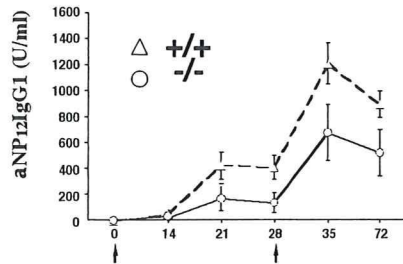
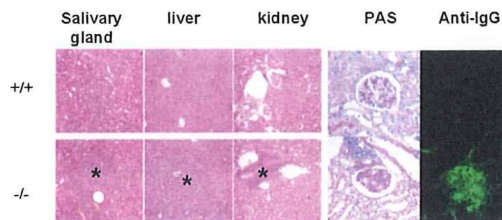


### Sema4D欠損マウスの抗体反応の低下



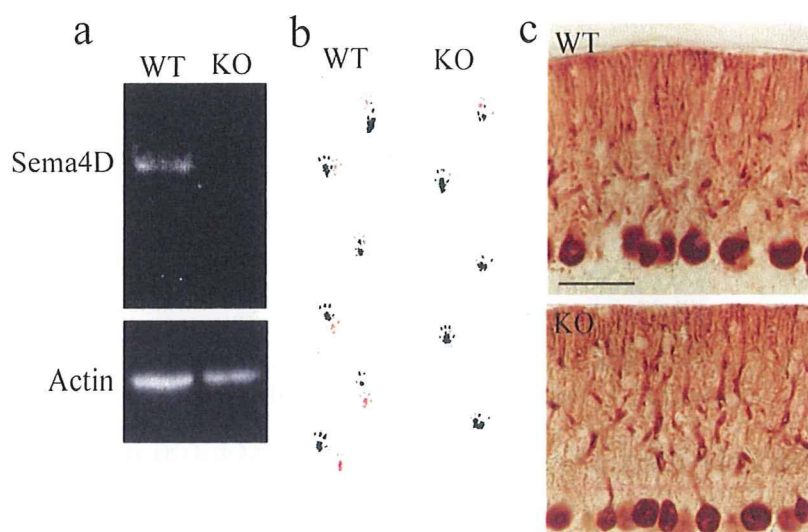
(*Immunity* 13: 633, 2000, *Immunity* 13, 621, 2000)

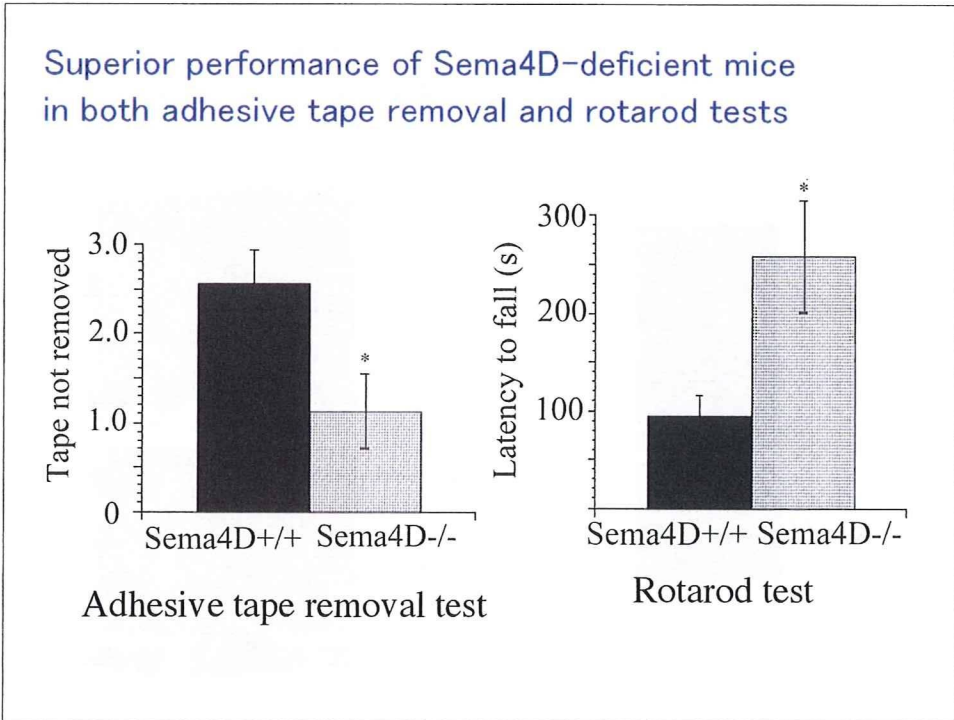
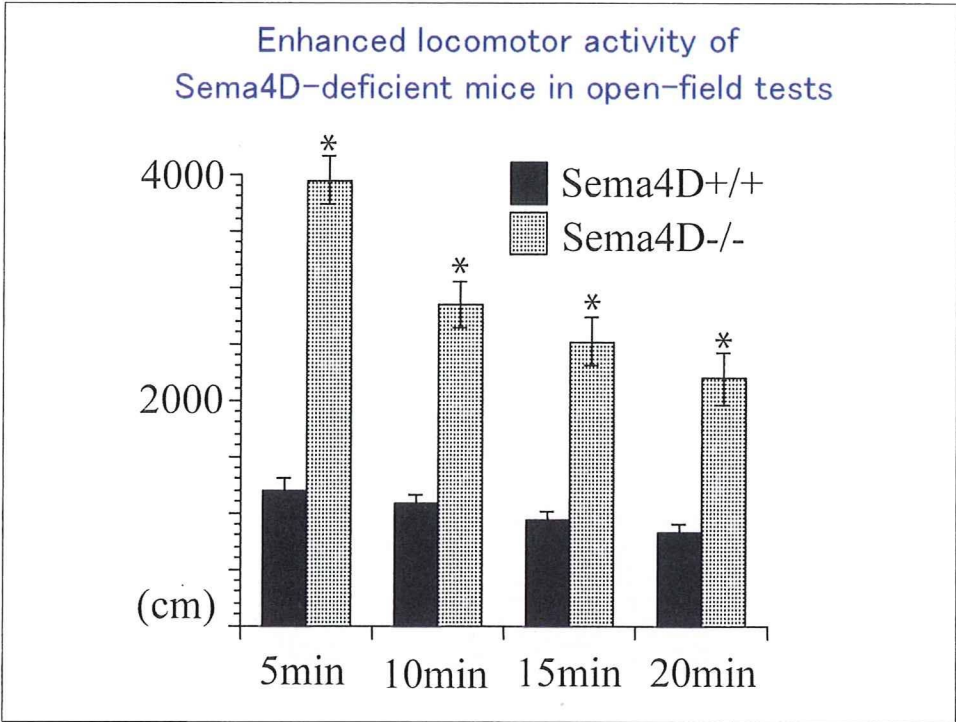
### 加齢に伴い、Sema4D欠損マウスは自己免疫を発症する



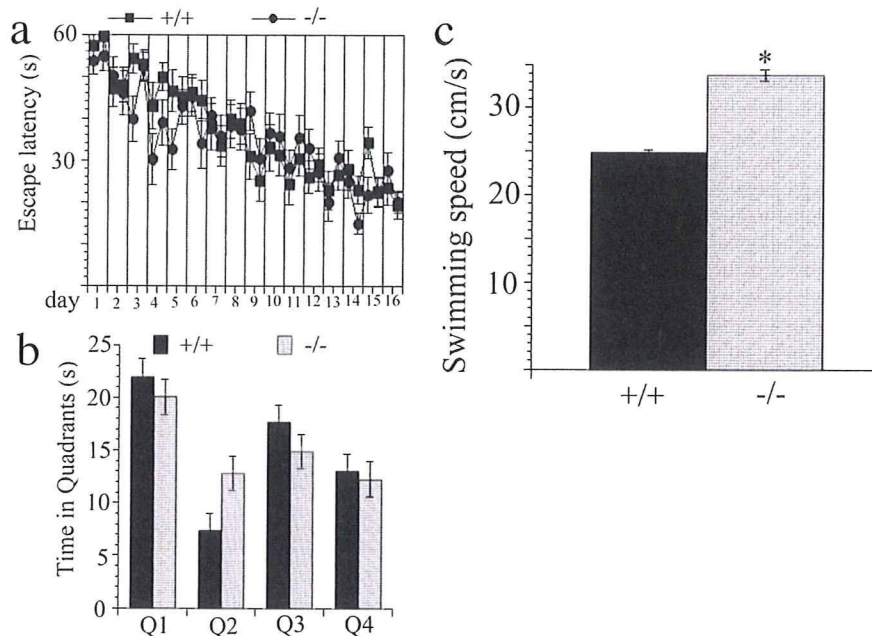
(*Int Immunol.* 17: 1277, 2005)

### Normal gait pattern and normal morphology of cerebellar Purkinje cells in Sema4D-deficient mice





### Faster swimming speed of Sema4D-deficient mice



### *Sema4D/CD100-deficient mice showed*

increased

- 1) locomotor activity in open-field tests,
- 2) superior performance in both the adhesive tape removal and rotarod tests which examine motor coordination and balance,
- 3) faster swimming speed than wild-type mice in Morris water maze,

but

normal learning and memory in the water maze task.

→suggesting the crucial involvement of Sema4D in the neurodevelopmental processes of the central structures mediating motor behavior in mice.

*Alternatively.....*

It has been reported that RNAi Knock down of Sema4D affects the formation of GABAergic, but not glutamatergic, synapses (Neuron 53:217, 2007), which may be relevant to the hyperactivity of Sema4D-deficient mice.

## 神経活動イメージングによる中枢作動性物質の神経回路毒性解析

研究分担者 富永 貴志

徳島文理大学 准教授

神経回路機能に対する化学物質の影響-特に認知機能への影響を計測する手段として膜電位感受性色素 (VSD) を用いて簡便かつ網羅的な評価を可能にする手法を開発する。本年は、記憶機能に障害を起こし得る記憶喪失性貝毒の原因物質であるドーモイ酸の海馬機能への影響の解析を主題とした。その結果、ex vivo 標本でシナプス長期増強の異常が確認できた。併せて新規顕微鏡によるランダムアクセス型の光刺激・計測による解析を始めた。

### A. 研究目的

これまで情動・認知行動試験では、実際に小児期の化学物質への暴露により、発生・発達期、成熟期において中枢性の異常、影響が認められてきている。この化学物質の中枢神経毒性の遅延性発現の定量化は喫緊の課題である。そのメカニズム解析のために記憶・学習機能の中枢である海馬、海馬-嗅内野-扁桃核の機能、およびその相互作用を定量化することは重要で、それらの中枢神経回路機能の変化を定量化する手法の確立が求められている。本研究では、膜電位感受性色素による神経活動イメージング法を導入して、神経回路活動の定量を行い、ex vivo 実験系 (スライス標本) でマウスを材料と用いた毒性試験法を確立する。これにより、中枢神経作動性物質の毒性作用の遅延性発現の定量的なメカニズム解析を行うことを目的とする。

### B. 研究方法

(1) 遺伝子改変マウスの神経回路機能評価 (MIT 利根川研究室にて)

初めにスライス標本作成手段の標準化の検討を行い、スライス標本作製手段 (角度、位置、厚みなど) を決定し、以降の実験で使用した。内側嗅内野から CA1 野へ投射する貫通線維のシナプスで細胞特異的にテタヌス毒 (TetX) を発現させた遺伝子改変マウスを用い、その貫通線維に電子刺激を加えた時の応答を光計測法により定量的に比較した。H21 は、さらにチャネルロドプシン (ChR2) による光刺激法の導入により、より選択性の高い貫通線維刺激を導入しつつある。

(2) マウスへの化学物質の単回強制投与後の神経回路機能の評価

化学物質は、400cps のメチルセルロース溶液に溶解し、決まった週令 (11-12 週令) のマウス

(C57BL/6J)に、強制単回投与で与え、あらかじめ決めた時間(2時間後から96時間後)に、断頭後、ex vivo 標本(スライス標本)を作成した。スライス標本は、標準的な手順に従って作成したが、その後、膜電位感受性色素(VSD; Di-4-ANNEPPS 0.2mM)で染色し、生理活性の回復を待って実験に供した。使用した化学物質は(i)バルプロ酸、(ii)アセフェートの2種類である。

### (3) マウスへの化学物質の腹注投与後の神経回路機能の評価

化学物質(記憶喪失性貝毒の一種、ドーモイ酸、domoic acid)を生理塩溶液に希釈し、決まった週令(11-12週令)のマウス(C57BL/6J)に腹注にて投与し、予め決めた時間(4日後、5日後)に断頭、ex vivo 標本(スライス標本)を作成した。(2)と同様に光計測に供するとともに、LTP(長期増強)誘導プロトコルによりLTPの誘導を行い、コントロールとの比較をおこなった。

### (4) ラット海馬スライス標本を用いたVSD光計測法の定量化

ラット(4週令から5週令)より、通常の手順に従って海馬スライス標本を作成し、膜電位感受性色素(VSD)で染色後、実験に供した。

### (5) 光計測に用いる新規光学系の構築

これまでに、新規の超高速共焦点光学系と、デジタルミラーデバイスを用いた多点同時光刺激装置つき光計測光学系の開発を行った。開発はほぼ当初の目標を達成して成功した。

(倫理面への配慮)

動物実験に際しては、徳島文理大学における「徳島文理大学における動物実験と動物の飼養及び保管等に関する規程」の通り、あらかじめ実験計画書を同大学実験動物委員会、倫理委員会へ提出し、承認を受けたうえで実施した。

## C. 研究結果

### (1) 遺伝子改変マウスの神経回路機能評価 (MIT 利根川研究室にて)

光計測により比較した結果、シナプス小胞遊離を阻害したマウスの貫通線維-CA1間のシナプス伝達が有意におさえられていることが分かった。ウイルスによるチャンネルロドプシンの発現系は有効に働き、チャンネルロドプシンとともに発現させたGFPの発現から貫通線維に特異的な発現が確認できた。問題は、チャンネルロドプシン分子は発現しているものの、光刺激はまだ成功していない。光刺激法のさらなる改良が必要である。

### (2) マウスへの化学物質の単回強制投与後の神経回路機能の評価

アセフェート(Acephate)は70 mg/Kgの投与量になる様に調整し(70 mg/mLを0.01 mL/体重(g))強制単回投与し、4日後(96時間後)にスライス標本を作成し光計測を行った。海馬神経回路の主な信号伝達経路(Mossy-CA3, Schaffer-CA1, Perforant Path-CA1)の信号経路について電気刺激に対する応答を光計測で比較した。その内、最も定性的に差が見られそうであったSchaffer-CA1の経路について、刺激応答関係を比較した。

H21はH20にラット海馬で確認できた神経興奮の定量的検定法を応用して、錐体細胞にそった神経興奮の程度を定量的に比較した。その結果、有意な差は検出されなかった。しかしながら、実験結果にはまだ検討の余地が残されているように見え、投与方法の検討を開始している。

### (3) マウスへの化学物質の腹注投与後の神経回路機能の評価

ヒトでアルツハイマー型の記憶喪失を惹起する記憶喪失性の貝毒ドーモイ酸は100 mg/Kgの投与量になるように調整し、腹腔へ注射して投与した。コントロールには同量の生食を投与した。投与4日後に、断頭して実験に供した。光計測の結果、CA1-CA3 シナプスで顕著な差がないことを見出したので、アルツハイマー型の病変として最もよく調べられているシナプスの長期増強現象について検定をおこなった。その結果、最大強度の刺激で誘導した場合、LTPの大きさはコントロールの方が、ドーモイ酸を投与した場合に比べ有意に大きいことがわかった。また、前シナプスのシナプス放出効率の指標であるPaired pulse facilitation インデックス(PPF インデックス)でも、差が見られ、ドーモイ酸投与マウスの方が大きかった。一方、個々のシナプス伝達の大きさは、光計測の結果からも示唆されたように、違いはなかった。

### (4) 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。この定量化法を(2)のアセフェートの効果の検定に用いることにより、一定の評価が可能となった。

### (5) 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。現在、そのソフトウェアを開発しながら、出力の調節などを行っている。この装置は現在、紫外光を刺激光として用いるため、ケージド化合物による刺激を行うように設計されている。これを、可視光(488nm)の光源を用いることにより、(1)で導入技術を開発しているチャンネルロドプシン分子の活性化に用いることで、より適用の範囲の広い技術に成熟させる。

## D. 考察

上記の(1)、(4)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)の結果は現状ではアセフェートによるCA3-CA1シナプスでの異常がないという結果を示している。これまでの文献上に示されているシナプス機能と認知機能の対応から考えると、アセフェートと遅発的に示されている行動異常と、今回の結果の間には乖離があり、より詳細な検討を必要としている。

(3)で示したドーモイ酸の腹注によるLTPの現象は、これまでに示されている行動異常とほぼ平行な関係にあり、ex vivo 標本の状態でドーモイ酸による遅発認知機能の異常を捉えられたということを示している。今後は、この機能異常の機構を

より詳細に調べる。これは認知機能に異常があるモデル動物としても極めて興味深いものである。さらに (5) の光学系を組み合わせるにより詳細な神経機構の解明が期待される。

#### E. 結論

本年はドーモイ酸投与マウスの認知機能異常の検出に一定の成果を得た。また、アセフェート投与による異常に関しては、ネガティブデータながら CA3-CA1 シナプスの関与があまりないとの結果を得た。さらに、新規光学系の調節はさらにすすみ、神経回路の機能検定への応用がより具体的に計画できるようになってきている。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

###### 1) 書籍

###### 2) 雑誌

Tominaga, Y., Ichikawa, M., Tominaga, T. (2009) 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* 64: 152-161.

##### 2. 学会発表

Tominaga, T. and Tominaga, Y. (2009) Simultaneous optical VSD-imaging of un-caging stimulation induced

neuronal activity with a newly developed patterned stimulation microscope 2009 Neuroscience Meeting Planner. Chicago: Society for Neuroscience, 2009. Online.

Tominaga, T. and Tominaga, Y. (2009) Specific mode of inhibitory activity enables preferential transmission of theta oscillatory activity in area CA1 of rat hippocampal slices, 36th International Congress of Physiological Sciences (IUPS2009), July 27-August 1, Kyoto, Japan

Tominaga, T. and Tominaga, Y. (2009) Modulation of feed-forward inhibition on CA1 pyramidal cells by patterned synaptic input probed with voltage-sensitive dye imaging in rat hippocampal slices. 32nd Annual Meeting of Japan Neuroscience Society, September 16-18, Nagoya, Japan

Tominaga, T. and Tominaga, Y. (2009) Layer dependent recruitment of feed-forward inhibition revealed by fast VSD-imaging in area CA1 of rat hippocampal slice preparation. Annual Meeting of Biophysical Society of Japan, October 30-November 1, Tokushima, Japan

HG 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)

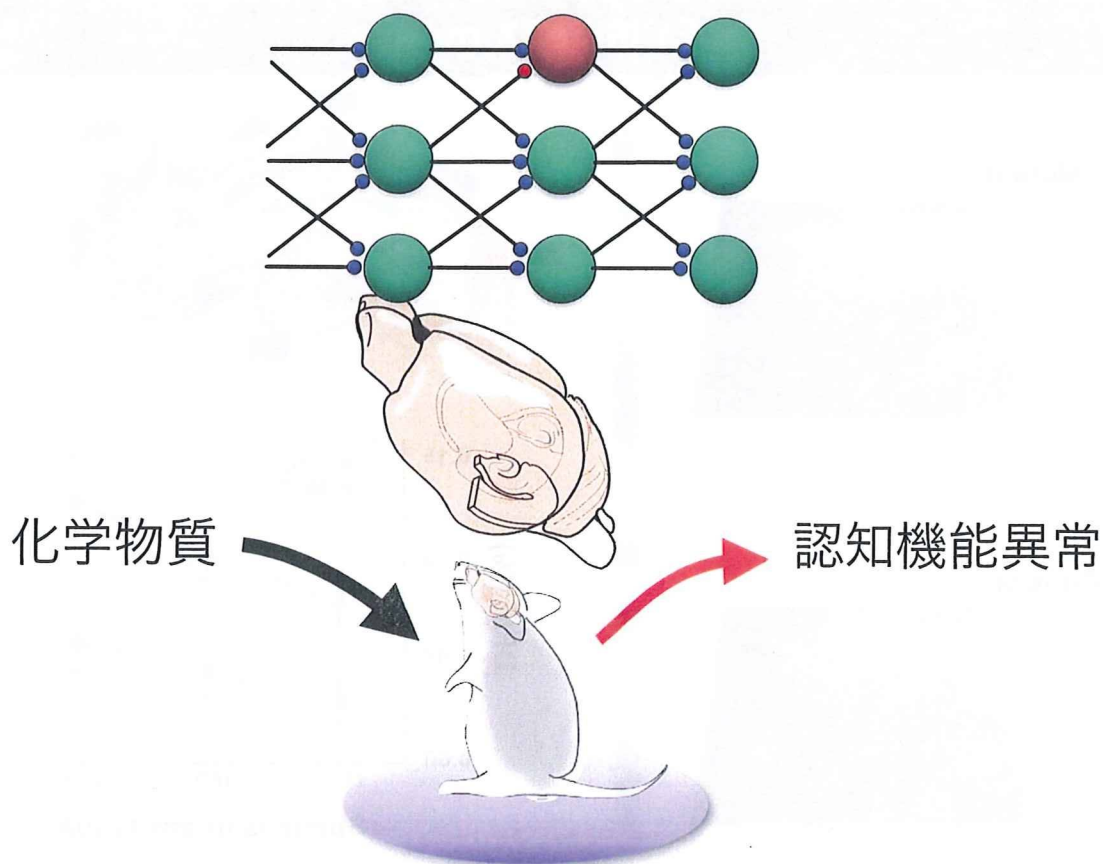


# 神経活動イメージングによる 中枢作動性物質の神経回路毒性解析

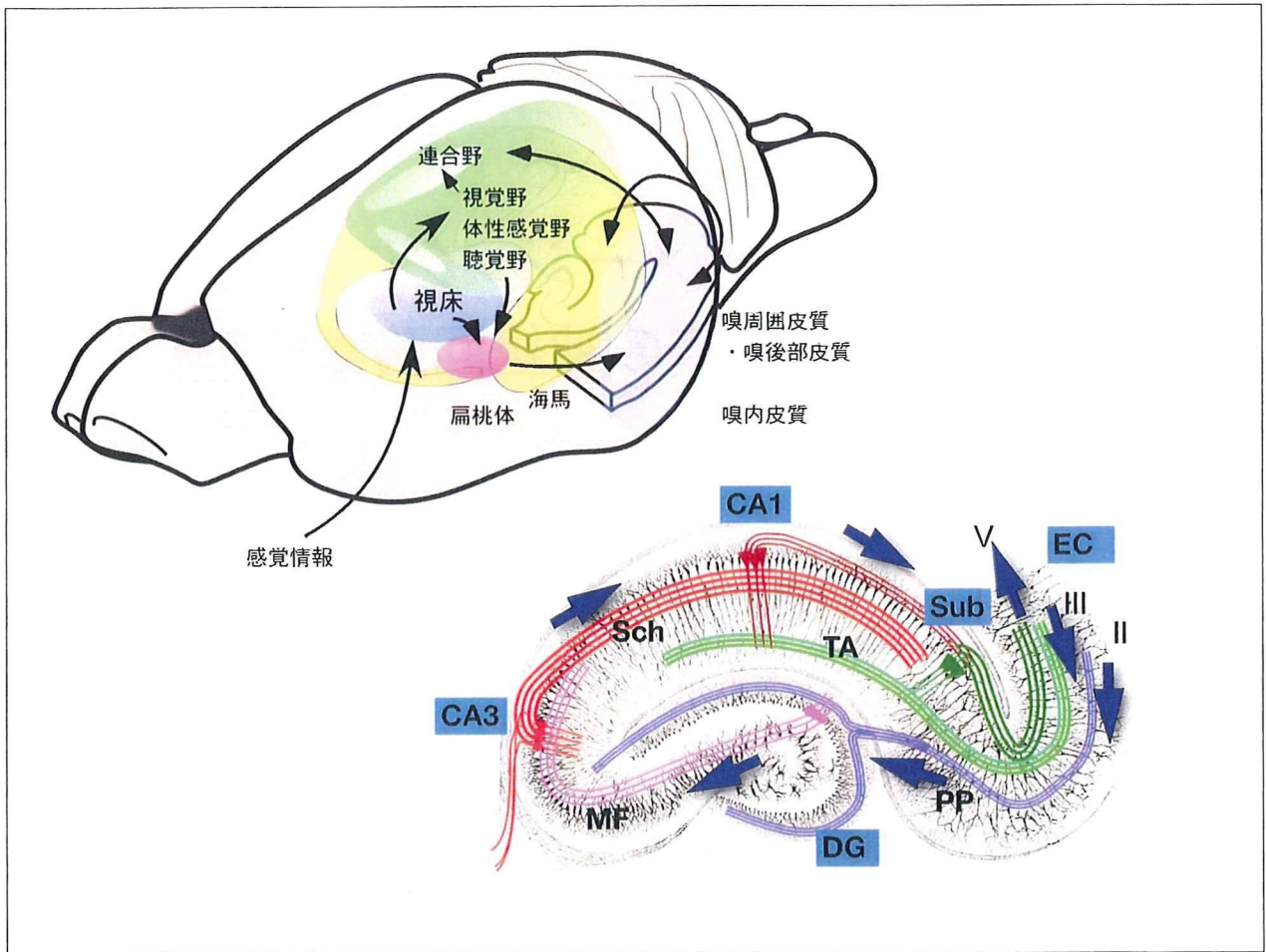
富永 貴志(徳島文理大学・香川薬学部)

化学物質の情動・認知行動に対する影響の毒性学的評価法に関する研究  
特に発達性影響の評価系のメカニズム解明による確立-(H20-化学一般-009)  
北嶋神経行動毒性班-第3回班会議 2010 2 26 東京国際フォーラム

## 神経回路異常





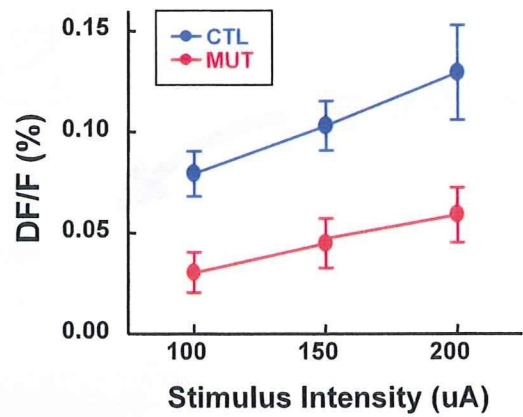
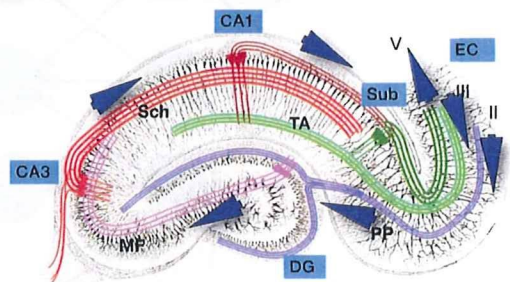


**TA neurotransmission is greatly reduced in ECIII-TeTX mouse**

Mutant



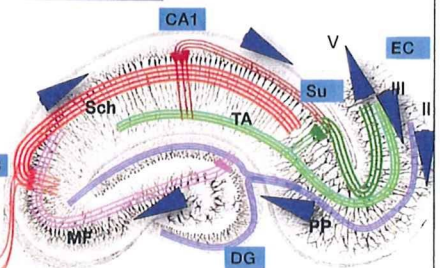
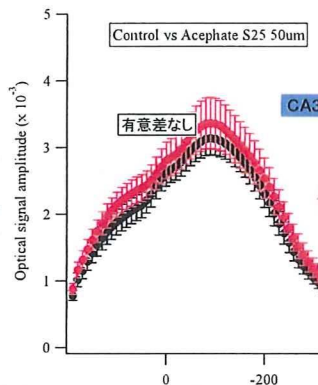
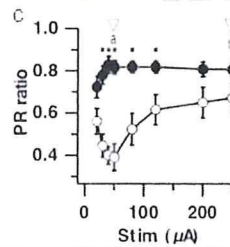
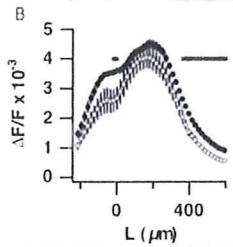
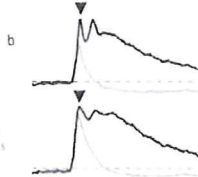
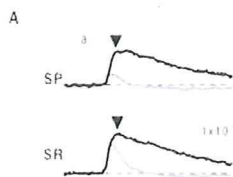
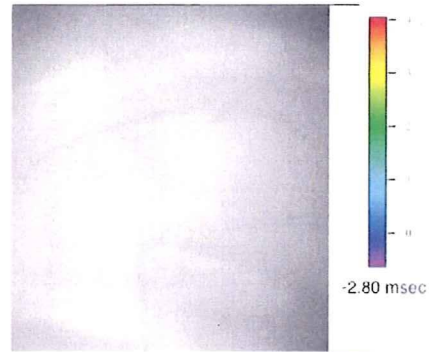
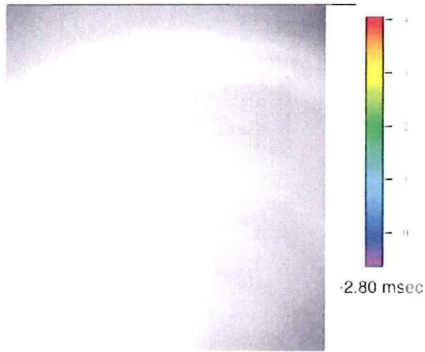
Control



# CA3-CA1 synapse

コントロール

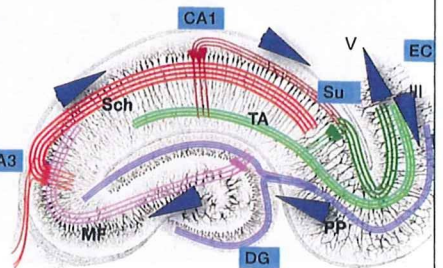
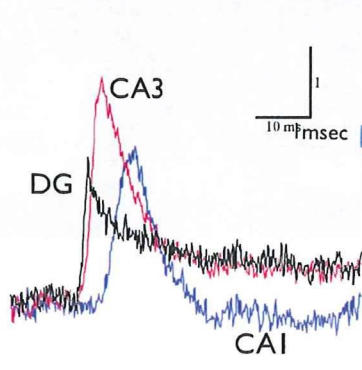
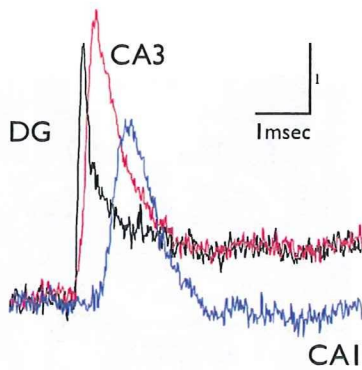
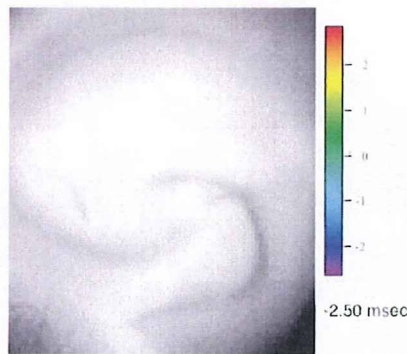
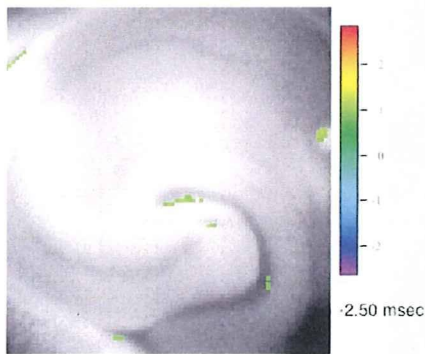
アセフェート



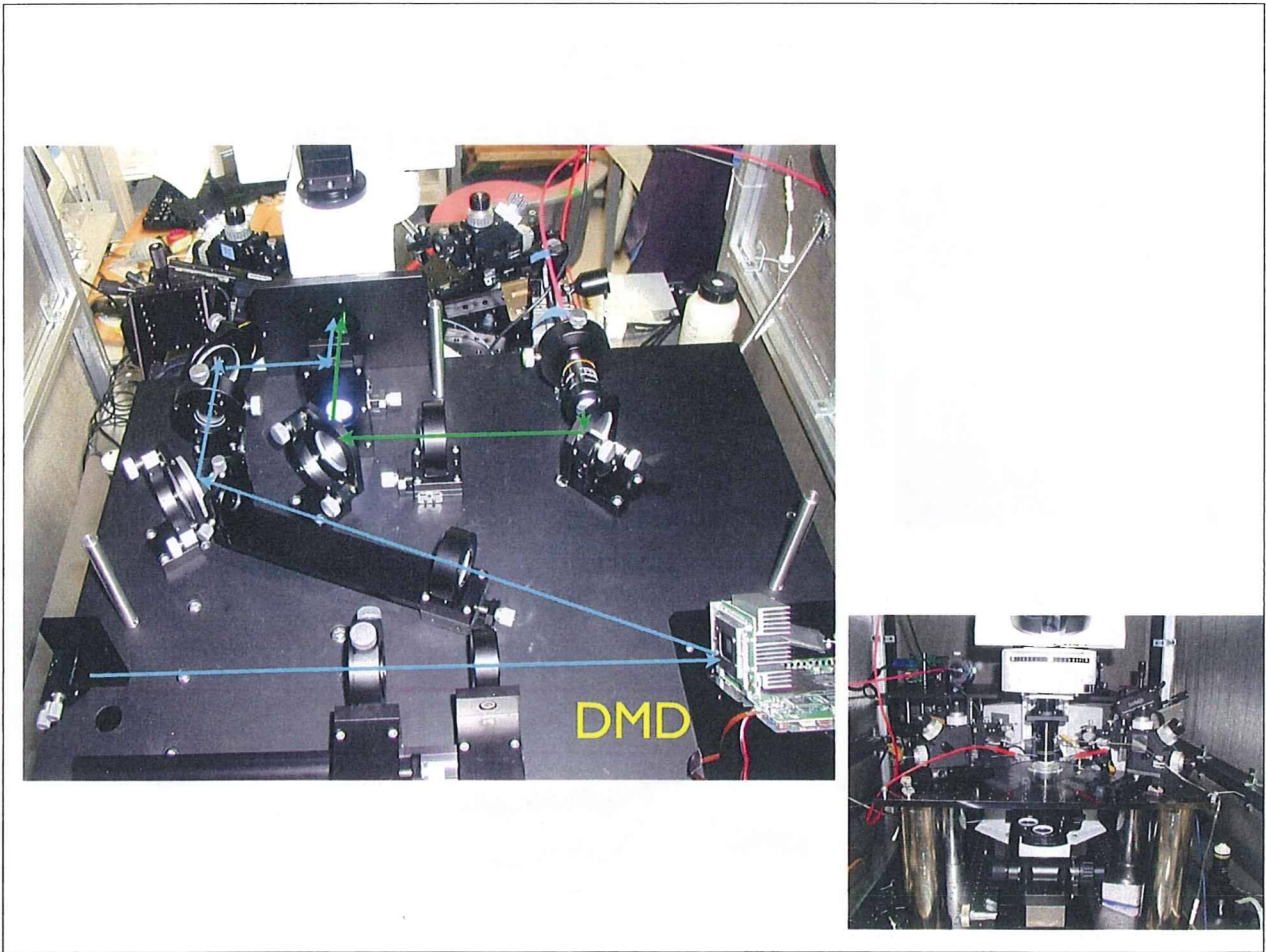
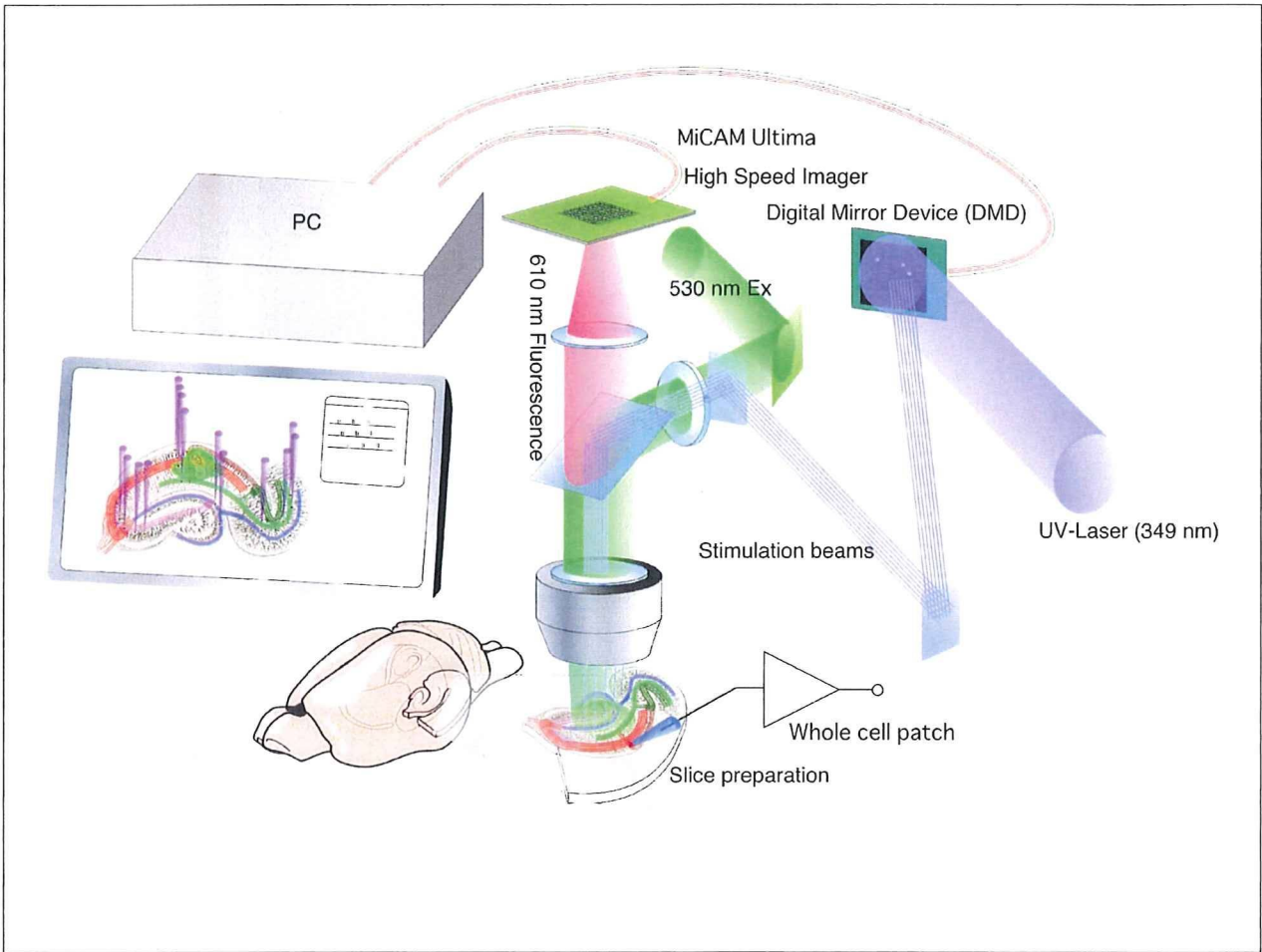
# DG-CA3-CA1

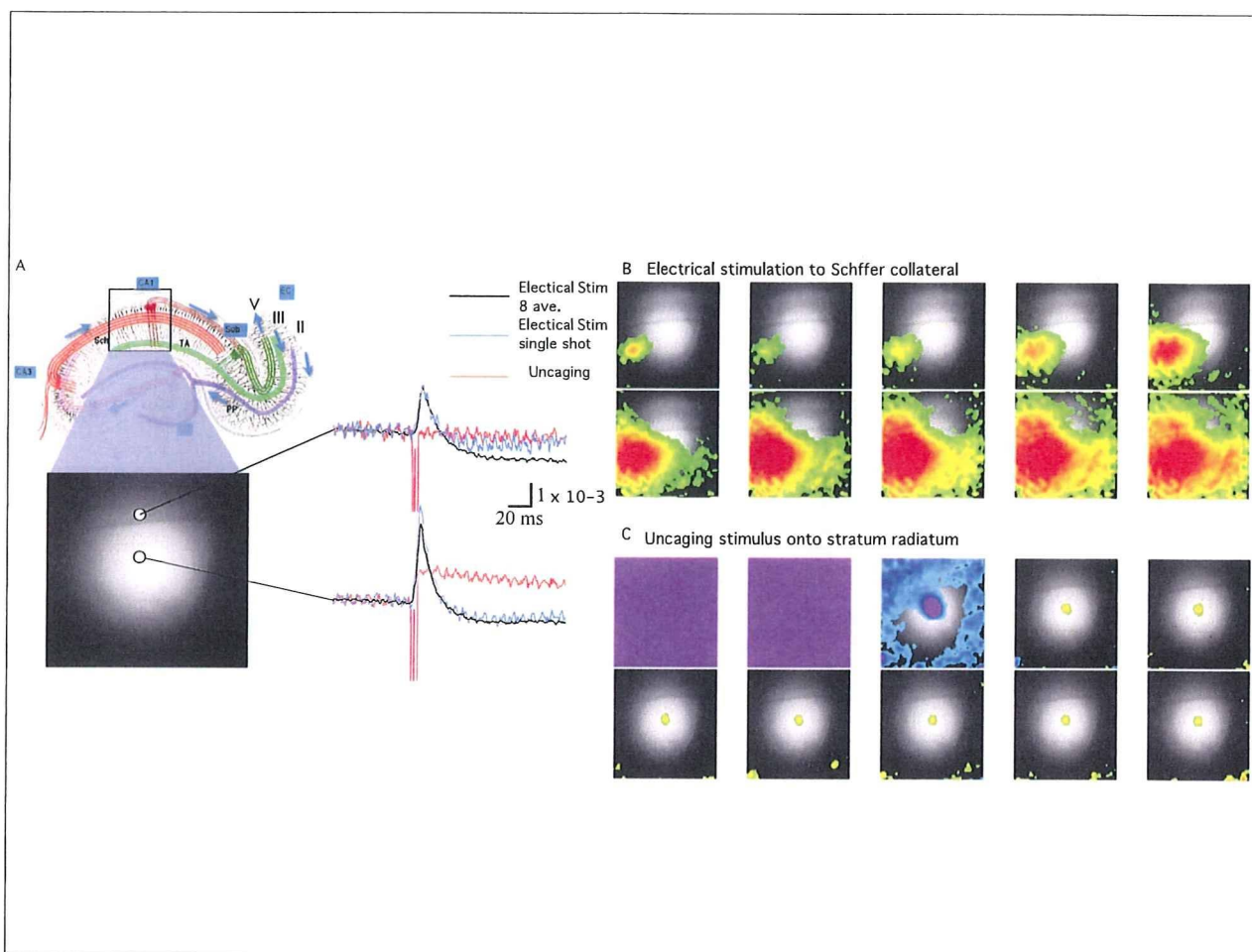
コントロール

ドーモイ酸投与後3時間

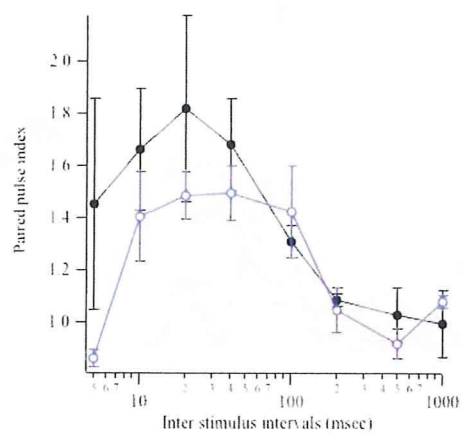
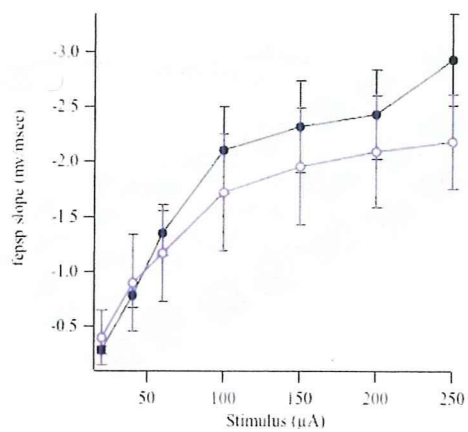




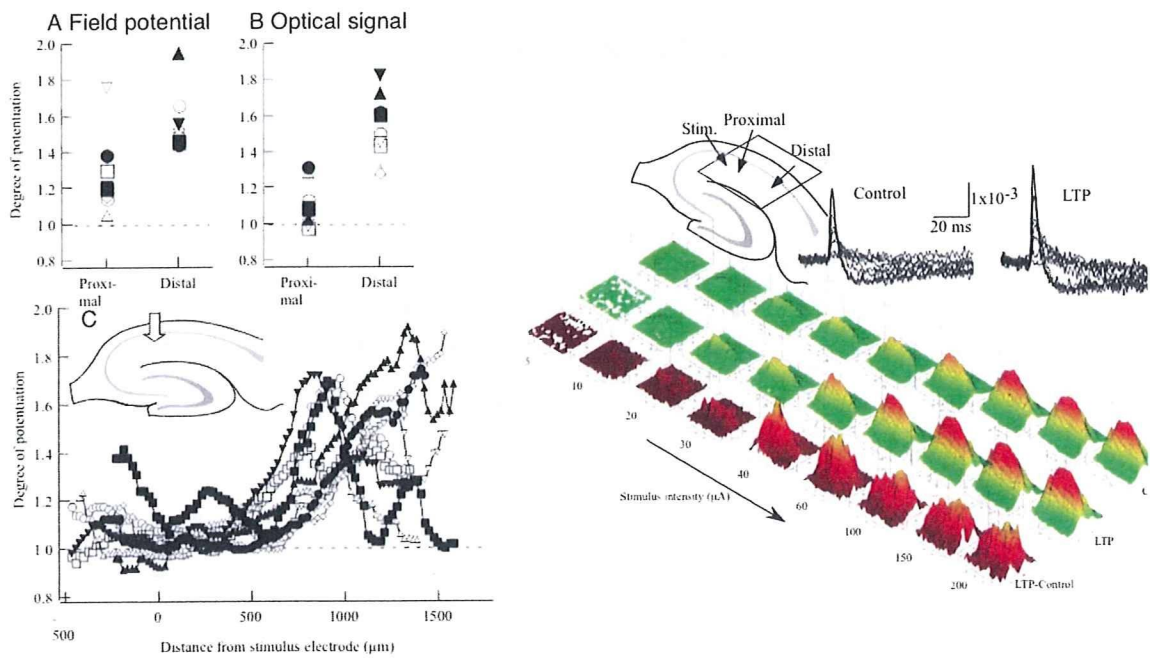
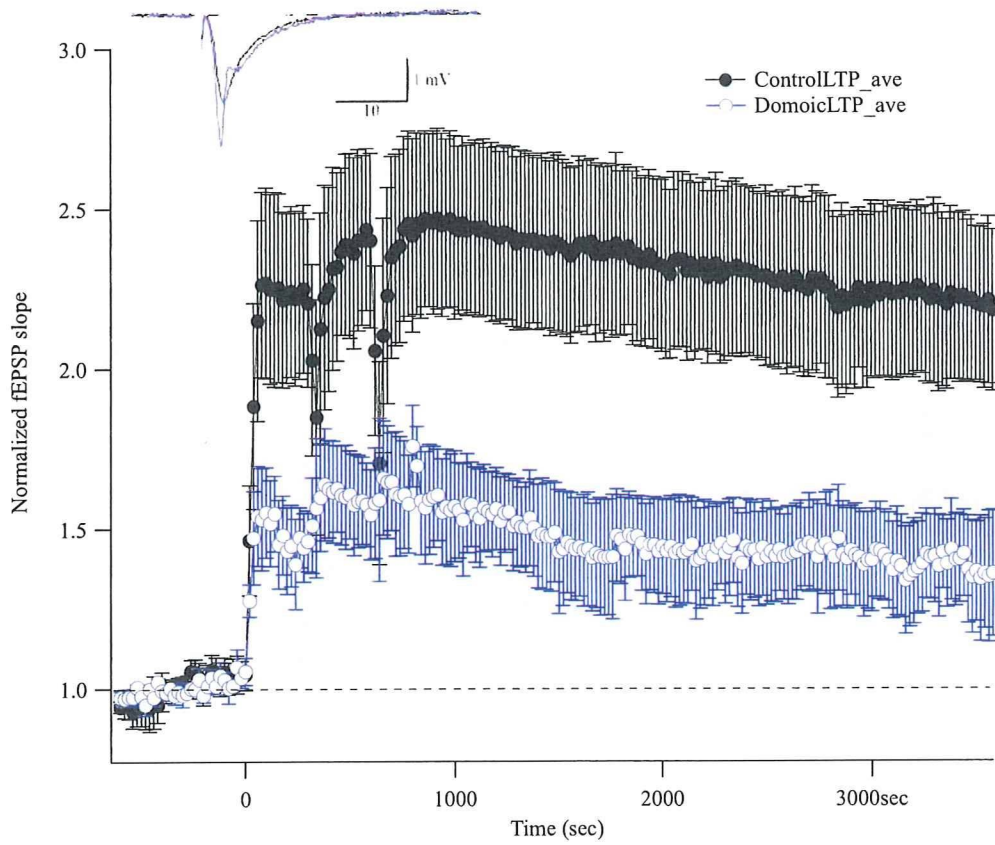




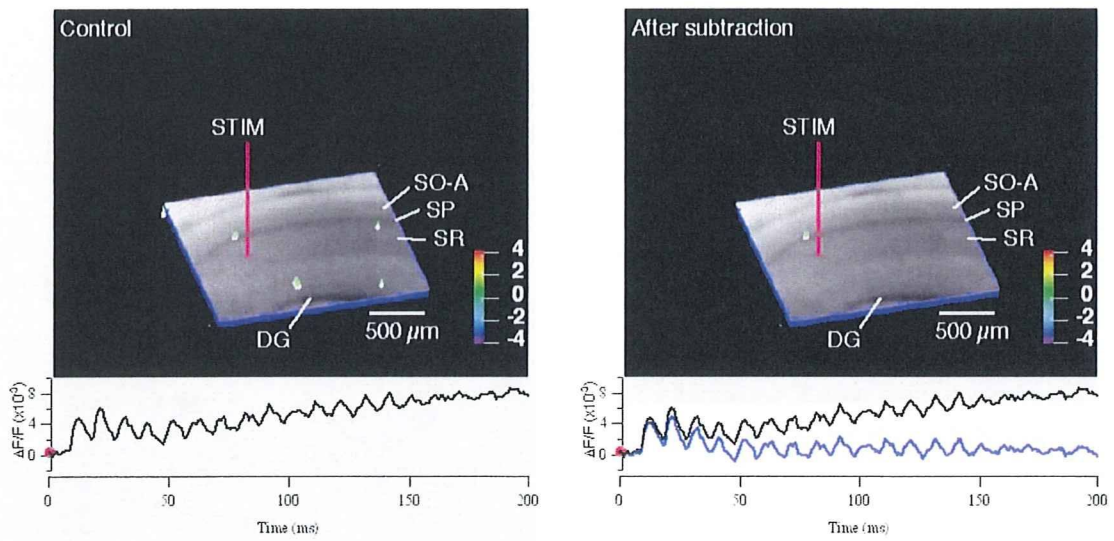
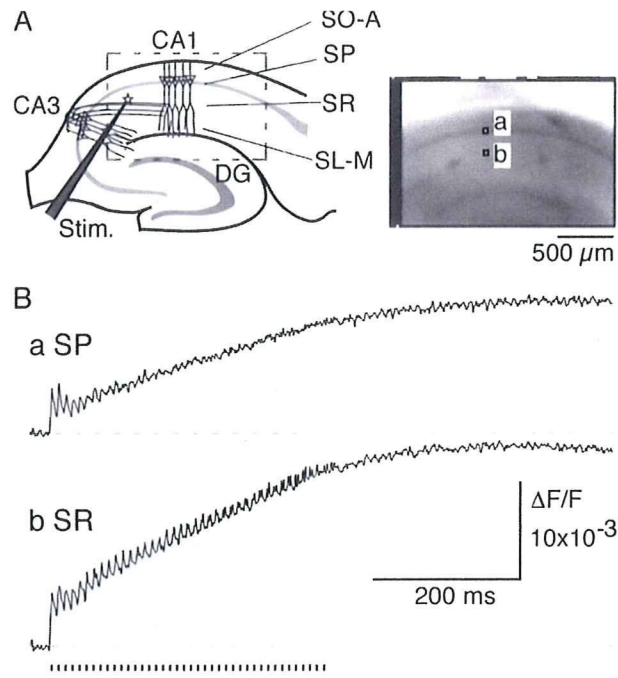
## ドーモイ酸投与後 4日

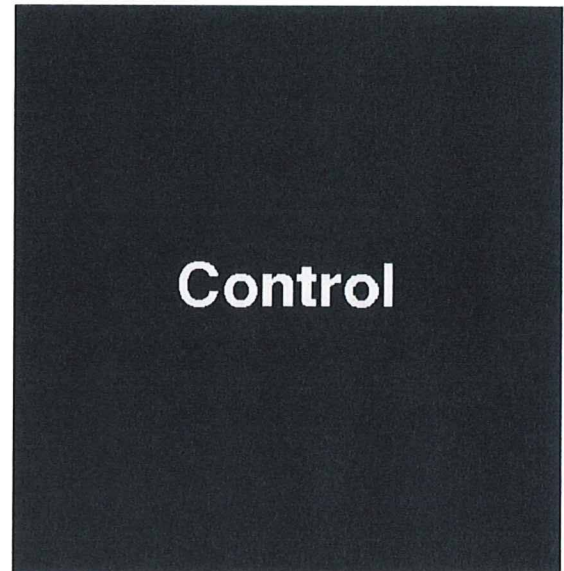
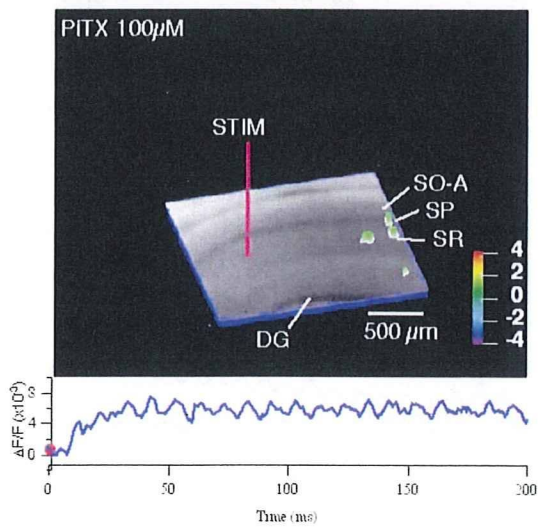
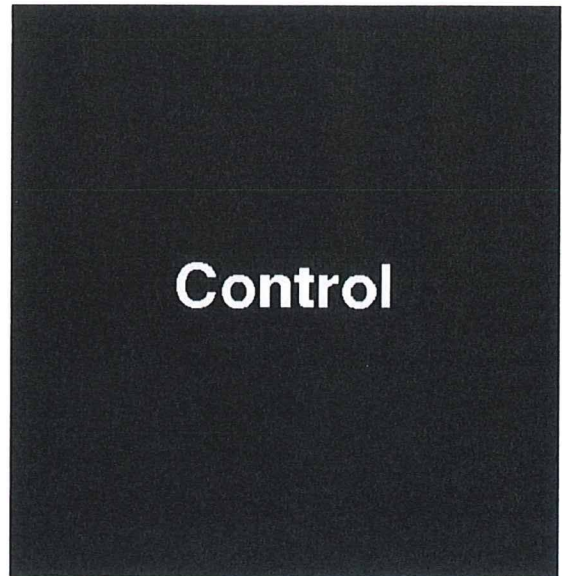
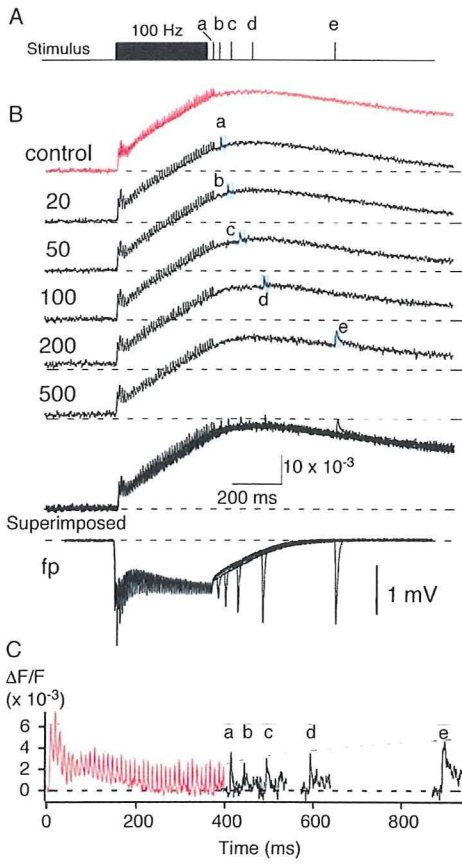


# ドーモイ酸の投与後4日でLTP誘導は阻害される

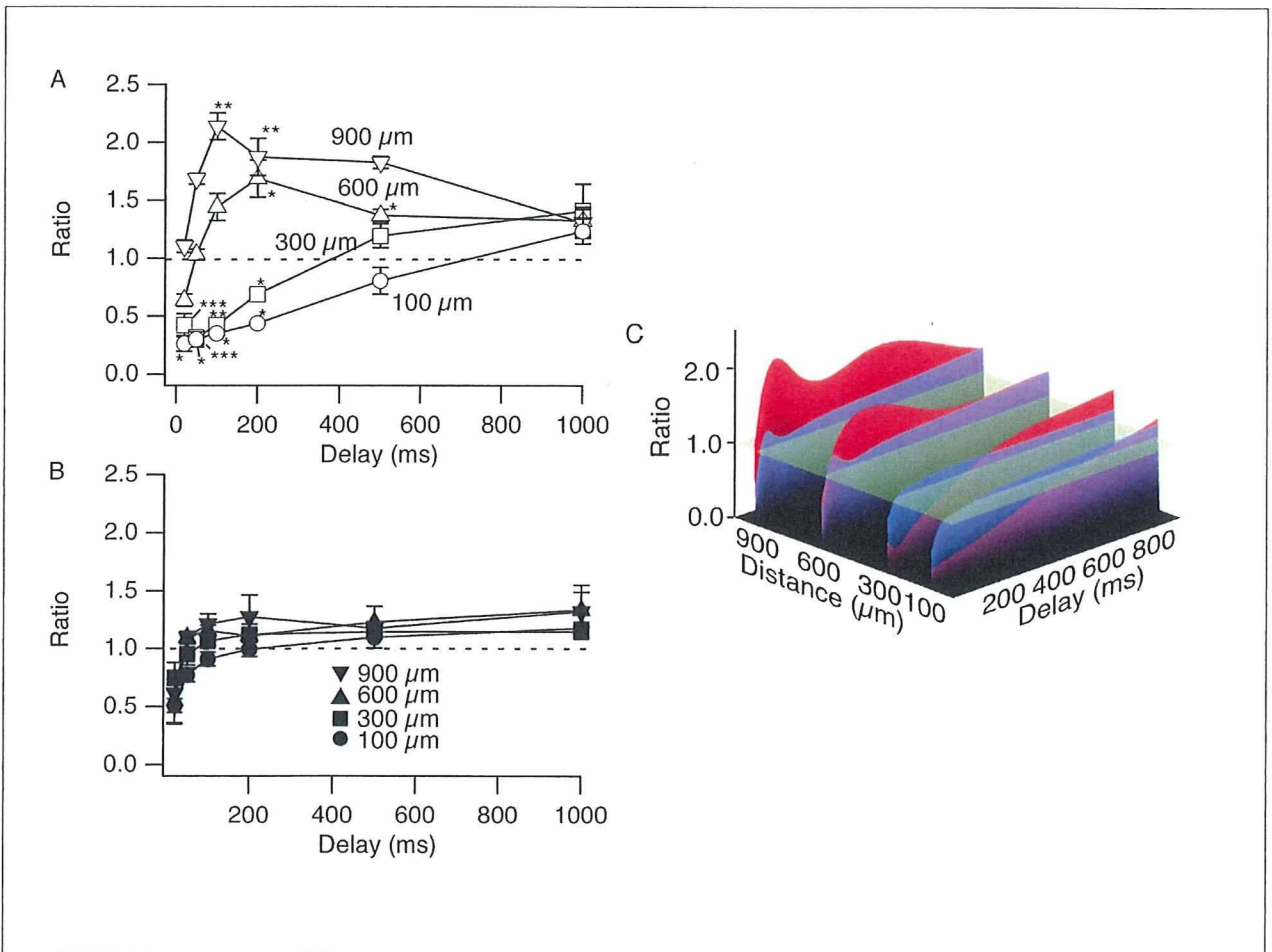
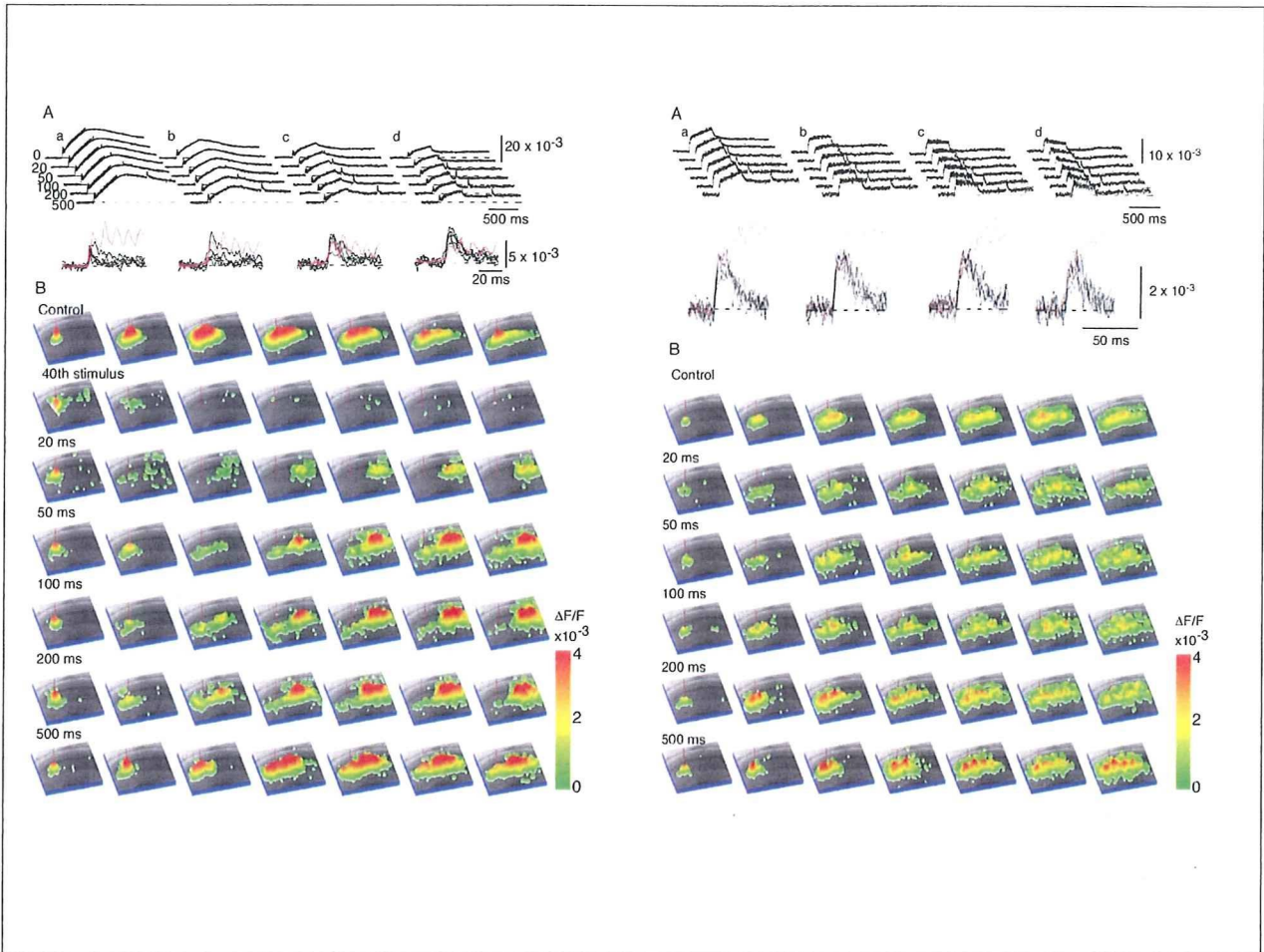












# まとめ

- 化学物質の認知機能への影響に関しては海馬とその周辺回路の活動を調べるのが大事である
- 光計測で海馬の主要な経路の伝達様式について研究することができる。
- この神経回路のプロービングのために新規顕微鏡を開発している。
- ドーモイ酸の遅発性の影響は長期増強の阻害に顕著に現れていた。
- この背後には長期増強の誘導プロセスに関連するなにかに異常があるはずであるのでそれを調べたい。



# 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

分担研究者 高森 茂雄

同志社大学 教授

バルプロ酸は、抗てんかん薬として臨床的に有用な薬として知られているが、一方で、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。また、実験動物への投与により、自閉症様の症状を呈することが知られている。本研究では、バルプロ酸暴露のシナプス形成に対する影響—特に、興奮性-抑制性バランスに与える効果を検討した結果、大脳皮質神経培養細胞において抑制性神経伝達の低下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、それらが複雑かつ秩序だったネットワークを形成し、細胞接合部であるシナプスを介してシグナルを伝達することにより、脳高次機能を発現する。神経回路網形成や局所的なシナプス活動の機能修飾が脳の機能発現に影響し、その破綻は精神疾患や神経変性疾患を惹起することが考えられるが、なかでも最近、興奮性神経伝達と抑制性神経伝達のバランスの破綻が、精神疾患の発現機序として注目を浴びている。本研究計画では、中枢神経作動薬の1つであり、抗てんかん薬として臨床的に用いられているバルプロ酸をモデル化学物質として取り上げ、興奮性—抑制性バランス(Excitatory-Inhibitory balance, EI バランス)の指標としてシナプス小胞型神経伝達物質トランスポーターをマーカータンパク質として用いることで、バルプロ酸が脳内 EI バランスの破綻に与える影響を検証する。

## B. 研究方法

生後1日目のラット大脳皮質由来の神経初代培養細胞に、DIV(days in vitro)1~4までの3日間、バルプロ酸(0.3 mM, 1.0 mM)を加えた。DIV4に培地を交換した後、DIV7とDIV14に全タンパク質を回収し、Western Blot法により、小胞型グルタミン酸トランスポーター(VGLUT1)、小胞型GABAトランスポーター(VGAT)、Synaptophysin、Synapsinの定量を行った。

(倫理面への配慮)

本研究に用いた実験動物は、同志社大学が定める「動物実験等の実施に関する規定」に従って行った。

## C. 研究結果

大脳皮質神経初代培養細胞の培養初期(DIV1~4)にバルプロ酸を添加し、DIV14にサンプリングしたものを実験に供した所、VGATの含量が対照群

に比べて有意に減少していることが分かった。この効果は、バルプロ酸濃度依存的であり、1 mM バルプロ酸添加群では、対照群の VGAT 含量に比べて 58.1±7.2%に低下した。それに対して、VGLUT1 含量は増加傾向(同条件で対照群比30%増)が、一般的なシナプスマーカーである Synaptophysin と Synapsin には変化が見られなかった。

#### D. 考察

我々の今回の実験条件では、バルプロ酸暴露により抑制性シナプス伝達強度の指標である VGAT の発現量が顕著に減少し、逆に興奮性シナプス伝達強度の指標となる VGLUT1 の発現量が増加傾向にあることが判明した。従来、バルプロ酸投与による VGAT の発現量変化の報告はなく、その作用機序が興味深い。また、本研究結果は、バルプロ酸投与による E/I バランス変化が自閉症様症状の発症メカニズムの1つである可能性を示唆している。

バルプロ酸の作用機序としては、GABA 分解酵素阻害作用やヒストンジアセチラーゼ(HDAC)阻害作用が知られている。今後は、これらに対する特異的な阻害薬の効果と比較検討することにより、バルプロ酸による E/I バランス破綻の発生メカニズムを明らかにしていくことが重要である。

#### E. 結論

抗てんかん薬として臨床現場で用いられている

バルプロ酸が、大脳皮質における E/I バランスの破綻を誘発する可能性が示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

Takamori S. Mechanism of glutamate transport into synaptic vesicles. (Keynote lecture) Kyushu Brain Days 2009. 2009.11.9, Fukuoka.

HG 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

化学物質の情動・認知行動に対する影響の毒性学的評価法に関する研究  
～特に遅発性影響の評価系のメカニズム解明による確立～ (H20-化学-一般-009)

## 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

同志社大学 生命医科学部  
分子神経生物学研究室

高森 茂雄

