

ATPセンサーATeam1.03YEMKを発現する海馬CA1錐体細胞

キーポイント

高品質 — FN1顕微鏡は幅広い高品質光学系の搭載が可能。サンプル深部の微細な構造を高精細かつ高コントラストに可視化。

多機能 — FN1顕微鏡とNIS-Elementsソフトウェアの組み合わせにより、多彩な周辺機器の活用が可能。

直感的 — NIS-Elementsソフトウェアは高機能でありながら使いやすく、カスタマイズも可能なユーザーインターフェースを搭載。

ニューロンおよびアストロサイト内における、 Na^+ 濃度変化のイメージング

生体脳組織における、細胞内ナトリウムの恒常性とシグナル伝達

ニューロンやアストロサイトが機能する上で、 Na^+/K^+ -ATPase (NKA) の働きによって細胞内のナトリウム濃度を低く維持することは必須の条件である。これまでの研究で、細胞内のナトリウム濃度($[\text{Na}^+]_i$)の上昇が、脳卒中後に生じるATP不足の影響として早期に発生することが示唆されている。脳内の Na^+ 濃度が制御不能な状態に陥ると、その影響は他の主要なイオンや神経伝達物質にまで及ぶ可能性がある。そのため、細胞内ナトリウムの恒常性と調整について知ることが、脳の機能を理解する上で極めて重要となる。

本アプリケーションノートでは、脳卒中時に生じる梗塞周辺脱分極 (PID) の状態において、ニューロンやアストロサイトの細胞内ナトリウムの増加が、いかにしてナトリウム/カルシウム交換系 (NCX) の逆転を惹起するのか、ハイネリッヒ・ハイネ大学 (ドイツ・デュッセルドルフ) の Gerkau博士による研究データを紹介する。博士の研究では、安定性と信頼性に優れたニコンの研究用対物上下動式正立顕微鏡Eclipse FN1と画像統合ソフトウェアNIS-Elementsを組み合わせることで、生体脳組織のニューロンやアストロサイトにおける細胞内ナトリウムイオンを、高品質な画像で可視化し、解析することに成功している。

局所的かつ大域的なNa⁺濃度変化のイメージング

細胞内のイオン濃度を測定するには、イオン検出蛍光インジケーターが広く用いられる。遺伝子コード型のプローブを含む多様なCa²⁺インジケーター色素が存在するが、公認されたNa⁺インジケーター色素については数が限られる。インジケーター色素を用いたニューロンやアストロサイトにおけるNa⁺濃度変化の動的測定には、一般的な蛍光顕微鏡のほか、共焦点顕微鏡や多光子顕微鏡が用いられるが、それぞれに一長一短があり、どのイメージング方法を選択するかは、研究内容やサンプル（培養細胞か生体組織かなど）によって決定される。

多光子イメージングは、焦点面のみからの蛍光を取得するため、焦点面以外の構造の褪色が軽減できる。これにより、散乱の大きな組織サンプルの場合でも、樹状突起や樹状突起スパインなどの細胞内区画におけるナトリウムを可視化できることが、多光子イメージングの長所として挙げられる。しかし、アストロサイトは広域にわたる3次元構造であるため、1つの焦点面からの画像だけでは細胞の一部しか解析できない。一方、蛍光イメージングでは観察エリアが焦点面に限定されないため、細胞の広範囲や細胞全体についても高速イメージングが可能である。蛍光イメージングのもう1つの長所としては、一度に多くの細胞が取得できるため、細胞ネットワークにおける活動の検出に適していることが挙げられる。スキャンの必要がなく、画像を単一のフレームとして取得できるため、対象全体の動的プロセスを同時に捉える上でも非常に有用である。また、撮影のフレームレートが高いため、極めて高速な細胞シグナルの測定に対応できる点も、重要な長所の1つとなっている。

Na⁺濃度変化の蛍光イメージング

ナトリウム結合ベンゾフランインソフタル酸 (SBFI) は、レシオメトリックでかつUV励起が可能なナトリウムインジケーターである。レシオイメージングは、細胞の移動、褪色、色素消失などに起因する色素濃度の変化にほぼ影響されることなく、ナトリウム濃度の変化が検出できる。さらに、*in situ*キャリブレーションにより、SBFI蛍光の比率変動を細胞内ナトリウム濃度 ([Na⁺]_i) の変化に変換することも可能である。また、アストロサイトの研究においては、生体色素であるスルホローダミン101 (SR101) をサンプルに投与することにより、アストロサイトを特異的に標識・識別できる。

FN1顕微鏡に蛍光装置を搭載したシステムは、これらの観察や研究に最適な設計を採用し、*in vitro*サンプル内の細胞の詳細を鮮明かつ高コントラストに可視化できる。適切なカメラや光源を搭載することで、高フレームレート撮影による高速レシオイメージングにも対応が可能である。蛍光イメージングシステムでは、細胞の3次元構造は2次元に変換されるものの、細胞全体の画像を取得することができる。

NIS-Elementsソフトウェアは、細胞内イオン濃度変化のイメージング用に構成したFN1顕微鏡と組み合わせることで、画像の取得・表示・解析などの高機能を統合した、画像記録用のシンプルなインターフェースが提供できる (図1)。



図1：研究用対物上下動式正立顕微鏡Eclipse FN1に固定ステージ、デジタルカメラ(Orca Flash 4)、灌流/マイクロインジェクション装置を搭載し、画像統合ソフトウェアNIS-Elementsを組み合わせたシステム

ケーススタディ

脳卒中後のニューロンやアストロサイトにおけるNa⁺増加の影響を測定

虚血性脳卒中の核となった領域においては、血流の途絶によってイオン濃度勾配の崩壊が生じ、これが早急な細胞死をもたらす。周囲組織は虚血の影響から回復する可能性があるものの、梗塞周辺脱分極 (PID) がこれを阻害し、さらなる代謝ストレスを発生させることがある。これらの変化には[Na⁺]_iの同時増加に誘発されるものがあることが示唆されているが、PIDに関連した[Na⁺]_i増加については、いまだに十分な情報が得られていない。

FN1顕微鏡とNIS-Elementsソフトウェアを用いた、Na⁺濃度変化の蛍光イメージング

ハインリッヒ・ハイネ大学 (ドイツ・デュッセルドルフ) 神経生物学研究所のGerkau博士は、多光子イメージングと蛍光イメージングを用いて齧歯動物の脳卒中モデル (*in vivo*および*in situ*) を観察し、マウス大脳皮質のニューロンやアストロサイトにおけるNa⁺とCa²⁺の値の変化を調査した (Gerkau, NJ et al, 2018)。

急性摘出した組織切片に蛍光ナトリウムインジケーター-SBFIを注入することで、FN1顕微鏡を用いてNa⁺濃度変化の蛍光イメージングが可能となる。アストロサイトについては、蛍光色素SR101で標識することにより識別した。

蛍光の取得と測定にはFN1顕微鏡 (図1) を、その際の画像取得・解析の制御にはNIS-Elementsソフトウェアをそれぞれ使用した。NIS-Elementsの機能には、以下のような優れた利点がある。

- モノクロメーターや高速LEDなどの外部光源、NIDAQからのアナログ/TTL信号で制御する電気刺激装置や加圧装置などの外部装置について、容易に統合や制御が可能。
- 波長と比率の両方について、実験中にオンラインで取得可能。
- 蛍光の時間変化について、実験中にオンラインで1つのウィンドウ内で測定可能。同データについて、時間に対する輝度変化および比率としてリアルタイムに表示可能。
- 1つの実験で、独立した50の領域が解析可能。

虚血性脳卒中がもたらす状況を*in vivo*において再現するため、アジ化ナトリウム (NaN₃, 5 mM) と、細胞の解糖やミトコンドリアの呼吸を阻害する2-デオキシグルコース (2-DG, 2 mM) を含む生理食塩水 (化学的虚血食塩水) に組織切片を浸漬。これにより生じたSBFI蛍光の変化を、キャリブレーション測定により[Na⁺]_iの変化に変換した。

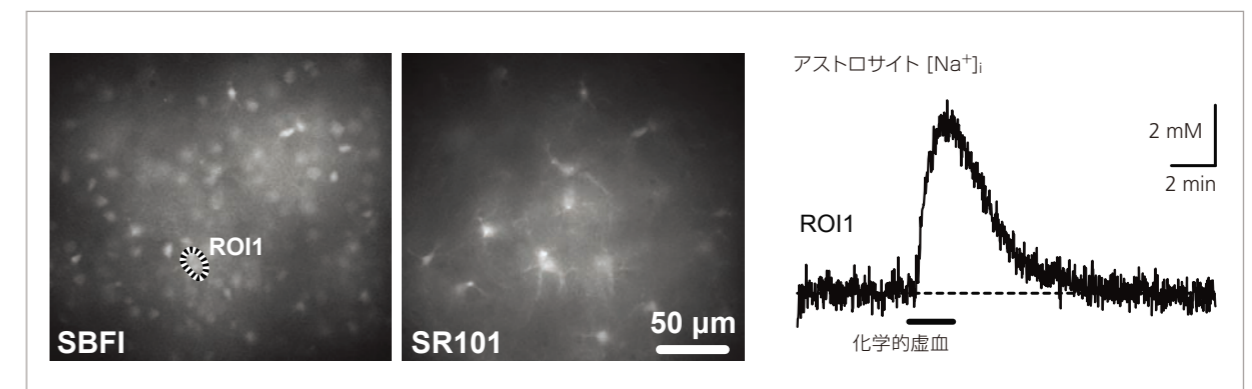


図2：急性摘出した大脳皮質切片のSBFI蛍光画像(左)とSR101蛍光画像(中央)。右のグラフは、5 mMのNaN₃および2 mMの2-DGの灌流によって誘発された2分間の化学的虚血に起因する、単一アストロサイト内の[Na⁺]_i変化を示す。

ニューロンやアストロサイトにおけるナトリウム/カルシウム交換系の逆転が、 虚血性脳卒中からの回復を促進する可能性

短時間（2分間）の化学的虚血の後、アストロサイト（図2）とニューロンのいずれにおいても一過性の $[Na^+]_i$ 増加が観察されている。より長時間の暴露では、細胞の Na^+ 負荷が持続し、細胞の大部分は回復できなかった。そのため、この組織モデルのナトリウムイメージングでは、ニューロンやアストロサイトにおいて、虚血条件下でのPIDに伴う多大な Na^+ 負荷が観察されている。さらに、薬理的アプローチを用いた実験によって、アストロサイトのグルタミン酸輸送活性が、この Na^+ 負荷に大きく影響していることが解明された。

驚くべきことに、細胞膜のナトリウム/カルシウム交換輸送体（NCX）の活動を阻害すると、ニューロンやアストロサイトにおける Na^+ 濃度が上昇することも、測定により判明している。その一方、化学的虚血に起因する Ca^{2+} 振動については大幅な減衰が見られた。これは、NCXが反転モードとなったために、ニューロンやアストロサイトからの Na^+ の流出を惹起し、 Ca^{2+} の流入を仲介したことを示唆している。このように、反転NCXによる Na^+ の流出は、虚血性脱分極からの回復を促進する可能性があり、NCX交換輸送体を標的とすることや細胞の $[Na^+]_i$ 負荷を低減することが、脳卒中による初期の細胞ダメージを軽減させる有望な戦略になり得ると考えられる。

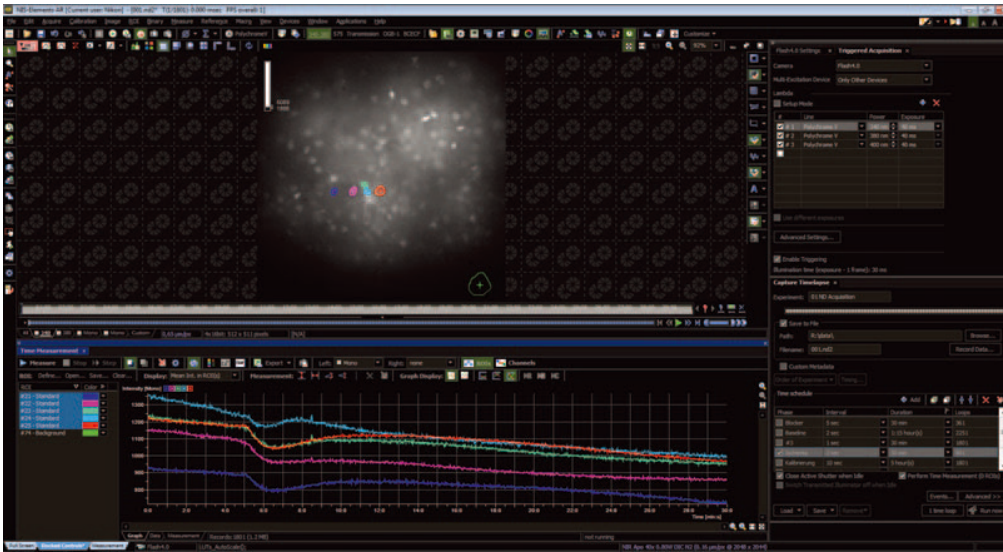
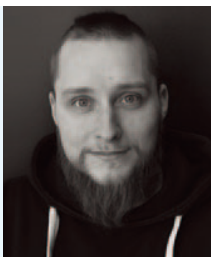


図3：NIS-Elementsソフトウェアは、アストロサイトやニューロン全体を定量的にレシオイメージングできるため、イオン濃度変化のハイコンテンツ解析が可能である。

ニューロンやアストロサイトにおける、イオン濃度変化の最適なイメージングを実現

本ケーススタディでは、FN1顕微鏡を用いて実験をカスタマイズすることで、生体脳組織のニューロンやアストロサイトにおける細胞内イオン濃度変化について、最適なイメージングや解析を行うことができた。FN1の安定性と信頼性に優れた機能により、長時間にわたるイメージングも可能である。また、NIS-Elementsソフトウェアは、アストロサイトやニューロン全体の定量的なレシオイメージングを実現し、イオン濃度変化のハイコンテンツ解析に威力を発揮する（図3）。さらに、顕微鏡システムに周辺機能を追加することで、同ソフトウェアを使用して蛍光寿命イメージング（FLIM）実験を行うことも可能である。

ニコンの製品を組み合わせることにより、このような高品質かつ多機能な蛍光イメージングシステムの構築が可能である。これにより、今後とも本ケーススタディのような研究の進展に大きく貢献していくことが期待される。



Niklas J. Gerkau博士

ハインリッヒ・ハイネ大学(ドイツ・デュッセルドルフ)にて博士課程を修了。最新の研究は、「虚血時のマウス脳における、ニューロンやアストロサイトのナトリウム恒常性の初期変化」の解明である。

参考文献 Gerkau NJ, Rakers C, Durry S, Petzold GC and Rose CR. (2018) Reverse NCX attenuates cellular sodium loading in metabolically compromised cortex. *Cerebral Cortex* 28: 4264-4280

謝辞 ・本アプリケーションノートの制作にあたり、科学的な考察および編集にご協力いただいた、ハインリッヒ・ハイネ大学のKarl Kafitz博士に謝意を表します。
・表紙画像ご提供：ハインリッヒ・ハイネ大学神経生物学研究所Rodrigo Lerchundi博士