

研究報告書

「質量顕微鏡法による神経伝達物質のイメージング」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成22年10月～平成26年3月

研究者: 矢尾 育子

1. 研究のねらい

本研究では、脳情報の時空間的制御の解明をコンセプトに、これまで可視化できなかった神経伝達物質の組織内分布を明らかにし、神経回路の形成機構を明らかにし、脳情報の解読につなげることをねらいとするものである。

脳の機能は、神経細胞同士がシナプスを介して形成する神経回路によって支えられている。シナプス前部に存在する神経細胞がグルタミン酸などの神経伝達物質を放出し、シナプス後部の神経細胞の表面に存在する受容体はその神経伝達物質を受け取ることによって、神経細胞間の情報伝達が行われている。従って、どのような神経伝達物質がどこに局在しているのか知ることは、局所回路の機能理解に不可欠である。

本研究では、神経科学研究での応用例がまだ少ない質量顕微鏡法を利用することで、既存の手法では詳細な組織内分布や局在を検出することができなかったさまざまな神経伝達物質にスポットをあて、それらの局在を記述することを試みる。さらにその中で時空間的解析が可能なものに焦点を絞り、刺激すなわち神経活動依存的な位置的・量的な変動を検出することにより、実際の神経回路の成り立ちを解明、脳情報の解読につなげる。

神経伝達物質の放出異常によって起こる病気は多く、全く新しい取り組みで神経伝達物質の動態を解明することによって、脳のはたらきの解明のみならず、健やかな脳を作り保つためのリハビリテーションなどに重要なアプローチとなることが期待される。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、神経科学研究での応用例がまだ少ない質量顕微鏡法を利用することで、既存の手法では可視化できなかったさまざまな神経伝達物質にスポットをあて、それらの局在を記述することを試みた。検出条件検討の結果最も効率のよかったアセチルコリンに焦点を絞り、中枢神経組織における局在の検出に成功し、脳情報の解読につながる成果が得られた。

関連論文を学術誌に発表し、プレスリリースを行った。複数の学会発表を行った。

行動解析により Scrapper-HKO (ヘテロ型ノックアウト) マウスは、恐怖記憶の獲得に異常があり、この結果をまとめ、神経科学学会大会および PLoS ONE 誌に発表し、第6回 ICNBD 国際カンファレンス、第84回日本生化学会大会にて発表を行った。関連する成果について OIST 国際ワークショップ、第34回日本神経科学大会で発表した。

ヒト病理標本を質量顕微鏡を用い測定を行った。疾患サンプル特異的に変化している候補分子をスクリーニングし、今後のイメージングにおいて注目する分子を決定した。質量顕微鏡を用いた病理標本の解析を行い、論文を投稿した。成果について第43回日本臨床分子形態学会・学術集会のシンポジウムでイメージングのセッションにて講演した。

質量顕微鏡法についてまとめ、書籍の分担執筆を行い Mass Spectrometry Handbook (Wiley Series on Pharmaceutical Science and Biotechnology: Practices, Applications and Methods) Wiley として出版した。

(2) 詳細

研究テーマ A「質量分析で検出可能な神経伝達物質のスクリーニング」

検出可能な神経伝達物質を絞り込み、検出条件の最適化をはかった。多数にのぼる神経伝達物質の基礎データを取得するためにまずは、文献での情報を収集するとともに、マウスの脳から質量顕微鏡法により検出可能なものを絞り込んだ。ヒトの標本から検出可能な物質についてもテーマ D と関連づけながら進め、期間を通じデータの蓄積に努めた。また、マトリクスの種類等の検出条件を変えてみることで種々の伝達物質の検出を試みた。

代表的な神経伝達物質について MALDI-TOF MS によるイオン化効率およびマトリクス分子の干渉を標品で検討し、検出感度を評価した結果、アセチルコリンが最もイオン化効率がよいことが分かった。組織切片全体の MS および MS/MS データを取得し、目的のイオンについて画像化を行った。得られた画像に対し、データベース上のアセチルコリン関連分子の局在との比較を行った。脊髄および脳切片の MS/MS イメージングにより得られた画像から、アセチルコリンは脊髄前角においてはコリン作動性運動神経細胞の細胞体、脊髄後角および脳では神経終末に多く検出されていることを確認した。

研究テーマ B「神経活動依存的変化の解析」

Scrapper-HKO (ヘテロ型ノックアウト) マウスは、恐怖記憶の獲得に異常があり、扁桃体での異常が予想されることから、SCR-KO マウス扁桃体で解析を行い、神経回路レベルの調節機構を明らかにする。本研究成果から恐怖記憶の消去を制御するヒントが得られ、PTSD などのリハビリテーションへの応用につながると期待される。

行動解析により Scrapper-HKO (ヘテロ型ノックアウト) マウスは、恐怖記憶の獲得に異常があり、扁桃体および海馬での異常が示唆された。詳細に検討した結果、主に海馬での異常によることが明らかとなった。この結果をまとめ、神経科学学会大会および PLoS ONE 誌に発表し、第 6 回 ICNBD 国際カンファレンス、第 84 回日本生化学会大会にて発表を行った。関連する成果について OIST 国際ワークショップ、第 34 回日本神経科学大会で発表した。

さらに、Scrapper ノックアウト (SCR -KO) マウスで変化している分子の同定を試みた。その検討結果を含め、第 35 回神経科学大会においてシンポジウムで発表した。

研究テーマ C「神経伝達物質動態の検討」

他の手法の結果との比較検討により、質料分析顕微鏡法で得られた結果の妥当性を検討する。本研究の研究テーマ A で得られた候補分子、アセチルコリンについて、直接検出された神経伝達物質の局在を他の間接的手法で検出された過去の報告と比較した。アレンアトラスデータベースでの in situ hybridization やアセチルコリン関連分子の免疫組織化学の結果と比較したところ、整合性があるものであった。特に分解酵素 (アセチルコリンエステラーゼ) の産生細胞の局在と一致したことから、質量顕微鏡法で検出されたものは神経終末に局在するア

セチルコリンであることが示唆された。質量顕微鏡法は神経伝達物質の組織内分布の可視化に有用と考えられた。

この結果をまとめ、論文を報告し、プレスリリースを行った。第 60 回アメリカ質量分析学会および第 19 回国際質量分析学会でポスター発表、第 42 回北米神経科学学会でポスター発表を行った。脳内物質の質量分析イメージング方法および応用について第 38 回医用マススペクトル学会でシンポジウム講演及び奨励賞受賞講演を行った。

研究テーマ D「ヒト神経疾患病理標本の解析」

ヒト疾患サンプルの解析を行う。神経伝達物質の放出異常が原因、あるいは異常を伴う精神疾患はアルツハイマー病を始め脳損傷、疼痛、てんかん、発作性疾患、うつ、ハンチントン病、統合失調症など数多くある。これらヒト疾患病理標本で神経伝達物質の異常について研究テーマ(A)~(C)の知見とあわせて情報を得る。この研究は臨床講座の協力を仰ぎ、包括脳ネットワークの支援を受けて行うものである。

実施のための倫理申請の手続きを行い、倫理申請審査が完了したのからヒト神経疾患病理標本の解析を開始した。疾患サンプル特異的に変化している候補分子をスクリーニングし、今後のイメージングにおいて注目する分子を決定した。

その他

質量顕微鏡法についてまとめ、書籍の分担執筆を行い Mass Spectrometry Handbook (Wiley Series on Pharmaceutical Science and Biotechnology: Practices, Applications and Methods) Wiley として出版した。

3. 今後の展開

研究テーマ A「質量分析で検出可能な神経伝達物質のスクリーニング」

近年、質料分析イメージングにおいて、物質の誘導体による対象分子の可視化が報告されつつある。目的物質の誘導体化により、イオン化効率の上昇および分子量シフトによる S/N 比向上が起こり、目的物質の検出が可能となる場合がある。現在取り組んでいる神経伝達物質について誘導体化を適用し、脳内での局在検出を試みる。

研究テーマ B「神経活動依存的変化の解析」

Scraper ノックアウト(SCR -KO)マウスで変化している候補分子を得ていることから、今後検証を行い、ヒト疾患との関連を検討する。

SCR-KO マウスは成長過程で徐々に死亡していく問題があるため、現在、誘導可能なコンディショナル KO(cKO)マウスを作製しつつある。SCR-KO マウスの脳では神経伝達物質の放出異常が起こっており、海綿状変性や神経細胞の萎縮などの異常が観察されている。cKO マウスでは更に初期の神経変性に関連する変化を検出できることが期待される。神経変性疾患のモデルとして他のモデルマウスについても質量顕微鏡法で観察し、ヒトの神経変性疾患脳サンプルから得られる情報との比較検討を行い、全く新しい情報を得る。また SCR-KO マウスを用い、SCRAPPERとそれが関与するタンパク質分解系の役割を明らかにする。さらに、質量顕微鏡法により、脳内神経伝達のバランスが破綻した時に起こる分子の変動を可視化し、新たな鍵分子を見出す。

研究テーマ D「ヒト神経疾患病理標本の解析」

ヒト死後脳サンプルの解析の結果について、神経変性疾患により変動する候補分子を得ていることから、候補分子の局在についてマウスモデル等を用い疾患との関連を検討する。

4. 評価

(1) 自己評価

第一に、テーマに掲げた神経伝達物質のイメージングとしてアセチルコリンの脳内分布可視化にし、新しい手法を脳情報の解読することができ、研究者のねらいが果たされたと考える。

関連論文が学術誌に発表されている事に加え、総説、学会発表、プレスリリース等により成果を広くアピールすることができた。本研究成果に関わる受賞が 3 件と、この間に昇進、独立できたことは、本研究の業績を評価されてのことと考えられる。

第二に、本領域では多様な背景の研究者が集合していることから、本領域にのみ可能な研究交流を通じての新たな協力関係が築かれ、共同研究に発展したことは望ましい展開であったと考える。

一方で、当初掲げた目標を全て網羅できたわけではなく、技術的な困難が伴うことが判明し期間内の達成を断念せざるを得ないテーマがあった。領域会議でのアドバイスや振り返りにより早い段階で中断し、他のテーマに注力できたことは幸いだったと考える。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

本研究は神経科学研究での応用例がまだ少ない質量顕微鏡法を用い、シナプス伝達物質、糖脂質等、生理活性物質の詳細な組織内分布や局在を実際の生物標本の上で検出することは目指す研究であり、工夫の末、その局在を確認するに至ったことは、大きく評価できる。当初の提案課題はほぼ完遂されたと考えられる。ヒト病理標本への適用拡大を試みており、今後、この成果を踏まえて、さらに多くの生体活性物質が検出可能となることが期待される。

本研究の主たる課題は、脳活動の上で不可欠な神経伝達物質を質量顕微鏡を用いて可視化することを試みるもので、必要な前措置を種々の試行の後に見出し、アセチルコリン、糖脂質等において可視化に成功した。すなわち、代表的な神経伝達物質について MALDI-TOF MS によるイオン化効率およびマトリクス分子の干渉を標品で検討し、検出感度を評価した結果、最もイオン化効率が良いアセチルコリンに的を絞り、マウス脳から得た組織切片全体の MS および MS/MS データを取得し、画像化し、データベース上のアセチルコリン関連分子の局在との比較を行った。脊髄および脳切片の MS/MS イメージングにより得られた画像から、アセチルコリンは脊髄前角においてはコリン作動性運動神経細胞の細胞体、脊髄後角および脳では神経終末に多く検出されていることを確認した。さらに遺伝子操作マウス Scrapper での実験により糖脂質の検出に成功した。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Lu J, Yao I, Shimojo M, Katano T, Uchida H, Setou M, Ito S. Ito. Identification of nitrated tyrosine residues of protein kinase G- α by mass spectrometry, Anal Bioanal Chem. (in press)
2. Takagi H, Setou M, Ito S, Yao I. SCRAPPER Regulates the Thresholds of Long-Term Potentiation/Depression, the Bidirectional Synaptic Plasticity in Hippocampal CA3-CA1 Synapses, Neural Plasticity, vol. 2012, doi:10.1155/2012/352829 (2012)
3. Sugiura Y, Zaima N, Setou M, Ito S, Yao I. Visualization of acetylcholine distribution in central nervous system tissue sections by tandem imaging mass spectrometry, Anal Bioanal Chem. 403(7):1851-61(2012)
4. Yamada M, Yao I, Hayasaka T, Ushijima M, Matsuura M, Takada H, Shikata N, Setou M, Kwon AH, Ito S. Identification of oligosaccharides from histopathological sections by MALDI imaging mass spectrometry, Anal Bioanal Chem. 402(5):1921-30 (2012)
5. Yao I, Takao K, Miyakawa T, Ito S, Setou M. Synaptic E3 Ligase SCRAPPER in Contextual Fear Conditioning; Extensive Behavioral Phenotyping of Scrapper Heterozygote and Overexpressing Mutant Mice, PloS one 6, e17317 (2011)

(2)特許出願

研究期間累積件数:なし

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

- 2013 年度医用マススペクトル学会奨励賞
質量分析イメージングによる脳情報の可視化—医学への貢献を目指して
- 2012 年度武田科学振興財団研究助成 医学系研究奨励
イメージングマススペクトロメトリーを利用した神経変性疾患発症の分子メカニズムの解明
- 第 36 回医用マススペクトル学会
優秀ポスター賞 質量顕微鏡法を用いた神経伝達物質の検出と可視化に向けた検討
- Sugiura Y, Yao I, Setou M. Imaging Mass Spectrometry (IMS) for Biological Application, Practices, Applications and Methods) Wiley; 1 版
- プレスリリース「質量分析でアセチルコリンの脳内分布の可視化に成功—神経疾患の仕組みを解き明かす一助に—」(2012 年4月)
<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20120420-3/>
化学工業日報、日刊工業、日経バイオテック、マイナビニュース、ナショナルジオグラフィック—脳神経内のアセチルコリン、初の可視化