

(3) ラット海馬スライス標本を用いた VSD 光計測法の定量化

光計測にタイムラプスの計測を適用し、海馬全体の膜電位応答が層によらず均一に測定しうることが示された。また、フィードフォワードの抑制性入力膜電位応答に対する影響を定量的に示す方法が確立した。

(4) 光計測に用いる新規光学系の構築

新規の超高速共焦点光学系はほぼ計算通りの性能があることが確認できた。デジタルミラーデバイス(DMD)を用いた多点同時光刺激装置つき光計測光学系で光刺激と光計測が同時に行えることが確認できた。

D. 考察

上記の(1)、(3)の結果から、適切な実験系を構築することにより光計測が妥当な定量性を有し得ることが示された。

(2)の結果はまだ、試行例が少なく、定量的な結果を示すことはできていない。これまでに、行動実験で示されている認知行動の異常と直接結びつく結果になれば非常に興味深い。さらに(4)の光学系を組み合わせることにより、より詳細な神経機構の解明が期待される。

E. 結論

本年はまだプロジェクトのスタートで実際の化学物質の評価という点では結果は限定的であるが、光計測を用いて神経回路の機能評価を行う手法は確立されてきていると言える。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

Allen, R.D., Tominaga, T. and Naitoh, Y. (2008) The Contractile Vacuole Complex and Cell Volume Control in Protozoa In: Osmotic and Ionic Regulation: Cells and Animals. CRC Press, David H. Evans ed. USA pp. 69 - 106.

富永貴志 「"細胞内小器官 収縮胞の動きと機能"」、動物の「動き」の秘密にせまる：運動系の比較生物学（吉村健二郎編）動物の多様な生き方 共立出版社（印刷中）

2) 雑誌

Tominaga, Y. Ichikawa, M., and Tominaga, T. Membrane potential response profiles of CA1 pyramidal cells probed with voltage-sensitive dye optical imaging in rat hippocampal slices reveal the impact of GABAA-mediated feed-forward inhibition in signal propagation. *Neurosci Res* (in press).

Koganezawa, N., Taguchi, A., Tominaga, T., Ohara, S., Tsutsui, K., Witter, M.P., and Iijima, T. (2008). Significance of the deep layers of entorhinal cortex for transfer of both perirhinal and amygdala inputs to the hippocampus. *Neurosci Res* 61, 172-181.

2. 学会発表

Tominaga, T. and Tominaga, Y. (2008) The impact of GABAA-mediated inhibition in signal propagation of rat hippocampal slices examined with membrane potential response profiles of CA1 pyramidal cells with voltage-sensitive dye optical imaging. Program No. 136.7. 2008 Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2008. Online.

Taguchi, A., Koganezawa, N., Tominaga, T., Ohara, S., Tsutsui, K.-I., Witter, MP, Iijima, T. (2008) Significance of the deep layers of entorhinal cortex for transfer of both perirhinal and amygdala inputs to the hippocampus. Program No. 738.12. 2008 Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2008. Online.

富永貴志、富永洋子. (2008) テタヌス様ガンマバンド刺激によって海馬スライス標本の CA1 野で引き起こされる神経回路網応答, 第 46 回日本生物物理学会年会, 福岡

富永貴志、富永洋子. (2008) 海馬スライス標本 CA1 野の神経興奮伝達におけるフィードフォワード抑制の大きさの細胞内分布を膜電位感受性色素により計測した, 第 31 回日本神経科学大会 / Neuroscience2008, 東京

田口綾香、小金澤紀子、富永貴志、大原慎也、筒井健一郎、Menno Witter、飯島敏夫. (2008) 感覚入力と情動性入力の海馬への情報伝達における嗅内皮質深層の役割

G. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

「新規超高速共焦点光学系」

富永貴志・市川道教 (出願予定)

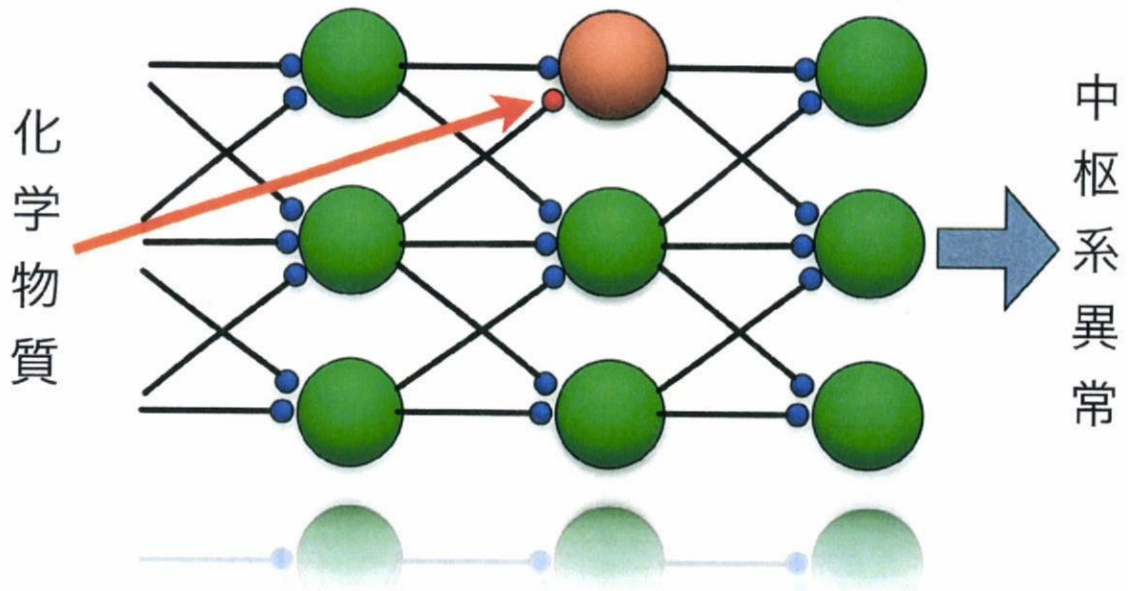
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

神経回路毒性

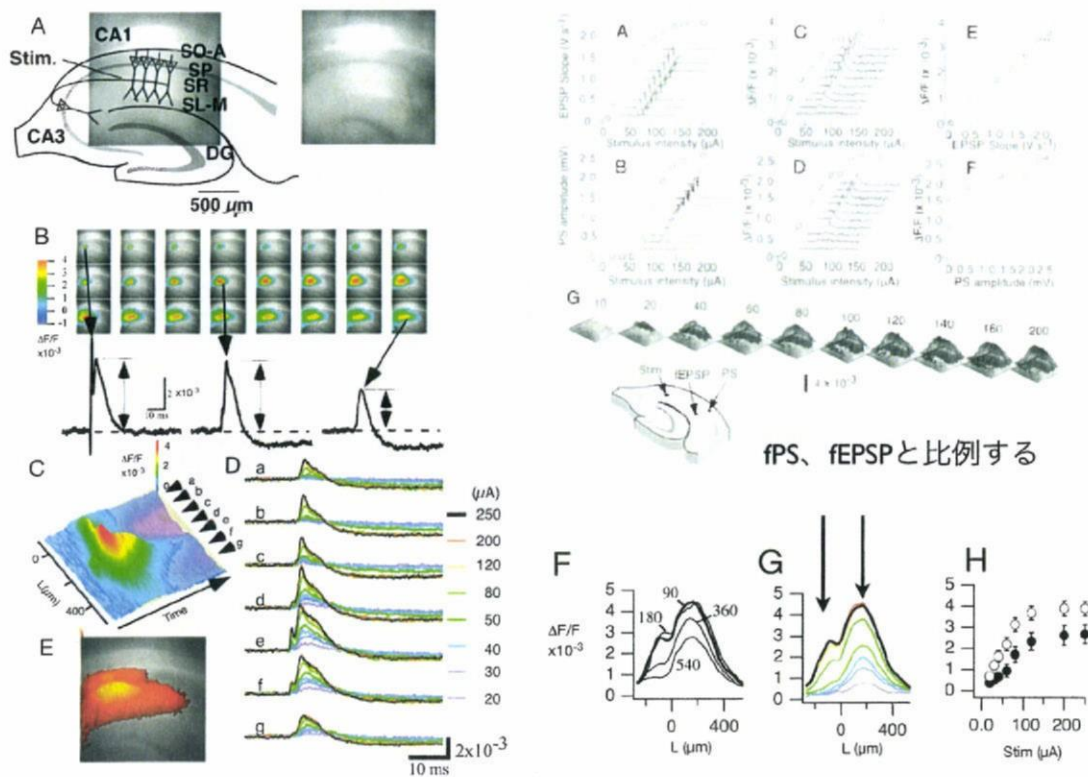


神経活動イメージングによる解析

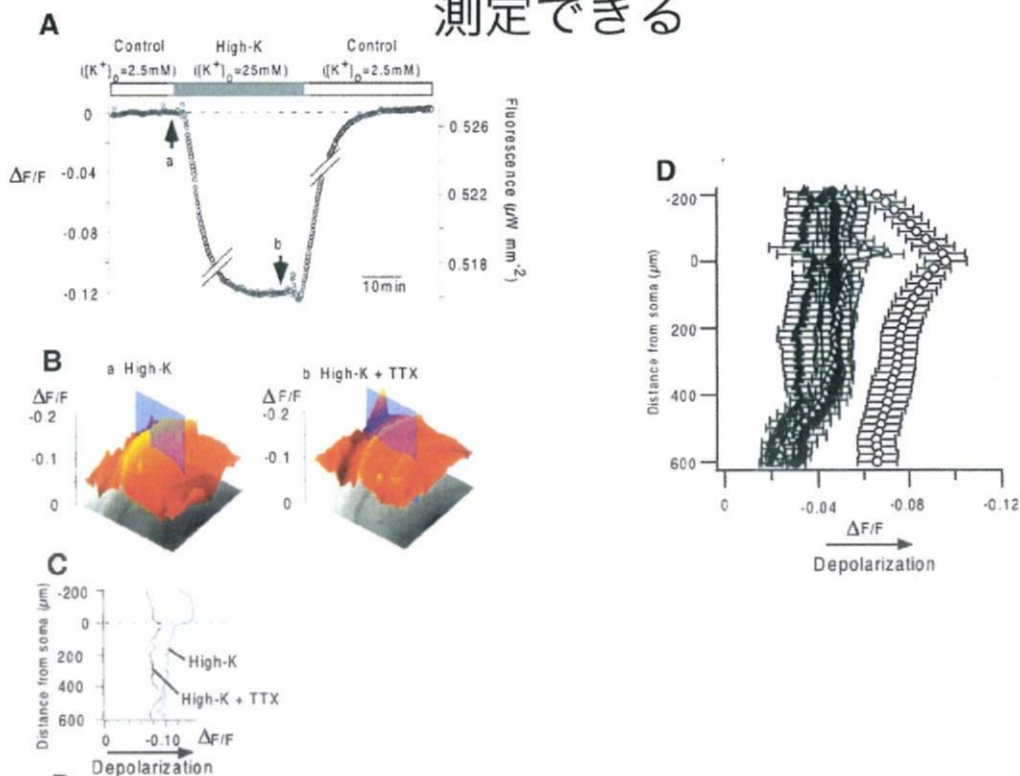
定量的に

神経回路異常を発見する

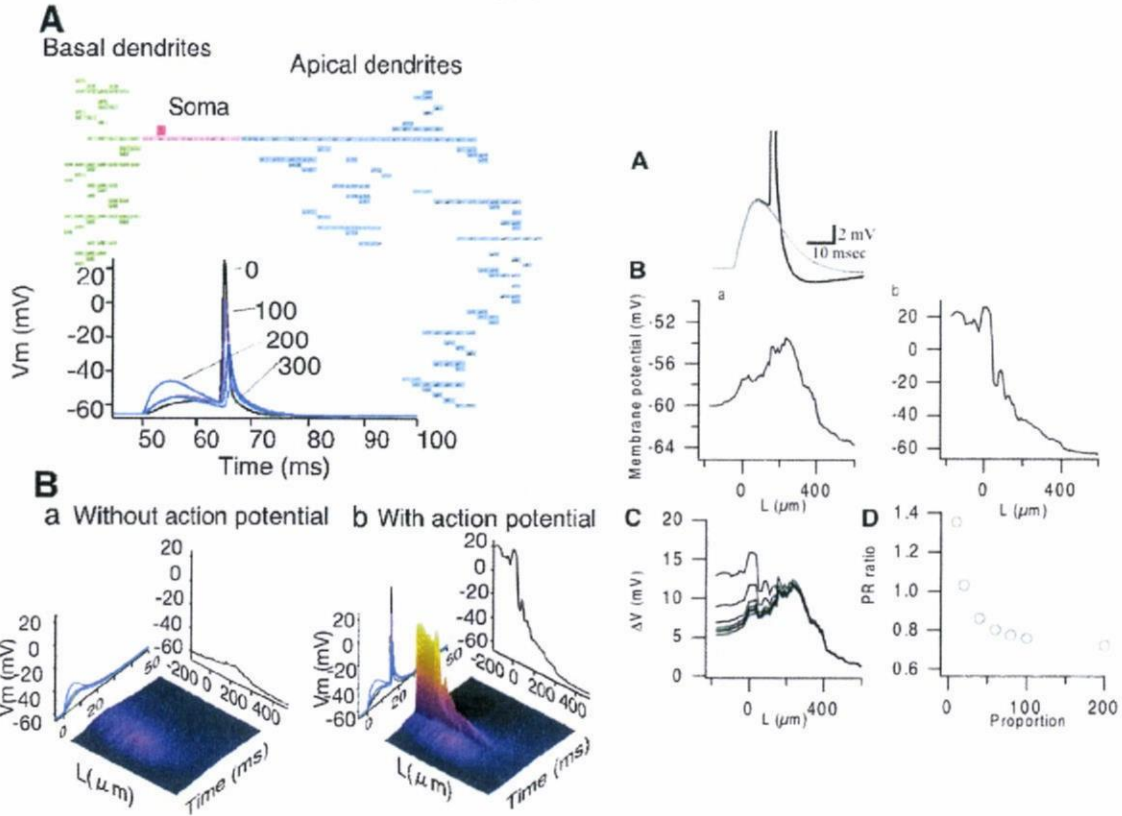
光信号の強度は何を反映しているのか？



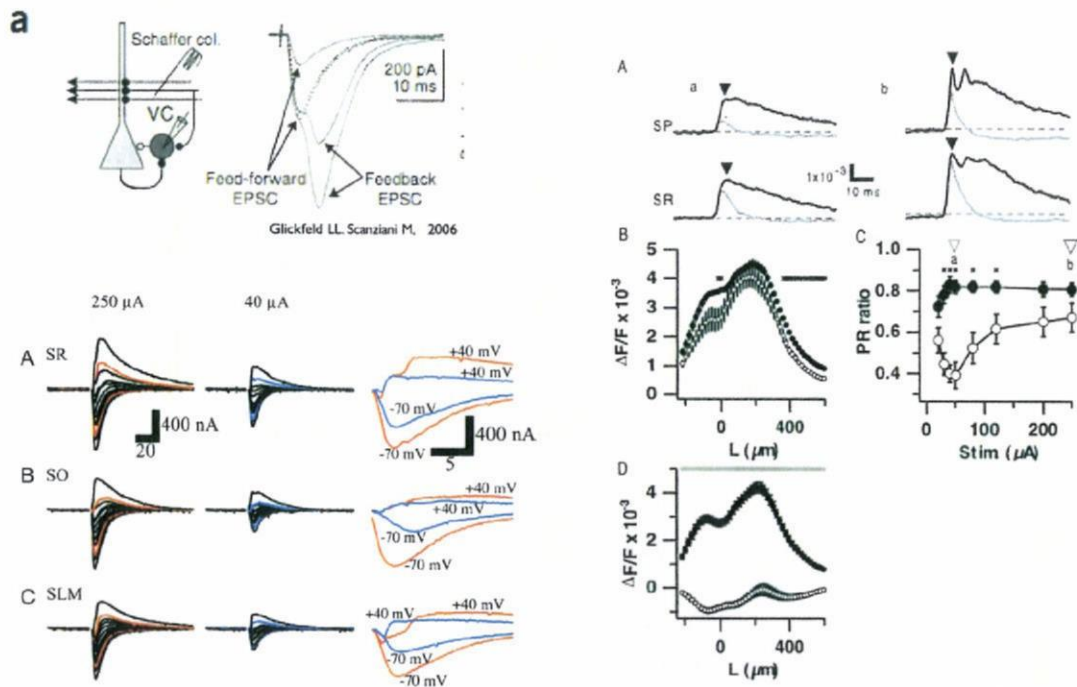
膜電位を一様に変えれば、一様な光強度変化が測定できる

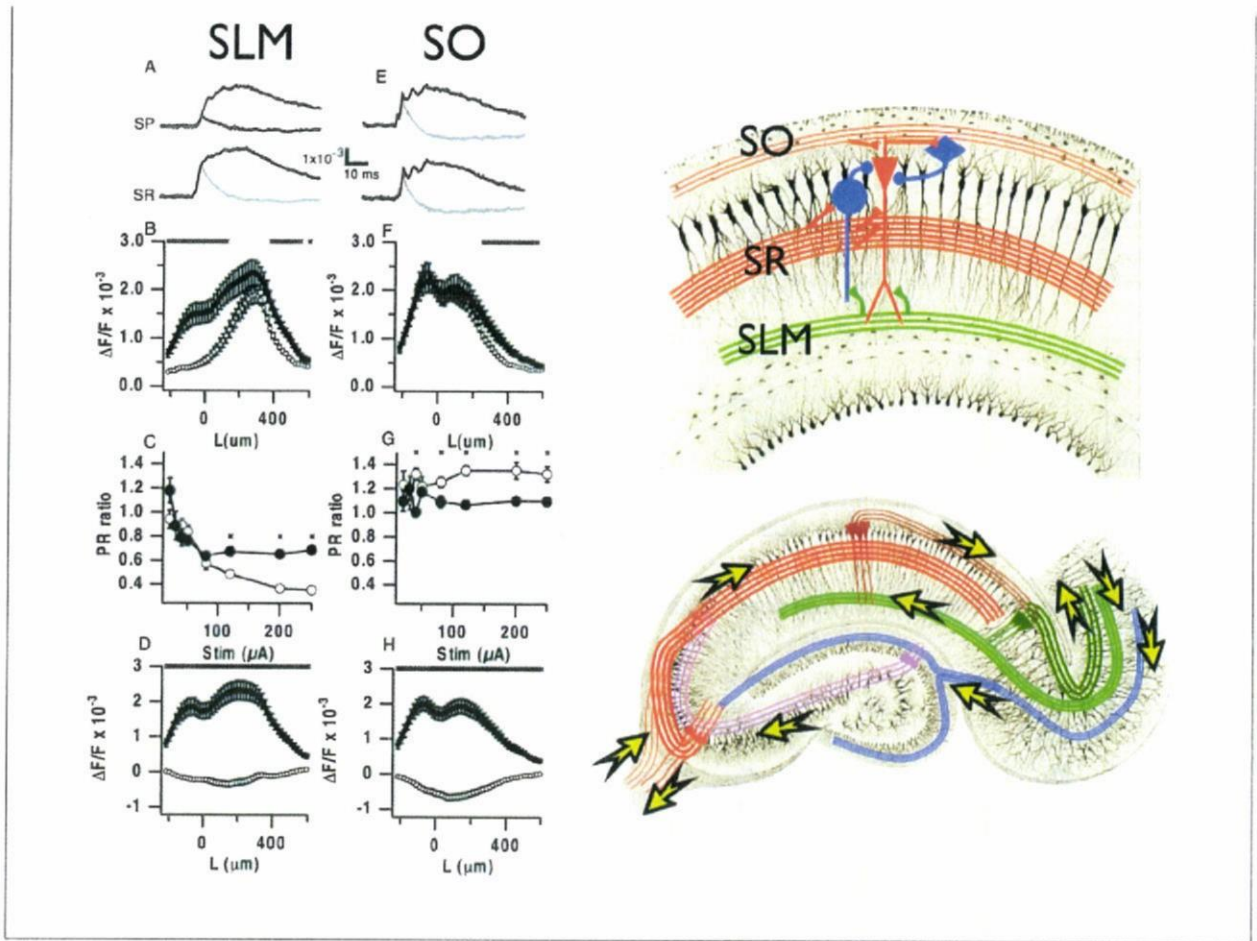


VSD信号は集団の信号を反映している

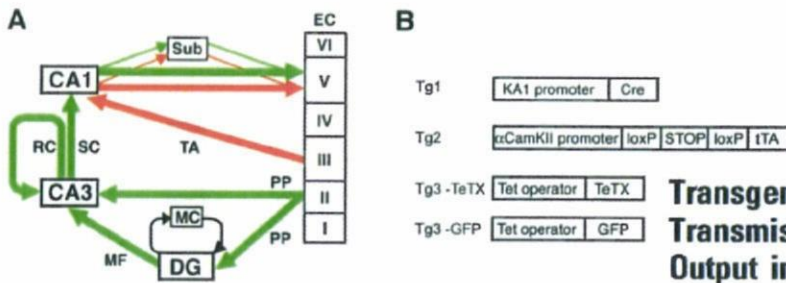


Feed-forward inhibitionの影響も測定できる





TG mouseの機能異常の解析

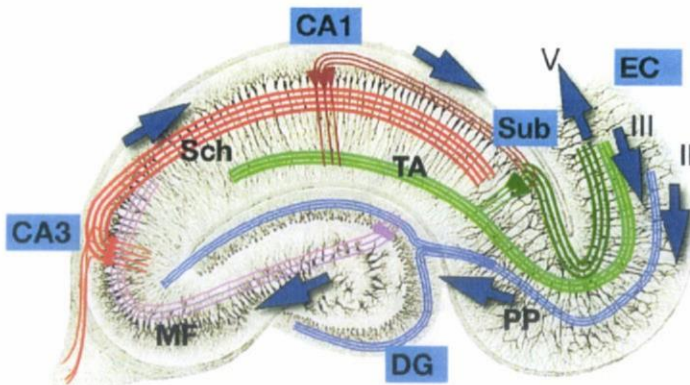


Transgenic Inhibition of Synaptic Transmission Reveals Role of CA3 Output in Hippocampal Learning

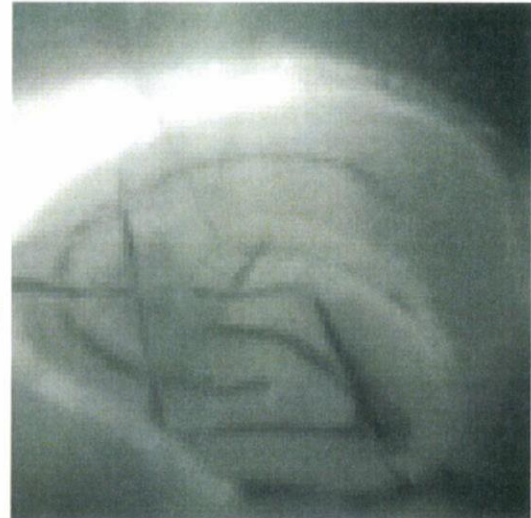
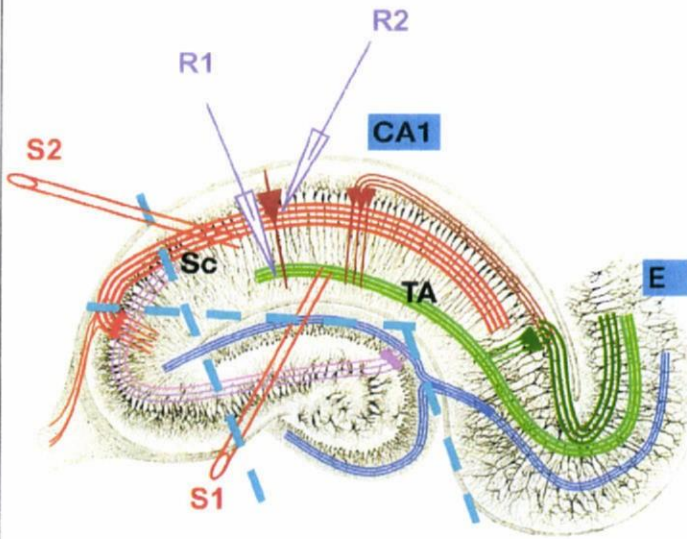
Toshiaki Nakashiba, Jennie Z. Young, Thomas J. McHugh, Derek L. Buhl, Susumu Tonegawa*

1260

29 FEBRUARY 2008 VOL 319 SCIENCE www.sciencemag.org



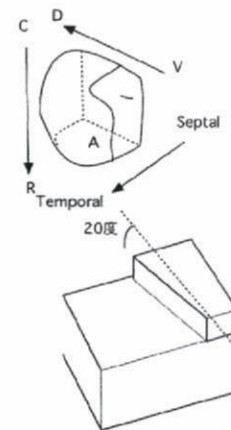
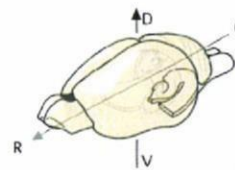
Geometry of the Electrode Set-up



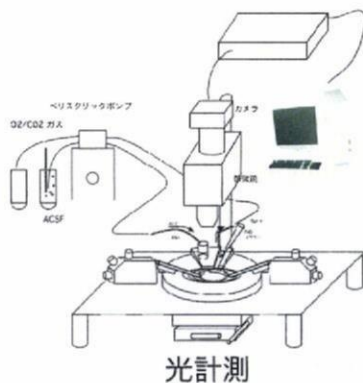
CA1回路におけるAcephateの遅発神経毒性の定量化



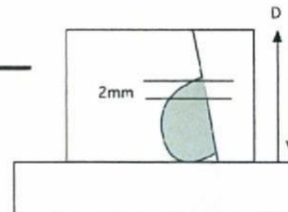
4日後



rostoral側の切断面を寒天ブロックに載せ、Septal側の切断面を寒天の突起部に押しあて角度をつける。



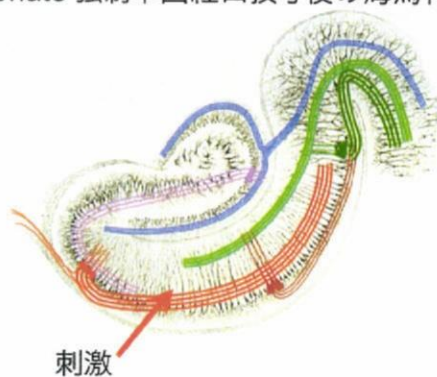
数時間



350 - 400 μmでスライス
2mmよりventral側で4枚程度
スライス標本がとれる
スライサー台

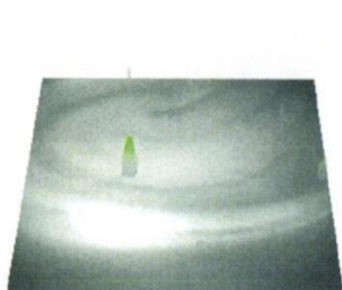
ex vivo スライス標本調整

Acephate 強制単回経口投与後の海馬神経回路活動



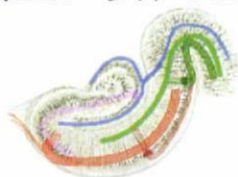
Control

Acephate

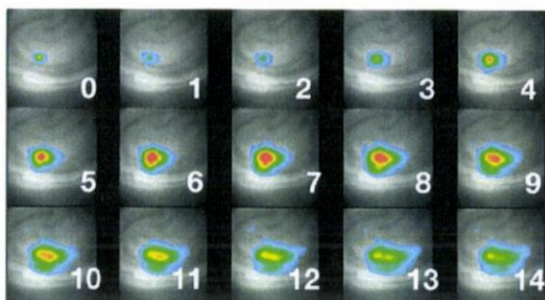


14

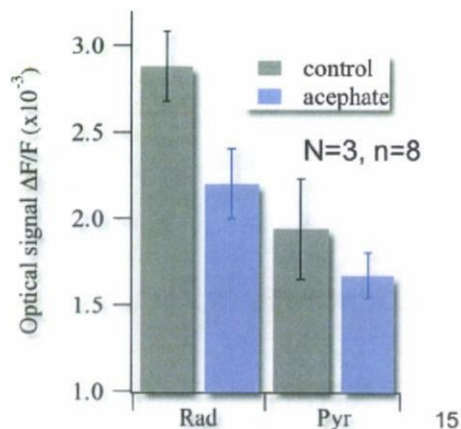
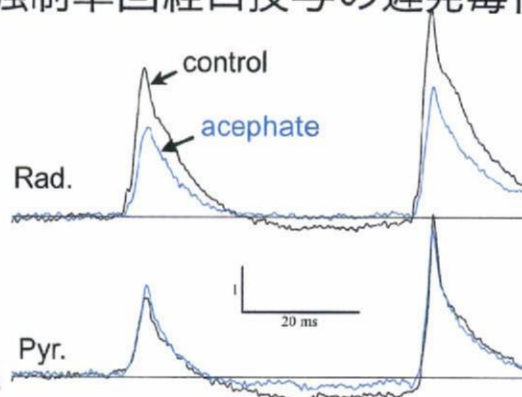
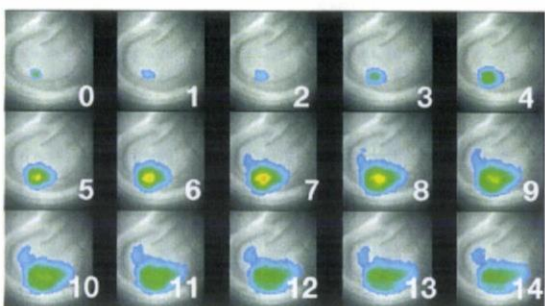
CA1回路上に表れたAcephateの強制単回経口投与の遅発毒性



Control



Acephate

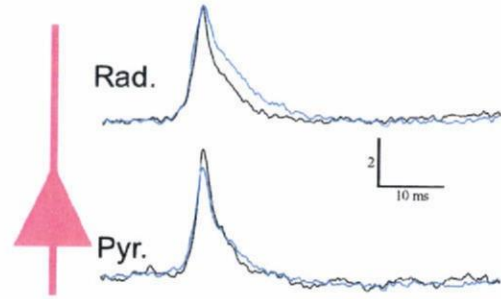
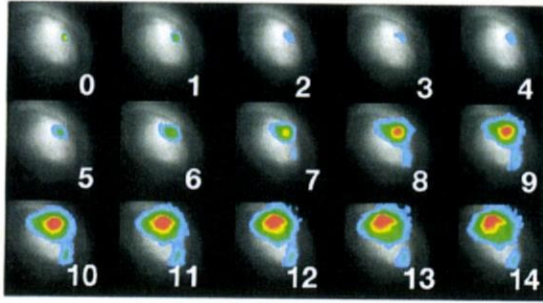


-104-

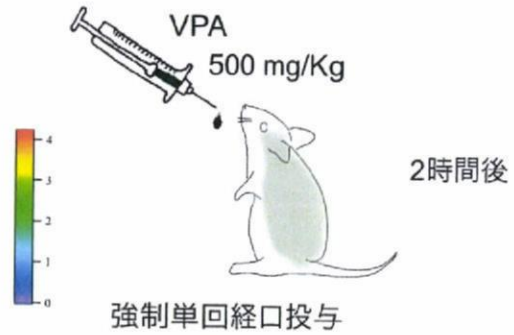
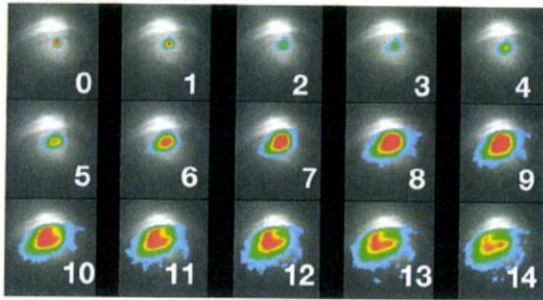
15

VPAの強制単回経口投与による回路異常は見つかっていない

Control



VPA



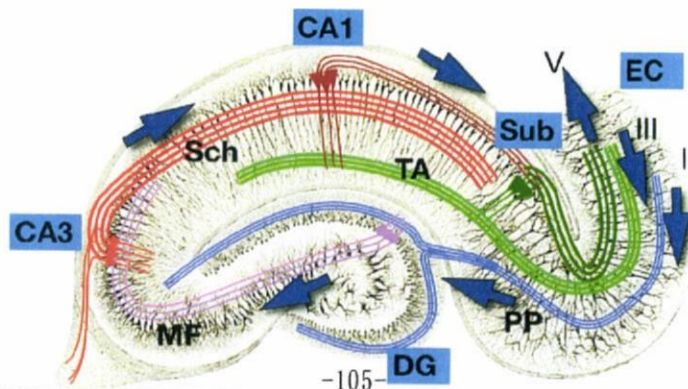
16

結果

- VSDを用いて定量的に神経回路異常を検証する手段は整った。
- アセフェートでは、遅発性毒性に基づく神経回路異常が示唆された。
- VPAでは、現在のところ異常を見いだしていない。

課題

- どの経路のどのような信号を検定すればよいのか？
 - シェーファー側枝-CA1が最もよいのか？-行動実験との対応
 - 可塑性発現等の検定が必要か？



17

神経伝達物質輸送活性計測による中枢作動性物質の
シナプス伝達機能毒性解析に関する研究

研究分担者 高森 茂雄

東京医科歯科大学 准教授

【研究要旨】

バルプロ酸は、GABA 分解酵素阻害作用を持ち、抗てんかん薬として臨床的にも有用な薬である。反面、妊婦の服用では、生まれた子供に催奇形性・頭部各所の形態異常を誘発するなど、強い副作用も確認されている。本研究では、マウスをモデル動物として用い、妊娠中期のバルプロ酸暴露が海馬におけるシナプス形成に及ぼす影響を評価したところ、バルプロ酸投与群の産仔の成熟脳海馬では、シナプス形成と成熟過程が阻害されている可能性を示唆する知見を得た。

A. 研究目的

我々の脳内には、数百—数千億個の神経細胞が存在し、それらが非常に複雑かつ秩序だったネットワークを形成し、互いにシグナルを交換することにより、脳高次機能を発現する。神経回路網や局所的な神経活動の機能修飾—なかでも、興奮性神経伝達と抑制性神経伝達のバランスの破綻は、遅発性の脳機能障害の原因となる可能性が指摘されているが、その分子メカニズムは明らかではない。本研究では、遅発性脳機能障害を誘発する中枢神経作動薬であるバルプロ酸をモデル化学物質として用い、興奮性—抑制性バランス(E/I balance: excitatory-inhibitory balance)の指標と

なるマーカータンパク質の発現量に対する影響を調べることで、遅発性脳機能障害の分子メカニズムの一旦を明らかにする。

B. 研究方法

GABA 分解酵素阻害作用を有し、臨床的には抗てんかん薬として用いられているバルプロ酸の過剰投与が、遅発性の脳機能障害を誘発するという作業仮説に基づき、E/I balance の破綻の指標として、小胞型グルタミン酸トランスポーター(VGLUT1/VGLUT2)と小胞型 GABA トランスポーター(VGAT)の海馬での発現量の変化を、定量的ウェスタンブロット法でモニターした。平成20年度は、妊娠中期(妊娠 12-14

日)マウスに一日一回 300 mg/kg の用量を経口投与し、産仔の生後発達期(生後 0, 3, 7, 14 日齢)および成体(8 週齢)の海馬全体をサンプリングした。海馬から界面活性剤である Triton X-100 の 1%溶液を用いてタンパク質を抽出し、SDS-PAGE およびウェスタンブロッティングに供した。今回は、VGLUT1/VGLUT2/VGAT およびシナプス小胞のマーカとして Synaptophysin の発現量を、バルプロ酸投与群と対照群において定量、比較した。

(倫理面への配慮)

本研究で行われた動物実験は、東京医科大学が定める「動物実験の基本指針」を遵守して行った。

C. 研究結果

【1】小胞型神経伝達物質トランスポーターの定量法の確立

VGLUT1/VGLUT2/VGAT およびシナプス小胞マーカである Synaptophysin の特異抗体を用いて、海馬抽出物中のそれぞれのタンパク質を定量的に比較する実験法を確立した。本実験法では、海馬サンプリング時のばらつき、タンパク質定量のデータのばらつき、ウェスタンブロットの検出のばらつき等がデータの精度に影響を与えると考えられるが、これまでの実験から、ウェスタンブロット時のばらつきが最も強い影響を持っていることが予想された。

【2】バルプロ酸の産仔脳発達期の E/I バランスに対する影響

妊娠中期(妊娠12-14日の3日間)母親にバルプロ酸を経口投与し、産仔脳のシナプス形成期におけるマーカ分子の発現に及ぼす影響を調べたところ、VGLUT1/VGAT/Synaptophysin の発現量は対照群とバルプロ酸投与群で差異は見られないが、VGLUT2 に関しては生後7日目と14日目に若干の発現増加傾向が見られた。

【3】バルプロ酸の産仔成体脳における E/I バランスに対する影響

【2】と同様の投与プロトコールで、8週齢脳における各マーカ分子の定量を行ったところ、VGLUT1 と Synaptophysin の発現量がバルプロ酸投与群では若干低下していることが分かった(それぞれ $P < 0.02$, $P < 0.04$; $n = 6$)。VGLUT2 と VGAT の発現量は差異が見られなかった(それぞれ $P > 0.2$, $P > 0.4$; $n = 6$)。

D. 考察

今回用いたバルプロ酸の投与プロトコールでは、バルプロ酸暴露母から生まれた産仔の海馬において、E/I balance の指標となる小胞型神経伝達物質トランスポーターのタンパク質発現量に大きな変化は見られなかった。従って、本投与プロトコールによって惹起される脳機能障害には、海馬神経回路の E/I balance の破綻は大きな寄与をしていないことが考えられた。しかしながら、産仔成体脳において VGLUT1 と Synaptophysin の発現量に有為な低下が認められることから、生後脳におけるシナプス形成、もしくは成熟に支障を来した可能性が示

唆された。免疫組織学的なアプローチや、海馬スライスを用いた実験からシナプス形成異常の示唆を得られるか否かが早急の研究課題となるだろう。

本研究アプローチでは、発現量の変化が極一部のシナプスでのみ起こる軽微な変化を検出することは非常に困難である。そのようなわずかな発現量変化が機能不全を引き起こす可能性は否定できない。本研究班の特質を活かした形態解析・網羅的な遺伝子発現解析を組み合わせた多角的な研究アプローチの重要性が、改めて浮き彫りにされた。

E. 結論

妊娠中期の母親マウスへのバルプロ酸暴露は産仔の脳発達期の E/I balance を顕著に侵害しないことが明らかになった。しかし、シナプス小胞マーカートンパク質の発現減弱が見られたことから、バルプロ酸暴露は、投与直後ではなく、産仔生誕後のシナプス形成あるいはシナプス成熟の過程に影響を及ぼす可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

Takamori S. Synaptic vesicles. In: Squire LR (ed.) *Encyclopedia of Neuroscience* 9, 801-808, 2009. Oxford: Academic Press.

高森茂雄 SNARE 蛋白質が媒介するシナプス小胞エキソサイトーシスの分子メカニズム 大野博司・吉森保編 *蛋白質核酸酵素* 増刊「メンブレントラフィックの奔流」, 共立出版, 東京, 2008, 2078-2083 .

高森茂雄, 塩原靖幸 小胞型グルタミン酸トランスポーター(VGLUT)の機能 *Clinical Neuroscience*, 中外医学社, 東京, 2008, 1087-1090.

2) 雑誌

Schenck S, Wojcik SM, Brose N, Takamori S. A chloride conductance in VGLUT1 underlies maximal glutamate loading into synaptic vesicles. *Nature Neuroscience* 12, 156-62, 2009.

Martens H, Weston MC, Boulland JL, Gronborg M, Groshe J, Kacza J, Hoffmann A, Matteoli M, Takamori S., Harkany T, Chaudhry FA, Rosenmund C, Erck C, Jahn R, Hartig W. Unique luminal localization of VGAT-C terminus allows for selective labeling of active cortical GABAergic synapses. *The Journal of Neuroscience* 28, 13125-31, 2008.

2. 学会発表

Takamori S. Mechanisms of glutamate transport into synaptic vesicles. Symposium on

Molecular Physiology of Synaptic Function,
Neuro2008, 2008.7.11, Tokyo.

高森茂雄 グルタミン酸のシナプス小胞への
取込機構 生理研研究会 「新たなコンセプト
でシナプス伝達機構を考える」2008.9.19, 岡
崎.

Takamori S. VGLUTs: 'exciting' times for
glutamatergic research? Symposium on the
MESO-CONTROL of the cells, by the cells,
for the cells. 2009.1.27, Kyoto.

F. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

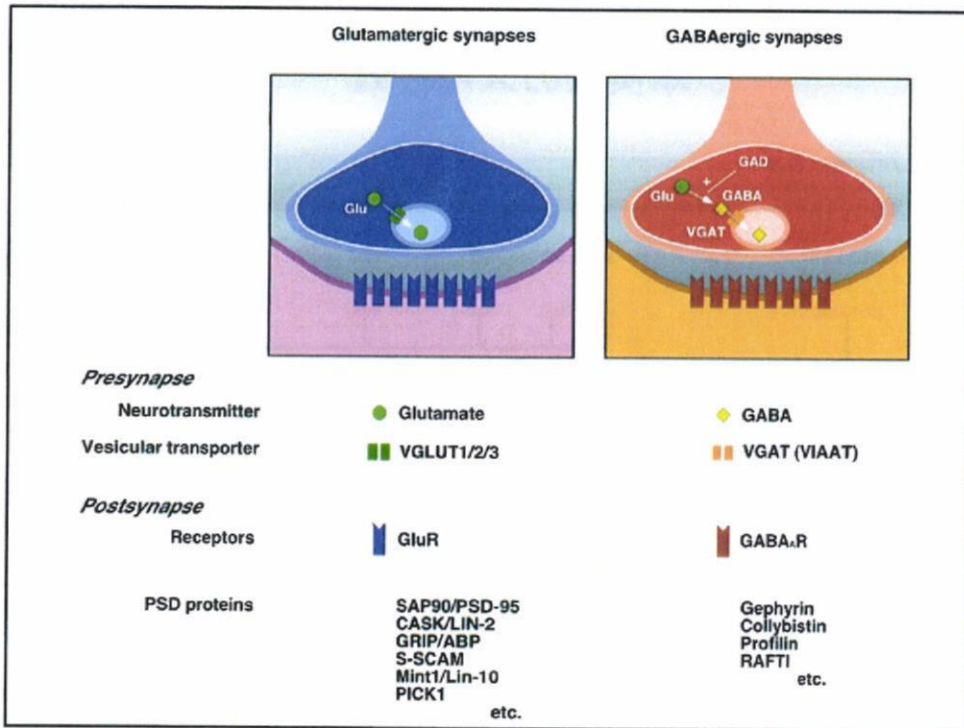
なし

2. 実用新案登録

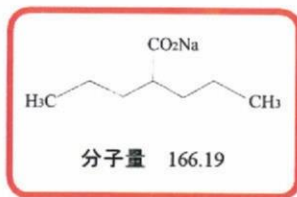
なし

3. その他

なし



Valproate: バルプロ酸ナトリウム



抗てんかん剤、躁病・躁状態治療薬

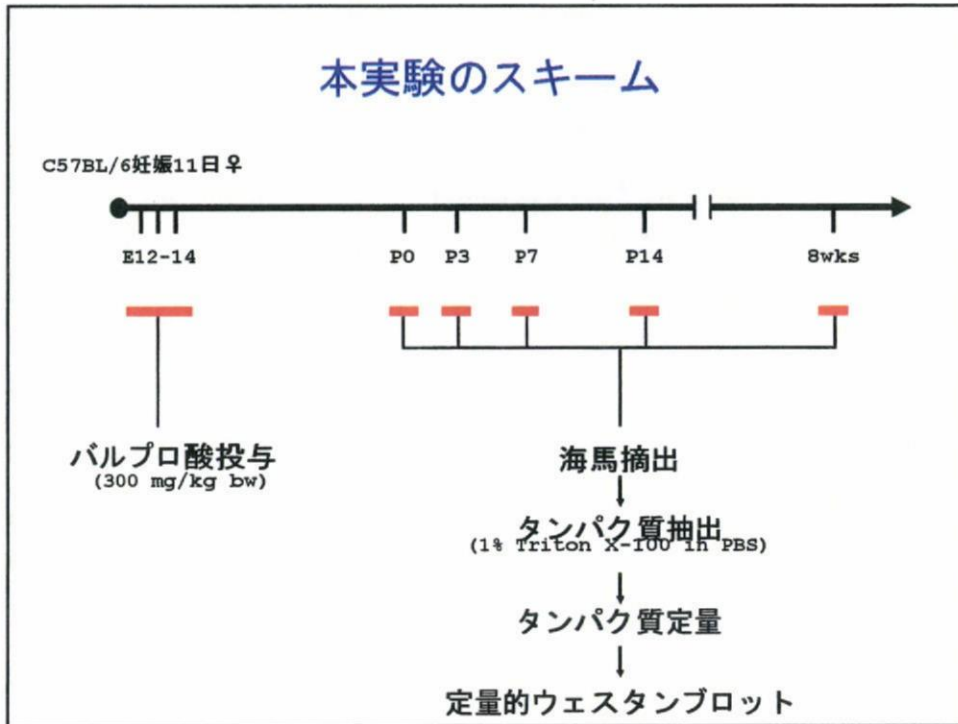
GABAトランスアミナーゼを阻害
→ 抑制性神経伝達の亢進

HDAC阻害作用（遺伝子発現制御）

副作用

1. 劇症肝炎等の肝障害
2. 高アンモニア血症を伴う意識障害
3. 高血性膀胱炎
4. 急性腎炎
5. 脳奇形性
6. 萎縮・痴呆様症状・パーキンソン様症状など
7. 催奇形性：妊婦に投与した場合子供に自閉症様症状

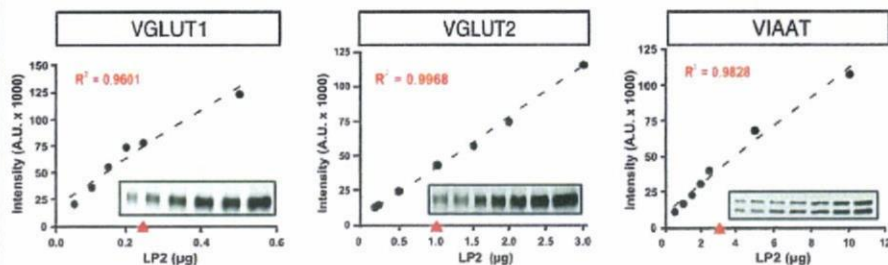
本実験のスキーム

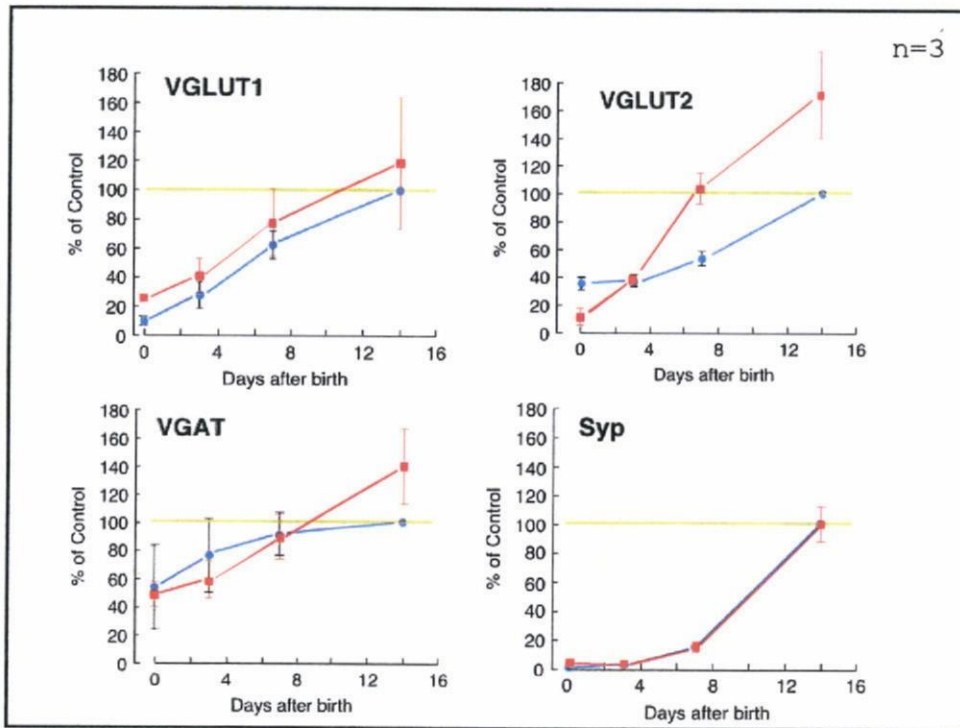


定量的ウェスタンブロット法

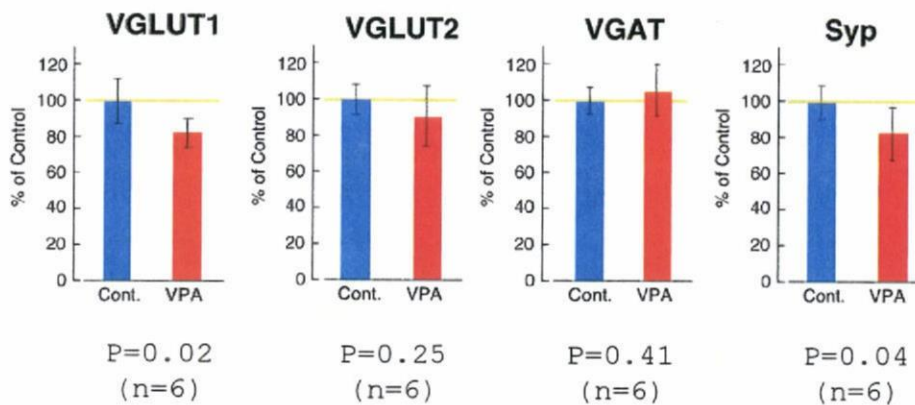
小胞型輸送体 : VGLUT1/2/3, VGAT (VIAAT)

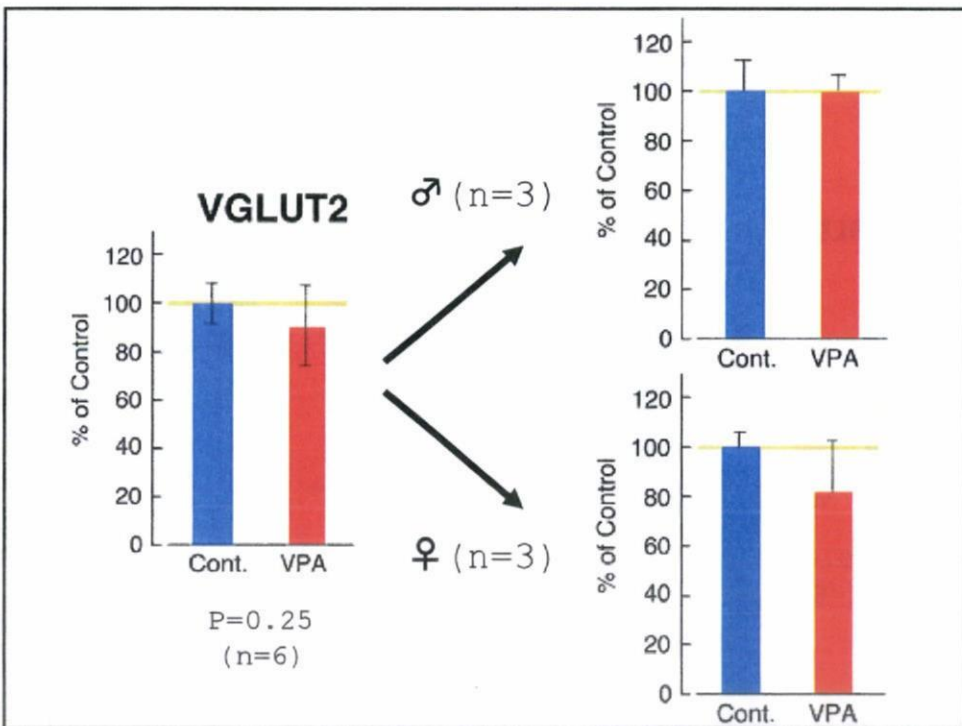
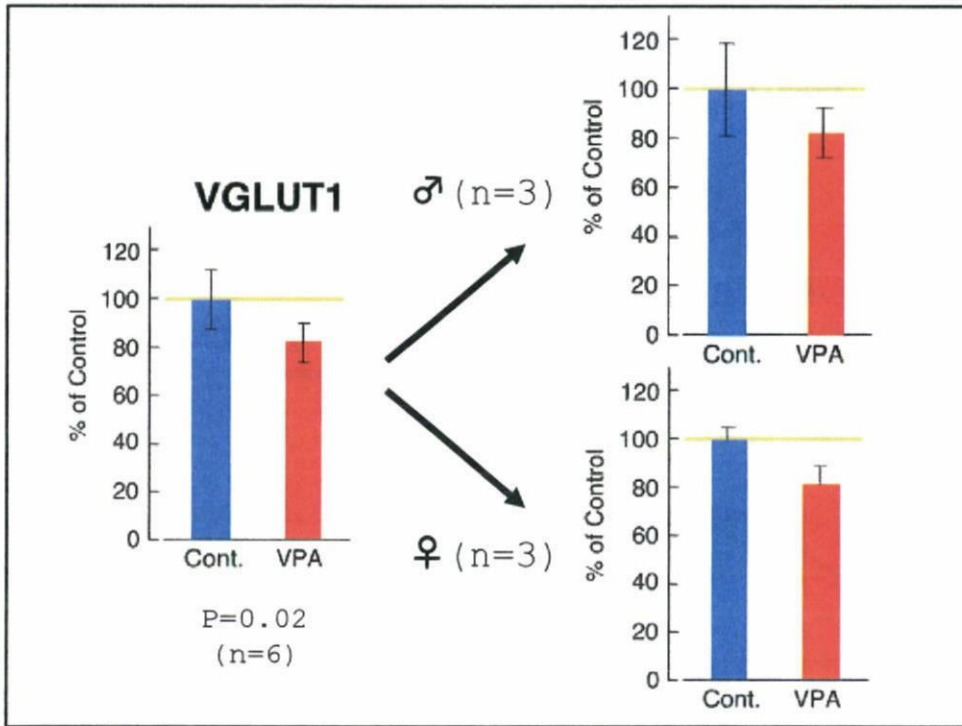
シナプス小胞マーカー : Synaptophysin

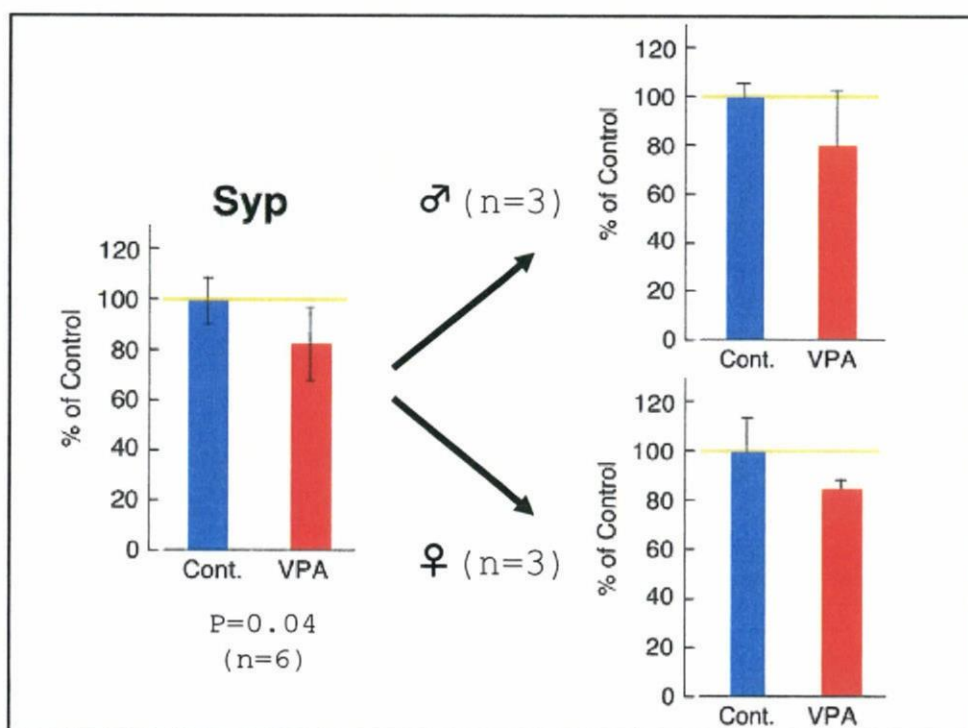
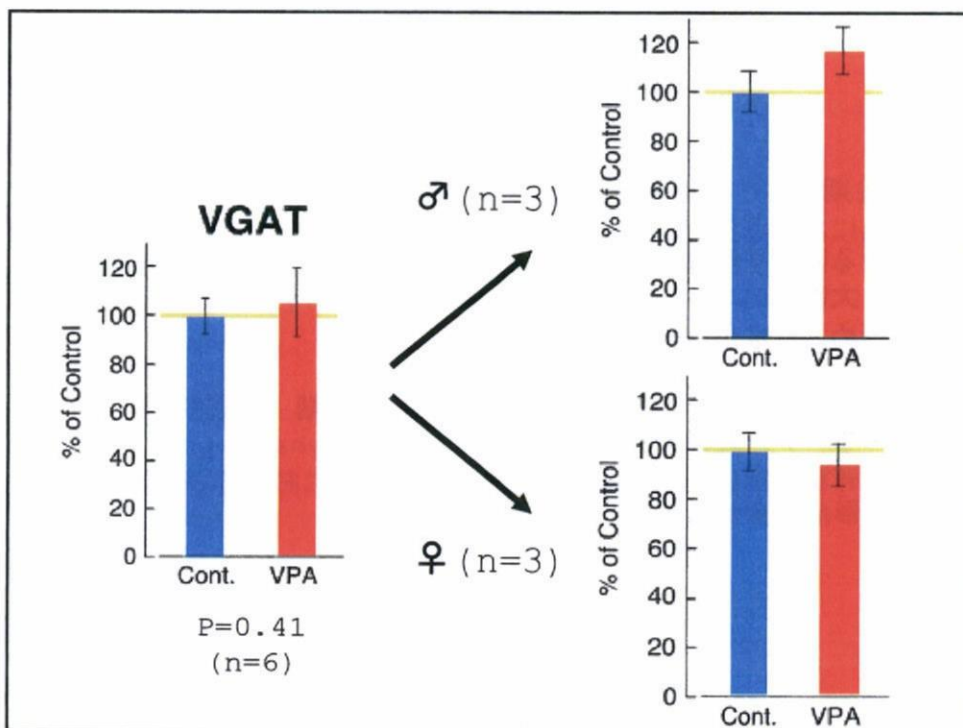




成熟産仔海馬 (8週齢) の評価







Summary

- 発生期におけるバルプロ酸の経胎盤暴露が、産仔の生後発育期の海馬におけるシナプス小胞型アミノ酸トランスポーターの発現に与える影響を調べた所、VGLUT2に軽微な上昇傾向を認めたものの、大部分のニューロンが発現しているVGLUT1、VGATには変化が認められなかった。

- 同様の投与プロトコルを用い、産仔の成熟期（8週齢）のトランスポーター発現を調べた所、VGLUT1及びSynaptophysinに発現の有意な減少が認められたことから、海馬における興奮性シナプス形成不全が疑われた。

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
山田一之	統合失調症と モノアミントラ ンスポーター		Clinical Neuroscien ce	中外医学 社	東京	2008	26(10) 1143 - 1145
菅野 純、北 嶋 聡、相崎 健一、五十 嵐 勝秀、小 川 幸男、関 田清司	トキシコゲノミ クスの大規模 高精度データ ベースの構築 と解析	野村護、 堀井郁 夫、吉田 武美	非臨床試験 ガイドラインへの 対応と新しい 試み	株式会社 エル・ア イシー	東京	2008	561 - 568
Allen, R.D., Tominaga, T. and Naitoh, Y	The Contractile Vacuole Complex and Cell Volume Control in Protozoa In: Osmotic and Ionic Regulation	David H. Evans ed	Cells and Animals	CRC Press	USA	2008	69 - 106
富永貴志	細胞内小器官 収縮胞の動きと 機能	吉村健二郎	動物の「動 き」の秘密 にせまる: 運動系の比 較生物学	共立出版 社		印刷 中	
Takamori S	Synaptic vesicles	In: Squire LR	Encycloped ia of Neuroscien ce	Oxford: Academic Press	英国	2009	9, 801 - 808
高森茂雄	SNARE 蛋白 質が媒介する シナプス小胞 エキソサイト ーシスの分子 メカニズム	大野博 司・吉森 保	蛋白質核 酸酵素増 刊「メンブ レントラフィ ックの奔流」	共立出版 社	東京	2008	2078 - 2083
高森茂雄、 塩原靖幸	小胞型グルタ ミン酸トランス ポーター (VGLUT) の 機能		Clinical Neuroscien ce	中外医学 社	東京	2008	1087 - 1090