間内では、解析した対象は鶏胚脳幹の第VIII脳神経関連核とその回路網に限られた。今後は、本研究プロジェクトの最終的な目標、すなわち「中枢神経系の機能発生に焦点をあて、その成果を機能破綻過程と比較検討することにより、老化にともなう細胞の死滅のメカニズムの一端を明らかにする」ことにむけ、さらに研究を継続していく予定である。

5．発表論文

(1) Momose-Sato, Y., Honda, Y., Sasaki, H. and Sato, K. (2004) Optical mapping of the functional organization of the rat trigeminal nucleus: Spatial and temporal dynamics of sensory information transfer during embryogenesis.

Journal of Neuroscience **24**, 1366-1376.

(2) Sato, K., Miyakawa, N. and Momose-Sato, Y. (2004) Optical survey of neural circuit formation in the embryonic chick vagal pathway.

European Journal of Neuroscience **19**, 1217-1225.

(3) Sato, K. and Momose-Sato, Y. (2003) Optical

detection of developmental origin of synaptic function in the embryonic chick vestibulo-cochlear nuclei.

Journal of Neurophysiology **89**, 3215-3224.

(4) Momose-Sato, Y., Miyakawa, N., Mochida, H., Sasaki, S. and Sato, K. (2003) Optical analysis of large-scale depolarization waves in the embryonic brain: A dual network of gap junctions and chemical synapses.

Journal of Neurophysiology **89**, 600-614.

(5) Momose-Sato, Y., Mochida, H., Sasaki, S. and Sato, K. (2003) Depolarization waves in the embryonic central nervous system triggered by multiple sensory inputs and spontaneous activity: optical imaging with a voltage-sensitive dye.

Neuroscience **116**, 407-423.

(6) Miyakawa, N., Yazawa, I., Sasaki, S., Momose-Sato, Y. and Sato, K. (2003) Optical analysis of acute spontaneous epileptiform discharges in the *in vivo* rat cerebral cortex.

NeuroImage **18**, 622-632.

(7) Sasaki, S., Sato, K., Shinomiya, K. and Momose-Sato, Y. (2003) Postnatal changes in intrinsic optical responses to peripheral nerve stimulation in the *in vivo* rat spinal cord.

NeuroImage **20**, 2126-2124.

(8) Miyakawa, N., Sato, K., Mochida, H., Sasaki, S. and Momose-Sato, Y. (2003) Functional mapping of neural activity in the embryonic avian visual system: Optical recording with a voltage-sensitive dye.

In: **Keio University International Symposia for Life Science and Medicine, Vol. 11, The Neural Basis of Early Vision**. Ed. Kaneko, A. Springer-Verlag, Tokyo, 194-198.

(9) Sato, K., Momose-Sato Y. and Kamino, K. Application of voltage-sensitive dyes to the embryonic nervous system.

In: **Light Scattering Imaging of Neural Tissue Function**. Eds. Rector, D., M., & George, J., S. The Humana Press Inc, Totowa, in press.

(10) Sato, K., Momose-Sato, Y. and Kamino, K. Light-scattering signals related to neural functions.

In: **Recent Research Developments in Membrane Biology II**. Eds. Fagan, J., Davidson, J., N. & Shimizu, N. Research Signpost, Kerala, in press.