

厚生科学研究研究費補助金
脳科学研究事業

神経回路網形成障害の分子機構に関する研究

平成 12 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 大野耕策

平成 13 (2001) 年 3 月

目次

I. 総括研究報告書

| | |
|----------------------------|---|
| 神経回路網形成障害の分子機構に関する研究 | 1 |
|----------------------------|---|

II. 分担研究報告

| | |
|---|----|
| 1. NPC1 蛋白質の神経回路網形成と維持に関する分子薬理学的研究 | |
| - ガングリオシッド GM1 の蓄積部位と蓄積機構の解明 - | 11 |
| 鳥取大学医学部助教授 二宮治明 | |
| 2. 発育期神経回路網形成をおこす遺伝性疾患の研究 | |
| - 発生期脳に働く NBS1 蛋白質に関する研究 - | 14 |
| 鳥取大学医学部助教授 岡 明 | |
| 3. 局所神経回路網遮断および過剰興奮法の開発と応用的研究 | |
| - HVJ- リボソームを用いた脳内遺伝子導入による海馬機能異常亢進と てんかん発作 - | 16 |
| 北里大学医療衛生学部教授 佐治真理 | |

| | |
|---------------------------|----|
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | 28 |
|---------------------------|----|

| | |
|-----------------------|----|
| IV. 研究成果の刊行物・別刷 | 33 |
|-----------------------|----|

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

総括研究報告書

神経回路網形成障害の分子機構に関する研究

主任研究者 大野耕策 鳥取大学医学部教授

【研究要旨】 種々の遺伝的障害は、それぞれに特有な神経症状を示す。1つの遺伝的欠陥が特定の神経回路網の成熟障害や変性と関係していることは疑いない。それぞれの発育期遺伝病での、神経回路網形成障害の分子機構を明らかにしていくことは、治療法確立に重要である。発育期の神経遺伝病として、結節性硬化症、ニーマン・ピック病C型、その他の疾患を取り上げ、その神経回路網障害機構を明らかにし、治療法の確立を目指す。

結節性硬化症：遺伝子産物ハマルチンは培養神経細胞の分化に伴い核から細胞質に移行し、そのアンチセンス DNA によりハマルチンの発現を抑制すると神経突起の伸長が促進され、さらに RhoA の恒常的活性型変異体を発現させると突起の伸長が抑制された。このことはハマルチンの核・細胞質移行は神経細胞の分化と深く関係し、Rho が下流に存在する可能性が高い。今後、神経分化と関係して核・細胞質移行を担うプロテオームを解析する。

ニーマン・ピック病C型(NPC)：モデルマウスで、ブルキンエ細胞や視床 VPL/ VPM だけではなく、深部知覚の中継核である延髄後索核や後根に早期から軸索変性が出現し、感覚系優位な神経回路網障害がおこることを見出した。この回路網障害とガングリオシッドの細胞内蓄積機構を解析する過程で、ニーマン・ピック病C型の原因蛋白質 NPC1 はリソソーム・後期エンドソームからの小胞輸送だけでなく、早期エンドソームから細胞膜への逆行性小胞輸送にも関与することを見出した。さらに、DNA チップ法により、インターフェロンで誘導される一群の遺伝子発現が亢進し、STATs がモデルマウス肝臓、視床、ブルキンエ細胞などの変性をおこす領域に強く発現することを見出した。今後、ニーマン・ピック病での STATs の発現増加の背景と神経回路網障害の関係を明らかにしていく。

その他の遺伝病：免疫異常に加え、小頭症や精神遅滞をきたす Nijmegen breakage 症候群を取り上げ、その原因蛋白質 NBS1 の抗体を用いヒト胎児脳を検索し、この蛋白質は胎生期に神経細胞が分裂、移動した直後の未熟な神経細胞とブルキンエ細胞に発現し、回路網形成の初期に重要な役割を果たす可能性を見出した。

神経回路網形成障害の解析と治療法を開発する1つの手段として、HVJ-リポソーム法により、脳内局所に遺伝子を導入し、局所神経回路網の遮断と興奮をおこす方法を開発した。ラット海馬歯状回周辺へグルタミン酸受容体サブタイプである AMPA 受容体サブユニットの変異体 GluR2Q を発現させると、音刺激性てんかん発作が誘発されることを明らかにした。この方法によって海馬に異常興奮性回路が形成され、側頭葉てんかん部分発作の発生病理と関係することが示唆されただけでなく、この方法が特定の神経回路網の機能解析や活性化に応用できる可能性が示された。

分担研究者

二宮治明・鳥取大学医学部・助教授

岡 明・鳥取大学医学部・助教授

佐治真理・北里大学医療衛生学部・教授

研究協力者

大原慎司・国立療養所中信松本病院・医長

渡部和彦・東京都神経科学総合研究所・副参事研究員

難波栄二・鳥取大学遺伝子実験施設・助教授

伊藤壽啓・鳥取大学農学部・教授

1. 研究目的

種々の遺伝的障害は、それぞれに特有な神経症状を示すことが多い。その原因は1つの遺伝的欠陥が、特定の神経回路網の成熟障害や変性に関係していると考えられるからである。1つの遺伝的欠陥がなぜ特定の神経回路網の成熟障害や変性につながるのか明らかにされた例はほとんどない。それぞれの遺伝的欠陥での、発育期神経回路網形成障害の分子機構を明らかにしていくことは、個々の神経回路網の特異性を明らかにすると同時に、治療法確立に向けて重要であると考えている。初年度は、神経細胞の発生分化をおこす結節性硬化症、脂質蓄積を示し、神経細胞が早期に変性するニーマン・ピック病C型を取り上げ、その神経回路網形成障害の分子機構を明らかにすることで、治療法の開発をめざす。

分担研究者として、ニーマン・ピック病C型に欠損するNPC1の細胞内機能を明らかにし、分子薬理的治療法の開発を目標とする二宮、結節性硬化症やニーマン・ピック病C型以外の遺伝性疾患の神経回路網形成障害の分子機構の解析をめざす岡、脳内神経回路網のHVJ-リボソーム法により脳内へのアンチセンスDNAを導入し、特定の神経回路網の機能解析と治療法開発を目指す佐治を加えた。

また、モデルマウスの神経回路網障害をさらに神経病理学的に明らかにするため大原、モデルマウスの神経系培養細胞を分子病理学的に明らかにする渡部、分子遺伝学的な解明のために難波さらに向神経系ウイルスの細胞内輸送の研究のため伊藤を研究協力者とした。

B. 研究方法

1. 結節性硬化症遺伝子変異と遺伝子産物の機能解析

その原因遺伝子であるTSC1とTSC2の変異解析を日本人76例についてPCR-SSCP法でスクリーニングし、異常のあるものについて自動塩基配列決定装置で解析した(研究協力者 難波)。TSC1遺伝子産物ハマルチンとTSC2遺伝子産物ツペリンの抗体を用いて、種々の培養細胞での局在、アンチセンスDNAを用いてそれらの蛋白質の発現を抑制したときの細胞の挙動、

ハマルチンが作用すると考えられる Rho の恒常的活性型変異体導入による細胞の挙動を見ることで、細胞増殖、神経細胞分化におけるハマルチンの役割について検討した（主任研究者 大野）。

2. ニーマン・ピック病C型モデルマウスの神経回路網障害の検討

ニーマン・ピック病C型と同じ遺伝子に欠陥をもつマウス、3週齢、6週齢、9週齢について、脳組織切片を用い、神経細胞脱落領域、スフェロイドの分布、コレステロール蓄積部位、糖脂質蓄積部位について調べた（大野、研究協力者 大原）。

さらにモデルマウス神経系細胞株の樹立により、その神経細胞レベルでの異常の解析を目指した（研究協力者 渡部）

3. ニーマン・ピック病C型の原因蛋白質 NPC1 機能と欠損細胞における病態解析

ニーマン・ピック病C型における糖脂質蓄積機構を解析するため、ガングリオシッド GM1 と結合して細胞内に輸送されるコレラトキシンを用いて細胞内輸送を検討した（研究分担者 二宮）。さらに NPC1 欠損細胞で発現蛋白質の違いをスクリーニングするため DNA チップ法により正常と患者細胞で発現量に違いのある mRNA をスクリーニングし、増加している mRNA について、細胞、組織レベルでの蛋白質の量をウェスタンブロットと免疫組織学的に調べた（主任研究者 大野、研究分担者 二宮）。これらの中で、インターフェロンで転写が促進される、STATs やインフルエンザ抵抗性遺伝子 MxA の発現が蛋白質レベルで増加していることが明らかになり、患者ではインフルエンザへの感染性が変化している可能性があり、細胞株を用いてインフルエンザウイルスの感染・複製の効率の比較検討を行っている（研究協力者 伊藤）

4. その他の遺伝的脳形成障害における神経回路網形成障害の分子機構

Nijmegen breakage 症候群は免疫系異常に加え、小頭症や精神遅滞を呈する疾患である。この原因蛋白質 NBS1 の抗体を作成し、ヒト胎児脳での発現を検討し、神経回路網形成に与える NBS1 蛋白質の役割を検討した（研究分担者 岡）

5. 局所神経回路網遮断および神経回路網過剰興奮誘発法に関する研究

神経回路網の興奮性を変化させることにより、実験的に神経活動の修飾をおこない、将来的な治療法への発展を目的として、HVJ-リボソーム法により局所脳内へ、遺伝子導入を行う方法の樹立を目指している。ラット海馬歯状回へ APMA 受容体サブユニットの変異体 GluRQ2 遺伝子を導入し、ラットに歯状回神経細胞に過剰興奮性を付与できるかどうか調べた（研究分担者 佐治）。

C. 研究結果

1. 結節性硬化症遺伝子変異と遺伝子産物の機能解析

TSC1 と TSC2 の変異解析を日本人患者 76 例について PCR-SSCP 法でスクリーニングし、異常のあるものについて自動塩基配列決定装置で解析した。TSC1 遺伝子については 11、TSC2 遺伝子については 20 の新規の異常を明らかにした。PCR-SSCP による変異の検出率は 40% と低かった。TSC1 に変異を持つ例の方が知的障害が軽い傾向にあったが明らかな遺伝子変異と臨床症状の間に相関は見いだせなかった（この成果の一部は Zhang H et al., J Hum Genet 1999; Pipó JR, Yamamoto T, Takeda H, et al. Hum Mut 2000 に発表した）。

TSC1 と TSC2 遺伝子産物の神経細胞分化における役割を検討するため、TSC1 及び TSC2 のアンチセンス DNA を分化能を持つ PC12 細胞に導入後、低血清、NGF 存在下で培養した。アンチセンス DNA を入れなかった場合には、細胞は G1(G0)に集積するのに対し、TSC1 及び TSC2 のアンチセンス DNA を入れた場合は S 期の集団が明らかに増加した。これらは TSC1 および TSC2 遺伝子産物が細胞周期の進行に抑制的に働いている可能性を示し、最近報告された結果と一致している。しかし、低血清、NGF 存在下での、PC12 細胞の神経突起の形成を定量化したところ、TSC1 アンチセンス導入では促進されるのに対し、TSC2 アンチセンス導入では抑制されることを見出した。TSC1 のアンチセンス DNA 導入による突起伸長の促進は、ハマルチンによって活性化されると報告された Rho の恒常的活性型変異体 V14RhoA を導入することで、抑制された。現在、神経突起形成に関する TSC1 および TSC2 の作用の違いを細胞膜裏側で働く蛋白質相互作用の違いからさらに検討中である。

また、TSC1 と TSC2 遺伝子産物であるハマルチンとツペリンの抗体を用い細胞内局在を調べた。分裂中の培養細胞ではツペリンは細胞質に、ハマルチンは核と細胞質に存在していた。PC12 細胞を低血清、NGF 存在下で培養すると分化誘導前には核と細胞質に存在していたハマルチンは、分化誘導後、大部分が細胞質に移行することを、免疫染色およびウエスタンブロットで確認した。ハマルチンには核局在シグナルは含まれず、核からの移行シグナルや別の核局在シグナルを持つ蛋白質と結合して、未分化状態では核に局在している可能性があり、現在、核局在と関係するハマルチンのドメインを決定中である。

2. ニーマン・ピック病 C 型モデルマウスの神経回路網障害の検討

ニーマン・ピック病 C 型と同じ遺伝子に欠陥をもつマウス、3 週齢～12 週齢について、脳組織切片を用い、大脳、小脳について神経細胞の膨化、神経細胞脱落領域、コレステロール蓄積細胞を検討した。神経細胞の膨化は、週齢とともに広い範囲の神経細胞に観察された。神経細胞の脱落についてこれまで小脳プルキンエ細胞が神経症状の発現とほぼ平行して脱落していくことが知られていたが、さらに視床 VPL/ VPM 核も同じ頃脱落し始め、死亡する 12 週頃完全に脱落することを見出し、視床 VPL/ VPM 細胞の脱落はプルキンエ細胞の脱落と合わせ、臨床症状と深い関係があると考えた (Yamada et al., Brain Dev, conditionally accepted)。ニーマン・ピック病 C 型の脳では生化学的にコレステロール含量の増加は知られていなかった。脳切片を NP-40 で処理した後、フィリピン染色を行うと神経細胞の胞体内にコレステロールが蓄積していることを見出した。しかし、コレステロールの蓄積はほとんどの大型神経細胞に認められ、コレステロールの蓄積がプルキンエ細胞や視床 VPL/ VPM 細胞の脱落と直接関係するとは考えにくかった (Yamada et al., Brain Dev, conditionally accepted)。

生化学的にはモデルマウスの脳では糖脂質の蓄積が顕著である。ガングリオシッド GM1 とガングリオシッド GM2 の蓄積を 3 週齢、6 週齢、9 週齢のマウス脳について検討した。この結果ガングリオシッド GM1 は正常でも内包、外包、小脳白質にわずかな染色性を認めた。3 週齢のモデルマウスでは大脳神経細胞、視床、海馬、小脳プルキンエ細胞領域に蓄積し、6 週齢、9 週齢では視床、海馬、小脳プルキンエ層での染色性は低下、消失した。一方、ガングリオシッド GM2 は正常マウスでは染色性されなかったが、モデルマウスでは海馬、視床、小脳顆粒層に蓄積し、年齢とともに蓄積が増加した。さらに GM1 はニューロンやアストロサイトに蓄積し、GM2 はニューロンとマクロファージに蓄積していた。さらにモデルマウスからの小脳プルキンエ細胞の培養によって、GM1 は細胞質と樹状突起に多く、GM2 は細胞質内顆粒に蓄積していた。6 週齢以降、視床、海馬、小脳プルキンエ層で GM1 の蓄積が目立たなくなるのは、GM1 の蓄積細胞が脱落しやすい可能性を示している (Taniguchi et al, submitted)。

視床 VPL/ VPM 細胞の脱落を神経病理学的にさらに解析するため、VPL/ VPM 核へ出力する延髄後索核について検討した。薄束核ではスフェロイドは 3 週から認められ、週齢を重ねるに連れ、その密度とともに経が増加した。スフェロイドはユビキチン陽性で、6 週齢以後マクロファージの出現を認め、9 週齢では神経細胞密度が減少した。楔状核ではスフェロイドの出現は 6 週からで、9 週齢では明らかに増加した。電顕的に、球状に腫大した構造物は、多数の concentrated lamellated body を含む軸索終末で、これらと樹状突起の間にシナプス結合が認められた。これらの封入体はシナプス前終末だけでなく、有髄繊維の軸索内や後索核神経細胞にも認められた。一方電子密度が増加し、萎縮した変性シナプス前終末が散見され、週齢とともに増加した。後索核では正常の老化に伴い、neuroaxonal dystrophy が後発する部位である。ニーマン・ピック病 C 型モデルマウスの病変を neuroaxonal dystrophy と呼ぶことには議論の余地はあるが、9 週齢のマウスでは正常老化に伴う neuroaxonal dystrophy に見られる特徴的の微細構造物 (tubulomembranous aggregate) が見られ、形態的な老化が早期に起こっていると示唆された。しかし、老化に伴うスフェロイドにシナプス形成を認めることはなく、この点がこのマウスの特徴で、neuroaxonal dystrophy が短期間で形成された可能性を示している。また、この腫大部で、高頻度に樹状突起とシナプス結合が認められたことは、この腫大部が軸索終末(presynaptic portion)であることを意味している。この変化は楔状核で強く、薄束核で弱く、この変性には lengthdependent な軸索変性機構が存在している可能性がある。後根神経節から後索核へ出力する軸索変性、後索核から視床腹側核へ出力する軸索の変性が、ニーマン・ピック病 C 型モデルマウスの感覚神経病変の基礎になって可能性がある (Ohara et al, 投稿準備中)。

また、ニーマン・ピック病 C 型の末梢神経の髄鞘には変性が報告されているが、軸索自体の変化は軽いとされている。このモデルマウスの後索核へ入力する軸索変性の病態解析のため後根神経節細胞の病態解析が必要である。この解析の第一歩として、8-10 週齢のモデルマウス後根神経節細胞を培養し、不死化細胞株 37C9 を樹立した。この細胞株は S100 蛋白質陽性、laminin、p75NTR 陽性で、シュワン細胞の形質を保持していた。さらに、コレステロール、ガングリオシッドを蓄積し、NPC1 mRNA の減少が確認でき、感覚神経病変の解析や治療法を検討する上で重要な系となる (Watabe, et al. 投稿準備中)

3. ニーマン・ピック病 C 型の原因蛋白質 NPC1 機能と欠損細胞における病態解析

ニーマン・ピック病 C 型における糖脂質蓄積機構を解析するため、ガングリオシッド GM1 と結合して細胞内に輸送されるコレラトキシンを用いて細胞内輸送を検討し、ニーマン・ピック病 C 型に欠損する蛋白質 NPC1 はリソソーム/ 後期エンドソームからのコレステロールを含む小胞輸送に関係するだけでなく、早期エンドソームから細胞膜への逆行性輸送に関与する可能性を示した (二宮治明による研究分担報告書参照)。

ニーマン・ピック病 C 型患者で発現量が変化している mRNA を DNA チップ法により検討した。この結果インターフェロンで誘導される遺伝子の発現が増加しているのを見出した。これらが蛋白質レベルで増加しているかどうかを患者細胞、npc 欠損 CHO 細胞、モデルマウス臓器で検討し、STATs、Mx の蛋白量が増加しているのを見出した。さらにモデルマウス肝細胞、小脳プルキンエ細胞、視床神経細胞でも免疫染色でその増加が確認された。現在 NPC1 の欠損で、なぜ STATs や Mx などの蛋白レベルの発現増加がおり、これらを抑制する可能性について検討中である (二宮、大野)。

4. その他の遺伝的脳形成障害における神経回路網形成障害の分子機構

Nijmegen breakage 症候群は免疫系異常に加え、小頭症や精神遅滞を呈する疾患である。この原因蛋白質 NBS1 の抗体を作成し、ヒト胎児脳での発現を検討し、この蛋白質は胎生期、分裂と移動を終えた時期の未熟な神経細胞やプルキンエ細胞に発現し、神経回路網形成開始に多くな役割を持つ可能性が示唆された (岡 明による分担研究報告書参照)

5. 局所神経回路網遮断および神経回路網過剰興奮誘発法に関する研究

神経回路網の興奮性を変化させることにより、実験的に神経活動の修飾をおこない、将来的な治療法への発展を目的として、HVJ- リボソーム法により局所脳内へ、遺伝子導入を行う方法の樹立を目指している。ラット海馬歯状回へ APMA 受容体サブユニットの変異体 GluRQ2 遺伝子を導入すると、ラットに歯状回神経細胞に過剰興奮性し、音刺激によっててんかん発作を誘発出来るようになることを明らかにした。HVJ- リボソームを用いた遺伝子導入は局所神経回路網の興奮性を変化させるのの有効な方法と考えられた (佐治真理による研究分担報告書参照)。

D. 考察

結節性硬化症

結節性硬化症は大脳皮質結節、脳室周囲の結節、てんかん、知的障害、顔面血管線維種などを特徴とする優性遺伝病である。回路網形成障害をおこす時期が神経細胞の発生時期であることを考えると中枢神経症状自体を治療することは難しいが、顔面の過誤腫や腎臓腫瘍などの予防法の確立のために、遺伝子機能とその欠陥状態での細胞の機能異常を明らかにすることが重要である。2つの原因遺伝子が単離され、遺伝子変異の解析が可能になったが、変異は多様で、検出率が低

く、臨床診断以上のメリットは少ない。原因遺伝子である TSC1 は Rap1-GAP、Rab5-GAP と相溶性あるいは類似機能をもつこと、TSC2 は Rho の活性と関係する機能を持つことから、ともに腫瘍抑制遺伝子の可能性が示唆されているが、これらの欠損でなぜ大脳皮質結節、脳室周囲の結節ができ、てんかんを効率に発症するのかまだ明らかではない。ひとの結節性硬化症の脳病変部ではモンスターグリアと言われる分化に異常を来した細胞が出現することが知られて、ジョウジョウバエの TSC1、TSC2 のノックアウト個体では、細胞の巨大化、細胞周期の異常が報告されているが、その背景は十分明らかではない。また、2つの遺伝子産物は共同して働くと考えられている。

今回、分化能を有する PC12 細胞を用いた場合、それぞれの遺伝子産物のアンチセンスノックダウンした場合、細胞周期から見た場合 S 期の増加という表現型は同じでも、分化という表現型は異なっていた。さらに TSC1 遺伝子産物ハマルチンは増殖期の場合には核に存在し、静止期には細胞質に存在すると言う、分化に伴う核-細胞質の移行が行われていることが明らかになり、今後この2つの現象を手がかりに、TSC2 遺伝子産物ツペリンとハマルチンがどの様に神経細胞分化に係わるのかを明らかにしていく。

ニーマン・ピック病C型

精神発達遅滞、失調、肝脾腫などで発病し、カタプレキシー、痙攣などを示す常染色体劣性遺伝性疾患である。年長で発病すると学習障害、ジストニア、失調で発病し、垂直眼球運動障害などを来す。また嚥下障害、構語障害を来しやすい。臓器にコレステロール、スフィンゴミエリン、糖脂質が蓄積する。1997年原因遺伝子の1つ NPC1 が単離され、2000年 NPC2 遺伝子が単離された。NPC1 はリソソーム/後期エンドソームからコレステロールを含む輸送小胞に存在し、NPC2 はリソソーム内に存在し、リソソームからコレステロールを含む脂質を輸送小胞に受け渡す働きをしていると考えられている。NPC1 と NPC2 は細胞内脂質小胞輸送に重要な機能を持ち、細胞内脂質恒常性維持に重要な役割をしていると考えられ、生物学的にも注目をあびている。さらに、これまでリビドーシスとして脂質の蓄積が神経変性と関係していると考えられてきたが、ニーマン・ピック病C型モデルマウスと LDL 受容体ノックアウトマウスとの交配やモデルマウスへの糖脂質合成阻害剤の投与によって、モデルマウスの神経症状が変化なく、蓄積脂質が神経変性と直接関係がないことが示されてきている。

初年度、我々はこのモデルマウスではブルキンエ細胞だけでなく、視床 VPL/ VPM、延髄後索核の神経細胞が早期に変性脱落し、その異常はシナプス前終末の変性による可能性を見出した。後根神経節、後索、後索核、視床 VPM/ VPL は固有知覚の神経回路であり、この神経回路網が選択的に変性することを見出した。この変性と臨床症状の関係はまだ明らかではないが、モデルマウスの症状には小脳失調に加え、感覚失調が加わっている可能性がある。今後、標的にするべき神経回路網は小脳ブルキンエ細胞と感覚神経回路網であることが明らかになった。

糖脂質のガングリオシッド GM1 と GM2 の蓄積のモデルマウス脳内分布および細胞内分布の検索で2つのガングリオシッドは異なる領域、異なる細胞、異なる細胞部位に存在することが明らかになった。ガングリオシッド GM1 は3週齢頃ブルキンエ細胞層、視床、海馬の神経細胞とアストロサイトに見られ、6週齢以後蓄積細胞は減少し、細胞脱落と関係していると考えられた。一方、ガングリオシッド GM2 は大脳白質、視床、小脳顆粒層の神経細胞とマクロファージに蓄積し、週齢とともに蓄積細胞は増加した。コレラトキシンを用いた解析で、NPC1 は早期エンドソーム

から細胞膜への逆行性輸送にも関係することを見出し、ガングリオシッド GM1 と GM2 の蓄積部位の違いには、NPC1 が働く小胞が複数存在することと関係していることが明らかになりつつある。

さらに DNA チップ法により一連の STATs の蛋白量が増加し、リン酸化 STAT も増加し、STAT の恒常的活性化が培養細胞、脳神経細胞の一部、肝実質細胞でおこっていることを明らかにしつつある。現在この背景は十分明らかではないが、この STAT 系の恒常的活性化が神経変性と関係している可能性は十分あり、今後の重要な検討課題の1つである。

E. 結論

1. 結節性硬化症の原因蛋白質の1つハマルチンは神経分化と関係して、核・細胞質を移動する。この移動を助ける蛋白質の同定と神経細胞分化における役割を明らかにすることが、結節性硬化症の神経回路網形成障害の理解に重要となる。
2. ニーマン・ピック病C型ではプルキンエ細胞と後根- 延髄後索核- 視床を結ぶ感覚系回路が早期に変性する神経回路網であり、この機構を明らかにすることが今後の課題である。
3. ガングリオシッド GM1 と GM2 の脳内蓄積様式はことなり、ガングリオシッド GM1 と結合するコレラトキシンをプローブとした実験で NPC1 の働くもう1つの細胞内小胞が存在する可能性が明らかになった。
4. ニーマン・ピック病C型患者細胞の DNA チップによる mRNA の比較とその後の解析で STAT 系の恒常的発現量の増加と活性化が、患者細胞、CHO 変異細胞、モデルマウス組織で明らかになり、今後 STAT 系の発現亢進と神経回路網障害との関係を明らかに出来る可能性がある。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Saji M, Kobayashi S, Ohno K and Sekino Y. Interruption of supramammillo-hippocampal afferents prevents the genesis and spread of limbic seizures in the hippocampus via a disinhibition mechanism. *Neuroscience* 97: 437- 445, 2000

Ikeda K, Urakami K, Arai H, Wada K, Wakutani Y, Ji Y, Adachi Y, Okada A, Kowa H, Sasaki H, Ohno K, Ohtsuka Y, Isikawa Y, Nakashima K. The expression of presenilin 1 mRNA in skin fibroblasts and brains from sporadic Alzheimer's disease. *Dementia* 11: 245-250, 2000

Yamamoto T, Ninomiya H, Matsumoto M, Ohta Y, Nanba E, Tsutsumi Y, Yamakawa K, Millat G, Vanier MT, Pentchev PG, and Ohno K. Genotype-phenotype relationship of Niemann-Pick disease type C: a possible correlation between clinical onsets and levels of NPC1 protein in isolated skin fibroblasts. *J Med Genet* 37: 707-711, 2000

Pipo JR, Yamamoto T, Takeda H, Maegawa S, Nanba E, Ninomiya H, Ohno K, and Takeshita K. Two novel serine repeat length polymorphisms (1043insS and 1043insSS) at exon 23 of the *TSC1* gene. *Hum Mut* 16: 375, 2000

Watabe K, Ohashi T, Sakamoto T, Kawazoe Y, Takeshima T, Oyanagi K, Inoue K, Eto Y, Kim SU. Rescue of lesioned adult rat spinal motoneurons by adenoviral gene transfer of glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Neurosci Res* 60: 511-519, 2000

Sakamoto T, Watabe K, Ohashi T, Kawazoe Y, Oyanagi K, Inoue K, Eto Y. Adenoviral vector-mediated GDNF gene transfer prevents death of adult facial motoneurons. *NeuroReport* 11:1857-1860, 2000

Horie M, Miyashita T, Watabe K, Takeda Y, Kawamura K, Kawano H. Immunohistochemical localization of substance P receptors in the midline glia of the developing rat medulla oblongata with special reference to the formation of raphe nuclei. *Dev Brain Res* 121:197-207, 2000

Yagi T, Jikihara I, Fukumura M, Watabe K, Ohashi T, Eto Y, Hara M, Maeda M. Rescue of ischemic brain injury by adenoviral gene transfer of glial cell line-derived neurotrophic factor after transient global ischemia in gerbils. *Brain Res* 885: 273-282, 2000

Ohara S, Takahashi H, Kato M, Nakamura T, Tukada M. Transnglionic gracile response following limb amputation in man. *Acta Neuropathologica* 100: 469-474, 2000

Tsukamoto H, Yamamoto T, Nishigaki T, Sakai N, Nanba E, Ninomiya H, Ohno K, Inui K, and Okada S: SSCP analysis by RT-PCR for the prenatal diagnosis of Niemann-Pick disease type C. *Prenat Diagn* 21: 55-57, 2001

Sawamura N, Gong J-S, Garver WS, Ninomiya H, Ohno K, Yanagisawa K, Michikawa M. Site-specific phosphorylation of tau accompanied by activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) in brains of Niemann-Pick type C model mice. *J Biol Chem* in press, 2001

Watabe K, Sakamoto T, Ohashi T, Kawazoe Y, Oyanagi K, Takeshima T, Inoue K, Eto Y, Kim SU. Adenoviral GDNF gene therapy for injured adult motoneurons. in Abe K (ed), *Inter-national Symposium on Molecular Mechanism and Therapeutics of Amyotrophic Lateral Sclerosis*. Excerpta Medica International Congress Series, Elsevier, Amsterdam in press, 2001

Watabe K, Sakamoto T, Ohashi T, Kawazoe Y, Oyanagi K, Takeshima T, Inoue K, Eto Y, Kim. Adenoviral gene transfer of glial cell line-derived neurotrophic factor to injured adult motoneurons. *Human Cell* in press, 2001

2. 学会発表

山本俊至、難波栄二、大野耕策、竹下研三. 日本人結節性硬化症患者の遺伝子異常
第42回 日本小児神経学会 2000年6月 大阪

Watabe K, Sakamoto T, Ida H, Ohashi T, Shen J, Hamanoue M, Eto Y, Ohno K. Establishment of spontaneously immortalized Schwann cells from murine models of Niemann-Pick disease type C (NPC; spm) and globoid cell leukodystrophy (GCL; twitcher). 14th International Congress of Neuropathology, Birmingham, UK, September, 2000

渡部和彦、坂本剛、井田博幸、上原けい子、衛藤義勝、大野耕策. Niemann-Pick 病 C 型モデルマウス(spm)由来培養シュワン細胞株の樹立
第41回日本神経病理学会総会学術研究会 2000年6月 米子

沈 勁松、渡部和彦、大橋十也、衛藤義勝. Twitcher マウス由来培養シュワン細胞株の樹立第43回日本神経化学学会大会 2000年10月 金沢

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

分担研究報告書

NPC1 蛋白質の神経回路網形成と維持に関する分子薬理学的研究

- ガングリオシッド GM1 の蓄積部位と蓄積機構の解明 -

分担研究者 二宮 治明 鳥取大学医学部・神経生物学・助教授

研究要旨

Niemann-Pick disease type C (NPC) は、進行性の神経細胞変性を伴う致死性の小児のライソゾーム蓄積病である。NPC 細胞における GM1 の蓄積部位を明らかにすることを目的として、NPC1 欠損 CHO 細胞 (CHO^{npc1(-/-)}) におけるコレラ毒素の細胞内輸送を解析し、以下の結果を得た。(1) NPC1 欠損細胞において GM1 は early endosome に蓄積する。(2) GM1 の蓄積は、early endosome からの recycling が遅延することによる。(3) NPC1 は、late endosome からの cholesterol outflow に関わることに加えて、early endosome からの GM1 outflow に直接に関わる。

A. 研究目的

NPC は、コレステロールと糖脂質の細胞小胞内蓄積を特徴とする、致死性の小児のライソゾーム蓄積病である。病理学的には、視床神経細胞や小脳 Purkinje 細胞をはじめとする種々の神経細胞が進行的に脱落し、臨床的には中枢神経症状が前景にたつ。神経細胞では、コレステロールに比べて糖脂質の蓄積のほうが顕著であるが、その脱落の真の理由は不明である。一方、主要原因遺伝子産物 NPC1 は、脂質小胞輸送に関わる膜蛋白質であるが、詳細な機能はいまだ不明である。我々の目的は、NPC1 の機能、脂質蓄積の機序、神経細胞死の機序を明らかにし、NPC の治療方法を見い出すことである。本研究では NPC 細胞における GM1 の蓄積部位を明らかにし、その機序を解明することを目的とした。

B. 研究方法

NPC1 欠損 CHO 細胞 (CHO^{npc1(-/-)}) における蛍光標識コレラ毒素 (cholera toxin; CT) の蓄積部位を解析した。さらに、¹²⁵I-CT の細胞内での代謝を、wild-type の細胞と比較検討した。

C. 研究結果

CHO^{npc1(-)}では、CT を取り込んだ小胞が細胞質周辺部に多数認められた。この小胞は、抗 GM1、抗 Rab5 陽性、抗 Lamp 陰性であり、TexasRed-transferrin, lysotracker で標識されなかった。同様の所見は、NPC 患者皮膚線維芽細胞においても認められた。これらの細胞染色の結果と一致して、CHO^{npc1(-)}では、細胞内に取り込まれた ¹²⁵I-CT の clearance が遅延しており、その遅延は CT が細胞外へ排出される量の減少と対応していた。細胞外排出量の減少の結果、CHO^{npc1(-)}では、活性型 CT (A subunit) の産生量が増加しており、CT の cyclic AMP 産生刺激効果は wild-type の細胞に比べて明らかに増加してした。細胞に GM1 を負荷すると CT の蓄積が増強されたのに対して、低密度リボ蛋白質の負荷は影響しなかったことから、CT の蓄積はコレステロールの蓄積に二次的なものではない。さらに、機能を消失した変異 NPC1 を CHO^{npc1(-)}に発現させると、CT を取り込んだ小胞に局在し、また、正常細胞を U18666A で処理すると、NPC1 は CT を取り込んだ小胞に局在した。

D. 考察

以上の結果から、以下の事がわかった。(1) NPC1 欠損細胞において GM1 は early endosome に蓄積する。(2) GM1 の蓄積は、early endosome からの recycling が遅延することによる。(3) NPC1 は、late endosome からの cholesterol outflow に関わることに加えて、early endosome からの GM1 outflow に直接に関わる。

E. 結論

NPC1 蛋白質は、初期エンドゾームから細胞膜への脂質の逆行性輸送に必要である。また、NPC1 欠損細胞はコレラ毒素に対する感受性が亢進している。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Okamoto Y, Ninomiya H, Miwa S and Masaki T. Cholesterol oxidation switches the internalization pathway of endothelin receptor type A from caveolae to clathrin-coated pits in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 275: 6439-6446, 2000

Chikumi H, Yamamoto T, Ohta Y, Nanba E, Nagata K, Ninomiya H, Narasaki K, Katoh T, Hisatome I, Ono K, Tanaka Y, Kuroda H and Ohgi S. Fibrillin gene (FBN1) mutations in

Japanese patients with Marfan syndrome. *J Hum Genet* 45: 115-118, 2000

Nagata K, Yamamoto T, Chikumi H, Ikeda T, Yamamoto H, Hashimoto K, Yoneda K, Nanba E, Ninomiya H and Ishitobi K. A novel interstitial deletion of KAL1 in a Japanese family with Kallmann syndrome. *J Hum Genet* 45: 237-240, 2000

Yamamoto T, Ninomiya H, Matusmoto M, Ohta Y, Nanba E, Tsutsumi Y, Yamakawa K, Millat G, Vanier MT, Pentchev PG and Ohno K. Genotype-phenotype relationship of Niemann-Pick disease type C: a possible correlation between clinical onset and levels of NPC1 protein in isolated skin fibroblasts. *J Med Genet* 37: 707-712, 2000

Pipo JR, Yamamoto T, Takeda H, Maegawa S, Nanba E, Ninomiya H, Ohno K and Takeshita K. Two novel serine repeat length polymorphisms (1043insS and 1043inssS) at exon 23 of the TSC1 gene. *Hum Mutat* 16: 375, 2000

Yamamoto T, Akaboshi S, Ninomiya H and Nanba E. DEFECT 11 syndrome associated with agenesis of corpus callosum. *J Med Genet* 38: E5, 2001

Tsukamoto H, Yamamoto T, Nishigaki T, Sakai N, Nanba E, Ninomiya H, Ohno K, Inui K and Okada S. SSCP analysis by RT-PCR for the prenatal diagnosis of Niemann-Pick disease type C. *Prenat Diag* 21: 52-54, 2001

Yamamoto T, Pipo JR, Ninomiya H, Ieshima A and Koeda T. Antley-Bixler syndrome and maternal virilization: a proposal of genetic heterogeneity. *Clin Genet* in press, 2001

Sawamura N, Gong J-S, Garver WS, Ninomiya H, Ohno K, Yanagisawa K and Michikawa M. Site-specific phosphorylation of tau accompanied by activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) in brains of Niemann-Pick type C mice. *J Biol Chem* in press, 2001

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

研究報告書

発育期神経回路網形成をおこす遺伝性疾患の研究

- 発生期脳に働く NBS1 蛋白質に関する研究 -

研究協力者 岡 明 鳥取大学医学部脳神経小児科助教授

研究要旨

NBS1 蛋白(Nibrin)の中中枢神経系での発現を検討した。NBS1 は、大脳、小脳共に胎児期中中枢神経系に非常に強く発現しており、その後発達とともに減少していた。その局在は胎児期中期の未熟な神経細胞であった。NBS1 蛋白は、二重鎖 DNA 損傷の修復機能に関連していることが明らかになってきており、発生期中中枢神経系では二重鎖 DNA 損傷や組換えが生じている可能性が高いことが示唆された。

A. 研究目的

NBS1 蛋白(Nibrin)は、二重鎖 DNA 損傷の修復に関与した蛋白で、その異常は染色体不安定症候群に属する Nijmegen breakage syndrome (NBS) の原因である。NBS 患者は、免疫系の異常に加えて小頭症や精神遅滞などの中枢神経系の異常を呈することから、NBS1 蛋白が発生期の脳において機能している可能性が考えられる。そこで我々は特異的な抗体を用いて、NBS1 蛋白の発現を検討した。

B. 研究方法

抗体は、NBS1 蛋白をウサギに免疫して抗血清を作成した。得られた血清を用いてウェスタンブロッティングを行い、正常リンパ芽球では NBS1 に相当する約 110kDa のバンドが出現し、NBS 患者由来の細胞ではこのバンドが欠損していることを確認した。この抗体を用いて、ウェスタンブロッティングおよび免疫組織科学にて検討した。

C. 研究結果

ウェスタンブロッティングでは、ヒト胎児期中期の大脳皮質および小脳皮質において、NBS1 の強い発現が認められた。そして、胎生後期にはこの発現は著明に減少し、その後は明らかな変化は認められなかった。免疫組織科学では、胎生中期の大脳皮質の未熟な神経細胞に NBS1 は強く発現していた。神経細胞の分裂が生じている脳室周囲では発現は見られないことから、

最終分裂後に NBS1 蛋白は発現してきたものと考えられた。小脳では特にプルキンエ細胞に強い発現が認められた。

D. 考察

NBS1 は、ATM や DNA-PKcs などと共に、二重鎖 DNA 損傷の修復や組換えに機能していることが明らかになってきている。我々のこれまでの検討で、ATM や DNA-PKcs などの蛋白も胎児期の脳に発現が認められている。従って、今回の NBS1 の発生期神経細胞での強い発現は、脳の発生において二重鎖 DNA 損傷あるいは組換えが生じていることを示唆していた。しかし、その生理的意義については今後さらに検討する必要があると考えられた。

E. 結論

NBS1 蛋白は、ヒト胎児期の未熟な神経細胞に強い発現が認められた。従って NBS1 は、神経細胞の発生において、二重鎖 DNA 損傷の修復や組換えなどの生理的な意義を持つものと考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Oka A, Takashima S, Abe M, Araki R, Takeshita K. Expression of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit and Ku80 in developing human brains: implication of DNA-repair in neurogenesis. *Neurosci Lett* 292: 167-170, 2000

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

厚生科学研究補助金（脳科学研究事業）

分担研究報告書

局所神経回路網遮断および過剰興奮法の開発と応用的研究

- HVJ-リポソーム法を用いた脳内遺伝子導入による海馬機能異常亢進とてんかん発作 -

分担研究者 佐治真理 北里大学医療衛生学部生理学

研究要旨

海馬歯状回の神経細胞が過剰興奮性を獲得することが側頭葉てんかん発作の発現とその拡大進展の病理学的機序である可能性を示唆する多くの実験的証拠が示されてきた。しかし、「歯状回神経細胞の過剰興奮性の獲得が海馬にてんかん原性を付与する」との仮説を実証する直接的証拠はまだない。この仮説を直接証明するために我々は、海馬歯状回にグルタミン酸受容体サブタイプである AMPA レセプターの過剰発現をもたらす遺伝子導入処置が過剰興奮性の獲得を介してラットに側頭葉てんかん原性を付与するかどうかを調べた。今実験では、Ca 透過性と強い内向き整流性を合わせもつ AMPA レセプターサブユニット GluR2 の変異体 GluR2Q を HVJ-リポソーム遺伝子導入法によりラットの歯状回とその周辺領域に強制発現させて、歯状回神経細胞を中心に GluR2Q 由来の過剰興奮性を付与した。GluR2Q 発現ラットにおいて、強度の音刺激を負荷すると典型的な側頭葉てんかん部分発作の運動行動変化と海馬脳波に部分発作に対応するてんかん発作波が誘導された。音刺激性てんかん発作の誘導効率と GluR2Q cDNA 注入部位との相関は、音刺激によるてんかん発作の発現は、歯状回での GluR2Q 強制発現により特異的に引き起こされることを示した。これらの結果から、我々は歯状回における GluR2Q 強制発現により新たに海馬に過剰興奮性回路が形成されることが、側頭葉てんかん部分発作の発症の病理学的機序に決定的な役割を果たしている結論した。

A. 研究目的

側頭葉てんかん発作の発現に海馬、特に歯状回の過剰興奮性の獲得が関与していることを示唆する多くの生理学的、病理学的証拠が報告されている (Blumcke et al., 2000; Coulter, 2000; Eslapez et al., 1999; Okazaki et al., 1999; Ptkannen et al., 2000; Sloviter, 1999)。歯状回は、記憶情報処理において感情的体験からの感情情報と知覚情報を海馬において統合するための入力制御機構を有することが想定される (Carre and Harley, 1991; Mizumori et al., 1989; Saji et al., 2000)。また我々は以前、歯状回に AMPA 受容体遺伝子を導入することにより過剰興奮性を付与すると、興奮性アミノ酸の扁桃体への注入により誘導される側頭葉てんかん部分

発作が全般化することを報告した(Ogata et al., 1998)。これらの知見から、海馬外からのてんかん発作波侵入により歯状回入力制御機構の変容を介して新たなてんかん発作源が歯状回に形成されることが側頭葉てんかん発作の拡大進展と海馬神経細胞障害発生のメカニズムであることが考えられる。これまで自発的なてんかん発作の発現に歯状回の過剰興奮性が関与することを直接に証明している研究はほとんどない。そこで、我々は「海馬歯状回に過剰興奮性を直接的に付与すると自発的発作発現に至るてんかん原性を獲得する」との仮説を立てた。本研究ではこの仮説を実証するために、AMPA レセプターの GluR2 サブユニットの Q/R サイトの1アミノ酸を置換した変異体 (GluR2Q) の過剰発現が神経細胞に Ca²⁺ 透過性ととも過剰興奮性を与えるとの報告に基づき(Sudo et al., 1999)、HVJ-リポソーム遺伝子導入法 (Kaneda, 1999; Saeki and Kaneda, 1998)を用いてこの GluR2Q をラットの海馬歯状回神経細胞に過剰発現させ、自発的てんかん発作発現の有無を検討した。

B. 研究方法

B-1. 海馬歯状回への GluR2Q-myc 融合遺伝子の cDNA プラスミドの導入

a. GluR2Q-myc 融合遺伝子の cDNA プラスミドの調整

AMPA レセプター GluR2 サブユニットの正常発現型 GluR2R と変異型 GluR2Q を、抗体による免疫反応性により識別することはできない。そこで、GluR2Q-myc 融合遺伝子の cDNA プラスミドを細胞に導入し、GluR2Q 遺伝子の下流に繋いだ myc 遺伝子の発現を c-myc 蛋白の免疫反応性で可視化することにより GluR2Q 発現の有無を調べた。CAG プロモーターをもつ GluR2Q-myc 融合遺伝子の cDNA プラスミドは、GluR2Q-myc 融合遺伝子を含むコスミドベクター(pAxCAwt) からアデノウィルスゲノムの削除とライゲーションによって得られた(Sudo et al., 1999)。

b. HVJ-リポソーム遺伝子導入法

HVJ-リポソーム遺伝子導入は、センダイウィルス (HVJ) の細胞融合機構を利用してリポソームの中味を細胞内に導入する方法である。リポソーム表面荷電が正である正電荷型 HVJ-リポソームが組織細胞への吸着性親和性が高いことから、本実験では、脳局所領域への高い遺伝子導入効率を得る目的で正電荷型 HVJ-リポソームを用いた(Saeki et al., 1997)。

c. HVJ-リポソームの調整

リン脂質 (5種類)、phosphatidylcholine(ePC, Sigma)、phosphatidylethanolamine dioleoyl(DOPE, Wako Chemical)、sphingomyeline(eSph, Sigma)、cholesterol(Chol, Sigma)、DC-cholesterol(DC-cholesterol, Avanti) をクロロフォルムに重量比 (ePC: DOPE: eSph: Chol: DC-cholesterol = 1: 1: 1: 2: 0.5) で溶かし混合する。脂質 8.375 mg を含む脂質混合液 1 ml をガラス管に入れ、窒素ガスで満たしてロータリーエバポレーターにより薄膜として乾燥させる。乾

燥した脂質薄膜に 100ml の cDNA プラスミドを含む緩衝液 BSS 250ml を加える。この混合液を 50 秒間ボルテックスにかけ次いで 10 秒間 37°C ウォーターバスで温める。この手順を 20 回繰り返す。混合液に BSS 800 ml を加えたものを、セルロースアセテート膜フィルター（粗い膜 2 回、細かい膜 1 回）に通して、サイズのそろった単膜リボソームに整形する。作成された単膜リボソームをあらかじめ紫外線照射により感染力を不活性化した HVJ(10,000 hemagglutinating unit) と混合し、4°C で 10 分間インキュベートする。更に、融合を促進するために、37°C で 1 時間攪拌振とうを行う。HVJ-リボソーム複合体は、蔗糖密度勾配遠心 (25,000 rpm, 4°C, 1.5 時間) によってフリーの HVJ から分離される。BSS と 30% 蔗糖の境界に集積した HVJ-リボソームをパスツールピペットにより回収し、0.06% WGA-HRP を含む BSS で HVJ-リボソーム懸濁液濃度を OD (540) = 0.6 に調整する。HVJ-リボソームにトラップされる DNA の割合がおおよそ 10-30% であることから、1 ml の HVJ-リボソーム懸濁液は、20-60 ng の cDNA を含んでいると考えられる(Yamada et al., 1996)。

d. 歯状回への GluR2Q-myc cDNA プラスミドの注入

音刺激を負荷する 2 日前に、麻酔下 (sodium pentobarbital, i.p., 40 mg/kg) で脳定位的に、ラットの片側の海馬歯状回とその近傍に 30-60 ng の GluR2Q-myc cDNA プラスミドを含む HVJ-リボソーム 1 ml を注入する。海馬歯状回への注入は、脳定位的に 3 箇所に分けて行われた。各注入座標は、1) AP: 5.2 mm, L: 1.5 mm, D: 3.0 mm; 2) AP: 4.7 mm, L: 1.5 mm, D: 3.0 mm; 3) AP: 4.2 mm, L: 1.5 mm, D: 3.0 mm である。注入には、空気加圧システムに接続した先端サイズ 30-40 mm のガラスマイクロピペットが用いられる(Saji et al., 1995)。

すべての実験は動物の倫理的使用に関する日本および国際ガイドラインを遵守して行われ、実験に用いる動物の数と動物の苦痛を最小限に押さえるべくすべての努力がなされた。

B-2. 音刺激 (Acoustic Stimulation, AS)

音刺激 (AS) は、目覚まし時計のベル (90 dB SPL) を 1 分間のインターバルを置いて 5 分間 2 回鳴らすことにより与えられた。

B-3. 海馬脳波の記録

a. 双極電極の設置

GluR2Q-myc CDNA プラスミドの注入から 2 日後、ラット頭部を麻酔下で脳定位装置に固定し、エナメルコートしたタングステン双極電極 (diameter: 0.15 mm; tip distance 1.0 mm) を cDNA プラスミド注入部位に対して対側の海馬 CA1-3 に設置し、歯科用セメントで頭骨に固定する。

b. 海馬脳波 (EEG) 記録の手順