

201111030A

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

脳内留置型微細内視鏡の開発と前臨床試験研究

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 祖父江 憲治

平成 24(2012)年 5 月

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

脳内留置型微細内視鏡の開発と前臨床試験研究

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 祖父江 憲治

平成 24(2012)年 5 月

# 目次

## I. 総括研究報告書

脳内留置型微細内視鏡の開発と前臨床試験研究

祖父江 憲治 . . . . . 1

## II. 分担研究報告書

1. 脳内留置型微細内視鏡の開発と前臨床試験研究

小笠原 邦昭 . . . . . 7

2. 脳内留置型微細内視鏡の開発と前臨床試験研究

人見 次郎 . . . . . 10

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 . . . . . 13

IV. 研究成果の刊行物・別刷り . . . . . 14

厚生労働科学研究費補助金(医療機器開発推進研究事業)

総括研究報告書

脳内留置型微細内視鏡の開発と前臨床試験研究 (H23-医療機器-指定-001)

岩手医科大学 医歯薬総合研究所 副学長 祖父江 憲治

研究組織

研究代表者 祖父江 憲治 岩手医科大学 医歯薬総合研究所 副学長

研究分担者 小笠原 邦昭 岩手医科大学 脳神経外科学 教授

人見 次郎 岩手医科大学 解剖学 教授

研究要旨

本研究は、重症頭部外傷やくも膜下出血重症例に術後脳内に留置し、術後の血流管理や血管動態のモニターを可能とする脳内留置型微細内視鏡の開発を目指し、医療用機器としての臨床応用を目的とした前臨床試験研究である。頭蓋内留置による脳障害を回避するため撮像装置は微細グラスファイバーを採用した。本年度はこのプロトタイプを開発・作製した。プロトタイプを用いた撮像試験を行い、また動物モデルを用いた血管撮像を実施した。現段階で微細な血管まで良好な解像度での観察が可能となった。今後の改良点として、高精度かつ広範囲の脳内環境をモニターするためにグラスファイバー、照明装置の改良を行うとともに、安全性のための構成素材の検討を進めている。さらに経時的な脳血管・血流動態をモニターするため、生体に安全性の高い蛍光色素を用いた撮像法導入も検討している。

A. 目的

近年、内視鏡はその精度・応用範囲・手技において飛躍的進歩を遂げ、臨床各科で有力な診断と治療ツールとなっている。脳神経疾患領域において、内視鏡は水頭症の脳室開放術・脳室内腫瘍摘出術・開頭脳動脈瘤クリッピング術の支援・下垂体手術時の支援等に用いられるが、手術室内での術中使用に限定されている。一方、脳神

経疾患の診断に関しては、MRI・PET など無侵襲診断法の進歩と内視鏡の手術室外使用の困難さから導入を試みられることはなかった。MRI・PET等の神経放射線学的検査は、ある時点の頭蓋内環境の状態を詳細かつ的確に把握できる利点がある。しかしながら、これまで脳神経疾患は時間あるいは日の単位で頭蓋内環境が変化し、連続的頭蓋内環境のモニタリングを必要とする症

例に多数遭遇するが、これに対処する手段が全くなかった。例えば重症頭部外傷の場合、脳圧コントロールは予後を大きく左右するが、脳圧コントロールの指標として脳血流・脳血管の持続的観察が可能となれば、直ちに適切な処置が可能となる。また、くも膜下出血では、発症4-14日目に出現する遅発性脳血管攣縮が予後を大きく左右する要因となる。重症例では初期から症状が重篤で、症状変化による脳血管攣縮の出現を把握出来ない。この場合も経時的脳血管観察が可能となれば、脳血管攣縮の出現を早期に診断し、早急かつ適切な処置を行うことが出来ると期待される。

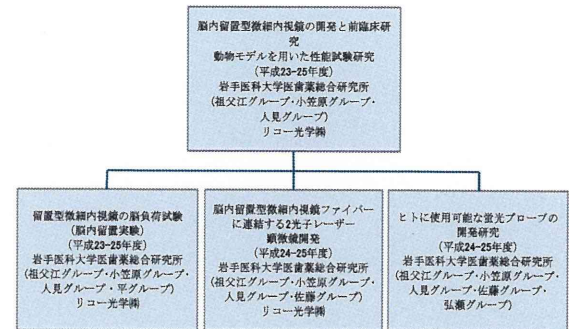
本研究の目的は、岩手医科大学とリコー光学株式会社による脳内留置型微細内視鏡の共同開発と前臨床試験研究であり、臨床応用へ橋渡しをすることにある。脳内留置型微細内視鏡の径は従来の内視鏡イメージを革新する細さで、急性脳血管障害や脳外傷の開頭手術時に脳内留置し、術後の脳血管攣縮をモニターするものである。従って内視鏡自体を脳内に挿入する為の侵襲を必要とせず、留置した患者への負担も少なく、不要となれば抜去が容易であるのが大きな特色である。これまでに類似の製品は現在報告がなく、従来の内視鏡イメージを革新する細さと用途を目指す。

## B. 研究方法

### 1. 脳内留置型微細内視鏡の開発とそれを用いた性能試験

(祖父江グループ、小笠原グループ、人見グループ、リコー光学株)

## 当初の研究計画



微細ガラスファイバーを束ねることによって高精細画像の取得を可能としながら、1mm径前後の細く柔軟な形状の微細内視鏡を開発する。微細ファイバーは細く柔軟な機器形状のため、狭く限定された頭蓋内脳周辺部においても圧迫負荷を与えることがなく、また照明光もファイバーによって引き込み、光源から発する熱の影響も排する形状とした。

### 2. 脳内留置型微細内視鏡内視鏡に連結する2光子レーザー顕微鏡開発

(祖父江グループ、小笠原グループ、人見グループ、リコー光学株)

試作した微細内視鏡プロトタイプはまず通常可視光化で解像度試験、カラーパレットによる色調試験を行った。頭蓋内留置使用のため、光源および光源ファイバーの使用も検討し、鮮明な画像の取得と血管動態の明確な判断のため白色LED光源を採用した。また、蛍光プローブによる血管・血流動態を観察するため、2光子レーザーによる顕微観察を検討した。

### 3. ヒトに使用可能な蛍光プローブの開発研究

(祖父江グループ、小笠原グループ、人見グループ)



通常可視光下での血管・脳組織観察に加えて、より選択的に血管および血流の動態を確認可能とするために、蛍光色素を用いた観察について検討を行った。

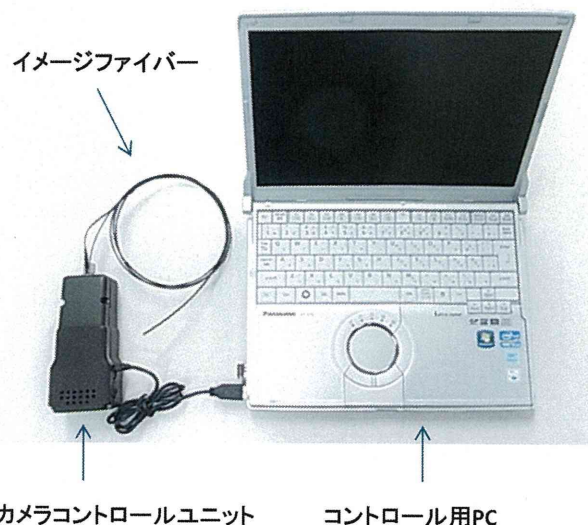
#### 倫理面への配慮

動物モデル（ラット・マウス・マーモセット）を用いた微細内視鏡の脳内留置実験による安全性試験とその後の組織化学・行動解析については、岩手医科大学動物実験委員会に申請中である。H23年度は申請中であったため、実験動物生体を用いた実験は行なわず、深麻酔下で安楽死させた後のラット成体を用いて撮像試験を行った。承認が下り次第、同委員会ガイドラインに従って動物モデルを用いた実験を遂行する。ヒトでの臨床安全性試験に向けてはPMDAに相談の上、岩手医科大学医学倫理委員会に申請予定である。承認後に、同委員会ガイドラインと厚生労働省「臨床研究に関する倫理指針」に従って研究を遂行する予定である。

#### C. 研究結果

今年度は短い研究期間ながら、岩手医科大学歯歯葉総合研究所、脳外科学、解剖学、リコー光学株式会社による立案、機器性能についての検討を端緒に、微細内視鏡プロトタイプの開発に成功した。実験動物を用いて内視鏡としての撮像性能および操作性や留置安全性に関わる材質の検討を重ね、機能の改良・改善を目指している。

#### 微細内視鏡プロトタイプ(1号機)全体像



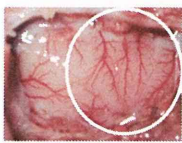
#### 1. 脳内留置型微細内視鏡の開発とそれを用いた性能試験

現時点で完成しているプロトタイプは一本当たり径14  $\mu\text{m}$  (モニターへの投映上、1画素に相当)プラスチックファイバーを7,500本束ねた内径1 mm、外径1.6 mmの微細内視鏡で、被写界深度2 mm・画角40度である。この微細内視鏡で、ラット脳の中大動脈はもちろん100  $\mu\text{m}$ 前後の小動脈まで観察可能である。プラスチックファイバーは7,500本束ねた状態であっても非常に柔軟であり、脳深部への留置に関しても有利であると考えられる。今後、さらに撮像ファイバー径を4  $\mu\text{m}$ /本のグラスファイバーを用いて細径化し、25,000本束ねた(25,000画素に相当)内径0.5 mm径で画角をさらに広げる(広角化)等の改良を行い、画像の鮮明化を計る。可視光の照明は白色LEDを採用し、イメージファイバー先端より照射可能とした。暗条件でもファイバー先端近傍を照明するには十分な明るさが得られた。し

かし、組織に照明が当たった際の強い反射は観察の障害となることから、分散光とすべく改良中である。

また今回の撮像試験では撮像時のソフトウェアの操作性および機能性が課題として上がった。現段階ではファイバーからの画像は既存のソフトウェアを用いてパソコンモニター上に描画、画質調整を行った。しかし、操作性には改善の必要があった。機能を十分に活かすことができるようにするため、撮像および機器の制御を行うソフトウェアの操作性についても改良を行っている。

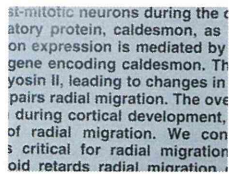
### 微細内視鏡プロトタイプによる撮像試験



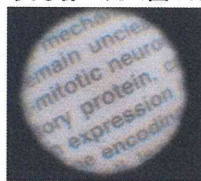
ラット大脳表層血管の実写像



微細内視鏡プロトタイプを用いた撮像  
(左実写像の丸で囲った部分)



論文の実写像



微細内視鏡プロトタイプを用いた撮像

## 2. 脳内留置型微細内視鏡内視鏡に連結する2光子レーザー顕微鏡開発

本研究の当初計画では蛍光プローブによる血管動態を観察可能とするため、2光子レーザー顕微鏡装置の導入を検討した。しかしレーザー光の長期照射による危険性ととも、後述のインドシアニングリーン (ICG) を用いることによって、光源部のフィルター交換により ICG の蛍光観察

により血流動態の詳細な観察が可能であると判断した。今後、ICGを始め、他の蛍光物質検出などに対応するために近赤外領域を含む多波長の照射を可能とする光源および検出用のフィルターセットについても検討を行っている。

### 3. ヒトに使用可能な蛍光プローブの開発研究

血管動態や血流の観察にはこれまでに動物モデルでは数種の蛍光色素が用いられている。血管内皮の選択的染色色素、蛍光色素を付加した多糖類 (デキストランなど) を静注による血流の蛍光観察などがそれに当たる。しかしこれらの方法はヒトへの臨床応用を考えた際に、安全性の確認プロセスを考慮すると実用化までの行程が長い。それに関して、脳外科手術において血管の選択的な可視化を目的としてインドシアニングリーン (ICG) という色素が薬事承認を終え、臨床応用が開始されている。ICGは肝機能検査を中心に、以前より臨床で使用されている色素であり、人体への安全性が確認されている。

ICGは血清蛋白質と結合すると800nm前後の波長の光で励起され、845nmの蛍光を発生する。生体における血管の蛍光観察を考える際には、どの程度まで励起光、蛍光が届くのかということが重要であり、血管近傍に存在する主要な吸光物質としてはヘモグロビンと水であり、それぞれおよそ600nm以下、800nm以上の波長の光を吸収する。つまりICGの励起波長800nm(近赤外領域)と蛍光波長845nmという性質は生体内での蛍光観察に適したものであるといえる。脳外科手術下では、ICGを静注した後に蛍光観察用のフィルターを通して観察すると、血管を選択的に浮かび上がらせて観察することができるため、脳血



管の走向や血流状態の確認に用いられている。当初の研究計画では、目的に適した新規の蛍光色素の開発を検討していた。しかしICGの利用によって当面の基本目的は達せられると考えている。今後動物モデルによる微細内視鏡試験において、ICGを用いた選択的な脳血管・血流動態の撮像、経時的観察を検討していく。

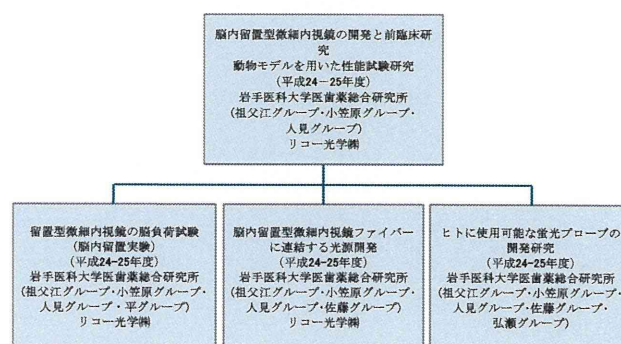
#### D. 考察

研究を開始して日が浅いが、脳内留置型に向けて、微細内視鏡プロトタイプを完成させることに成功した。これを用いて撮像試験が可能となった。現プロトタイプの画像解像度には改善の必要があるが、使用するファイバーの細径化と本数の増加による画質の向上については既に具体的な変更を進めている。この微細内視鏡プロトタイプを攣縮ラット・マウス・マーモセットの脳損傷モデル・脳底動脈および中大脳動脈狭窄モデルなどの当該部位に留置し、性能および実用性・安全性の検討を行う。微細内視鏡を長時間脳内留置し(1~3週間程度)、抜去後の脳機能(組織化学的検索、血行動態を含む脳血管機能、モデル動物の行動)について解析を行い、微細内視鏡脳内留置の性能・実用性・安全性を検討する。さらに臨床応用では衛生面も考え先端留置部をディスプレイ可能なカートリッジ式にすることが可能か検討を行っている。

臨床での使用に関して、重症くも膜下出血においては、内視鏡を脳底槽あるいはシルビウス裂、大脳半球間裂などのくも膜下腔に留置し、脳内主幹動脈である内頸動脈、中大脳動脈、前大脳動脈等の主幹動脈の口径変化を経時的に観

察することにより、脳血管攣縮の状態をモニターすることを想定している。また、重症頭部外傷においては、皮質静脈あるいは橋静脈の周囲に留置し、その色彩を見ることにより、脳内酸素の需要と供給のバランスを知ることが可能となる。この際に、i) 鮮明な画像を得る、ii) 一時的に観察部位を洗浄する機能、iii) 脳内を観察しながら観察部位を一定範囲で変えられる機能、の3つが必要と考えられる。i)に関しては上述したように現在の撮像性能をさらに改良することでクリアできると考えているが、ii)、iii)の機能が当面の課題となる。ii)に関してはくも膜下出血後の脳槽ドレナージ用のドレーン近傍に留置する場合には不要となるかもしれないが、それとは独立にファイバーその機能を持たせる必要があるか検討している。iii)に関しては、視野の広角化とともにどの程度の視野調節が必要であるのか、動物モデルも用いながら確認していく。また、撮像や光源、検出のコントロールを容易に行うことができるソフトウェアの開発も今後の課題である。

#### 今後の研究計画





interaction with Myosin II. J Biol Chem. 2012; 287(5), 3349-3356. (査読有)

#### E. 結論

脳内留置型微細内視鏡はこれまで困難であった脳外科手術閉頭後の頭蓋内環境を正確にモニターし、より迅速かつ的確な処置を可能とする画期的なアプローチとなり得る。本年度は開発・研究が端緒に着いたところだが、重要な基盤を打ち立てることができた。より高度な医療機器としての完成を目指し、今後、機能の洗練と安全性の確認を進めていく。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 結果発表

##### 1. 論文発表

Morita T., Mayanagi T. and Sobue K.  
Caldesmon regulates axon extension through

##### 2. 学会発表

Kazuyoshi Nakamura, Taira Mayanagi, You Komagiri, Kenji Sobue & Manabu Kubokawa: Involvement of interferon- $\gamma$  in modulating K<sup>+</sup> channel activity in human kidney proximal tubule cells. 第89回日本生理学会大会シンポジウム: 上皮イオン輸送の細胞分子メカニズム 2012年3月29日(松本)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

準備中

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

厚生労働科学研究費補助金(医療機器開発推進研究事業)

分担研究報告書

脳内留置型微細内視鏡の開発と前臨床試験研究 (H23-医療機器-指定-001)

研究分担者 小笠原 邦昭 岩手医科大学 脳神経外科学 教授

研究要旨

脳外科手術において術後の頭蓋内の血流状態を把握することは予後管理において非常に重要である。本研究は、脳外科手術後の血流管理や脳組織腫脹のモニターを目的として、頭蓋内に留置可能な微細内視鏡の開発を目指す。脳外科手術閉頭後にこれまでも経頭蓋的ドップラーなどを用いて脳血流状態のモニターは行なわれてきたが、これまで経時的に頭蓋内の視覚的観察を行うことは不可能であった。術後に脳槽ドレナージとともに術野に留置するという形態には侵襲性がなく、これまでの頭蓋内状態のモニター法では困難であった血流変化の速やかな検出や、危険な状態への予兆を見出せる可能性を持っている。今年度は微細内視鏡の作成に向けて課題や問題点の抽出をもとに、試作機の作成を行った。

A. 目的

脳組織は酸素および栄養要求性が非常に高く、脳血管に生じた血流の障害は限定的なものであっても脳組織に大きな影響を与える。脳血流障害によって生じる脳機能障害は麻痺や意識障害を引き起こし、後遺症はその後の生活の質を落とし、介護が必要となるなど福祉を論じる上でも予防と、機能障害を残さない適切・迅速な対応が必要となる。

脳外科で診療するくも膜下出血 (SAH) は、多くの例では脳動脈瘤の破裂によって発症し、強い頭痛や意識障害、嘔吐の症状を引き起こす。現在ではごく初期の段階で発見し、適切な処置

を行えば高い生存率と機能障害を起こす可能性も低く抑えられるようになった。しかしくも膜下出血の30~40%において、発症後4日目から14日目頃にかけて遅発性に生じる脳血管攣縮と呼ばれる脳動脈の可逆的狭窄が起こる。脳血管攣縮は生命を脅かし、重篤な障害を残す結果となる場合も少なくない。早期の適切な処置で急性期を脱した患者の機能および生命の予後を左右する重要な合併症だといえる。脳動脈瘤はウィリス動脈輪近傍に生じることが多く、脳の動脈支配にはウィリス動脈輪より先に側副血行路がないため、この領域に血流障害が生じると重篤な状態に陥り易い。脳血管攣縮の詳細な発生機序は未解明な部分も多い。これまでは経頭蓋

的ドップラーによって脳血管攣縮中大脳動脈水平部の血流速度を指標としていたが、確定診断には血管造影が必要であり、そこには時間的な遅延が生じやすい。水分・電解質調節と血圧を高めに維持することで血流を確保するといった予防措置や、Rho キナーゼ阻害薬、トロンボキサン A2 合成阻害薬によって血管収縮阻害など一定の有効性を示す方法も報告されてきた。しかし、より詳細に頭蓋内血管近傍に生じる変化、攣縮の予兆を捉える事が可能となればよりの確かなタイミングで必要な処置を施すことが可能となる。また脳内留置に関しては、これまでも頭蓋内にドレーンを留置して血腫の溶解、排出を促す脳槽ドレナージは、脳血管攣縮の抑制的処置として安全かつ効果的に行なわれてきた方法である。このことから実際に用いる太さ 5mm 程度のドレーンよりも細い内視鏡の留置について、空間的な問題は生じないと考えられるものである。

他にも外傷性の脳損傷後の脳圧の管理など様々な場面において、頭蓋内の状態をモニターすることで適切なタイミングで必要な処置を施すことが可能となり得る。

本研究では臨床での利用を念頭においた脳内留置による侵襲性が低い細径の微細内視鏡の開発を進めた。

## B. 研究方法

本年度は岩手医科大学とリコー光学㈱との共同開発により、脳内留置を可能とする微細な内視鏡について、その使用に必要な様々な機能性について検討を行い、試作機の開発を行った。

撮像は微細ファイバーを束ねた撮像ファイバーによって行い、光源も同様にファイバーを用いて撮像部に照射を行う。検出に関しては可視

光に加えて、蛍光観察が可能である光学性能を持たせる。また、血管動態を明確に観察するため、既に脳外科手術で使われているインドシアニングリーンの利用を検討する。

開発に際しては、今後の脳内留置試験に必要な安全性を考慮した機器形状、素材を用いたものとした。

## 倫理面への配慮

動物モデル(ラット・マウス・マーモセット)を用いた微細内視鏡の脳内留置実験による安全性試験とその後の組織化学・行動解析については、岩手医科大学動物実験委員会に申請中である。H23 年度は申請中であったため、実験動物生体を用いた実験は行なわず、深麻酔下で安楽死させた後のラット成体を用いて撮像試験を行った。承認が下り次第、同委員会ガイドラインに従って動物モデルを用いた実験を遂行する。ヒトでの臨床安全性試験に向けては PMDA に相談の上、岩手医科大学医学倫理委員会に申請予定である。承認後に、同委員会ガイドラインと厚生労働省「臨床研究に関する倫理指針」に従って研究を遂行する予定である。

## C. 研究結果

今年度は今後の改良の土台となる試作機の完成に成功した。現在試験を行ったのは白色 LED による可視光下での観察であるが、解像度、色調ともに良好な結果を得た。実験動物の脳血管において 100  $\mu\text{m}$  径程度の血管まで確認することが可能であり、臨床での主要な脳血管の大きさに対して現段階でも十分な撮像性能をもっていると言える。照明に関しては、ファイバーの近傍で照射光が組織に反射し、撮像の障害になることが生じることがあった。これに関しては

より適切な光源照射の方法、強度について検討・開発を進めていく。また、脳内留置については、留置部分素材の安全性と、衛生面への考慮が必要である。素材はグラスファイバー（試作機はプラスチックファイバー）を用いて、エチレンオキシドによるガス滅菌を可能としている。また、留置中の安全性のためにも内視鏡を固定するためにファイバーの中ほどに固定用の固定パッチをつけ、頭皮に固定が可能とできるようにした。

また血管動態を選択的に可視化する手段として、インドシアニングリーン（ICG）の利用を検討した。ICGは、肝機能検査など既に生体への安全性が確認されている。これを静注することで、ICG色素と、血清中のタンパク質が結合し血流中で蛍光を発するようになる。これはFDAでも認められた安全性の高い色素である。ICGは比較的長時間血流中で蛍光が観察できる試薬である。この検出に向けて、すでに術中に利用されている術中蛍光観察装置の仕様などから、励起光・蛍光観察用のフィルターセット、モニター中での観察条件について検討した。

#### D. 考察

微細内視鏡のプロトタイプは非常に細く柔軟な機器形状でありながら、良好な撮像性能を示した。解像度の改善はさらに進められておりより鮮明な画像の取得が可能となる見込みである。次年度以降、実験動物モデルを用いた機能・安全性試験によって、新たな改善点、技術的課題も出てくることが考えられる。これらを解決し

ながら、より機能的かつ安全な医療機器としての完成を目指す。

#### E. 結論

脳内留置型微細内視鏡は脳外科手術後の術後管理において、有用なツールとなり得るものだと考えられる。現段階では今後の開発の基盤となる試作機が出来あがったところであるが、今後改良を加えることによって、従来の医療機器にない機能性を備えた優れた機器としての完成が期待されるものである。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 結果発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

準備中

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし



分担研究報告書

脳内留置型微細内視鏡の開発と前臨床試験研究 (H23-医療機器-指定-001)

研究分担者 人見 次郎 岩手医科大学 解剖学 教授

研究要旨

本研究は、微細なグラスファイバーを用いた撮像により、脳内に留置可能な微細形状の内視鏡の開発を目的とする。脳外科手術後に頭蓋内に留置することによって、脳内環境の視覚的な経時観察が可能な医療用機器としての完成を目指すものである。これによって脳血管、脳内血流状態を始め、脳組織の状態をリアルタイムでモニターすることを可能とする。神経細胞の保護の観点から迅速な処置が必要な脳外科手術後の術後管理に新たな可能性をもたらすものとなることが期待される。微細内視鏡の試作機を開発し、その機能性について検討を行った。

A. 目的

本研究は脳外科での開頭手術の後に脳槽内に留置することによって、経時的により詳細に頭蓋内の血流や脳組織の変化を観察することを可能とする微細内視鏡の開発を進める。観察のために頭蓋内に内視鏡を挿入するとなると、その侵襲性が問題となるが、開頭手術が行われた後に閉頭時に主要脳血管が観察可能な部位に留置するという方法であれば、これは特別な侵襲性を必要とするものではない。脳組織は強固な頭蓋骨に覆われていることよって、脳外科手術の後の遅発性脳血管攣縮や脳圧の亢進などの適切な処置が必要な状況の出現に対して、経頭蓋的な方法によって間接的に脳内環境をモニターすることしか出来なかった。MRI や CT、SPECT などの画像診断の進歩はこの術後管理に対して有用なものであることは間違いないが、長期にわ

たる経時的な観察に向けた方法とは言えないのも事実である。遅発性の脳血管攣縮はくも膜下出血発作の後、4~14 日後に高頻度で生じるものであるが、いつそれが起きるのかを予測することは困難である。そのためこれまでは経頭蓋的ドップラーによって中大脳動脈の水平部の血流速度のモニターが用いられてきたが、より可視的にその血流および脳血管に生じる変化を観察することが可能となれば、素早い発見と迅速な処置、あるいは予測すらも可能となるかもしれない。頭蓋内という特異な環境ゆえに同様のアプローチは前例がないが、ドレナージのために太さ数 mm のドレンチューブの留置はよく行なわれるものであり、決して突飛なものではない。神経細胞の保護のためにとりわけ迅速な対応が必要となる脳外科術後管理において画期的な手法となり得るものと考えられる。

臨床での使用に関して、重症くも膜下出血においては、内視鏡を脳底槽あるいはシルビウス裂、大脳半球間裂などのくも膜下腔に留置し、脳内主幹動脈である内頸動脈、中大脳動脈、前大脳動脈等の主幹動脈の口径変化を経時的に観察することにより、脳血管攣縮の状態をモニターすることを想定している。そのために高精細画像の取得と、必要に応じて選択的な血流・血管動態を観察することを可能とする蛍光観察法の開発を行う。

## B. 研究方法

本学とリコー光学㈱との共同開発体制によって、プラスチック製あるいはガラス製のマイクロファイバーを束ねた撮像装置を開発する。頭蓋内での撮像を可能とする照明ファイバーと共に閉頭の際に脳槽内に留置可能な微細な形態とする。光源の選定、留置・観察に用いる機器としての機能性を検討し、安全性および操作性を考慮に入れた上で試作機を作製する。

試作機を用いて撮像試験を行い、性能の改良を進めていく。血流動態をより明確に観察できるように蛍光色素を用いた観察法を検討し、動物実験でその精度を確認する。

## 倫理面への配慮

動物モデル(ラット・マウス・マーモセット)を用いた微細内視鏡の脳内留置実験による安全性試験とその後の組織化学・行動解析については、岩手医科大学動物実験委員会に申請中である。H23年度は申請中であったため、実験動物生体を用いた実験は行わず、深麻酔下で安楽死させた後のラット成体を用いて撮像試験を行った。承認が下り次第、同委員会ガイドラインに従って動物モデルを用いた実験を遂行する。

ヒトでの臨床安全性試験に向けてはPMDAに相談の上、岩手医科大学医学倫理委員会に申請予定である。承認後に、同委員会ガイドラインと厚生労働省「臨床研究に関する倫理指針」に従って研究を遂行する予定である。

## C. 研究結果

上述のコンセプトのもと、開頭手術の際に脳槽に脳組織への圧排なく留置可能な微細なファイバー内視鏡の開発を行った。本年度は撮像性能を確認するためのプロトタイプを完成させることができた。これを用いて画質解像度、明度、色調観察性能の検討を進めた。

撮像のためのファイバーはプロトタイプではプラスチック製のマイクロファイバーを用いているが、より精細な画質を実現するためにガラス製のより細径のグラスファイバーを用いることによって微細内視鏡径を拡大することなく、画質を向上させることが可能である。ガラス製ファイバーはより細径化、高画質化を可能とするが、一方でプラスチックファイバーよりも束ねた際の柔軟性で劣る。脳内留置を行う際に血管視野へのアプローチなどにおいてファイバーの柔軟性が必要とされる場面が想定されるため、この点については慎重に検討を進めていく。

また今回の撮像試験では撮像時のソフトウェアの操作性および機能性が課題として上がった。現段階ではファイバーからの画像は既存のソフトウェアを用いてパソコンモニター上に描画、画質調整を行っていた。しかし、操作性に問題があり、描出画質を適切に改善するには手間がかかるものであった。撮像に際して改善していく必要がある課題として今後対処していく。

## D. 考察

ラットの脳血管は微小なものであるが、内視鏡試作機ではかなり細い血管まで観察することができた。既にこの試作機を用いた結果を基にして構成素材の検討が進められており、さらなる撮像性能の改善が進められている。ファイバー材質の変更に伴って強度や柔軟性が従来のものとは変化する可能性があるため、今後も入念な撮像試験を行うとともに、動物モデルを用いた実験系によって課題抽出およびその解決によって機能・安全性の確認・改善を進めていく。脳槽内に留置するにあたって、脳組織を空間的に圧迫することを避けるため、より細径でより高画質をコンセプトに開発を行う。

また、今年度の微細内視鏡プロトタイプを用いた撮像試験によって、感覚的にかつ適切に内視鏡の操作、画質調節が可能なソフトウェアの開発も進める必要があることが浮かび上がった。これは多波長光源を利用して蛍光色素を用いた観察を行う際にはより重要になってくる課題である。来年度以降の開発に反映させていく。

本研究の主眼は可視的観察を行う内視鏡の開発であるが、さらに脳組織の酸素飽和度をモニターする電極や、血流、血圧をモニターするドップラー探査子などを同時に留置することも検討していく価値があると考えられる。

#### E. 結論

脳内に留置することで直接的に頭蓋内環境を観察するという発想はこれまで臨床においてなされなかったアプローチである。技術面、安全性の面で開発・確認していかなければいけない部分はあるが、迅速な処置が必要な脳外科分野

の医療機器として大きな可能性を持っている。また、この微細な内視鏡と、術後留置というアプローチは他の医療分野においても応用可能なものである。

今回試作に成功した微細内視鏡プロトタイプを用いて、今後撮像試験および動物モデル試験を綿密に実施していくことによって改善点を抽出し、機能性、安全性および操作性を高めていく。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 結果発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

準備中

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Morita T., Mayanagi T. and Sobue K.	Caldesmon regulates axon extension through interaction with Myosin II.	Journal of Biological Chemistry	287(5)	3349-3356	2012



# Caldesmon Regulates Axon Extension through Interaction with Myosin II\*

Received for publication, August 18, 2011, and in revised form, November 27, 2011. Published, JBC Papers in Press, December 9, 2011, DOI 10.1074/jbc.M111.295618

Tsuyoshi Morita<sup>†</sup>, Taira Mayanagi<sup>†,§</sup>, and Kenji Sobue<sup>†,§1</sup>

From the <sup>†</sup>Department of Neuroscience, Osaka University Graduate School of Medicine, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan and the <sup>§</sup>Department of Neuroscience, Institute for Biomedical Sciences, Iwate Medical University, 2-1-1 Nishitokuta, Yahaba-cho, Shiwa-gun, Iwate 028-3694, Japan

**Background:** Axon extension, an essential step for creating neural circuits, is regulated by cytoskeletal dynamics.

**Results:** Caldesmon is a regulator of the actin cytoskeleton and enhances axon extension through direct interaction with myosin II.

**Conclusion:** Caldesmon binding to myosin II inhibits myosin II function, resulting in the enhancement of axon extension.

**Significance:** This study elucidates how caldesmon-regulated actin-myosin system is involved in axon extension.

To begin the process of forming neural circuits, new neurons first establish their polarity and extend their axon. Axon extension is guided and regulated by highly coordinated cytoskeletal dynamics. Here we demonstrate that in hippocampal neurons, the actin-binding protein caldesmon accumulates in distal axons, and its N-terminal interaction with myosin II enhances axon extension. In cortical neural progenitor cells, caldesmon knockdown suppresses axon extension and neuronal polarity. These results indicate that caldesmon is an important regulator of axon development.

Neurons in the developing brain extend axonal and dendritic arbors that create a complex circuitry, and the guided extension of axonal fibers is an essential step in this process. Axon extension is regulated by the coordinated interaction of microtubules and actin filaments in the axonal growth cone. A growing body of evidence indicates that microtubule polymerization and stabilization play positive roles in axon extension (1), whereas actin filament roles are more complicated. For example, knocking out Ena/VASP or Cdc42, which positively regulate actin polymerization, causes axonal tract loss (2, 3). In contrast, inhibiting the actin nucleation factor Arp2/3 and pharmacologically destabilizing actin filaments enhances axon extension (4, 5). Thus, the fundamental details of axon guidance and regulation by actin filaments are not well understood.

Caldesmon (CaD)<sup>2</sup> was first identified as a smooth-muscle protein that binds calmodulin and actin (6). It has since been found to be ubiquitously expressed in smooth muscle and non-muscle cells, and to regulate Ca<sup>2+</sup>-dependent actomyosin contraction (7, 8). CaD binds to the side of filamentous actin (F-actin) and inhibits actin-myosin interactions, as revealed by

superprecipitation assays and actin-activated myosin ATPase activity (9–11). CaD binding also stabilizes F-actin filaments by enhancing actin-tropomyosin binding and preventing the actin-severing activity of gelsolin or cofilin (12, 13). CaD plays important roles in migration of non-muscle cells via regulating actin-myosin system (8). We recently reported that CaD is involved in detrimental glucocorticoid-induced effects during cortical brain development (14, 15): glucocorticoids increase CaD levels, transiently retarding the radial migration of cortical neuronal progenitor cells. We also reported that CaD localizes to neuronal growth cones (16). Thus, it seems that CaD plays multiple important roles in neuronal development. In this report, we demonstrate a novel role for CaD in axon extension via its N-terminal myosin binding sequence.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Materials**—The myosin II ATPase inhibitor blebbistatin, the myosin light chain kinase inhibitor ML-7, and the Rho-associated protein kinase inhibitor Y27632 were purchased from Merck. The following antibodies were purchased: anti-tau1 (Chemicon), anti-MAP2 (Chemicon), anti-nonmuscle myosin IIA (Abcam), anti-nonmuscle myosin IIB (Abcam), anti-GFP (Invitrogen), anti-FLAG (Sigma), anti-Myc (9E10, Santa Cruz Biotechnology), and anti-GAPDH (FL-335, Santa Cruz Biotechnology). Anti-CaD antibody was generated as previously described (17).

**Cell Culture and Immunostaining**—Hippocampal neurons were prepared from rat hippocampi on embryonic day 18.5. The dissociated neurons were plated on poly-L-lysine-coated coverslips, and cultured in glial-conditioned MEM containing 1 mM pyruvate, 0.6% (w/v) D-glucose, and 2% B27 supplement (Invitrogen). The next day, the culture was changed to a neurobasal medium containing 2% B27 supplement and 0.5 mM L-glutamine. Cortical NPCs were prepared from rat cerebral cortex on embryonic day 15.5 (E15.5), cultured as previously described (14), plated on laminin-coated coverslips, and cultured under basic FGF-free conditions to induce their differentiation into polarized neurons. A549 and HEK293T cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum. Cells cultured on coverslips were fixed using 4% paraformaldehyde and then processed for immunocyto-

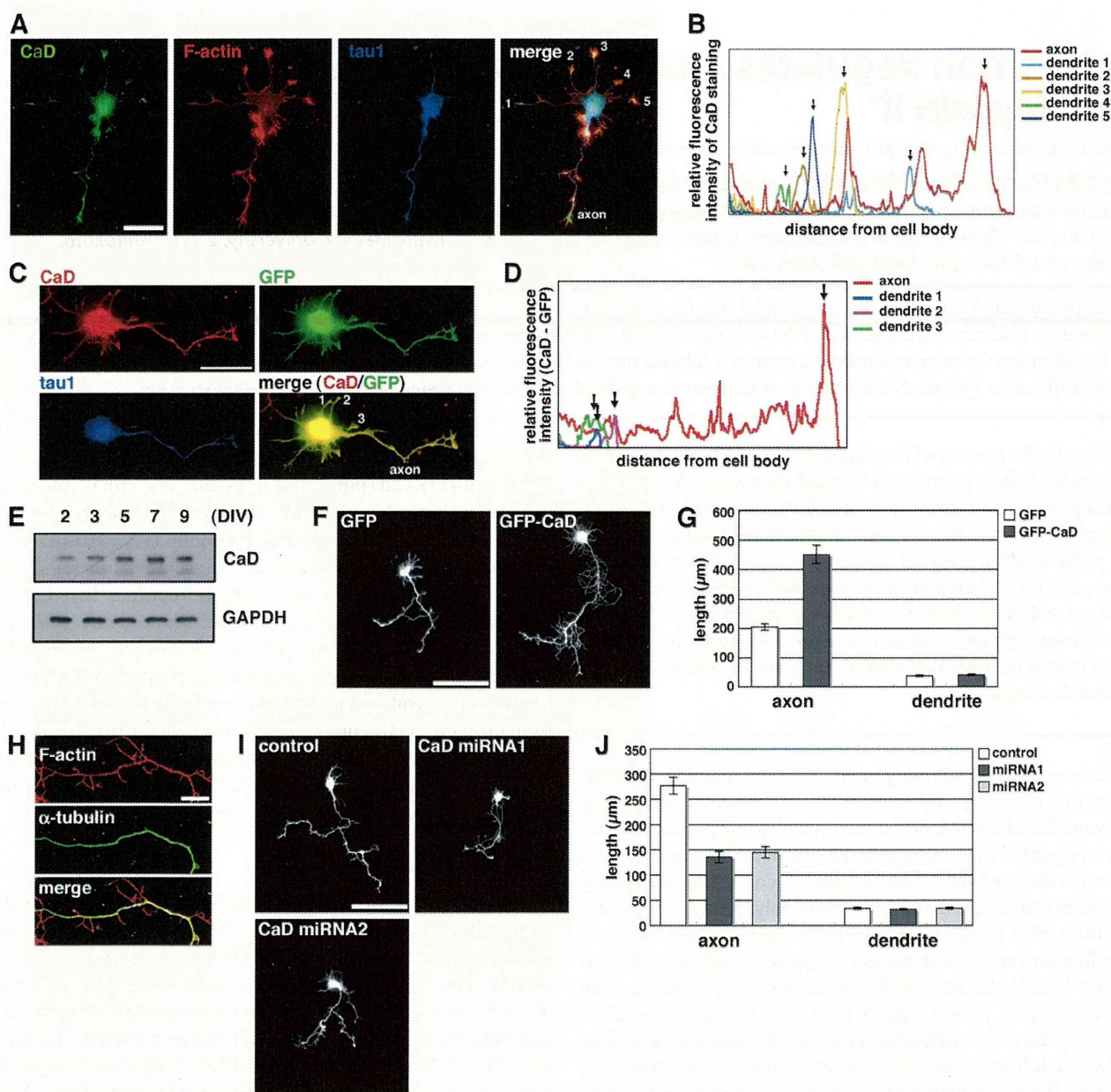
\* This work was supported by Grants-in-aid for Scientific Research 20240038 from the Japan Society for the Promotion of Science (to K. S.) and 23110510 from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT) (to K. S.).

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed: Dept. of Neuroscience, Institute for Biomedical Sciences, Iwate Medical University, 2-1-1 Nishitokuta, Yahaba-cho, Shiwa-gun, Iwate 028-3694, Japan. Tel.: 81-19-651-5710; Fax: 81-19-908-8020; E-mail: ksobue@iwate-med.ac.jp.

<sup>2</sup> The abbreviations used are: CaD, caldesmon; DIV, day *in vitro*; NPCs, neural progenitor cells; FGF, fibroblast growth factor; HMM, heavy meromyosin.



## Caldesmon Regulates Axon Extension



**FIGURE 1. CaD involvement in axon extension.** *A*, CaD protein localization in primary cultured hippocampal neurons. The neurons were fixed and triple-stained with anti-CaD, anti-tau1 antibodies, and phalloidin (F-actin). Bar, 50  $\mu\text{m}$ . *B*, dendrite and axon fluorescence intensities measured in the CaD-immunostained image shown in *A*; arrows indicate growth cones. *C*, neurons, which had been transfected with GFP as a cell volume maker, were fixed and triple-stained with anti-CaD, anti-GFP, and anti-tau1 antibodies. Bar, 50  $\mu\text{m}$ . *D*, dendrite and axon fluorescence intensities were measured in the CaD-immunostained and GFP-immunostained images shown in *C*, respectively, and then GFP-intensity was subtracted from CaD-intensity to correct for the influence of cell volume. Arrows indicate growth cones. *E*, changes in CaD protein expression during neuronal development. *F*, morphology of GFP- or GFP-CaD-transfected neurons after 3 days in culture (bar, 100  $\mu\text{m}$ ) and *G*, quantification of their axonal and dendritic length. Axonal length represents the longest axon branch. Data are means  $\pm$  S.E. from six independent experiments. *H*, morphology of CaD-induced filopodia-like protrusions. The myc-CaD-transfected neurons were fixed and stained with anti-tubulin and phalloidin (F-actin). Bar, 25  $\mu\text{m}$ . *I*, morphology of neurons transfected with control miRNA, CaD miRNA1, or CaD miRNA2, and cultured for 5 days (bar, 100  $\mu\text{m}$ ), and *J*, quantification their axonal and dendritic lengths. Data are means  $\pm$  S.E. from four to six independent experiments.

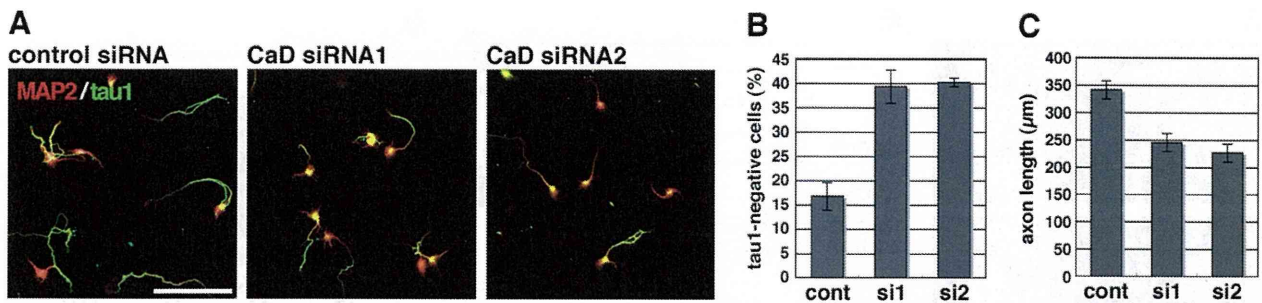
chemistry. To label F-actin, Alexa 568-phalloidin (Molecular Probes) was added to the secondary antibody solution.

**Transfection**—Hippocampal neurons prepared from rat embryos on E18.5 were transfected by the calcium phosphate method as described previously (18). In brief, DNA-calcium phosphate precipitates were prepared using a calcium phosphate transfection kit (Invitrogen). The hippocampal neurons were plated on a Nunclon $\Delta$  surface plate (Nalge Nunc Interna-

tional) and incubated with the precipitates for 3 h. The transfected neurons were replated on poly-L-lysine-coated coverslips and cultured for 3 to 5 days. A549 and HEK293T cells were transfected using Lipofectamine 2000 or Lipofectamine LTX (Invitrogen).

**Expression Plasmids**—The coding regions for human l-CaD, its N terminus (1–263 amino acids), C terminus (264–558 amino acids), and N terminus  $\Delta$ 21–47 (lacking amino acids





**FIGURE 2. CaD involvement in cortical NPC axon development.** A, proliferating cortical NPCs were incubated with control siRNA, CaD siRNA1, or CaD siRNA2 for 3 days, and cultured in basic FGF-free medium for 3 days. The cultured cells were fixed and stained with anti-tau1 (green) and anti-MAP2 (red) antibodies. Bar, 200  $\mu$ m. B, percentage of tau1-negative non-polarized cells among the differentiating progenitor cells. Data are means  $\pm$  S.E. from at least 120 cells. C, quantification of axonal length in tau1-positive cells. Data are means  $\pm$  S.E. from at least 30 cells.

21–47 from the N terminus), and the N-terminal fragments of rat myosin IIA (1–1961 amino acids) and IIB (1–1976 amino acids) were amplified by PCR and subcloned into the highly efficient mammalian expression plasmid pCAGGS. EGFP and Myc tag sequences were fused to the 5'-end of the coding sequences. The mcherry-LifeAct expression vector was constructed as previously reported (19).

**RNA Interference**—Short-interfering RNAs (siRNAs) against rat CaD were transfected into growing cortical NPCs using Lipofectamine RNAi MAX (Invitrogen). MicroRNA (miRNA) plasmids against rat CaD were constructed as previously described (14) and transfected into hippocampal neurons by calcium phosphate precipitation. The targeting sequences and the siRNA and miRNA knockdown efficacy were reported in our previous studies (14, 20).

**Immunoprecipitation**—HEK293T cells with transfected expression vectors were lysed with Triton-X-buffer (0.05% Triton X-100 (pH 7.6), 30 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl 5 mM EGTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, and protease inhibitor mixture for use with mammalian cell and tissue extracts (Nacalai Tesque)). Immunoprecipitation was performed using the earlier-listed antibodies and protein G-Sepharose (GE Healthcare Life Sciences). The Sepharose beads were boiled in SDS-sample buffer to elute the immunocomplexes.

## RESULTS

**CaD Enhances Axon Extension in Hippocampal Neurons**—CaD, a ubiquitous regulator of the actin cytoskeleton, localizes along actin fibers and in the ruffling membrane (7, 8). Here, we found that CaD was located in the soma and growth cones of primary cultured hippocampal neurons, with the strongest expression in the distal axon (Fig. 1, A–D). CaD levels increased for 3 to 7 days *in vitro* (DIV) ( $2.3 \pm 0.8$ -fold at 7 DIV *versus* 2 DIV) while the neurons established polarity and actively extended axons (Fig. 1E). The location and time-course of CaD expression in these cells are consistent with its having a role in axon extension.

We therefore investigated CaD function in neurite outgrowth by overexpressing or knocking down CaD in hippocampal neurons. We used GFP-fused CaD (GFP-CaD), which has the same functions as endogenous CaD (14, 20). GFP-CaD dramatically enhanced axon extension but did not significantly affect dendrite length as compared with the control, GFP (Fig. 1, F and G). GFP-CaD also enhanced formation of filopodia-like

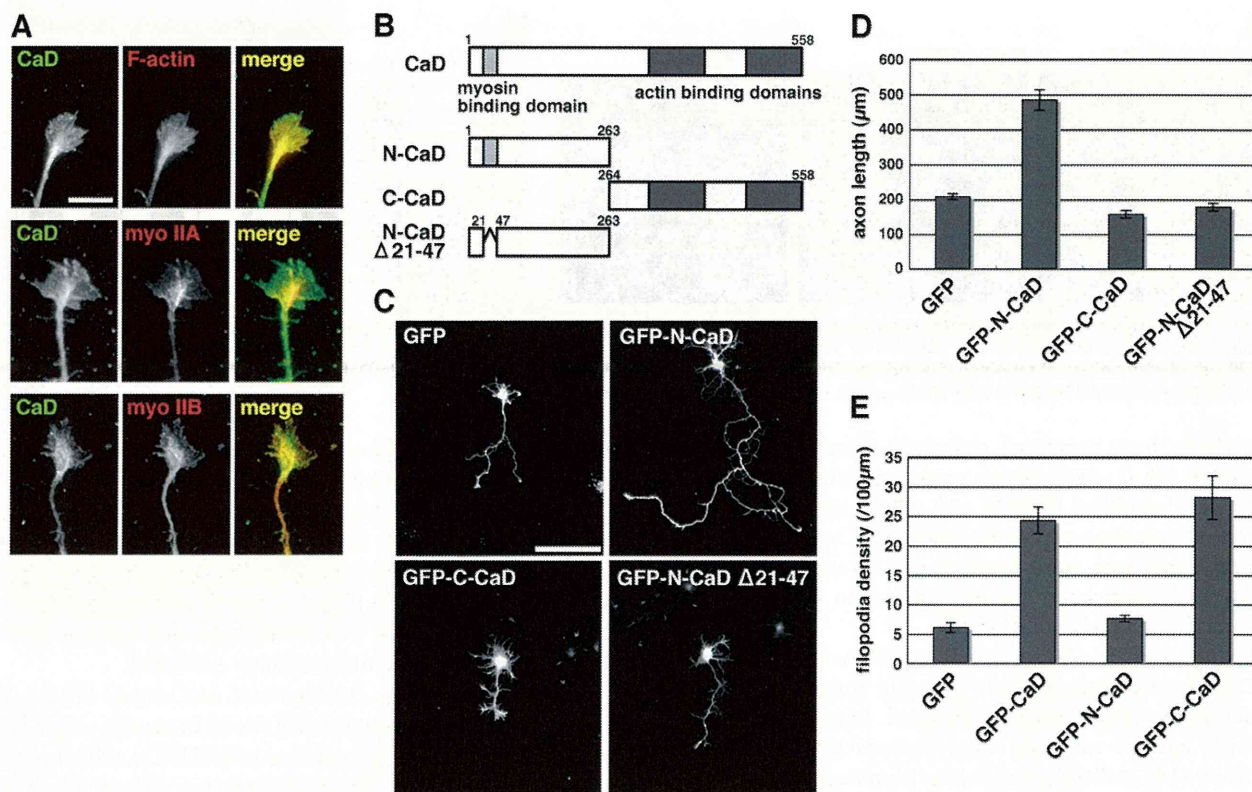
protrusions from the soma and axon branches (Fig. 1F). These CaD-induced protrusions were composed of concentrated actin filaments and were distinct from the main axonal branches, which were filled with microtubules (Fig. 1H). Knocking down the endogenous CaD decreased axon length, but not dendritic length (Fig. 1, I and J), indicating that CaD accumulates in the distal axon of hippocampal neurons during their development and enhances axon extension.

**CaD Regulates Axon Development in Cortical NPCs**—To monitor CaD involvement in early events in neurite outgrowth, we used cortical neural progenitor cells (NPCs), which proliferate as non-polarized cells in the presence of basic fibroblast growth factor (FGF) (14, 21). Under basic FGF-free conditions, however, NPCs stop proliferating and establish neuronal polarity with MAP2-positive dendrites and a tau1-positive axon (Fig. 2A). When CaD was knocked down with siRNAs in proliferating NPCs, tau1-staining showed that the establishment of neuronal polarity was significantly suppressed within three culture days under basic FGF-free conditions (Fig. 2, A and B). Even in polarized cells, the length of tau1-positive axons was significantly shortened by CaD knockdown (Fig. 2, A and C), as observed in hippocampal neurons. At an early stage of NPCs differentiation into polarized cells, immature axons were often stained with both anti-MAP2 and anti-tau1 antibodies. In the CaD-knockdown NPCs, some short axons were MAP2/tau1 double positive, suggesting delayed development of these cells. These findings indicate that CaD plays important roles in establishing neuronal polarity and in axon extension in developing NPCs.

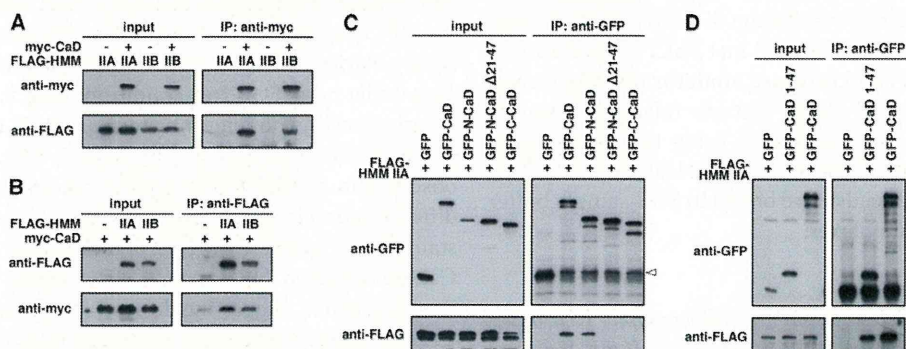
**CaD-Myosin Interaction Required for Axon Extension**—CaD has been reported to bind smooth muscle myosin at its N terminus and F-actin at its C terminus, suggesting that it functions to link these molecules (22). In the growth cone of hippocampal neuronal axons, CaD colocalized with F-actin and myosin IIA/IIB, the major non-muscle isoforms of myosin II (Fig. 3A). To examine myosin and actin involvement in CaD-induced axon extension, CaD N- and C-terminal fragments (N-CaD and C-CaD) were expressed separately in hippocampal neurons. N-CaD enhanced axon extension like full-length CaD, but C-CaD did not (Fig. 3, B–D), suggesting that CaD interaction with myosin, but not F-actin, is necessary for CaD-induced axon extension. On the other hand, C-CaD, but not N-CaD, induced formation of the filopodia-like protrusions like full-



## Caldesmon Regulates Axon Extension



**FIGURE 3. The effect of CaD N- and C-terminal fragments on axon extension.** *A*, CaD, myosin IIA, and myosin IIB localization in the hippocampal neuron axonal growth cone. Bar, 10 μm. *B*, CaD domain structure. *C*, morphology of neurons cultured for 3 days after transfection with GFP, GFP-N-CaD, GFP-C-CaD, or GFP-N-CaD Δ21–47 (bar, 100 μm.), and *D*, quantification of their axonal length. Data are means ± S.E. of values from four to six independent experiments. *E*, quantification of their filopodial density. Data are means ± S.E. of values from four to six independent experiments.



**FIGURE 4. CaD and myosin II interactions.** *A*, HEK 293T cells transfected with myc-CaD and FLAG-HMM IIA or FLAG-HMM IIB were immunoprecipitated using anti-Myc antibody or *B*, anti-FLAG antibody. *C*, HEK 293T cells were transfected with FLAG-HMM IIA and GFP, GFP-CaD, GFP-N-CaD, GFP-N-CaD Δ21–47, or GFP-C-CaD and immunoprecipitated with anti-GFP antibody. *Arrowhead*: IgG light chain position. *D*, HEK 293T cells were transfected with FLAG-HMM IIA and GFP, GFP-CaD Δ21–47, or GFP-CaD and immunoprecipitated with anti-GFP antibody. *Arrowhead*: IgG light chain position.

length CaD (Figs. 1*F* and 3, *C* and *E*), suggesting that this effect is dependent on the C-terminal actin binding domains.

Co-immunoprecipitation was used to determine whether non-muscle myosin II, like smooth- and skeletal-muscle myosins, binds to CaD. Because CaD is reported to bind to the S-1 and S-2 regions of smooth and skeletal muscle myosins (23), we examined CaD interactions with myosin IIA or IIB N-terminal fragments, which are composed of a globular head domain, a neck region, and a small tail fragment corresponding to heavy meromyosin (HMM). As with smooth and skeletal muscle myosins, CaD bound to HMM IIA and IIB, and CaD's C-termi-

nal F-actin-binding domains were not necessary for these interactions (Fig. 4, *A*–*C*).

Previous studies demonstrated that the 27-amino acid sequence in CaD's N terminus (Tyr-21 to Lys-47 in human I-CaD) is necessary for binding to smooth-muscle myosin (24). N-CaD Δ21–47 fragment, in which this 27-amino acid sequence is deleted, did not interact with HMM IIA, and a CaD fragment including amino acids 1–47 was the minimum required for HMM IIA binding (Fig. 4, *C* and *D*). Importantly, N-CaD Δ21–47 fragment completely lost the ability to enhance axon extension (Fig. 3, *C* and *D*), strongly supporting the idea that CaD is accumulated in the growth cone as