

- of brain-derived neurotrophic factor in the rat brain. *Psychopharmacology* 158: 100-106.
- T.Tamura, S.Morinobu, Y.Okamoto, et al. (2002) The effects of antidepressant drug treatments on activator protein-1 binding activity in the rat brain. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psychiat.* 26: 375-381.
- A.Kagaya, H.Katagiri, Y.Tawara, et al. (2002) Effect of sub-chronic treatment with duloxetine on serotonin-2A receptor function *in vivo* and *in vitro*. *Biogenic Amines* (in press)
- S.Nakae, A.Kagaya, H.Katagiri, et al. (2002) Serotonin-2A receptor and the receptor-mediated signaling systems in rats : possible implication for pathophysiology of mood disorders. *Current Topics in Neurochemistry* (in press)

## 2. 学会発表

- A.Kagaya, and S.Yamawaki. Modulation of intracellular calcium signaling by stress and mood stabilizers. 7th World Congress of Biological Psychiatry 2001. 7. 1-6. Berlin.
- 田村達辞、森信繁、福本拓治ら 急性拘束ストレスによるラット脳 AP-1 結合能の変化に対するリチウム投与の影響 第23回日本生物学的精神医学会 2001.4.11-13 長崎
- 末永貴美、辻誠一、森信繁ら ラット脳内 calcium/calmodulin dependent protein phosphatase に対するリチウムの影響 第23回日本生物学的精神医学会 2001.4.11-13 長崎
- 辻誠一、森信繁、菅原幸子ら ラット脳内 Bcl-2 発現に対するストレスの影響 第23回日本生物学的精神医学会 2001.4.11-13 長崎
- 福本拓治、森信繁、岡本泰昌ら バルプロ酸投与の BDNF 及び TrkB に対する影響 第31回日本神経精神薬理学会 2001.10.4-5 広島
- 辻誠一、末永貴美、川野樹一朗ら ストレス反応性の形成に関与する遺伝子のラット海馬での検討 第31回日本神経精神薬理学会 2001.10.4-5 広島

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

## ストレスの適応破綻に関する臨床的研究-Sensory gating system-

分担研究者 岡本泰昌 広島大学医学部助手

**研究要旨** Sensory gating system とは外界からの刺激に対して、生体の感受性を変化させる前注意的な神経機構で、環境への適応に重要な役割を果たしていると考えられている。今回の検討から、様々な急性のストレスにより gating system の適応的变化が生じること、ストレス関連疾患ではこの変化がみられないこと、ストレス事象の予期により感覚入力が増加される可能性が考えられた。

### A. 研究目的

Sensory gating system とは生体にとってあまり重要でない感覚刺激に対しては反応を小さくし (gating out)、重要な刺激に対しては反応を大きくする (gating in) 脳の前注意的な情報処理過程である。この情報処理過程は電気生理学的には P50 suppression (gating out に対応)、mismatch negativity (MMN : gating in に対応) などの複数の事象関連電位によって構成されており、ストレスに対する適応機構として重要な役割を果たしていると考えられる。本研究では、一つめの検討としてストレスに対する適応機構としての sensory gating system に着目し、健常者およびうつ病患者において急性ストレス負荷の影響を検討した。次に、われわれはストレス事象の予期が、感覚入力に与える影響を検討するために、快・不快などの情動刺激を用いた予期的反応時間課題を行い、機能的磁気共鳴画像法 (fMRI) および脳磁図 (MEG) を用いて課題遂行時の脳活動を検討した。

### B. 研究方法

検討-1(健常者およびうつ病者を対象とした急性ストレスの Sensory gating system に及ぼす影響)

#### 1-1. 物理的ストレスが健常者の Sensory gating system に及ぼす影響の検討

健常対照者 6 例を対象として寒冷刺激負荷前後に P50 suppression および MMN を 204 channel 脳磁計を用いて測定した。P50 suppression は 500 ms 間隔で呈示される一対のクリック音 (1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>) を 8 秒間隔で提示し、クリック音に対する反応の強度の比 (2<sup>nd</sup> / 1<sup>st</sup> : t/c ratio) で評価した (t/c ratio が小さいほど gating out の能力が高い)。MMN は 500 ms 間隔で連続して呈示される標準刺激の中に 20% の割合で逸脱刺激を提示し、逸脱刺激に対する加算波形から標準刺激に対する加算波形を引いた波形から

MMN 反応を求めた。

#### 1-2. 物理的ストレスがうつ病患者の Sensory gating system に及ぼす影響の検討

うつ病患者 8 例を対象として、1-1. と同様の測定をおこない、健常者の結果との比較をおこなった。

#### 1-3. 情動的ストレスが健常者の Sensory gating system に及ぼす影響の検討

健常対照者 15 例を対象として情動スライド (positive, neutral, negative) を提示し、その間の P50 suppression を測定した。情動スライドの種類毎に t/c ratio を求め、情動が P50 suppression に及ぼす影響を検討した。

#### 検討-2(健常者を対象としたストレス予期の Sensory gating system に及ぼす影響)

#### 2-1. ストレス予期反応課題の機能局在に関する fMRI を用いた検討

健常者 15 名を対象に、1.5T の MRI 装置(島津 Marconi 社製)を用い、予期的反応時間課題遂行時の fMRI を撮像した。課題は、二つ 1 組の刺激(予告刺激 S1 と標的刺激 S2)を一定の刺激間隔(4sec)でモニターに呈示し、S2 後にボタン押し反応をさせた。S1 刺激として、○、△、□の幾何学図形を呈示した(100msec)。S2 刺激として、異なる情動価(快/不快/中性; 各 30 枚)を持つスライドを呈示した(2sec)。被験者は、○-快、△-不快、□-中性のように S1-S2 の組み合わせを固定した条件(予期可能条件)と、S1-S2 の組み合わせがランダムな条件(予期不可能条件)を交互に行った。解析は SPM99 を用い、予期可能条件と予期不可能条件の時の脳活動領域を比較検討した。

#### 2-2. ストレス予期反応課題遂行中の脳機能に関する MEG を用いた検討

健常者 6 例を対象に、全頭型 204 チャンネル脳磁図システム(Neuromag 社製)を用い、予期的反応時間課題遂行時の脳磁図を記録した。脳磁場データは情動価毎に S1 呈示前 500msec から S2 呈示後 1000msec を加算平均し、脳内信

号源の推定を行った。

### 倫理面への配慮

被験者に対しては研究内容について十分な説明を行い文章にて同意を得た。本研究は広島大学医学部倫理委員会にて承認を受けている研究計画に基づいて実施した。

### C. 研究成果

1-1. 健常者において cold pressor test は t/c ratio を増加させ、MMN 反応を増大させた。

1-2. うつ病患者において cold pressor test は t/c ratio を増加させたが、MMN 反応に対しては影響を与えなかった。

1-3. 健常者において negative な情動スライド提示中の t/c ratio は positive および neutral な情動スライド提示中と比較して増加していた。

2-1. 予期可能条件では予期不可能条件と比較して、前頭前野の領域(内側前頭前野、背外側前頭前野)で有意な活動上昇を認めた。また、不快刺激を予期する時に後頭部の活動上昇が認められた。

2-2. いずれの情動刺激においても、S2 刺激呈示前約 300msec 付近に、前頭前野に信号源がみられた。信号源の強度は、快刺激と比較して、不快刺激で大きかった。一方、情動刺激に対する後頭部視覚誘発反応は、快刺激と比較して、不快刺激で小さかった。

### D. 考察

検討1の結果から、急性の物理的ストレスは健常者の gating out を減少させ、gating in を増加させた。急性のストレス状況下では外界のすべての情報に対して注意を払うことは理に適っており、これらの反応は急性ストレスに対する正常な適応反応であると考えられる。うつ病患者における物理的ストレスに対する反応の低下は健常者に認められたストレスに対する正常な適応反応が低下した状態、すなわちストレスに対する不適応状態を有する可能性が示唆された。また、情動的ストレス、特に negative な情動刺激は P50 suppression の t/c ratio を増加させ、物理的ストレスだけでなく、情動的ストレスも sensory gating system に対して影響を与えることが明らかとなった。

検討2の結果から、将来の情動刺激予期における前頭前野の役割が示唆された。また、不快刺激が予期できる場合には、その感覚入力抑制される可能性が示唆された。

### E. 結論

今回の sensory gating system に関する所見は、うつ病を始めとするストレス

関連疾患の病態生理との関連だけでなく、健常人においてもストレス負荷時には認知機能の低下を引き起こしやすいことの生理学的な一面を説明している。またストレスの予測がストレスに関する感覚入力を抑制している可能性もあり、ストレス事象に対する適応を考えていく上で興味深いものと考えられた。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

山下英尚 他、脳磁図 (MEG) を用いたストレス適応破綻の脳内機構に関する研究

— Sensory gating system に焦点を当てた検討—薬療基金報告集(印刷中)

Hidehisa Yamashita et al, Visual emotional stimuli modulate auditory sensory gating studied by magnetic P50 suppression. Neuroreport, (in submitted)

#### 2. 学会発表

Kazutaka Ueda et al, Neural processing of emotional stimuli: A magnetoencephalographic study. 2001 Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum Regional Meeting, Hiroshima Japan, October 2-5, 2001.

Hidehisa Yamashita et al, Impairment in P50 auditory sensory gating induced by acute stress. CREST workshop (奈良) 2001.4

山下英尚 他、聴覚性 sensory gating system に対する急性ストレスの影響、広島脳機能研究会 (広島) 2001.6

山下英尚 他、脳磁図 (MEG) を用いたストレス適応破綻の脳内機構に関する研究

— Sensory gating system に焦点を当てた検討—薬療基金報告会 (大阪) 2001.12

### H. 知的財産の出願・登録状況

なし

ストレスの適応破綻の脳内分子機構の解明と予防法の開発に関する研究

分担研究課題  
MEGによる脳機能研究とその画像解析

分担研究者 西谷 信之 国立身体障害者リハビリテーションセンター研究所  
感覚機能系障害研究部感覚認知障害研究室長

**研究要旨** 初年度に続き、ストレス負荷に対する脳活動の変化を明らかにする事を目的として、脳磁場（MEG）および磁気共鳴分光法（MRS）の非侵襲的手法を用いて、ストレス関連脳機能の解明を行った。初年度に開始した不快刺激の認知課題における海馬機能の研究では、ストレス性刺激に対して右海馬での $\theta$ 波と、コリン・クレアチニンの増加を認めた。また MEG により、海馬のみならず前頭葉、頭頂葉においても同様に、ストレス性刺激に対して $\theta$ 波が増大していることが明らかになった。この結果は、海馬から大脳皮質へのニューラルネットワークの機能的解明に繋がることを示唆している。さらに MRS において、神経化学物質の代謝の時間的変化を捉えた。次に難易度の異なる刺激・課題に対する大脳皮質の機能解明研究として、MEG を用いて簡単および複雑な計算課題時における脳活動評価を行った。その結果、複雑な課題に対しては応答時間が遷延し、簡単な課題に比べて応答の大きさが減少していた。このことは、大脳皮質は課題の難易度に対応した応答をすることでストレス性負荷を分散している可能性を示唆している。

**A. 研究目的**

初年度に引き続き、2年次における本分担研究では、脳磁場計測（MEG）、磁気共鳴分光法（MRS）を用いて、ヒト脳におけるストレス性負荷の脳内処理のメカニズム・伝達過程を非侵襲的に解明することを目的とした。

**B. 研究方法**

**1. ストレス性刺激におけるヒト海馬ならびに大脳皮質活動の変化**

**(1) 脳磁場計測**

10名の健常成人（男性：4名、女性：6名、年齢：平均23.3歳、全員右利き）から、快・不快情報の弁別課題時の脳活動を、海馬並びに大脳皮質でも評価した。

刺激は International Affective Picture System (IAPS, Lang et al., 1997)より、動物ならびに乳幼児の快・不快写真（合計4写真）を選択した。動物同士もしくは乳幼児同士で、それぞれ快・不快写真を組にし、遮蔽室外に設置した液晶プロジェクタ（ELECTROHOME社製 ELECTRONICS, VistaGRAPHX2500）介して、実験室内の被験者の1m前方の黒背景のスクリーン上に投影した。刺激呈示間隔を平均 2.0 秒（1.8-2.2 秒）、呈示時間0.3 秒で、各記録につき計100回ずつ、無秩序な順で被験者に呈示した。刺激制御は、遮蔽室外のパーソナルコンピューター(NEC製、PC-98)上の画像制御プログラム Multi Stimu (NEC

メディカルシステムズ社製)にて行った。快・不快写真の刺激呈示確率は、20または80%とし、いずれかを標的とした。組写真の呈示順は、被験者間で偏りのないように平均化した。被験者には、標的写真の呈示回数のカウントを、また記録中、体動・瞬目を可能な限り抑制するよう指示した。

脳磁場記録は、122及び306チャンネル全頭型MEG (Neuromag社製、Helsinki, Finland) を用いて、静穏な磁気遮蔽室内で実施した。被験者は計測装置直下で座位を保持し、頭部を計測機器に密着し固定した。頭部の機器に対する位置を、頭皮上に装着した頭部位置指示コイルからの信号を各記録開始時に計測し統一した。脳磁場波形は、刺激呈示開始時を起点として、刺激前100ミリ秒を基準として、刺激前100ミリ秒から刺激後900ミリ秒間で標的・非標的の刺激毎に加算平均した。眼球運動と瞬目を監視するために、右眼裂外側部と下部に2個のAg/AgCl皿電極を接着した。通過周波数帯域を、脳磁場・眼球運動に対して 0.03-100 Hz、標本周波数を403Hzとした。脳磁場計測中、瞬目と被験者の意識レベルの監視のために、各チャンネルの波形をモニターし、瞬目過多や意識レベル低下時にはインターフォンにて被験者に注意を喚起した。

解析は、加算平均した波形の再現性を確認し、多電流源モデル(Hamalainen et al., 1993; Nishitani et al., 1998, 1999,

2000) を用いて、標的刺激に対する活動源の推定を行い、各被験者の頭部MRIに重畳した。次に海馬ならびに大脳皮質の活動波形を、高速フーリエ変換にて周波数解析を行い、4Hz帯域ごとにTSE (Salmelin and Hari, 1994) を用いて事象関連同期・非同期現象(event-related desynchronization: ERD、event-related synchronization: ERS)の解析を行った。

## (2) 事象関連磁気共鳴分光法による計測

ストレス刺激負荷に伴う、海馬における神経化学的変化を解明するために、初年度より開発してきた刺激呈示を起点とし記録を行う事象関連MRSを、1.5 T、<sup>1</sup>H-MRI (TR 1500, TE 135)において継続して行なった。被験者は、脳磁場計測に参加した10名の健常成人である。

刺激は、脳磁場計測と同様のものを用いた。標的・非標的刺激の呈示確率は20%、80%とした。標的刺激は、快・不快刺激のいずれかとし、被験者間で均衡するようにした。刺激呈示間隔、呈示時間は脳磁場計測と同様にし、パーソナルコンピューター上のSTIM (値うるs巻、S手rリング、USA) で制御し、液晶プロジェクター (Sony) を介してスクリーン上に無秩序な順で投影した。被験者にはHead Coil上に設置した鏡を通して刺激を観察・識別し、標的刺激の出現回数を数えるよう指示した。

記録は、被験者頭部画像の撮像を、通常のT1-weighted imageで最初に行った。これを基に、1x2x1センチ立方の関心領域を左もしくは右の海馬体・海馬傍回りに設定した。水抑制後、傾斜磁場調整を行い、Shimming Levelを6-10 Hzに調整した。1回の検査における刺激呈示回数は150回とした (記録時間5分)。撮像を開始は、水抑制に要する時間と、頭皮上脳波や脳磁場における応答潜時 (Nishitani et al., 1998, 1999) を考慮し、刺激呈示開始時から25ミリ秒毎に遅延時間を設定し記録した。

求められたMRSに対して、残存する水成分の制御を行った後、Choline-compound (Cho、分光周波数 3.20 ppm)、Creatine-compound (Cr、3.00 ppm)、N-acetylaspartate (NAA、2.01 ppm)の分光周波数を含む周波数帯域で基線補正を行った上で高速フーリエ変換ならびにGaussian変換した後に、各スペクトルの積分値を算出した。その後安静時の各物質の値で課題負荷時の値を補正し、Cho/NAA、Cr/NAAの相対値を統計処理した。

## (倫理面への配慮)

研究概要に関して所属機関の倫理委員会に計り審査を受けた。被験者また

は保護者・関係者から、口頭ならびに文書にてインフォームドコンセントを徹底した。被験者の個人情報等に係るプライバシーの保護ならびに如何なる不利益も受けないように十分に配慮した。磁気遮蔽室内で実施する検査に対しては、遮蔽室内に他の検査者が同室し、安全の確保に努めた。

## 2. 難易度の異なる刺激・課題におけるヒト脳の活動の変化

### (1) 脳磁場計測

右利き健常成人9名 (男5名、女4名、23-37歳、教育年数は全被験者とも16年以上) を対象とした。刺激は、第一刺激(S1)、第二刺激(S2)を設定し、1から9までの一桁の数、20、22、30、33、40、44を除いた12-49までの二桁の数字、ロシアまたはギリシャ文字の中から9文字 (Π、Φ、Υ、Λ、Γ、Θ、Ξ、Υ、Ψ)、およびこの中の2種類から作成した5種類の図を用いた。各刺激は、縦4.5×横6.0cmの範囲内に黄色文字で投射した。刺激呈示時間は400ミリ秒で、刺激間隔はS1-S2間を1500ミリ秒、S2-S1間を3500±350ミリ秒、S2-S3間を2500ミリ秒とした。対象課題は、数字、文字、図の観察とした。計算課題では、1桁数字のみ、または2桁数字のみの暗算とした。S1刺激の数字にS2刺激の数字を加算し、第三刺激(S3) “=”呈示後に口頭で回答するよう被験者に指示した。

記録・解析は1.(1)と同様に行った。応答磁場波形は、S2刺激を起点にし、S2刺激前200ミリ秒から刺激後3000ミリ秒までの誘発磁場波形を加算平均した。1施行は40回の反応とした。

## C. 研究結果

### 1. ストレス性刺激におけるヒト海馬ならびに大脳皮質活動の変化

快・不快写真の標的刺激を識別する課題では、不快刺激が20%の確率で呈示され、かつ標的となっている時に、両側半球において応答磁場が明瞭に認められた。多電流源モデルによる活動源推定の結果、両側の後頭部、頭頂部、前頭部と海馬に活動源が認められた。活動源の大きさは、80%の不快刺激や快刺激よりも、20%不快刺激を標的とした時、左右半球の海馬、頭頂部、前頭部のいずれにおいても最大であった。一方、TSEによる解析では、20%不快標的刺激の呈示により、右海馬でθ波帯域が最も非同期していた。この変化は刺激呈示後250-270ミリ秒から認められ、400-450ミリ秒で最大であった。また頭頂部、前頭部においてもこの傾向が認められた。これは、動物、乳幼児の写真にかかわらず認められた。

事象関連MRSによる研究では、cho/NAAとCr/NAAは、不快標的刺激の方が、快標的刺激よりも大きく、特に右側海馬では左側に対して有意に大きかった。さらに刺激提示後から本スキャンまでの遅延時間を変化させた場合で、右海馬からの記録では、20%不快標的刺激に対してcho/NAAとCr/NAAが、刺激提示後265ミリ秒後から急激に増大し、約360ミリ秒で減少していた。

## 2. 難易度の異なる刺激・課題におけるヒト脳の活動の変化

図形の観察では、刺激後100-550ミリ秒の間に磁場応答が認められた。信号源は、100-250ミリ秒で両側後頭部、後頭側頭移行部、下・中側頭部後方そして上頭頂部に、300-550ミリ秒で下頭頂部に推定された。数字の観察では、図形の観察で推定された部位に加え、200-260ミリ秒で左右、特に左側の上側頭部に推定された。

数字の観察と一桁の計算では刺激後250-700ミリ秒で、磁場応答波形に差が認められた。信号源は、250ミリ秒までは観察課題とほぼ同じ部位に推定された。250ミリ秒後では、左半球では上側頭部後～下頭頂部 (n=8, 333ミリ秒)、下前頭部 (n=2, 357ミリ秒)、上側頭部中部 (n=3, 398ミリ秒)の順に、また右半球では下前頭部 (n=5, 341ミリ秒)、上側頭部 (n=4, 454ミリ秒)、下頭頂部 (n=3, 495ミリ秒)の順に活動していた。一桁と二桁の計算の比較では、両側半球前-中側頭部で応答波形に差が認められた。二桁の計算では、同部位での活動が550-800ミリ秒にみられ、一桁の計算に比べて活動時間が遷延する傾向が認められた。

## D. 考察

ストレス性負荷に対する、ヒト大脳皮質および海馬の活動変化を、MEG、MRSにより、非侵襲的に明らかにした。

ストレス性刺激の弁別課題でのMEGによる結果は、認知課題において海馬が関与することを示しており、これまでの結果と一致する(Nishitani et al., 1998, 1999)。不快情報を標的にした際に、海馬において左右差を認めたが、これは不穏な顔表情の認知が扁桃を含む右辺縁系にて主として処理されているとするこれまでの研究と合致するものである。

さらにMEGによりその海馬における活動の周波数解析から、 $\theta$ 波帯域の活動が、不快標的刺激で右海馬において有意に増大することが明らかになった。この結果は海馬における興奮性シナプス後電位の上昇を示唆している。一方海馬における $\theta$ 波大域の増大はコ

リン作動性ニューロンで生じることが知られており、

本研究の結果は不快情報の弁別課題における記憶のエンコーディングを反映していると考えられた。この海馬における $\theta$ 波帯域活動の上昇並びにピーク潜時は左海馬の方が右に比べて早期であった。このことは事象の記憶の更新が左海馬において先行していることを示唆するものである。

次に $\theta$ 波の不快標的刺激に対する増加が、大脳皮質前頭部、頭頂部においても認められたことは、辺縁系-大脳皮質間の機能的投射経路の関与を示唆するものであると考えられる。

MRSの結果は不快刺激の弁別において、海馬のシナプスにおける神経伝達物質アセチルコリンの合成と分解、ミトコンドリアにおけるエネルギー代謝の、それぞれの亢進を示唆するものであり、MEGの結果を支持するものであると考えられる。さらにMRSを用いた本研究で刺激提示から計測までの時間を変更することにより、生体の神経化学物質の代謝の時間的変化を、非侵襲的に明らかに出来たことは、脳機能解明に新たな知見をもたらすと考えられる。

さらに計算課題では、刺激の形態的な情報処理に続き計算処理が行われるが、一桁の計算における主たる活動部位は左上側頭部後部～下頭頂部であった。これに対して二桁の計算では、さらに活動部位が広汎な部位に及び、その応答も遷延していることが、本研究で明らかになった。このことは複雑な情報処理には、より多くの脳部位の資質を要することを示している。しかし一方でこの結果は、複雑な課題・ストレス性負荷を脳の局所部位で集中的に処理するのではなく、情報の持つ要因に準じて広汎な部位にストレス性素因を分散し、局所脳部位のストレス適応破綻を回避しようとする生体防御であるとも考えられる。そして、この情報分散メカニズムの異常が、ストレス適応破綻疾患の発症に結びつくのではないかと考えられた。

## E. 結論

ストレス性負荷・刺激によるヒト脳活動の変化を、MEG、MRSにより非侵襲的に評価した。

その結果、海馬から大脳皮質へのニューラルネットワークの機能的連携が示唆された。また大脳皮質のストレス性負荷に対する機能解明研究の結果から、ヒト脳は課題の難易度に対応した応答をすることでストレス性負荷を分散し、ストレス適応破綻を回避していることが示唆された。

- F. 健康危機情報  
特記事項なし
- G. 研究発表  
1. 論文発表
- (1) Nishitani N, Maeno M, Maruyama K, Okamoto J: Magnetoencephalographic and biochemical aspects of event-related cognitive activities in hippocampus. *NeuroImage* 13 : S453, 2001.
  - (2) Nishitani N: Role of hippocampus in auditory cognitive processing. *Proceedings of the 12<sup>th</sup> International Conference on Biomagnetism* 9-12, 2001.
  - (3) Nishitani N, Hari, R: Temporal dynamics of cortical representation for action. *Proceedings of the 12<sup>th</sup> International Conference on Biomagnetism* 331-334, 2001.
  - (4) Nishitani, N.: Higher Brain Function and MEG. *Brain Science and Mental Disorders*. (in press).
  - (5) Nishitani, N.: Brain Rhythm and Stress. *Clinical Encephalography* (in press).
  - (6) Nishitani N, Hari, R: Viewing lip forms: Cortical Dynamics. *Neuron* (under revision).
  - (7) Nishitani N, Maeno M: Dynamics of human hippocampal cognitive process by neuromagnetic and neurochemical assessments. (in submission)
  - (8) Nishitani N, Maeno M: Non-invasive estimation of neurochemical dynamics. (in submission).
2. 学会発表
- (1) Nishitani N, Maeno M, Maruyama K, Okamoto J: Magnetoencephalographic and biochemical aspects of event-related cognitive activities in hippocampus. 7<sup>th</sup> Annual Meeting of the Organization for Human Brain Mapping. (June, 2001 in Brighton, UK)
  - (2) Nishitani N: Higher Brain Function and MEG. In: *Neurophysiological Approach to psychological functions. 11<sup>th</sup> Symposium by Research for Psychological and Neurological diseases*. (Dec. , 2001 in Tokyo)
  - (3) Nishitani N: Higher Brain Function and Neuroimaging . In: *Panel Discussion: Research of Higher Brain Function by EEG and MEG – Recent Topics-* . 31th Annual Meeting of Japanese Clinical Neurophysiology. (Nov., 2001 in Tokyo).
  - (4) 飯嶋 睦、西谷 信之：全頭型脳磁場計測装置による計算過程の解明。  
第25回日本脳神経CI学会総会、(2001年、2月、東京)
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）  
以下全て、特になし
1. 特許取得
  2. 実用新案登録
  3. その他

## ストレス負荷時の神経細胞アクチン骨格再構成に関する研究

分担研究者 尾藤 晴彦 京都大学医学研究科講師

**研究要旨** ストレス負荷による部位特異的な神経細胞形態変化を早期に検出するため、神経細胞内アクチンを可視化できる GFP-actin を作成した。これを用い、まず海馬培養神経細胞において、ストレス負荷を模した種々の過剰刺激により、NMDA 受容体を介した  $Ca^{2+}$  流入により樹状突起スパインで細胞形態変化が誘導されるメカニズムを明らかにした。また、GFP-actin を海馬錐体細胞に発現するトランスジェニックマウスを作成した。これを用い、今後、生きた成体におけるストレス負荷時の神経形態変異ならびに細胞骨格動態を可視化できることが期待される。

### A. 研究目的

ストレスが持続化すると、生体恒常性の破綻を来し、様々な疾患罹患のリスクを著しく増悪させることが知られている。現代の高齢化社会においては、ストレスが引き起こす健康障害の増悪の阻止ということは緊急課題である。ストレスにさらされた個体の脳内部では、様々なシグナル伝達経路が活性化され、神経伝達・神経回路の機能を修飾すると考えられている。しかしながら、そのような分子修飾の詳細については、ほとんど解明されていない。

ストレス負荷が強すぎると、海馬を中心とした領域で非可逆的な神経細胞死に至る前病変として、可逆的な神経細胞形態、とくに樹状突起の平坦化が顕著に引き起こされるとの報告がある。我々は、このような細胞レベルでの可逆的なストレス病変の分子機構を探索することにより、不可逆性の病変への進行を阻止できる可能性が見いだされるのではないかと考え、ストレス負荷時の神経細胞アクチン再構成に関する研究を行うことにした。

すでに今までの知見により、GFP-actin 分子を用いて、樹状突起内アクチン細胞骨格を可視化できることが明らかになっている。そこで以下の2つの実験システムを構築することとした。

1) 初代海馬神経培養系における過剰な神経興奮負荷時に樹状突起アクチン細胞骨格がどのような挙動をとるのかを観察し、その詳細な分子機序を解析する。

2) トランスジェニックマウスに GFP-actin を神経細胞特異的に強制発現させ、ストレス病態モデルにおける樹状突起アクチン細胞骨格病変形成機構について探索する。

両システムを通して得られた知見を元に、樹状突起病変の進行を阻止する治療法の開発が期待される。

### B. 研究方法

#### B-1. GFP-actin 発現アデノウィルスを用いた過剰神経興奮状態における樹状突起アクチン動態の解析

マウス海馬錐体細胞の初代培養系において、GFP-actin 発現アデノウィルスを感染させ、種々の電気活動を負荷した時に、神経アクチン細胞骨格にどのような動態変化を及ぼすかをレーザー共焦点顕微鏡システムを用いタイムラプス計測した。電気刺激は以前尾藤らが開発したフィールド電極刺激法を用い、観測されたアクチンダイナミクスの時定数と高 K 刺激や NMDA 刺激時に認められた時定数を比較した。また、電気刺激にてどの細胞部位でアクチン動態変化が引き起こされるを同定した。

#### B-2. 神経細胞特異的 GFP-actin 発現マウスの作成

Columbia 大学医学部 Eric R. Kandel 教授より forebrain-selective な発現を可能にする CaMKII promoter を供与していただき、同プロモータ下流に GFP-actin を結合したコンストラクトを作成し、常法により C57BL/6 受精卵へ核内注入を行った。これを仮妊娠した親の子宮へ戻し、生まれた仔におけるトランスジェーンの有無、またその子孫における germline transmission を Southern blot 法ならびに PCR 法によって確認した。

#### (倫理面への配慮)

動物、組み替え DNA を用いた実験に関して、京都大学内担当諸委員会の基準に依拠して実験を行っている。現時点で、生きた動物個体に対するストレス負荷をまだ行っていない。

### C. 研究成果

#### C-1. GFP-actin 発現アデノウィルスを用いた過剰神経興奮状態における樹状突起アクチン動態の解析



Adex-NSE-GFP-actin と Adex-CMV-GFP-actin の両ウイルスを比較したところ、後者を低タイターで初代培養海馬錐体細胞に感染させたときに、最も GFP-イメージングが容易に達成できることが分かった。そこで、同ウイルスにより GFP-actin を発現した海馬錐体細胞を用い、フィールド電極刺激により、神経活動依存的に制御される神経細胞骨格動態の可視化を行った。電気刺激は、毎10秒毎に50Hz刺激1秒を繰り返した。この刺激を行うと、樹状突起スパインにおける GFP-actin の点状構造が一部増強されることが明らかになった。これは、過剰な NMDA 受容体刺激を介した  $Ca^{2+}$  流入によって、一部の樹状突起スパイン内アクチン集積が増強され、形態変化も伴うのとよく合致していた。また、過剰な電位依存性  $Ca^{2+}$  チャンネル刺激による  $Ca^{2+}$  流入に伴う細胞体辺縁部アクチン骨格は、少数の細胞であったが、電気刺激群でも再現された。

本成果は現在論文投稿中である。

## C-2. 神経細胞特異的 GFP-actin 発現マウスの作成

C57BL/6 由来受精卵へのマイクロインジェクションを約200回行い、ICR 仮親子宮に戻した後、2匹の仔が生まれた。各々について尻尾 DNA を採取・精製し、Southern Blot 法と PCR 法でトランスジーンの有無を調べたところ、2匹の仔にて、インテグレーションを確認できた。各々について、C57BL/6 に戻し交配し、germline transmission が確認された。現在、トランスジーンを両アレルに発現するマウスラインの作成と、同ラインにおける GFP-actin 発現プロファイルを確認中である。

## C-4. 本研究と関連した共同研究の成果

神経活動依存性のアクチン細胞骨格制御は、ストレス負荷時のみならず、その他の生理的・病的神経可塑性においても必須なメカニズムと考えられている。そこで、生理的なアクチン細胞骨格再編成の例として、CV-1 細胞のアクチン骨格制御、病的可塑性として、Pax6 遺伝子欠損マウスの軸索伸長異常を取り上げたところ、本研究を通じて立ち上げた蛍光観察系をもちいて、アクチン制御の上流の制御因子として、新たに PIP-5K や転写因子の Pax6 を同定した。

また、マウス個体のストレス行動異常をスクリーニングする過程で、PGE 受容体サブタイプ EP1 の遺伝子欠損マウスにストレス負荷時の行動異常が認められることを発見した。

## D. 考察

本研究によって、全くあらたな、神経細胞内樹状突起のアクチン細胞骨格可視化法を開発し、樹状突起スパインが過剰刺激により形態変化する一つのメカニズムを明らかにした。GFP-actin を用いることにより、初代培養細胞レベルでは、確かに異なるカルシウム流入の過剰負荷が、樹状突起の形態変化を引き起こすことが証明された。これらの実験データは、神経活動、とくにストレス等に見られる過剰神経活動などにおいて、発生するカルシウム流入源の組み合わせによって、細胞骨格再構築の分布が制御されている可能性を示唆した。GFP-actin を神経細胞に発現するトランスジェニックマウスを用いることにより、このような発見がさらに *in vivo* のストレスモデル実験によっても実証できるよう今後実験を計画していく予定である。

## E. 結論

我々の実験データにより、シナプス活動が過剰におこるとき、シナプスを含む樹状突起スパイン内のアクチン細胞骨格の動態が、NMDA 受容体を介したカルシウム流入によってダイナミックに制御されていることが示した。上記成果は、GFP-actin を発現した初代培養神経細胞を用いて得られたものなので、今後は GFP-actin 発現トランスジェニックマウスを用い、実際にストレス性樹状突起病変が引き起こされるのか、またその原因は何か等を解明していきたい。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Yamamoto M; Hilgemann DH; Feng S; Bito H; Ishihara H; Shibasaki Y; Lin HL. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induces actin stress fiber formation and inhibits membrane ruffling in CV1 cells. *J. Cell Biol.*, 152: 867-876, 2001.

2. Yamasaki T; Kawaji K; Ono K; Bito H; Hirano T; Osumi N; Kengaku M. Pax6 regulates granule cell polarization during parallel fiber formation in the developing cerebellum. *Development* 128: 3133-3144, 2001.

3. Furuyashiki T, Bito H, Narumiya S. Regulation of cytoskeleton by Rho. in *Signal transduction: Mechanisms that*

regulate cell fate and cell functions. (E. Nishida and S. Ohno eds., Kyoritsu Shuppan, Tokyo), pp.49-67, 2001

4. Furuyashiki T, Arakawa Y, Takemoto-Kimura S, Bito H, Narumiya S. Multiple spatiotemporal modes of actin reorganization by NMDA receptors and voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels. submitted

## 2. 学会発表

1. Matsuoka Y; Bito H; Kobayashi T; Sugimoto Y; Ushikubi F; Ichikawa A; Nakao K; Narumiya S. Sickness behavior and EP receptors. *Jpn. J. Pharmacol.* 85, Suppl. I, 15P, S6-5, 2001. 第74回日本薬理学会年会(3.21-23, 2001, 横浜) シンポジウム発表

2. 尾藤晴彦、古屋敷智之、ゼービオレーヌ、成宮周. シナプスから核へのシグナリング: CREB 制御のカルシウム依存性。第78回日本生理学会予稿集 p.134, S5-8, 2001. 第78回日本生理学会年会(3.29-3.31, 2001, 京都) シンポジウム発表

3. 松岡陽子、尾藤晴彦、小林拓也、杉本幸彦、牛首文隆、中尾一和、成宮周. ストレス反応におけるプロスタグランジンの役割。第78回日本生理学会予稿集 p.230, S61-3, 2001. 第78回日本生理学会年会(3.29-3.31, 2001, 京都) シンポジウム発表

4. 古屋敷智之、尾藤晴彦、成宮周. GFPを用いた神経細胞の局所における細胞骨格制御の解析。第78回日本生理学会予稿集 p.237, S64-5, 2001. 第78回日本生理学会年会(3.29-3.31, 2001, 京都) シンポジウム発表

5. 尾藤晴彦. 神経活動依存性  $Ca^{2+}$  シグナリングによる CREB リン酸化調節とアクチン制御。第24回日本神経科学学会大会予稿集 p.161, S08-2, 2001. 第24回日本神経科学学会、第44回日本神経化学学会合同大会(9.26-9.28, 2001, 京都) シンポジウム発表。

6. 松岡陽子、尾藤晴彦、山田清文、He Jue、小林拓也、牛首文隆、鍋島俊隆、中尾一和、成宮周. プロスタグランジン E 受容体 EP1 によるストレス行動の制御。第24回日本神経科学学会大会予稿集 p.231, PA1-152, 2001. 第24回日本神経科学学会、第44回日本神経化学学会合同大会(9.26-9.28, 2001, 京都) ポスター発表。

7. Takemoto-Kimura S; Ohmae S; Kikumura S; Tanji M; Furuyashiki T; Narumiya S; Bito H. Molecular cloning and characterization of CLICKs, novel candidates for CREB kinases of the  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase family expressed predominantly in the CNS. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 27, 2001. 第31回北米神経科学学会年会(11.10-15, 2001) ポスター発表

8. Matsuoka Y, Bito H, Yamada H, He J, Kobayashi T, Ushikubi F, Muro S, Fukuda Y, Nabeshima T, Nakao K, Narumiya S. Neuroendocrinological, biochemical and behavioral impairments in EP1-receptor-deficient mice reveal a critical role for prostaglandin E2 in stress responses. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 27, 959.13, 2001. 第31回北米神経科学学会年会(11.10-15, 2001) ポスター発表

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者氏名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Furuyashiki T, Bito H, Narumiya S.	Regulation of cytoskeleton by Rho.	E. Nishida and S. Ohno	Signal transduction: Mechanisms that regulate cell fate and cell functions.	Kyoritsu Shuppan	Tokyo	2001	49-67
Morinobu S, Fukumoto T, Tsuji S, Yamawaki S, Takahashi J, Tanaka K, Fujimaki K	Lithium and signal transduction.	Nabeshima T.	Catecholamine Research: from molecular insights to clinical medicine.	Kluwer Academic Plenum Publishers		in press	

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
Takahashi J, Tanaka K, Morinobu S, Fujimaki K, Li S-T, Kato K, Ohkawa M, Yamawaki S, Katon N.	Influence of restraint stress on the expression and the serine/threonine phosphatase activity of calcineurin in the rat brain.	Synapse	40	130-136	2001
Fujimaki K, Morinobu S, Takahashi J, Yamawaki S, Kato N, Kanno M, Okuyama N, Kawakatsu S, Otani K, Kusumi I, Koyama T	Nucleotide sequence analysis of the binding site on the inositol 1, 4, 5-trisphosphate type-1 receptor in bipolar disorder. -A negative study-	J Affect Dis	65	139-143	2001
Hisaoka K, Nishida A, Koda T, Miyata M, Zensho H, Morinobu S, Ohta M, Yamawaki S.	Antidepressant drug treatments induce glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) synthesis and release in rat C6 glioblastoma cells.	J Neurochem	79	25-34	2001
Fukumoto T, Morinobu S, Okamoto Y, Kagaya A, Yamawaki S.	Chronic lithium treatment increases the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the rat brain.	Psychopharmacol	158	100-106	2001

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kouhata S, Kagaya A, Nakae S, Nakata Y, Yamawaki S.	Effect of acute lipopolysaccharide administration on ( $\pm$ )-1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane-induced wet dog shake behavior in rats: comparison with body weight change and locomotor activity.	Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psychiat.	25	395-407	2001
Katagiri H, Kagaya A, Nakae S, Morinobu S, Yamawaki S.	Modulation of serotonin-2A receptor function in rats after repeated treatment with dexamethasone and L-type calcium channel antagonist nimodipine.	Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psychiat.	25	1269-1281	2001
Miyoshi I, Kagaya A, Kohchi C, Morinobu S, Yamawaki S.	Characterization of 5-HT <sub>2A</sub> receptor desensitization and the effect of cycloheximide on it in C6 cells.	J. Neural Transm.	108	249-260	2001
Kurata K, Takebayashi M, Kagaya A, Morinobu S, Yamawaki S.	Effect of b-estradiol on voltage-gated calcium channels in rat hippocampal neurons: a comparison with dehydroepiandrosterone.	Eur. J. Pharmacol.	416	203-212	2001
Sasaki Y, Hayakawa H, Kagaya A, Yamawaki S.	Effect of forced running stress on behavior and on brain serotonin system in rats.	Biogenic Amines	16	137-155	2001
Yamamoto M, Hilgemann DH, Feng S, Bito H, Ishihara H, Shibasaki Y, Lin HL.	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induces actin stress fiber formation and inhibits membrane ruffling in CV1 cells.	J. Cell Biol.	152	867-876	2001
Yamasaki T, Kawaji K, Ono K, Bito H, Hirano T, Osumi N, Kengaku M.	Pax6 regulates granule cell polarization during parallel fiber formation in the developing cerebellum.	Development	128	3133-3144	2001
Nishitani N, Maeno M, Maruyama K, Okamoto J.	Magnetoencephalographic and biochemical aspects of event-related cognitive activities in hippocampus.	NeuroImage	13	S453	2001
Nishitani N.	Role of hippocampus in auditory cognitive processing.	Proceedings of the 12 <sup>th</sup> International Conference on Biomagnetism		9-12	2001
Nishitani N, Hari, R.	Temporal dynamics of cortical representation for action.	Proceedings of the 12 <sup>th</sup> International Conference on Biomagnetism		331-334	2001

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nakae S, Kagaya A, Katagiri H, Yamawaki S.	Serotonin-2A receptor and the receptor-mediated signaling systems in rats : possible implication for pathophysiology of mood disorders.	Current Topics in Neurochemistry			in press
山下英尚 他	脳磁図 (MEG) を用いたストレス適応破綻の脳内機構に関する研究ー Sensory gating system に焦点を当てた検討ー	薬療基金報告集			印刷中
Nishitani, N.	Higher Brain Function and MEG.	Brain Science and Mental Disorders.			in press
Nishitani, N.	Brain Rhythm and Stress.	Clinical Encephalography			in press

20010634

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので  
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。