研究会報告

〔 目 次 〕

1. 膜機能分子ダイナミクスの分子機構解明に向けて (代表者：老木 成稔 2007年9月6日-9月7日)	217
2. イオンチャネル・トランスポーターと心血管機能：学際的取り組みによる新戦略 (代表者：古川哲史 2007年11月13日-11月14日)	226
3. 細胞機能を制御するシグナリング機構の普遍性と特異性 (代表者：久野 みゆき 2007年10月4日-10月5日)	236
4. 細胞死研究の新たな展開と関連する素過程 (代表者：高橋 良輔 2007年8月15日-8月16日)	246
5. 視知覚研究の融合を目指して－生理，心理物理，計算論 (代表者：西田 眞也 2007年6月14日-6月15日)	256
6. シナプス可塑性の分子的基盤 (代表者：真鍋 俊也 2007年6月21日-6月22日)	263
7. 生体システム間境界領域における ATP・アデノシン情報伝達の役割 (代表者：南 雅文 2007年9月6日-9月7日)	269
8. 理論と実験の融合による神経回路機能の統合的理解 (代表者：深井朋樹 2007年11月29日-11月30日)	286
9. 脳波と脳磁図を用いたヒト脳機能の解明 (代表者：柿木 隆介 2007年6月21日)	295
10. 大脳皮質－大脳基底核連関と前頭葉機能 (代表者：宮地重弘 2008年1月17日-1月18日)	335
11. シナプスの形成と成熟の分子機構：細胞外環境と形態変化 (代表者：竹居光太郎 2007年12月6日-12月7日)	343
12. 大脳皮質機能単位の神経機構 (代表者：金子武嗣 2007年11月28日-11月29日)	348
13. 神経科学の道具としての fMRI 研究会 (代表者：本田 学 2006年11月21日-11月22日)	352
14. Motor Control 研究会 (代表者：高草木薫 2007年6月28日-6月29日)	361
15. 認知神経科学の先端 「注意と意志決定の脳内メカニズム」 (代表者：小川 正 2007年10月11日-10月12日)	404
16. シナプス伝達ダイナミクス解明の新戦略－シナプス伝達の細胞分子調節機構－ (代表者：加藤総夫 2007年11月21日-11月22日)	409
17. 中枢・末梢臓器間連携による摂食，エネルギー代謝調節 (代表者：矢田俊彦 2008年2月28日-2月29日)	417
18. グリア細胞による脳機能調節機構の解明 新しいグリア研究の手がかりを求めて (代表者：工藤 佳久 2007年4月26日-4月27日)	425

19. 上皮膜機能活性化物質と上皮膜防御の最前線 (代表者：中張隆司 2007年11月1日-11月2日)	433
20. 電子顕微鏡機能イメージング法の展開 (代表者：白田 信光 2007年12月25日-12月26日)	443
21. 筋・骨格系と内臓の痛み研究会 (代表者：水村 和枝 2007年12月6日-12月7日)	456
22. 体温調節, 温度受容研究会 (代表者：永島 計 2007年9月26日-9月27日)	471
23. TRP チャネルの機能的多様性とその統一的理解 (代表者：森泰生 2007年7月19日-7月20日)	481
24. 伴侶動物の臨床医学研究会および第38本比較臨床医学会総会 (代表者：丸尾幸嗣 2007年11月30日-12月1日)	490
25. Okazaki Symposium 2007 On Obesity & Diabetes (代表者：児島 将康 2007年4月14日-4月15日)	496
26. 位相差電子顕微鏡から見た顕微鏡染色体構造とダイナミクス (代表者：仁木 宏典 2007年7月19日)	510

1. 膜機能分子ダイナミクスの分子機構解明に向けて

2007年9月6日-9月7日

代表・世話人：老木 成稔（福井大学医学部）

所内対応者：久保 義弘（神経機能素子）

- (1) KCNE による KCNQ1 チャネル電位センサードメインの制御
中條浩一, 久保義弘（生理研・神経機能素子）
- (2) 単粒子解析法によるイオンチャネルの構造解明
小椋俊彦, 三尾和弘, 佐藤主税（産総研・脳神経情報）
- (3) 固・液界面における蛋白質-蛋白質相互作用の NMR 解析
大澤匡範, 嶋田一夫（東大・院薬系）
- (4) KcsA カリウムチャネルゲーティングの 1 分子解析
清水啓史¹, 岩本真幸¹, 今野卓¹, 二瓶亜三子³, 佐々木裕次², 老木成稔¹
(¹福井大・医, ²SPRING-8, ³セイコーインスツル)
- (5) 巨大リポソームを用いたブタ脳 Septin による脂質二重膜変形過程の直接観察
滝口金吾（名大・院理・生命理学・生体膜）
- (6) 古細菌における光利用戦略：エネルギー産生と情報変換の使い分け
須藤雄気（名大・理）
- (7) 電位依存性プロトンチャネル：プロトン透過の温度依存性
久野みゆき¹, 安藤啓之², 森畑宏一¹, 酒井啓¹, 清水啓史², 老木成稔²
(¹大阪市大・院医・分子細胞生理, ²福井大・医・分子生理)
- (8) 膜蛋白質におけるプロトン伝導
神取秀樹（名工大・院工）
- (9) CFTR チャネルゲーティングエンジンにおける“ミスファイア”メカニズム
清水宏泰, 相馬義郎, T.-C. Hwang
(大阪医科大・基盤医学 I・生理, ミズーリ大学・John M. Dalton 心臓血管研)
- (10) 性ホルモン非ゲノム経路を介した NO 産生による心筋カリウムチャネル制御機構
黒川洵子, 浅田健, 中村浩章, 古川哲史（東医歯大・難研・生体情報薬理）
- (11) 心筋ミトコンドリア Na⁺/Ca²⁺交換 (mNCX) の機能
金 鳳柱, 松岡達（京大・院医・細胞機能制御）
- (12) HCN チャネルの S1 領域の構造と機能の関係
石井孝広, 中島則行, 大森治紀（京大・院医・神経生物）
- (13) イオンチャネルの機能環境を探るための探査針を試験管内分子進化で作る試み
久保泰（産総研・脳神経情報・脳機能調節因子）
- (14) 分子動力学シミュレーションを用いた大腸菌機械受容チャネル MscL の開口過程の解析
澤田康之¹, 村瀬雅樹², 曾我部正博^{1,2,3}
(¹名大・院医・細胞生物物理, ²JST・ICORP/SORST・細胞力覚, ³生理研・細胞内代謝)
- (15) 機械受容チャネル MscS の活性化・不活性化の分子メカニズム
野村健¹, 吉村建二郎^{1,2}, 曾我部正博^{1,3,4}
(¹JST・ICORP/SORST・細胞力覚, ²筑波大・生命環境科学・構造生物,
³名大・院医・細胞生物物理, ⁴生理研・細胞内代謝)

(16) クラミドモナスの機械受容チャネルの奇妙な振る舞い

吉村建二郎 (筑波大・院生命環境科学・構造生物学)

【参加者名】

滝口 金吾 (名古屋大・大学院), 須藤 雄気 (名古屋大・大学院), 久野 みゆき (大阪市立・大学院), 黒川 洵子 (東京医科歯科大), 皿井 伸明 (京都大・大学院), 金 鳳柱 (京都大・大学院), 岡 千晶 (京都大・大学院), 車 采映 (京都大・大学院), 王 建武 (京都大・大学院), 佐藤 主税 (産業総合研究所), 三尾 和弘 (産業総合研究所), 相馬 義郎 (大阪医科大・基礎医学 I), 曾我部 正博 (名古屋大・大学院), 澤田 康之 (名古屋大・大学院), 野村 健 (名古屋大・大学院), 吉村 健二郎 (筑波大・大学院), 久保 泰 (産業総合研究所), 神取 秀樹 (名古屋工業大・大学院), 石井 孝広 (京都大・大学院), 中島 則行 (京都大・大学院), 大澤 匡範 (東京大・大学院), 老木 成稔 (福井大・医学部), 清水 啓史 (福

井大・医学部), 岩本 真幸 (福井大・医学部), 辰巳 仁史 (名古屋大・医), 森 貴治 (名古屋大学・理), 柴田 幹大 (名古屋工業大・大学院), 吉次 麻衣子 (名古屋工業大・大学院), 川鍋 陽 (名古屋工業大・大学院), 伊藤 元博 (名古屋工業大・大学院), 古谷 祐詞 (名古屋工業大・大学院), 高橋 賢 (名古屋大・医), 小林 千草 (分子研), 久木田 文夫 (統合バイオ), 黒川 竜紀 (統合バイオ), 大河内 善史 (統合バイオ), 佐々木 真理 (統合バイオ), 沼田 朋大 (生理研), 久保 義弘 (生理研), 立山 充博 (生理研), 中條 浩一 (生理研), 伊藤 政之 (生理研), 長友 克広 (生理研), 松下 真一 (生理研), 石井 裕 (生理研)

【概要】

チャネル・トランスポータ・ポンプなど膜機能分子の構造・機能に関する情報が近年急速に蓄積し, 分子機構についての理解が深まっている。分子が働く有様をダイナミックに捉えることこそ生理学の目指すところであるが, その目的を達成するための大きな前進が行われてきた。このような進歩の裏には基本的な手法の絶え間ない技術革新が基礎にある。そのような研究の初期に芽生えたアイデアや地道な実験の工夫などをじっくりと議論できるための場を作るべく本研究会を開催した。昨年に引き続き, 膜機能蛋白質のダイナミクスに関する優れた研究成果に接することが出来た。トピックスは膜蛋白の局所構造, 全体像, ダイナミック像から, イオン輸送, ゲーティングなどの詳細な機能までをカバーし, 手法も電気生理学はいうにおよばず, 分光学的方法から計算機科

学の方法まで多岐にわたった。特に発表メンバーが少し変わり, 本研究領域の新しい側面を展開することができた。中でも分光学的手法や遺伝子工学などの領域は急速な進展をしめし, さらなる発展を期待できる。本研究領域の研究者は日本ではいくつかの学会に分散しているため, 一堂に会する機会が少ない。発表時間と討論の時間を十分とることにより, 踏ん込んだ議論の場とすることができた。それぞれの研究領域のエキスパートが技術の粋を追求していることが研究者に刺激を与える。実際, いくつかの発表は世界的にもトップレベルの成果をだしていることがわかる。原子レベルの構造から一分子の機能・ダイナミクスまで, 実験的・理論的解析が急速に展開している現状を把握でき, 若い研究者が積極的に参加できる研究会に発展させたい。

(1) KCNE による KCNQ1チャネル電位センサードメインの制御

中條 浩一, 久保 義弘 (生理学研究所 神経機能素子研究部門)

電位依存性 K^+ チャネルの KCNQ1 は, 発現する β サブユニット KCNE の種類によって電流の性質が著しく変化する。KCNE による修飾のメカニズムを知る目的で, シ

ステイン点変異を S4 セグメントの細胞外側に存在する Ala226 に導入し, KCNQ1 の電位センサーの動きが KCNE 存在下でどのように変わるかを SCAM (substituted

cysteine accessibility method) によって評価した。KCNE1 存在下, 非存在下ともに MTSES の A226C への修飾は脱分極時すなわち電位センサーが up state にあるときに起こり, その修飾スピードは KCNE1 存在下では非存在下に比べて約 13 倍遅かった。一方 KCNE3 存在下では MTSES の修飾スピードは膜電位に依存せず, 電位センサーが常に up state にあると考えられた (Nakajo and Kubo,

2007)。以上の結果は, KCNE1 が KCNQ1 の電位センサーを down state に, KCNE3 が up state にそれぞれ安定化させていることを示唆する。

Nakajo K & Kubo Y (2007) KCNE1 and KCNE3 Stabilize and/or Slow Voltage Sensing S4 Segment of KCNQ1 Channel J Gen Physiol 130 : 269-281.

(2) 単粒子解析法によるイオンチャネルの構造解明

小椋俊彦, 三尾和弘, 佐藤主税 (産業技術総合研究所 脳神経情報研究部門)

TRP チャネルは様々な刺激を感受する multi-sensor である。TRPC3 はこのファミリーの中でも生理学的な研究の蓄積が多く, Diacylglycerol またはホスホリパーゼ C γ との直接的結合により活性化する。さらには細胞内小胞体膜の IP3 受容体とも結合し, その活性を調節する。この TRPC3 の構造解析を, 京大藤吉・森等との協力のもとクライオ電子顕微鏡像を用いて行い, 高さ 240 Å 幅 200 Å の隙間だらけの膨れあがった構造を持つことが分かった¹⁾。外側はワイヤー状の構造で中心はイオンが入り込むと思われる小部屋状になっていた。この構造は多くの分子との結合を可能にすると思われる, マルチセンサーといわれる TRP チャネルとして極めて理にかなっている。

P2X₂ は痛みの伝達などに特化したチャネルである。生理研久保等と共同して行っている構造解析によって, そ

の構造は細胞外部分が広がった 3 角錐様であることが判ってきた²⁾。

TRIC は, 細胞内の小胞体膜上に存在する K チャネルである。神経・筋肉などの興奮性細胞の小胞体は, その膜上のチャネルを通じて細胞質に Ca²⁺ を放出することで, 様々な生理現象を起こす。しかしこの際, Ca イオン放出による小胞体膜の膜電位の劇的な変動はない。これは Ca²⁺ 放出とは逆向きに, TRIC チャネルが K イオンを流入させるためであることが最近明らかになった³⁾。この TRIC チャネルの構造は京大竹島等と共同で解析され, 三角形に側面が角張った砲弾型であることが判明した。

1) J. Mol. Biol. 367(2), 373-383, 2007.

2) Biochem. Biophys. Res. Comm. 337(3), 998-1005, 2005.

3) Nature 448, 78-82, 2007.

(3) 固・液界面における蛋白質-蛋白質相互作用の NMR 解析

大澤匡範, 嶋田一夫 (東京大学・大学院薬学系研究科)

膜蛋白質複合体における分子認識機構を解明するためには, 複合体形成の場となっている脂質二重膜を含んだ系で解析する必要がある。これまでに我々は, 膜タンパク質をアフィニティビーズに固定化した状態で脂質二重膜中に再構成する “bead-linked proteoliposome (BPL)” を開発し, 実際にカリウムチャネル KcsA を再構成した BPL とチャネルブロッカーである Agitoxin 2 の相互作用の転移交差飽和 (TCS) 法による解析に成功した。しかし, ビーズなどの不溶性成分が試料に共存することで, NMR

スペクトルが大きく広幅化し解析が困難になることが問題となっていた。そこで本研究では, 試料のマジック角高速回転 (MAS) によりスペクトルの高感度化・高分解能化を図り, TCS 法にて固・液界面における分子認識機構を解明する NMR 測定法の開発を目的とした。

相互作用系として, ユビキチン(Ub)とユビキチン加水分解酵素 (YUH) (K_d=19 μ M) を選択した。YUH をビーズに固定化することによって, 固・液界面の相互作用系とした。YUH 固定化ビーズ共存下での 2H,15N-Ub の MAS

条件下での NMR スペクトルは、静止状態に比べ、分解能が劇的に改善された。TCS 法の測定を行ったところ、Ub 上の YUH 結合界面選択的に交差飽和が観測され、本

手法が固・液界面の相互作用系の解析に有用であることが示された。

(4) KcsA カリウムチャンネルゲーティングの1分子解析

清水啓史¹, 岩本真幸¹, 今野卓¹, 二瓶亜三子³, 佐々木裕次², 老木成稔¹
(¹ 福井大・医, ²SPring-8, ³セイコーインスツル)

チャンネルゲーティングにおける構造変化をリアルタイムで捉えるために 1 分子 X 線解析法を適用した。KcsA カリウムチャンネルの細胞外ループに変異を導入し (52K), チャンネル分子を基板へ倒立固定した。金結晶を細胞質ドメイン末端 (161C) に結合し、これに高輝度放射光 (SPring-8) を当て、発生する回折点の動きをビデオレートで観察した。KcsA チャンネルが pH 依存性であることを利用し、中性 pH で閉状態、酸性 pH でゲート開閉の動態を捉えた。閉状態ではチャンネル分子長軸方向のわずかな曲がり運動がランダム熱運動として観察された。一方、

ゲーティング下では大きな角度範囲の長軸のまわりにねじれ運動が観察された。これは KcsA サブユニット内のゲートヘリックスがグリシンヒンジで折れ曲がり、サブユニット間での協動的な構造変化によるものと考えられる。酸性 pH 下でも開チャンネルブロッカーである tetrabutylammonium (TBA) によりねじれ運動は停止した。表面プラズモン共鳴の実験結果と合わせると、TBA 存在かでは開ロック状態にあると考えられる。ゲーティング運動を様々な角度から観察した。

(5) 巨大リポソームを用いたブタ脳 Septin による脂質二重膜変形過程の直接観察

滝口 金吾 (名古屋大学大学院理学研究科・生命理学専攻・生体膜機能)

細胞や細胞内小器官は生体膜によって外界と区切られ機能を維持している。生体膜においては脂質二重膜の直下に種々の蛋白質が集積しており、両者間の物理化学的相互作用によって膜の形態や性質が規定される。特に、自己集合性を併せ持つリン脂質親和性蛋白質や生体膜の裏打ち構造を構成する細胞骨格系蛋白質は脂質二重膜に形状変化を誘発したり、逆に安定化したりすることで、細胞運動、細胞質分裂などの重要な生命現象に必須の役割を果たしている。

本研究では、新規の生体膜形状制御蛋白質を探索すると共に、それらによる膜の変形過程を直接観察するため、暗視野顕微鏡下でブタ脳抽出液を巨大リポソームに作用させた。その結果、リポソームから多数の管状の膜突起

が形成され伸長する現象が発見された。その原因蛋白質を探索同定したところ、この変形には Septin が必須であることが判明した。Septin はインビトロで重合してフィラメントやリング状の構造を形成でき、細胞内で膜が活発に変形しているところに局在していることが知られている。今回の発見により Septin が膜の形態形成に積極的に関与している可能性が示唆された。

本研究の成果は、リポソームの変形過程を直接観察する系が新しい膜作用蛋白質の探索に有効なことを示している。またこの系の発展利用によって、他の蛋白質による膜変形の過程も観察し、その機構の理解が容易になることが期待される。

(6) 古細菌における光利用戦略：エネルギー産生と情報変換の使い分け

須藤 雄気 (名古屋大学大学院理学研究科・生命理学専攻・生体膜機能)

生物は長い進化の中で、光をエネルギー源もしくは情報源として利用する術を見出してきた。どのようなメカニズムでエネルギー変化と情報変換に機能分化しているのだろうか？ 古細菌は、エネルギー変換を司る膜蛋白質 (バクテリオロドプシン, BR) と、情報変換を司る膜蛋白質 (センサーロドプシン II, SRII) を持ち、機能分化を理解するための有用な生物である。我々は最近、BR から SRII 様光センサーへの機能転換を試み、74% (約 200 残基) のアミノ酸が異なるにも関わらず、わずか 3 つ (1%) のアミノ酸置換で機能が変換されることがわかった^(1,2)。さらに光センサー型 BR の構造・構造変化の解析

を行ったところ、3 つのアミノ酸残基の内、光励起に伴う 1 つのアミノ酸残基の変化が情報伝達を決める重要な要素であることがわかった⁽³⁾。BR においても 1 組の水素結合がエネルギー産生能を決定するという報告がなされており、蛋白質内部の非常に局所的な構造が機能を左右する「活性部位」であることが明らかになりつつある。

(1) Sudo and Spudich (2006) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **103**, 16129.

(2) Sudo et al. (2006) J. Biol. Chem. **281**, 34239.

(3) Sudo et al. (2007) J. Biol. Chem. **282**, 15550.

(7) 電位依存性プロトンチャネル：プロトン透過の温度依存性

久野みゆき¹, 安藤啓之², 森畑宏一¹, 酒井啓¹, 清水啓史², 老木成稔²

(¹大阪市立大学大学院医学研究科分子細胞生理学, ²福井大学医学部分子生理学)

膜電位依存性プロトンチャネル (H^+ channel) は、脱分極によって開口し H^+ を選択的に透過させるチャネルである。多様な細胞に発現し、特に phagocytes においては、respiratory burst の遂行に欠かせないと考えられているが、その H^+ 透過メカニズムは未だ解明されていない。 H^+ channel 活性は温度変化に応じてダイナミックに変動する。しかし、これが H^+ 透過の温度依存性を反映したものかどうかの証明はない。私達は、高密度に H^+ channel を発現するマイクログリアのホールセル H^+ 電流を記録しながら一瞬間だけ細胞を異なる温度の flow に暴露す

る温度ジャンプ法を工夫し、 H^+ 透過の温度依存性を検討した。数ミリ秒以内に種々の大きさの温度変化 (ΔT : 最大 $\pm 15^\circ C$) を与えることが可能となり、温度ジャンプ前後の H^+ 電流比 ($I_{ratio} = I_{post-jump} / I_{pre-jump}$) と ΔT より Q10 値を算出した。25 $^\circ C$ における Q10 値は 1.5 (活性化エネルギー: 36.9 kJ/mol) で、water-filled pore をもつイオンチャネルで報告されている値とほぼ一致した。また Q10 値は、4 $^\circ C$ から 49 $^\circ C$ の間で温度が高くなるほど減少した。これらの温度特性は H^+ channel の H^+ 透過機構を考える上で重要な手がかりとなることが期待できる。

(8) 膜蛋白質におけるプロトン伝導

神取秀樹 (名古屋工業大学大学院工学研究科)

疎水的な膜内でイオンを輸送するチャネルやポンプは、内部に決まった輸送経路をもつと考えられる。構造生物学の進展により、数々のイオン輸送蛋白質の立体構造が決定され、メカニズムに関する生物物理学的な議論が、原子レベルでの構造化学的基盤の上で可能になった。

しかしながら、イオン輸送は動的なものであり、静的な構造だけから機能をもたらす蛋白質のダイナミクスを議論するのは難しい。その点、光駆動性の蛋白質は高い時間分解能で機能発現のダイナミクスを追跡できるのが魅力である。

高度好塩菌のプロトンポンプであるバクテリオロドプシンは、詳細な立体構造と光による反応ステップ解析の有利さゆえ、メカニズムの理解が最も進んでいるイオン輸送蛋白質の1つである。実際に現在では、内部に結合した水分子の位置変化や水素結合変化が議論の焦点となっている。一方、最近のゲノム科学の進展により、バクテリオロドプシンの類似蛋白質として種々の光センサー

や光駆動プロトン（あるいはカチオン）チャネルが発見され、ロドプシンにおけるプロトン伝導機構に関して新たな展開が見られている。

本講演では、バクテリオロドプシンにおける研究の現状と展望をご紹介するとともに、新たに発見されたロドプシンから得られる情報について、プロトン伝導という観点から話題を提供した。

(9) CFTR チャネルゲーティングエンジンにおける“ミスファイア”メカニズム

清水宏泰, 相馬義郎, T.-C. Hwang

(大阪医科大学 基盤医学 I 講座 生理学教室, 米国ミズーリ大学 John M. Dalton 心臓血管研究所)

CFTR チャネルは、2つの Nucleotide Binding Domain (NBD) を持つ ABC トランスポータースーパーファミリーをメンバーで、NBD における ATP 分子の結合と加水分解のサイクルによって得られた機械的駆動力を利用してチャネルゲートの開閉を行っていると考えられている。

この NBD エンジンにおいては、ATP 2 分子を挟み込んだ形での NBD2 量体の形成およびその解離を繰り返しており、CFTR チャネルではこの 2 量体形成によってチャネルゲートが開から開状態に遷移し、ATP の加水分解に

伴う 2 量体の解離に伴ってゲートが閉状態に戻るという作業仮説が提唱されている。

CFTR チャネルの平均開口時間はおよそ数 100 msec であるが、確率は非常に低いが ATP の除去後も数〜数 10 秒間以上開口状態を維持し続ける現象が存在することが知られている。この現象は、NBD エンジンでの ATP 加水分解が起こらない作動不良（ミスファイア）によるものであると考えられた。このミスファイアを起こすメカニズムについての考察を行った。

(10) 性ホルモン非ゲノム経路を介した NO 産生による心筋カリウムチャネル制御機構

黒川 洵子, 浅田 健, 中村 浩章, 古川 哲史

(東京医科歯科大学・難治疾患研究所・生体情報薬理学分野)

心臓機能における男女差は古くから知られている。その一例として QT 延長症候群の不整脈リスクは女性で高いことが挙げられ、性ホルモンが作用することが指摘されている。その分子メカニズムの一つとして、我々は男性ホルモンによる性ホルモン非ゲノム経路を介した一酸化窒素 (NO) 産生を 2005 年に報告した。心筋で産生された NO はイオンチャネルを制御して活動電位を短縮し不整脈に保護的に作用すると我々は考えている。NO 産生による cGMP 依存的な L 型 Ca^{2+} 電流抑制に対し、cGMP 非依存的な遅延整流性 K^{+} 電流 (I_{Ks}) 増大のメカニズムはいまだ不明であった。そこで NO による I_{Ks} 増大

のメカニズムの解明を目指し、心室筋細胞におけるパッチクランプ実験と発現系における biotin-switch 法を用いて実験を行ったところ、 I_{Ks} チャネル α サブユニットである KCNQ1 の C 末端 Cys445 におけるニトロソ化が関与していることを示唆する結果を得た。Living cell 条件下での KCNQ1 蛋白のニトロソ化には、あるたんぱく質 X の共発現が必要であることも示しており、蛋白分子間相互作用もニトロソ化に関与していると考えられる。Cys445 におけるニトロソ化が NO による I_{Ks} チャネル機能制御の決定因子であるかどうかについては現在検討中である。

(11) 心筋ミトコンドリア $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換 (mNCX) の機能

金 鳳柱, 松岡 達 (京都大学大学院 医学研究科 細胞機能制御学)

心筋ミトコンドリア $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換 (mNCX) のミトコンドリア膜電位 ($\Delta\psi_m$) と細胞質 Na^+ 依存性を明らかにする目的で、ミトコンドリア Ca^{2+} (Ca^{2+}_m) と $\Delta\psi_m$ を測定した。細胞質 Na^+ 依存性 Ca^{2+}_m 排出 (mNCX の順交換) の初速度は脱分極状態で変化せず、 Ca^{2+}_m 排出に伴う膜電位変化も見られなかった。 Ca^{2+}_m 排出の初速度は細胞質 Na^+ の増加に伴い増加した。一方、Ruthenium Red (Ca^{2+} ユニポータ抑制剤) 存在下に、600 nM Ca^{2+} 液を灌流すると Ca^{2+}_m は誘導された脱分極によって増加した。この Ca^{2+}_m 増加は CGP-37157 (mNCX 阻害剤) により抑制

されたことから、mNCX の逆交換によると考えられた。しかし、脱分極時の Ca^{2+}_m 増加は細胞質 Na^+ を増加させるにつれて増大し、見かけ上逆の細胞質 Na^+ 依存性を示した。細胞膜 NCX モデルを基に、mNCX のコンピュータモデルを作成し解析したところ、実験条件下においては、mNCX 順交換の膜電位依存性が見られないと予測された。しかし、ミトコンドリア内 Na^+ 濃度が細胞質 Na^+ の約 50% と仮定すると、mNCX 逆交換の膜電位依存性及び見かけ上逆の Na^+ 依存性を再現する事ができた。

(12) HCN チャネルの S1 領域の構造と機能の関係

石井孝広, 中島則行, 大森治紀 (京都大学医学研究科神経生物学講座 第一生理学教室)

過分極で活性化される陽イオンチャネル (HCN チャネル) は心臓や神経細胞において、自発発火の制御など重要な役割を果たしている。HCN チャネルは構造的には電位依存性カリウムチャネルスーパーファミリーに属し、4 種類のサブタイプが存在する。サブタイプにより活性化速度や cAMP に対する感受性に違いがあり、その違いが生理学的役割の違いに寄与していると考えられている。しかし、機能と構造との関係は解明されていない部分が多い。

我々は以前に、サブタイプ間の活性化速度の違いが第一膜貫通領域 (S1) の違いに関係していることを見つけた。今回は S1 領域に点変異を導入し、変異体をアフリ

カツメガエル卵母細胞に発現させて電流を測定し解析した。S1 領域に大きな疎水性の側鎖を持つトリプトファン残基を導入し、チャネル機能を解析したところ、19 個の変異体のうち 4 個の変異体からは電流応答が消失した。その周期性から S1 はアルファヘリックスをとることが示唆された。また別の 2 つの変異体では、いくら脱分極してもチャネルが閉じず、これらの変異が電位センサーの可動部分 (S4 領域) に影響を及ぼしていることが示唆された。さらに、S1 と S4 領域の直接の相互作用を調べるため両方にシステインを導入しその電流応答を解析した。

(13) イオンチャネルの機能環境を探るための探索針を試験管内分子進化で作る試み

久保 泰 (産業技術総合研究所 脳神経情報研究部門 脳機能調節因子研究グループ)

天然の生理活性物質は、bungarotoxin, charybdotoxin, TTX などで明らかのように、イオンチャネルや膜受容体の構造と活性相関などの分子基盤研究における分子プローブとして極めて有用な情報を提供する。私たちは、イ

オンチャネルや膜受容体を標的とする神経毒ペプチドを南米産サンゴヘビから探索し、12 種類の α 型神経毒様ペプチドを同定した。それぞれの生理特性と遺伝子構造を解析する中で、これらのペプチド遺伝子が加速進化とよ

ばれる特異な分子進化をしており、これらに共通する分子骨格 (scaffold) が標的分子に対して極めて柔軟性の高いものであることが予測された。これより、 α 型神経毒ペプチドの分子骨格を保持してループ領域をランダム化したペプチドライブラリーを作製し、膜受容体のリガンド結合領域を含むタンパク質を新たな標的とするペプチ

ドの選択を行なった (指向的分子進化)。その結果、IC50 が約 100nM のペプチドが3種類単離され、そのうち2種類は膜受容体のアゴニスト、1種類はアンタゴニストとして作用することが判明した。現在、Ligand-gated ion channel についてこの技術の適用を試みている。

(14) 分子動力学シミュレーションを用いた大腸菌機械受容チャネル MscL の開口過程の解析

澤田 康之¹ 村瀬 雅樹² 曾我部 正博^{1,2,3}

(¹名古屋大学・大学院医学系研究科・細胞生物物理学分野,

²JST・ICORP/SORST・細胞力覚プロジェクト, ³生理学研究所・細胞内代謝)

大腸菌機械受容チャネル MscL は二回膜貫通ヘリックスを持つサブユニットのホモ5量体で構成されており、細胞膜の伸展で生じる膜張力を直接感受してゲーティング (開口) する膜蛋白質である。大腸菌 MscL の3D構造は、同様の構造を有する結核菌 MscL の結晶解析に基づいた信頼できるモデルが提案されている。このモデルを使って、分子動力学シミュレーションに基づいたいくつかのゲーティングモデルが提案されている。しかし、これらの先行研究では脂質膜と MscL タンパクとの間の相互作用が考慮されておらず、MscL がどの部位で膜面張力を受容し、それがどのようにゲーティングを導くかは明らかにされていない。そこで本研究では、蛋白質-脂質膜間の相互作用を考慮したモデルを作成して分子動

力学シミュレーションを行い、開口過程の詳細な解析を行った。本モデルでは、脂質二重膜に MscL を埋め込んで平衡化した後、膜面に平行な方向の圧力を下げることで張力を発生させた。その結果、2ナノ秒程度の計算で、張力による MscL 開口の初期過程をシミュレートすることができた。そのとき、脂質膜に面するアミノ酸残基のうち細胞外面の油水界面近くに位置する Phe78 のみが脂質分子と強く相互作用することが判明し、この残基が MscL の張力センサーであることが強く示唆された。本モデルを使い、開きやすい変異体 (G22N) や、開きにくい変異体 (F78N) のシミュレーションを行ったところ、実験結果と整合性のある結果が得られ、このモデルの有効性が示された。

(15) 機械受容チャネル MscS の活性化・不活性化の分子メカニズム

野村 健¹ 吉村建二郎^{1,2} 曾我部正博^{1,3,4}

(¹科学技術振興機構・ICORP/SORST・細胞力覚プロジェクト

²筑波大学・生命環境科学研究科・構造生物科学専攻

³名古屋大学・大学院医学系研究科・細胞生物物理

⁴生理学研究所・細胞内代謝)

大腸菌には MscS, MscL と呼ばれる機械受容チャネルが発現している。低張刺激に晒されて菌体が膨張すると、閾値の低い MscS から順に開口してイオンを放出することで細胞の破裂死を防いでいる。MscS は膜3回貫通構造を有するサブユニットのホモ7量体で構成されている。

MscS は細胞膜の伸展で生じる張力で活性化され、膜電位 (脱分極) 依存的に不活性化される。しかしこれらを統一的に説明できる分子モデルは提案されていない。本研究では、まず活性化機構を調べる目的で膜張力感知部位の同定を試みた。その結果、細胞内外面の油水界面に近い

場所に位置するアミノ酸が脂質と強く相互作用してポアの開口を導く膜張力センサーであることが示唆された。一方、細胞内界面に位置する膜貫通領域連結ループの負電荷アミノ酸 (D62) と、これに接する細胞質領域の正電荷アミノ酸 (R128, R131) は強い静電相互作用で結びついていると考えられており、ポアの開口による D62 の膜面方向への放射状の拡大移動に伴って R128, R131 も移

動し、細胞質領域が拡大されチャネルが開口することが示唆されている。そこでこれらのアミノ酸を置換して静電相互作用を阻害すると、チャネルの開口は抑制された。また脱分極時には、細胞内界面への正電荷の蓄積が D62 を電氣的に中和して、R128, R131 との相互作用を阻害することで電位依存的不活性化を導くものと想像される。

(16) クラミドモナスの機械受容チャネルの奇妙な振る舞い

吉村 建二郎 (筑波大学・生命環境科学研究科・構造生物学専攻)

従来、機械受容として細胞が外界からの機械刺激を受容する機構のみが知られていたが、最近、TRP チャネルが酵母の細胞内で機械受容を行っていること (Zhou et al, 2003) や、原核生物型機械受容チャネル MscS のホモログ MSC1 がクラミドモナスの細胞内に発現していること (Nakayama et al, 2007) が明らかになっている。これらの機械受容チャネルは外界の浸透圧変化に間接的に応答するという可能性と、細胞内膜系の組織化に必要であるという可能性が示唆されている。本発表では、MSC1 を大腸菌に発現させてパッチクランプにより電気生理学的性

質を調べた結果について、すでに結晶構造が明らかになっている MscS と対比させながら報告する。MscS は Cl^- の透過性は K^+ の透過性より 1.4 倍大きいだけであるが、MSC1 は 7 倍も大きかった。チャネルのコンダクタンスは MscS が 1 nS であるのに対して、MSC1 は 0.4 nS しかなかった。MSC1 が開く閾値は MscS の約 1.6 倍大きかった。興味深いことに、MSC1 はチャネルが開くときの閾値は、閉じるときの閾値の約 3 倍も大きかった。このような顕著なヒステリシスは、MscS をはじめとする他の機械受容チャネルで見られない新奇な性質である。

2. イオンチャネル・トランスポーターと心血管機能：学際的取り組みによる新戦略

2007年11月13日-11月14日

代表・世話人：古川哲史（東京医科歯科大学難治疾患研究所生体情報薬理分野）

所内対応者：久保義弘（自然科学研究機構生理学研究所神経機能素子研究部門）

- (1) 虚血-再灌流による心筋機能障害： $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構阻害薬を用いた解析
行方衣由紀，高原 章，田中 光（東邦大学薬学部薬物学）
- (2) ラット動脈管におけるT型カルシウムチャネルの役割の検討
赤池 徹¹，横山 詩子¹，全 紅¹，石川 義弘¹，南沢 享²
（横浜市立大学大学院医学研究科循環制御医学¹ 早稲田大学先進理工学部生命医科学科²）
- (3) Cav1.2チャネルのカルモジュリンおよび Ca^{2+} 依存性調節
亀山正樹，韓冬雲，蓑部悦子，王午陽，はお麗英
（鹿児島大学大学院医歯学総合研究科神経筋情報生理学，中国医科大学薬学院薬理学教室）
- (4) Structure of the Ca_v2 IQ domain in complex with Ca^{2+} /calmodulin: High-resolution mechanistic implications for channel regulation by Ca^{2+}
森 誠之，井上隆司
（福岡大学医学部医学科生理学，福岡大学大学院医学研究科人体生物系細胞分子制御学）
- (5) L型 Ca^{2+} チャネル $\text{Ca}_v1.2$ と $\text{Ca}_v1.3$ の心臓ペースメーカー活動電位における役割
中瀬古寛子，赤羽悟美（東邦大学医学部医学科薬理学講座）
- (6) 肥大心における低分子量G蛋白質RadによるL型カルシウムチャネル修飾について
村田光繁¹，木村至²，矢田浩崇¹，福田恵一¹
（慶應義塾大学医学部再生医学講座¹，東京医療センター感覚器センター分子細胞生物学研究部²）
- (7) 心臓の病的肥大におけるTRPCチャネルの役割
西田 基宏，黒瀬 等（九州大学大学院薬学研究院薬効安全性学分野）
- (8) LPA受容体刺激によって血管平滑筋細胞に誘導される，活性酸素を介したシグナル伝達経路
伊豫田拓也^{1,2}，Mei-Zhen Cui¹，岩本隆宏²（テネシー大学獣医病理生物学¹，福岡大医学部薬理学²）
- (9) エピジェネティック因子群と心臓発生，心疾患
竹内 純（東京工業大学グローバルエッジ研究院）
- (10) 心筋における交感神経伸長と神経栄養因子
三輪佳子¹，李 鍾国¹，高岸芳子²，小谷 潔³，平林真澄⁴，神保泰彦³，児玉逸雄¹
（名古屋大学環境医学研究所 心・血管分野¹，名古屋大学環境医学研究所 発生・遺伝分野²，
東京大学大学院新領域創成科学研究科 人間環境学専攻³，
自然科学研究機構 生理学研究所行動・代謝分子解析センター⁴）
- (11) G蛋白質サイクルモデル化による心臓副交感神経系調整の再現
村上慎吾，鈴木慎悟，倉智嘉久（大阪大学医学部薬理学講座）
- (12) レトロウイルスによるcDNA発現ライブラリーを用いた肺癌原因遺伝子の発見
間野博行（自治医科大学医学部ゲノム機能研究）
- (13) メタボローム解析によるガス分子を介した生体制御機構の探索と医学応用
末松 誠（慶應義塾大学医学部医化学）
- (14) 内向き整流カリウムチャネルの低親和性スペルミンブロック：細胞内領域チャネルポアの役割
石原圭子，Yan Ding-Hong（佐賀大学医学部生体構造機能学器官細胞生理分野）

(15) 心筋電気活動における KCNE タンパク質の機能的意義

豊田 太, 丁 維光, 松浦 博 (滋賀医科大学生理学講座細胞機能生理学部門)

(16) 血管平滑筋での Ca^{2+} スパークによる膜電位調節機構解明の新たな展開

山村寿男, 大矢進, 今泉祐治 (名古屋市立大学大学院薬学研究科細胞分子薬効解析学分野)

(17) 性周期による QT 延長症候群不整脈リスク変動のシミュレーション

—プロゲステロンによる心筋イオンチャネル制御のデータを基に—

黒川洵子, 古川哲史 (東京医科歯科大学難治疾患研究所生体情報薬理学分野)

【参加者名】

末松 誠 (慶應義塾大学 医学部 医化学), 間野博行 (自治医科大学 医学部 ゲノム機能研究部), 亀山正樹, 養部悦子 (鹿児島大学 大学院医歯学総合研究科 神経情報生理学), 西田基宏 (九州大学 大学院薬学研究院 薬効安全性学分野), 村田光繁 (慶應義塾大学 医学部 再生医学講座), 石原圭子 (佐賀大学 医学部 器官細胞生理学分野), 松浦 博, 丁 維光, 豊田 太 (滋賀医科大学 生理学講座 細胞機能生理学部門), 鷹野 誠 (自治医科大学 生理学教室), 古川哲史, 黒川洵子, 笹野哲郎, 大石咲子, 角坂祥子 (東京医科歯科大学 難治疾患研究所 生体情報薬理学分野), 竹内 純 (東京工業大学 グローバルエッジ研究院), 行方衣由紀 (東邦大学 薬学部 薬物学講座), 赤羽悟美, 中瀬古寛子, 伊藤雅方 (東邦大学 医学部 医学科 薬理学講座), 渡邊泰秀 (浜松医科大学 医学部 看護学科健康科学領域医療薬理学部門), 森 誠之 (福岡大学医学部医学科生

理学), 岩本隆宏, 伊豫田拓也 (福岡大学 医学部 薬理学講座), 南沢 亨 (早稲田大学 先進理工学部 生命医科学科), 赤池 徹 (横浜市立大学 大学院医学研究科 循環制御医学), 木村純子, 坂本多穂 (福島県立医科大学 薬理学), 山村寿男, 船橋賢司, 村田秀道, 池田知佳子, 荻原和信, 木村拓哉, 水谷浩也), 山本清司 (名古屋市立大学 大学院薬学研究科 細胞分子薬効解析学分野), 李鐘国, 森島幹雄 (名古屋大学 環境医学研究所 心・血管分野), 村上慎吾名 (大阪大学 医学部 薬理学講座), 桑原宏一郎 (京都大学 医学部 内分泌・代謝内科学), 澤田光平, 谷口智彦 (エーザイ 創薬第1研究所), 藤高啓右 (名古屋市立大学), 久保 義弘, 立山 充博, 中條 浩一, 伊藤 政之, 長友 克広, 松下 真一, Batu KECELI, 石井 裕 (生理研神経機能素子)

【概要】

平成 19 年度は 11 月 13 日 (火) - 14 日 (水) の 2 日間, 岡崎カンファレンスセンター 2 階小会議室で 51 名の参加者を集めて研究会を開催した。特別講演として, エピゲノム研究専門家である自治医科大学医学部ゲノム機能研究部間野博行教授, およびガスバイオロジーとメタボローム解析の専門家である慶應義塾大学医学部医化学講座末松誠教授による講演の 2 題と, 15 題の一般発表を行った。一般発表も学際的なアプローチを目指して, 心臓電気生理 8 題に加えて, 血管電気生理 2 題, 心臓発生 1 題, 血管発生 1 題, 心臓再生 1 題, イオンチャネル構造解析 1 題, コンピューターモデリング 1 題, という多彩な領域からの発表を行った。また心臓電気生理に関しても, Ca チャネル 3 題, K チャネル 3 題, TRP チャネル 1 題, Na-Ca 交換体 1 題と多岐にわたる発表が行われ, 活発な質疑応答を行った。また 13 日の研究会の後に行われた懇

親会でも, 分野の異なった研究者が共同研究の可能性などに関して活発な意見交換を行った。

学際的なアプローチとともに本年度の研究会の大きな目的の一つとして, 若手研究者の積極的な参加および発表ということがあった。発表では, 教授による発表は特別講演 2 題を含めて 3 演題だけにとどまり, 大学院生による発表も 2 演題行われた。参加者に関しても, 17 名の大学院生と 1 名のポスドクが含まれ若手の参画のきっかけはつかめたものと考えている。また, 今回は生理研のホームページから本研究会の開催を知り, 参加された方も数名いらっしまったことも追記したい。

以上, 心臓電気生理研究における学際的な取り組み, および若手研究者の参加, という 2 つの大きな目的はある程度達成することができ, 心臓電気生理研究の新たな発展のきっかけとして重要な研究会となったものと考えられる。

(1) 虚血一再灌流による心筋機能障害 : $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構阻害薬を用いた解析

行方衣由紀, 高原 章, 田中 光 (東邦大学薬学部薬物学)

心筋虚血一再灌流障害における $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構 (NCX) の寄与を特異的阻害薬 SEA0400 を用いて組織および細胞レベルで評価した。モルモット冠動脈灌流右心室標本で SEA0400 は正常心筋の収縮機能および活動電位波形に影響を与えず、再灌流後に観察される収縮力低下および活動電位持続時間の短縮からの回復を促進させた。また再灌流時に発生した不整脈を SEA0400 は抑制した。さらに SEA0400 は虚血による心筋組織内 ATP 量の減少を抑制し、再灌流後の ATP 量回復を促進させた。次に虚血条件におけるミトコンドリア機能を単離心室筋細胞を用いて評価したところ、細胞質内 Ca^{2+} 濃度の上昇と同時にミトコンドリアの膜電位低下および Ca^{2+} 濃度上昇

が観察され、これらの時間経過はいずれも SEA0400 で遅延した。さらに透過性細胞を用いてミトコンドリア内の Ca^{2+} 動態を検討した結果、ミトコンドリア上の NCX は Ca^{2+} くみ出しに寄与していたが SEA0400 はこの機構には無影響であった。以上の結果より心筋虚血一再灌流時には細胞膜上の NCX から流入した Ca^{2+} によって Ca^{2+} overload が生じ、ミトコンドリアの Ca^{2+} 濃度が上昇し、不可逆的な心筋機能障害に至ったと考えられた。細胞膜上の NCX を阻害することは心抑制を伴わずに虚血一再灌流障害を軽減する心筋保護治療戦略の有効な手段と期待できる。

(2) ラット動脈管における T 型カルシウムチャンネルの役割の検討

赤池 徹¹, 横山 詩子¹, 全 紅¹, 石川義弘¹, 南沢 享²

(横浜市立大学大学院医学研究科循環制御医学¹ 早稲田大学先進理工学部生命医科学科²)

【背景】平滑筋収縮は Voltage-dependent Ca^{2+} channel (VDCC) を介した細胞内 Ca^{2+} の上昇により生じるため、VDCC は動脈管の閉鎖にも重要な役割を担っていると考えられる。我々は先行研究で T 型 VDCC の発現が出生前後に上昇することを報告した。

【目的】動脈管収縮及びリモデリングにおける T 型 VDCC の役割を解明すること。

【方法】全ての実験で Wistar rat の動脈管を用いた。1) 酸素分圧が $\alpha 1\text{GmRNA}$ の発現に及ぼす影響を RT-PCR 法で検討した。2) $\alpha 1\text{G}$ の siRNA と plasmid を用い、平滑筋細胞遊走能を検討した。3) 選択的 T 型 VDCC 阻害薬

(R(-)-efonidipine)を用い、酸素による動脈管収縮への T 型 VDCC の関与を検討した。

【結果】1) 低酸素分圧から正常酸素分圧への変化によって、 $\alpha 1\text{GmRNA}$ の発現は 1.5 倍に増加した。2) $\alpha 1\text{GsiRNA}$ で $\alpha 1\text{G}$ の発現を抑制すると遊走能は対照に比べ 53%まで低下した ($p < 0.05$)。 $\alpha 1\text{Gplasmid}$ を過剰発現させると、遊走能は 60%亢進した ($p < 0.01$)。3) 酸素による動脈管収縮を、R(-)-efonidipine は濃度依存症に抑制し、 10^{-6}M で最大張力の 74%まで拡張した ($p < 0.01$)。

【結論】T 型 VDCC を介する Ca^{2+} 流入は、出生後の動脈管の血管収縮やリモデリングを促進すると考えられた。

(3) Cav1.2チャンネルのカルモジュリンおよび Ca^{2+} 依存性調節

亀山正樹, 韓 冬雲, 蓑部悦子, 王 午陽, はお麗英

(鹿児島大学大学院医歯学総合研究科神経筋情報生理学, 中国医科大学薬学院薬理学教室)

心筋 L 型 Ca^{2+} チャンネル (Cav1.2) は、 Ca^{2+} 依存性促進

(CDF) と不活性化 (CDI) を示し、カルモジュリン (CaM)

の関与が報告されているが、その機構については不明な点が多い。本研究では、CDF と CDI の機構を解明する目的で、当研究室のこれ迄の成果を基に仮説的モデルを考え、モルモット心室筋細胞を用いた実験により検証することを試みた。

【仮説】Cav1.2 チャンネルには、2カ所の CaM 結合部位 (A サイト及び I サイトとする) が存在し、CaM が A サイトに結合すると CDF が起こり、I サイトに結合すると A サイトの状況に拘わらず CDI が起こる。

【結果】Insidie-out パッチで、種々の Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 条件の下、CaM およびその変異体の濃度依存的な作用を検討した。 $[Ca^{2+}]_i < 100$ nM の条件下で、 $0.15\text{--}2$ μM CaM (+ 2.4 mM ATP) は Cav1.2 チャンネルの開口確率を濃度依存的に増加させたが、より高濃度では抑制を示し、濃度-反応

曲線は bell 型となった。この曲線は、 $[Ca^{2+}]_i$ を増加させると左方にシフトした。 Ca^{2+} 結合能の無い CaM 変異体も bell 型の濃度-反応曲線を示したが、 $[Ca^{2+}]_i$ によるシフトは見られなかった。これらの結果は、1) A 及び I の両サイトは共に Ca^{2+} -free CaM (apoCaM) と Ca^{2+} /CaM の両者を結合すること、2) CaM 親和性は A サイトの方が高いこと、3) CaM 親和性は、両サイト共に apoCaM $<$ Ca^{2+} /CaM であること、などを組み入れることでモデルと整合した。【結語】以上の結果から、2カ所の CaM 結合部位を持つモデルは、CDF と CDI の機構をうまく説明できることが示された。また、従来の考えとは異なり、 Ca^{2+} -free 条件下でも CaM (apoCaM) は CDF および CDI 様の調節作用を起こしうることが示唆された。

(4) Structure of the Ca_v 2 IQ domain in complex with Ca^{2+} /calmodulin: High-resolution mechanistic implications for channel regulation by Ca^{2+}

森 誠之, 井上隆司

(福岡大学医学部医学科生理学, 福岡大学大学院医学研究科人体生物系細胞分子制御学)

P/Q 型カルシウムチャンネルには Ca^{2+} -dependent facilitation (CDF) と呼ばれるチャンネル活性化頻度の上昇に伴い、カルシウム流入を促進するポジティブフィードバック制御が観察される。この CDF の結果、伝達物質の放出が促進され、様々な神経や筋細胞の興奮パターンに急速な影響が促される。本研究は CDF の分子基盤を構造学的観点を変えて明らかにすることを目的とし、Cav2.1 (P/Q 型) IQ ドメインと Ca^{2+} 仲介分子、カルモジュリン (CaM) の結晶複合体構造解析を行った。興味深いことに、この構造は機能的には逆の Ca^{2+} -dependent inactivation を引き起こ

す Cav1.2 (L 型) チャンネル IQ と Ca^{2+} CaM の複合体構造と非常に似た構造であることが明らかとなった。しかしながら、電気生理学的にシステマのアラニンスキニングなどを用いて検討した結果、(1) IQ モチーフの上流域に重要な結合部位が存在する、分子シミュレーションによる結合エネルギーとの相関から、(2) CaM N-lobe の結合が重要であること、(3) C-lobe と IQ ドメインの弱結合性が CDF 発生に重要であるという結果などが、本研究から新たに導き出された。

(5) L 型 Ca^{2+} チャンネル Ca_v 1.2 と Ca_v 1.3 の心臓ペースメーカー活動電位における役割

中瀬古寛子, 赤羽悟美 (東邦大学医学部医学科薬理学講座)

洞房結節には L 型 Ca^{2+} チャンネル α_1 サブユニットの Ca_v 1.2 と Ca_v 1.3 が発現しており、 Ca_v 1.3 は活性化と不活性化の電位依存性が Ca_v 1.2 に比べ過分極側へシフトしていることが報告されている。本研究では Ca_v 1.3 の電気生理学的特徴を Ca_v 1.2 と比較し、洞房結節のペースメ

ーカー活動電位における役割を検討した。

電位依存性不活性化 (VDI) キネティクスを解析したところ、 Ca_v 1.3 は Ca_v 1.2 に比較して VDI が遅く、定常的な不活性化からの回復速度が速いことを見出した。細胞内カルボキシル末端 (C 末端) 領域に着目し、 Ca_v 1.2

の C 末端領域を $Ca_v1.3$ 型に置換したキメラチャネル CTD を作成し解析を行った。その結果, CTD は $Ca_v1.3$ 型の遅い VDI を示し, C 末端領域が $Ca_v1.2$ と $Ca_v1.3$ の VDI 速度の差異を担うことが示唆された。洞房結節の活動電位波形で電位固定を行い Ca^{2+} チャネル電流を解析したところ, $Ca_v1.3$ は緩徐脱分極相から活性化し始め, 再分極相で再活性化が見られ, 幅広い電位で活性化してい

た。さらに反復脱分極下において, $Ca_v1.2$ に比較して $Ca_v1.3$ と CTD では Ca^{2+} チャネル電流量が高いレベルで維持されていた。

以上より, $Ca_v1.3$ は活性化電位が深くかつ VDI が遅いという特徴を有し, 洞房結節のペースメーカー活動電位において緩徐脱分極相および活動電位幅の維持に重要な役割を担うことを明らかにした。

(6) 肥大大心における低分子量 G 蛋白質 Rad による L 型カルシウムチャネル修飾について

村田光繁¹, 木村 至², 矢田浩崇¹, 福田恵一¹

(慶應義塾大学医学部再生医学講座¹, 東京医療センター感覚器センター分子細胞生物学研究部²)

低分子量 Ras 関連 G 蛋白 RGK ファミリー (Rad, Gem, Rem) が L 型 Ca^{2+} チャネル β サブユニットと結合し L 型 Ca^{2+} 電流 ($I_{Ca,L}$) を抑制することが知られている。最近我々は, 心臓において内因性 Rad が心筋 L 型 Ca^{2+} 電流を調節することにより不整脈の発生に関わっていることを報告した。さらに Rad のプロモーター活性が, カルシニューリン/NFAT 系によって活性化することが報告されており, 心肥大において Rad が重要な働きをしている可能性が示唆される。そこで本研究では肥大大心における Rad の意義について検討した。新生児ラット培養細胞をアンジオテンシン II (AngII) で刺激し心肥大を惹起し

た。Rad 遺伝子の発現は AngII 刺激後 4 時間に早期のピークをもつ増加を認め, さらに刺激 3 日後より再上昇を認めた。この AngII 刺激による Rad 遺伝子の増加はカルシニューリン阻害剤であるシクロスポリン A (CysA) により抑制された。また, $I_{Ca,L}$ は AngII 刺激 1 日後ではコントロールと比較し変化を認めなかったが, 刺激 3 日後には有意に減少していた。一方, ドミナントネガティブ Rad を強発現した細胞では, AngII による $I_{Ca,L}$ 抑制作用の減弱を認めた。以上の結果より, Rad は L 型カルシウム電流量を調節することにより肥大大心における収縮機能障害の発症とかかわっている可能性がある。

(7) 心臓の病的肥大における TRPC チャネルの役割

西田基宏, 黒瀬 等 (九州大学大学院薬学研究院薬効安全性学分野)

心臓の病的肥大には, アンジオテンシン (Ang) やエンドセリン (ET) により誘発される細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 上昇とそれに続く転写因子 Nuclear Factor of Activated T cells (NFAT) の活性化が関与すると考えられている。ラット新生仔の初代培養心筋細胞を用いて, NFAT 活性化につながる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇のメカニズムを調べた結果, 我々はジアシルグリセロール (DAG) 感受性の Transient Receptor Potential Canonical (TRPC) チャネル (TRPC3/TRPC6) が Ang II 刺激による NFAT 活性化を仲介することを見出した。この過程には, DAG で誘発される膜電位のシフト(脱

分極) とこれに付随した電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャネルの活性化が関与していた。一方, ET-1 刺激による長期的な NFAT 活性化に TRPC6 タンパクの発現増加が関与することも明らかにした。このメカニズムには, 三量体 G_{12} ファミリー蛋白質 ($G_{12/13}$) を介したシグナリング経路が関与していた。以上の結果から, 神経体液性因子により受容体-G 蛋白質を介して誘発される心肥大応答において, DAG 感受性 TRPC チャネルが重要な役割を果たすことを明らかにした。

(8) LPA 受容体刺激によって血管平滑筋細胞に誘導される、活性酸素を介したシグナル伝達経路

伊豫田拓也^{1,2}, Mei-Zhen Cui¹, 岩本隆宏² (テネシー大学獣医病理生物学¹, 福岡大医学部薬理学²)

Lysophosphatidic Acid (LPA) は oxLDL を構成する分子の1つであり、粥状動脈硬化領域への集積が認められる。LPA は血管平滑筋細胞に作用して、Egr-1 発現を介した凝血因子 Tissue Factor (TF) の発現を誘導する。この TF によって活性化された血小板も LPA ソースの1つであることから、この分子がエンドレスな血液凝固サイクルを誘導している可能性がある。今回、培養血管平滑筋細胞を用い、この Egr-1 発現の機序について検討した。LPA 刺激は ERK, JNK, p38 全てのリン酸化を誘導したが、この時 ERK 阻害剤が JNK の活性化を阻害した。さらに LPA が同細胞において活性酸素 (ROS) 産生を誘導する

知見を既に得ていたが、ERK 阻害剤が ROS 産生を抑制し、さらに抗酸化剤が JNK の活性化を阻害したことから、ERK と JNK が ROS を挟んで縦に並んでいると推測された。ROS 産生制御因子としては PKC が知られているが、今回の系では PKC δ が ERK の活性化を制御していた。また、Egr-1 発現を検討したところ、上記で阻害効果の認められた阻害剤や抗酸化剤などが Egr-1 発現を抑制した。最後にこの応答に関与する LPA 受容体について検討したところ、LPA1 が主としてこの応答に関与していることが示唆された。

(9) エピジェネティック因子群と心臓発生、心疾患

竹内 純 (東京工業大学グローバルエッジ研究院)

心臓主要転写因子群 (Nkx, Tbx, Gata, Myocardin, Islet1) は、その多くがヒト先天性心疾患の原因遺伝子として知られており、発生過程においても重要な役割を担っていることが様々なモデル動物において報告されている。しかし、これまでの国内外の研究から既存の転写因子のみでは心臓分化誘導を引き起こせない。我々はその理由としてクロマチン構造状態にあると考え、染色体再構成因子群である SWI/SNF 複合体に着目し解析を行ってきた。

マウス KO の結果、SWI/SNF 複合体は心臓発生において重要な機能を持ち合わせていることが明らかとなり、*in vivo* transfection assay 法により、心臓主要転写因子と協調的に作用することで、異所的な心筋マーカー発現が見

受けられ、予定心臓領域において拍動する細胞集団の存在が確認され、心臓誘導が引き起こされた。このことから、心臓主要転写因子が機能する際に SWI/SNF 複合体の存在が重要な役割を担っていると考察出来る。

さらに、SWI/SNF 複合体に変異が起こると左心室拡張機能障害を引き起こし、Tbx 遺伝子と強固に会合して、Ca²⁺系イオンチャネル群の発現制御していることも明らかとなってきた。今回、心臓主要転写因子 Tbx, Nkx とエピジェネティックな SWI/SNF 因子が心臓誘導と心臓生理においてパートナーを選びながら特異的な機能をしていることを明らかにした。

(10) 心筋における交感神経伸長と神経栄養因子

三輪佳子¹, 李 鍾国¹, 高岸芳子², 小谷 潔³, 平林真澄⁴, 神保泰彦³, 児玉逸雄¹
(名古屋大学環境医学研究所 心・血管分野¹, 名古屋大学環境医学研究所 発生・遺伝分野²,
東京大学大学院新領域創成科学研究科 人間環境学専攻³,
自然科学研究機構 生理学研究所行動・代謝分子解析センター⁴)

【目的】心筋における交感神経の伸長と神経-心筋接合形成の分子機構を調べる目的で、神経栄養因子の効果を検討した。

【方法】ラット新生仔由来心室筋細胞と上頸神経節交感神経細胞を近接培養し(間隔1mm)、神経伸長、神経-筋接合部形成に対する nerve growth factor (NGF: 50 ng/mL), glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF: 10 ng/mL) の効果を、免疫染色法、電子顕微鏡写真および多電極付培養皿を用いた細胞外電位記録法により調べ、NGF, GDNF 非添加の Control 群と比較した。

【結果】心筋細胞への交感神経の伸長は、NGF, GDNF

添加いずれの群においても、Control 群より促進していた。心筋細胞における synapsin と β 1-adrenergic receptor 発現は、NGF 添加群よりも GDNF 添加群で亢進していた。電顕では、シナプス小胞を有する神経終末が心筋細胞に分布していた。細胞外電位記録では、心筋細胞自己拍動のゆらぎを反映する Fractal 指数 (Lorenz plot) が、GDNF 存在下で有意に増加した (GDNF vs Control 1.5 ± 0.02 vs 1.3 ± 0.08 , $p < 0.05$, $n=3$)。

【結論】NGF, GDNF は心筋内での交感神経の伸長を促し、GDNF はさらに神経-心筋の接合形成を促進する効果があることが示唆された。

(11) G 蛋白質サイクルモデル化による心臓副交感神経系調整の再現

村上慎吾, 鈴木慎悟, 倉智嘉久 (大阪大学医学部薬理学講座)

心臓の機能は生理的・心理的要求に応じ、交感神経と副交感神経からなる自律神経によって調整される。この制御は、受容体から G 蛋白質を介したイオンチャネルへの情報伝達系によって実現されている。この心臓興奮制御の定量的な理解のために、我々の実験結果を基にし、G 蛋白質制御性カリウムチャネルのムスカリン性活性化のモデル化を行うことで、副交感神経系制御のモデルを製作した。G 蛋白質制御カリウムチャネルは、m2 ムスカリン性受容体にカップリングした G 蛋白質の $\beta\gamma$ サブユニットによって活性化される。今回製作したモデルで

は、この情報伝達系を2つの構成要素に分けた。一つは $\beta\gamma$ サブユニットと G 蛋白質制御カリウムチャネルで構成され、もう一つは m2 ムスカリン性受容体と G 蛋白質で構成される。G 蛋白質制御カリウムチャネルに対する RGS 蛋白質の役割に関する近年の我々の発見を取り込むことにより、モデルはアセチルコリンによる G 蛋白質制御性カリウムチャネルの活性化の特性を再現することができた。このモデルにより、心臓興奮の神経制御に関する定量的な理解が進むと考えられる。

(12) レトロウイルスによる cDNA 発現ライブラリーを用いた肺癌原因遺伝子の発見

間野博行 (自治医科大学医学部ゲノム機能研究)

肺癌は我が国および欧米の癌死の第一位を占める予後

不良の疾患であり、発癌機構の解明に基づく新たな治療

法の開発が待たれていた。我々は微量の臨床検体から効率良く cDNA を発現させるレトロウィルスライブラリー構築法を開発し、それをを用いて肺癌の原因遺伝子をスクリーニングした。具体的には喫煙歴を有する 62 才男性に生じた肺腺癌外科切除標本から cDNA 発現ライブラリーを構築し、それをマウス 3T3 繊維外細胞に感染させた。その結果生じた形質転換フォーカスから感染レトロウィルスの cDNA を回収したところ、微小管会合タンパク EML4 と受容体型チロシンキナーゼ ALK とが融合した

新たな癌遺伝子 EML4-ALK を発見することに成功した。EML4-ALK は恒常的に二量体化した、活性型チロシンキナーゼであり、3T3 繊維芽細胞に形質転換フォーカスを作ると共にヌードマウスに皮下腫瘍を形成した。さらに本邦の肺非小細胞癌患者検体における同融合遺伝子の有無を確認したところ、約 7% の症例で EML4-ALK が存在することが示された。これら EML4-ALK 陽性肺癌は将来において ALK チロシンキナーゼ阻害剤の治療対象となると期待される。

(13) メタボローム解析によるガス分子を介した生体制御機構の探索と医学応用

末松 誠 (慶應義塾大学医学部医化学)

ガス状メディエータは生体内で生成される低分子で生体高分子の「隙間」に入り込み、部位特異的に結合してその機能を調節する特徴を持つ。我々は 1994 年にストレス誘導酵素である heme oxygenase (HO) から生成される一酸化炭素 (CO) が肝臓の類洞血管を恒常的に弛緩させ、血流維持作用をもたらすことを報告した。これを契機として生体内での CO が NO と類似の血管拡張物質であることを示唆する報告が多数提示されたが、両者は全く異なるガスメディエータであることをいくつかの実験から証明してきた。ガス分子の作用点やレセプタ分子を探索することは困難を極めるが、メタボローム解析技術を活用することにより戦略的に特定のガス分子の作用点を同定し、その生物学的考察を推進することが可能になった。その結果低酸素応答で誘導される代表的な酵素で

ある HO-1 由来の CO により、methionine から cysteine を生成する酵素である cystathionine beta synthase が阻害され、thiol 代謝リモデリングが起こることが明らかになった。さらに代表的なヘム蛋白である hemoglobin は赤血球において酸素運搬体としてだけでなく、低酸素を感知しながら ATP 依存性の血管拡張を惹起するスイッチとして作用し、CO はその作用を阻害、NO は活性化することが明らかになった。これら 3 つの現象はともに CO がヘムに結合すると 6 配位、NO が結合すると 5 配位をとるといった蛋白のコンフォメーション変化の違いによるものである。CO による本酵素の活性制御は糖代謝酵素のメチル化制御を介した glucose 代謝調節機構となっている可能性も示唆され、がん病巣の生育に伴う糖代謝のリモデリングにも密接な関連があることが考察された。

(14) 内向き整流カリウムチャネルの低親和性スペルミンブロック：細胞内領域チャネルポアの役割

石原圭子, Yan Ding-Hong (佐賀大学医学部生体構造機能学器官細胞生理分野)

Kir2 内向き整流カリウムチャネルを流れる外向き電流は、作業心筋 (心室筋・心房筋) やプルキンエ線維の静止電位維持や再分極相形成に重要な役割を担い、細胞内のスペルミン等の陽イオンによるチャネル・ブロックにより調節されている。Kir2.1 チャネルのコンダクタンスにはブロックに対する感受性が異なる二成分がみられ、外向き電流の大部分は、ブロック感受性が低い小さなコ

ンダクタンス成分を流れる事を私たちは以前に報告した (Ishihara & Ehara, 2004; Yan & Ishihara, 2005)。今回は Kir2.1 チャネル変異体のスペルミンによるブロックを解析した。その結果、膜貫通領域ポア内面に位置する Asp172 側鎖の負電荷を中和する変異体 (D172N) は、野生型チャネルのブロック低感受性コンダクタンス成分と同等のブロック感受性を示すが、細胞内領域ポア内面の

Glu224 側鎖の負電荷を中和する変異体 (E224G) では、高感受性と低感受性のコンダクタンス成分の比率は変化せず、低感受性成分のブロック感受性が著しく低下する事が分かった。この結果は、Kir2.1 チャンネルにブロック感受性が異なる二状態があるという仮説を支持し、Kir2 チ

ャンネルの細胞内領域ポア内面の負電荷は高親和性ブロックの際にポリアミンが結合する部位では無いが、低親和性ブロックが起きる際の結合部位である事が示唆された。

(15) 心筋電気活動における KCNE タンパク質の機能的意義

豊田 太, 丁 維光, 松浦 博 (滋賀医科大学生理学講座細胞機能生理学部門)

心筋 K^+ チャンネルの KCNQ1 (Q1) は β サブユニットの KCNE1 (E1) と会合し I_{Ks} を構成する。一方、心臓には他の KCNE タンパク質の発現も示されてきており、心筋 Q1 はこれらとも会合し多様な性質の K^+ チャンネルを構築している可能性がある。本研究は、KCNE2 (E2) および KCNE3 (E3) による Q1 の機能調節を検討した。Q1 を安定発現した CHO 細胞に E1 を導入すると I_{Ks} 様の電流が得られ、E2 や E3 を導入すると常時活性化型の K^+ 電流が誘発した。そこで E1 と E2 を同時に導入すると I_{Ks} と類似の時間依存性電流のみが記録されたが、Q1/E1 電流とは性質が異なっていた。一方、E1 と E3 を共発現すると

Q1/E1 電流と Q1/E3 電流の合算電流が誘発した。このことから E2 や E3 は E1 存在下でも Q1 と会合できることが示唆された。次にモルモット心筋細胞に RNA 干渉法を適用し KCNE タンパク質の発現抑制が膜電流や活動電位におよぼす効果を検討した。E1 あるいは E2 を標的とした人工 RNA を導入すると I_{Ks} が 50-70%抑制された。

一方、E3 のノックダウンは I_{Ks} に影響をおよぼすことなく活動電位の延長を引き起こした。モルモット心筋再分極過程に E1 のみならず E2 や E3 も寄与する可能性が示唆された。

(16) 血管平滑筋での Ca^{2+} スパークによる膜電位調節機構解明の新たな展開

山村寿男, 大矢 進, 今泉祐治 (名古屋市立大学大学院薬学研究科細胞分子薬効解析学分野)

平滑筋では、筋小胞体からの自発性 Ca^{2+} 遊離によって、局所 Ca^{2+} 濃度上昇 (Ca^{2+} スパーク) が生じる結果、大コンダクタンス Ca^{2+} 活性化 K^+ (BK) チャンネルの活性化を介して、筋緊張度が調節されている。本研究では、ウサギ門脈平滑筋細胞に共焦点蛍光顕微鏡もしくは全反射蛍光 (TIRF) 顕微鏡とパッチクランプ法を併用して、細胞内 Ca^{2+} 濃度変化と BK チャンネル活性を同時記録した。その結果、細胞膜直下で発生した Ca^{2+} スパークだけが自発一過性外向き電流 (STOC) と同期した。 Ca^{2+} スパークと同

期した自発一過性過分極 (STH) も観察できた。 Ca^{2+} スパークとそれに対応する STOC や STH の上昇時間や半値幅は、それぞれ良く相関した。さらに、細胞膜表面に局限した TIRF 領域 (ガラス接着面より 200 nm 以内) において、 Ca^{2+} スパークを効率よく検出することが出来た。以上より、血管平滑筋細胞の局所部位で発生する Ca^{2+} スパークのより詳細な解析とその近傍に存在する BK チャンネルの生理的意義の解明に、TIRF 顕微鏡を用いた可視化画像解析が有用であることが分かった。

(17) 性周期による QT 延長症候群不整脈リスク変動のシミュレーション
—プロゲステロンによる心筋イオンチャネル制御のデータを基に—

黒川洵子, 古川哲史 (東京医科歯科大学難治疾患研究所生体情報薬理学分野)

QT 延長症候群における不整脈リスクは女性において有意に高く, 性周期や周産期により変動する。臨床的には, 高プロゲステロンレベル状態では QT 間隔が短く不整脈リスクが減少する傾向が報告されているが, メカニズムはいまだ解明されていない。我々は膜に限局した反応である非ゲノム作用に注目し, 電気生理学的手法, 生化学的手法によりプロゲステロン (P_4) の心筋再分極相への作用を定量的に解析し, 結果を活動電位シミュレーション (Luo-Rudy モデル) に導入して不整脈リスクへの影響を統合的に調べた。生理的濃度範囲の P_4 は, P_4 受容体の非ゲノム経路による NO 産生を介して, 交感神経非刺激時には遅延整流カリウム電流を増大し, 交感神経刺激

時には L 型 Ca^{2+} 電流を減少した。シグナル分子はカベオラに局在化しており, 非ゲノム経路を担う P_4 受容体の新たな候補も見出した。性周期における女性の血中 P_4 濃度の最高値 40.6 nM と最低値 2.5 nM における実験データを活動電位シミュレーションに導入したところ, 性周期に伴う活動電位幅の変動を再現することができた。さらに, 先天性および薬剤による不整脈に対して P_4 は保護的作用を持ち, 黄体期に保護的作用が増強されることが予測された。 P_4 のデータを基にしたシミュレーションモデルは, 女性の性周期によりダイナミックに変動する不整脈リスクを予測するという応用が将来的に期待される。

3. 細胞機能を制御するシグナリング機構の普遍性と特異性

平成19年10月4日-10月5日

代表・世話人：久野 みゆき (大阪市立大学大学院医学研究科)

所内対応者：久保 義弘 (神経機能素子研究部門)

- (1) グルタミン酸イメージングによる単一シナプスレベルでの素量子解析
廣瀬 謙造, 坂本 寛和, 飯沼 将, 並木 繁行 (名古屋大学大学院医学系研究科)
- (2) 蛍光グルタミン酸指示分子を用いたシナプス間隙からのグルタミン酸漏出の可視化
大久保 洋平, 関谷 敬, 並木 繁行, 坂本 寛和, 飯沼 将, 廣瀬 謙造, 飯野 正光
(東京大学大学院医学系研究科)
- (3) 神経可塑性関連タンパク Arc と PSD タンパク間の相互作用およびシナプス局在機構の解析
奥野 浩行, 野中 美応, 藤井 哉, 竹本一木村 さやか, 尾藤 晴彦
(東京大学大学院医学系研究科)
- (4) 腎マクラデンサ細胞の神経型一酸化窒素合成酵素
河原 克雅, 川田 英明, 安岡 有紀子, 福田 英一 (北里大学医学部)
- (5) Essential role for STIM1 in mast cell activation and anaphylactic responses
馬場 義裕, 黒崎 知博 (横浜理化学研究所 免疫アレルギー科学総合研究センター)
- (6) プレシナプスアクティブゾーンタンパク質 RIM1 と VDCC β サブユニットとの結合が
神経伝達物質放出にもたらす新たな機能
森 泰生, 清中 茂樹, 若森 実, 三木 崇史, 瓜生 幸嗣 (京都大学大学院工学研究科)
- (7) KcsA カリウムチャネルゲーティング構造変化の1分子追跡
清水 啓史, 岩本 真幸, 今野 卓, 二瓶 亜三子, 佐々木 裕次, 老木 成稔 (福井大学医学部)
- (8) プリズム型全反射顕微鏡を用いた複数セカンドメッセンジャーのリアルタイムモニター
最上 秀夫, 安達 英輔, 鈴木 優子, 嘉副 裕, 佐藤 洋平, 櫻井 孝司,
上山 健彦, 齋藤 尚亮, 浦野 哲盟 (浜松医科大学)
- (9) 細胞内情報伝達反応素過程の1分子解析
佐甲 靖志 (理化学研究所)
- (10) マクロファージにおける TRPV2 チャネルの生理的機能
長澤 雅裕, 中川 祐子, 小島 至 (群馬大学生体調節研究所)
- (11) 小脳脊髄変性症14型 (SCA14) 発症に関与する PKC γ 変異体の機能解析
足立 直子, 小林 剛, 高橋 英之, 川崎 拓実, 酒井 規雄, 齋藤 尚亮
(神戸大学バイオシグナル研究センター)
- (12) 異種 GPCR 相互作用による中枢シナプス可塑性の調整
田端 俊英, 上窪 祐二, 狩野 方伸 (大阪大学大学院医学系研究科)
- (13) 低分子量 GTP 結合蛋白の細胞内小胞上での活性変化の可視化
松田 道行 (京都大学大学院生命科学研究科)
- (14) 接着斑におけるメカノトランスダクション：力学刺激によるアクチン重合の制御機構
平田 宏聡, 辰巳 仁史, 曾我部 正博 (生理学研究所・名古屋大学大学院医学系研究科)
- (15) 内耳蝸牛内高電位の成立機構
日比野 浩, 任 書晃, 倉智 嘉久 (大阪大学大学院医学系研究科)

(16) 膜電位－細胞長変換素子プレステチンの分子構築と動的構造変化

Kristin Rule, 立山 充博, 山本 友美, 久保 義弘 (生理学研究)

(17) HCN チャネルによる骨代謝制御

納富 拓也, Tim Skerry, John Burford, 川脇 順子, 久野 みゆき (大阪市立大学大学院医学研究科)

【参加者名】

松田 道行 (京都大学大学院生命科学研究科生体制御学), 日比野 浩, 任 書晃 (大阪大学大学院医学系研究科 薬理学講座分子細胞薬), 小島 至, 長澤 雅裕, 中川 祐子 (群馬大学生体調節研究所), 曾我部 正博 (名古屋大学大学院医学系研究科・細胞生物物理), 平田 宏聡 (JST・ICORP/SORST「細胞力覚」), 飯野 正光, 大久保 洋平, 稲生 大輔, 久保田 淳 (東京大学大学院医学系研究科細胞分子薬理), 尾藤 晴彦, 奥野 浩行 (東京大学・大学院医学系研究科・神経生化学分野), 齋藤 尚亮, 足立 直子 (神戸大学バイオシグナル研究センター), 森 泰生, 清中 茂樹, 三木 崇史, 瓜生 幸嗣 (京都大学大学院工学研究科 合成・生物化学専攻), 佐甲 靖志 (理化学研究所 細胞情報研究室), 馬場 義裕, 黒崎知博 (理研免疫センター分化制御研究グループ), 河原克雅 (北里大学医学部生理学), 川田 英明 (北里大学大

学院医療系研究科細胞分子生理学), 老木 成稔 (福井大学医学部・分子生理), 最上 秀夫 (浜松医科大学・生理), 田端 俊英 (大阪大学大学院医学系研究科・細胞神経科学属), 上窪 祐二 (大阪大学大学院生命機能研究科), 久野 みゆき, 納富 拓也 (大阪市立大学大学院医学研究科分子細胞生理学), 川脇 順子 (大阪市立大学大学院医学研究科共同研究室), 廣瀬 謙造 (名古屋大学大学院医学系研究科・細胞生理), 根本 知己 (生理研脳機能計測センター), 川上 良介 (生理研脳形態解析), 毛利 達磨 (生理研細胞内代謝), 西巻 拓也 (生理研生体恒常機能), 古家 園子 (生理研生体情報解析室), 稲村 正子 (生理研分子神経生理), 川田 英明 (北里大学大学院医療系研究科), 久保 義弘, 立山 充博, 中條 浩一, 伊藤 政之, 長友 克広, 松下 真一, Batu KECALI, 石井 裕 (生理研神経機能素子)

【概要】

細胞が担う機能は臓器によって多様であるが、一見異なる細胞反応においても共通のシグナリング機構が働いていることが少なくない。この細胞機能を制御するシグナリング機構 (情報の流れ) の“普遍性”は自明のことのように思いがちである。しかし、個々の研究に没頭していると、自分の扱うものと異なる組織細胞で起こる現象やそのシグナリング機構の実態については案外知らないものである。時には虫瞰図から鳥瞰図へと広い視野で、あるいは異なった角度から考えてみることも、それぞれの研究を展開させていく上で有用であろう。本研究会は、細胞シグナリングの研究に携わりながら、日常の研究活動の場が違うため出会うことの少ない異分野の研究者が一堂に会して意見を交換する機会を創出するべく企画された。したがって、材料や方法論は問わず、細胞で何が起こっているかに興味をもっている研究者が、それぞれ取り組んでいる課題について自由に語るというスタイル

をとった。結果として、神経、腎臓、マスト細胞、インスリン分泌細胞、マクロファージ、線維芽細胞、内耳有毛細胞、破骨細胞とパラエティに富む細胞を用いた研究が集まった。また、用いられた研究手法も分子生物学、分子イメージング、電気生理学、生化学、生物物理学など多岐に渡るものであった。一方、題材となった細胞応答は、分泌、代謝、受容体反応、電位調節、カルシウム応答、細胞骨格、細胞運動と全ての細胞に共通する現象であり、細胞機能を制御するシグナリングの普遍性にあらためて気づかされた。また、発表の多くに取り入れられていたように、近年の潮流のひとつである機能分子を特定した細胞シグナリング可視化の技術の進化とその普及の速さには目を見張るものがあった。専門分野の枠を超えた2日間に渡る発表と活発な討論を通して、各自の研究を多様な切り口から見直し発展させるきっかけが生まれることが期待された。

(1) グルタミン酸イメージングによる単一シナプスレベルでの素量子解析

廣瀬 謙造, 坂本 寛和, 飯沼 将, 並木 繁行 (名古屋大学大学院医学系研究科・細胞生理学)

脳機能の本質を支えるのは、シナプス伝達と呼ばれるシナプスにおける中枢神経細胞間の情報のやり取りである。しかし、シナプス伝達の様式にはいまだ不明な点が多い。中枢シナプス伝達様式を解明するための新しいアプローチとして、我々は代表的な中枢シナプス伝達物質であるグルタミン酸を直接に可視化するための蛍光プローブ (EOS: Glutamate (E) Optical Sensor) の開発を行なった。我々の開発したプローブは、低分子蛍光色素と AMPA 型グルタミン酸受容体に由来するグルタミン酸結合蛋白質とからなるコンジュゲートであり、グルタミン酸が結合することによって蛍光強度変化が生ずる。海馬培養神

経細胞をこのプローブで標識し、蛍光顕微鏡下でイメージングすることでシナプスにおいて放出されるグルタミン酸の観測を試みた結果、単発の活動電位の発生で誘発されるグルタミン酸放出を単一シナプスレベルで観測することに成功した。さらに、従来電気生理学的実験データの解析に用いられてきた素量子解析法をグルタミン酸イメージングのデータ解析に適用することで、単一シナプスレベルでのシナプス伝達様式の一部が明らかになってきた。この新しいアプローチを用いた最近の知見について紹介した。

(2) 蛍光グルタミン酸指示分子を用いたシナプス間隙からのグルタミン酸漏出の可視化

大久保 洋平¹, 関谷 敬¹, 並木 繁行², 坂本 寛和², 飯沼 将², 廣瀬 謙造², 飯野 正光
(¹ 東京大学大学院医学系研究科細胞分子薬理, ² 名古屋大学大学院医学系研究科細胞生理)

前シナプス終末から放出されたグルタミン酸がシナプス間隙から漏れ出し、シナプス外に存在する受容体を活性化するという“グルタミン酸スピルオーバー”の存在を示唆する知見が報告されている。しかしながらこれまでの研究では、グルタミン酸動態は興奮性後シナプス電流の測定により間接的に推定されてきただけであり、グルタミン酸スピルオーバーに関する理解は非常に限られたものであった。我々は最近、GluR2 サブユニットのグルタミン酸結合ドメインを用いて新規の蛍光グルタミン酸指示分子 (glutamate (E) optical sensor, EOS) を開発した。本研究ではこの EOS を用いて、小脳平行線維-プルキンエ細胞間シナプス伝達により惹起されるグルタミン酸動態を可視化し、スピルオーバーの検出を試みた。平行線維の入力に依存して、シナプス間隙外において EOS

の蛍光強度の上昇が観察された。つまりグルタミン酸スピルオーバーを直接検出することに成功した。この方法によりスピルオーバーを誘発する条件を調べたところ、数本の近接した平行線維が生理的発火パターンを示せば誘発されることが明らかになった。加えて平行線維が高頻度で多数回入力すると、スピルオーバーしたグルタミン酸が波状に周囲に拡散するという特徴的な動態も観察された。そしてこの波状に拡散するグルタミン酸が、隣接したシナプスに浸入することで AMPA 受容体を活性化し、シナプスクロストークを惹起することも示唆された。以上のことから、EOS を用いたシナプス間隙外グルタミン酸の直接的かつ詳細な測定により、グルタミン酸スピルオーバーに関して重要な知見が得られると期待される。

(3) 神経可塑性関連タンパク Arc と PSD タンパク間の相互作用およびシナプス局在機構の解析

奥野 浩行, 野中 美広, 藤井 哉, 竹本—木村 さやか, 尾藤 晴彦
(東京大学・大学院医学系研究科・神経生化学分野)

神経特異的前初期遺伝子の一つ *Arc* 遺伝子は刺激に対して極めて高い発現誘導性を示し、シナプスの長期可塑性に重要な役割を果たしていることが示唆されている。また、近年、遺伝子改変マウスや遺伝子発現抑制法を用いた個体解析により、記憶・学習等の脳高次機能における *Arc* 遺伝子の関与を示唆する知見が蓄積されてきた。しかしながら、シナプス活動による *Arc* mRNA の発現誘導制御メカニズムや *Arc* 蛋白の樹状突起やスパインへの輸送メカニズム、そしてシナプスにおける機能という本質的な点に関しては不明である。

本研究においては、*Arc* の機能を生化学的・細胞生物学的手法を用いて解析することを目的とし、Yeast two-hybrid assay 等を用いて *Arc* 結合蛋白の候補を検索した。その結

果、*Arc* はさまざまなシナプス関連タンパクと結合する可能性が示唆された。このタンパク—タンパク相互作用の生物学的・生理学的意義を解析するため、我々は蛍光エネルギー転移 (FRET) を応用した生細胞における相互作用の可視化を試みた。本研究では、任意の結合蛋白ペアから GFP 由来蛋白でラベルされた FRET ペアを単離する新しい方法を開発した。スクリーニングの結果得られた FRET ペアを海馬神経細胞に導入したところ、FRET が樹状突起およびスパインで認められ、生神経細胞において *Arc* と PSD 蛋白の相互作用を可視化することに成功した。生化学的・および細胞生物学的な解析結果と合わせ、神経活動依存的な *Arc* のシナプス局在機構に関して考察を行った。

(4) 腎マクラデンサ細胞の神経型一酸化窒素合成酵素

河原 克雅, 川田 英明, 安岡 有紀子, 福田 英一 (北里大学医学部生理学)

腎臓は、細胞外液の量、イオン組成などを調節できる唯一の器官である。糸球体近接装置 (JGA) の構成要素であるマクラデンサ (MD) 細胞が、尿細管糸球体フィードバック (TGF: tubuloglomerular feedback) 機構の塩濃度センサー的役割を果たし、糸球体濾過量 (GFR) を制御している。MD 細胞は、管腔内液の [NaCl] 変化に応答し、アデノシン・ATP・一酸化窒素 (NO)・PGE₂ などの液性因子を放出する。これらの因子は協調的に作用し、近接する輸入細動脈壁の収縮/弛緩あるいは顆粒細胞からレニン分泌を促進し、GFR を維持・調節している。我々は、不死化したマウス培養遠位尿細管細胞から MD 細胞株

(NE-MD) を樹立し (Yasuoka Y et al, 2005), MD 細胞に高発現している神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) の構造および機能を解析した。その結果、nNOS の発現量および NO 産生量は、細胞外液の [Cl⁻] 変化だけではなく、pHi と [Ca²⁺]_i の影響を受ける事がわかった。また NE-MD 細胞に発現している nNOS 蛋白 (55 kD, inducible) は、脳や心筋の nNOS 蛋白 (150-160 kD, constitutive) に比べ小さく (約 1/3)、還元ドメインの大半を欠失していた。MD 細胞 nNOS の特殊な構造が、TGF 機構のシグナル系に必要な構造的理由になっている可能性がある。

(5) Essential role for STIM1 in mast cell activation and anaphylactic responses

馬場 義裕, 黒崎 知博

(横浜理化学研究所 免疫アレルギー科学総合研究センター 分化制御研究グループ)

マスト細胞はアレルギー反応を引き起こすためのエフェクター細胞であり, アレルゲンの刺激によってマスト細胞が脱顆粒すると, ヒスタミン等のケミカルメディエーターが放出され, 血管拡張, 血管透過性の亢進, 気道の狭窄などの即時型反応が起こり, さらに, サイトカインなどの作用で炎症を主体とする遅発型反応が起こる。これらの現象にカルシウムが関与する事が知られているが, ストア作動性カルシウム (store-operated calcium: SOC) チャネルを介するようなカルシウム流入および持続的カルシウムシグナルの役割は不明である。そこで我々はこ

の疑問にアプローチするため, 小胞体カルシウムセンサーであり, SOC 流入に必須の分子である STIM1 を欠失させたノックアウトマウスを作製した。ホモ Null 変異マウスは分娩前後で致死であったが, 胎仔肝細胞から分化させた STIM1 欠損マスト細胞を用いる事により, STIM1 が IgE 依存的な抗原刺激によるカルシウム流入に必須であることを明らかにした。さらに, STIM1 がマスト細胞の脱顆粒, サイトカイン産生, そしてアナフィラキシー反応において重要な役割を果すことを見出しました。

(6) プレシナプスアクティブゾーンタンパク質 RIM1 と VDCC β サブユニットとの結合が神経伝達物質放出にもたらす新たな機能

森 泰生¹, 清中 茂樹¹, 若森 実^{1,2}, 三木 崇史¹, 瓜生 幸嗣 (¹京大・工, ²東北大・歯)

神経線維を伝播してきた活動電位に正確に反応して「神経伝達」が生じるためには, 前シナプスから後シナプスへの厳密な神経伝達物質の放出が必要である。プレシナプスのアクティブゾーンにおいては, シナプス小胞, 電位依存性 Ca²⁺チャネル (VDCC), SNARE タンパク質が「足場」タンパク質を介して集積することで, 厳密な放出の制御を実現している。今回, 我々はアクティブゾーンタンパク質として知られる RIM1 の C 末端と VDCC

の β サブユニットが相互作用していることを明らかにした。様々な測定結果から, アクティブゾーンにおける RIM1-VDCC β サブユニットの結合は, シナプス小胞を Ca²⁺チャネル近傍につなぎとめ, Ca²⁺チャネルの不活性化を防ぐことで Ca²⁺流入を持続させるという, 神経伝達物質放出における2つの重要な役割を有していることを明らかにした。

(7) KcsA カリウムチャネルゲーティング構造変化の1分子追跡

清水 啓史¹, 岩本 真幸¹, 今野 卓¹, 二瓶 亜三子³, 佐々木 裕次², 老木 成稔¹

(¹福井大学医学部・分子生理, ²SPring-8 大型放射光施設 (財) 高輝度光科学研究センター 放射光研究所,

³セイコーインスツル)

チャネル分子の立体構造がカリウムチャネルを中心に解明され, ゲートの開構造を示すものと閉構造を示すものが得られた。これらの静止像をもとに, ゲート開閉にどのような構造変化の経路をたどるか予想されてきた。

ところが現在までに使われてきた分光学などの実験法は蛋白質の局所構造を解明することを目的としたもので, チャネル分子全体にわたる構造変化を明らかにすることはできない。そこで我々は1分子 X 線計測法により KcsA

カリウムチャネルの pH 依存性ゲーティングをリアルタイムで捉えることを試みた。可溶化した KcsA チャネルを細胞外ループ領域で基板に固定し、細胞質ドメインに結合した金ナノ結晶からの X 線回折スポットを追跡した。チャネルが静止状態にある中性 pH ではチャネル分子がわずかに曲がる bending を示したが、開閉遷移をしめす酸性 pH ではチャネル軸を中心にねじれ運動 twisting

が発生した。これは膜貫通ヘリックス M2 が中央部のヒンジで折れ曲がる運動様式を大域的に見たものに相当する。酸性 pH での twisting 運動は、開チャネルブロッカーである TBA (tetrabutylammonium) 存在下で完全に停止した。twisting 運動の起源は膜貫通領域に発すると考えられる。

(8) プリズム型全反射顕微鏡を用いた複数セカンドメッセンジャーのリアルタイムモニター

最上 秀夫¹, 安達 英輔¹, 鈴木 優子¹, 嘉副 裕, 佐藤 洋平², 櫻井 孝司³,
上山 健彦⁴, 齋藤 尚亮⁴, 浦野 哲盟¹

(¹ 浜松医科大学生理学, ² 慶応大学システムデザイン工学, 浜松医科大学光量子医学研究センター
³ 細胞イメージング, ⁴ 神戸大学バイオシグナルセンター分子薬理)

近年の遺伝子工学の進歩及び光学機器の発展により、イメージング技術は生細胞における分子の時空間的解析にとって非常に有効な手法となっている。今回我々は、新たにプリズム全反射顕微鏡を開発し、細胞機能の調節を行う主要なセカンドメッセンジャーである Ca²⁺, cAMP, DAG (ジアシルグリセロール) の同時可視化解析を行った。1) 細胞内 Ca²⁺測定は Fura-2 の蛍光強度変化, 2) cAMP 測定は epac1-camap (FRET-based cAMP indicator) の蛍光強度変化, 3) DAG は C1-mRFP (PKC γ の DAG 結

合部位) の局在変化を指標とした。COS 細胞及びインスリン産生細胞をこれらプローブで標識しそれぞれ ATP または高カリウム刺激を行って 1) 2) を落射蛍光法 3) を全反射蛍光法にて計測した。各細胞においてこれら刺激は同時に 3 つのシグナルを惹起された。更に、シグナルの重なり合いを考慮した上で検討した結果、生データにおいても互いのシグナルに質的な影響を及ぼすことなく測定可能なことが判明した。

(9) 細胞内情報伝達反応素過程の 1 分子解析

佐甲 靖志 (理化学研究所)

細胞内の情報処理は、蛋白質分子間の認識と修飾反応のネットワークによって担われている。単純な素反応がループやカスケードを作って組み合わされることにより高次情報処理機能を発現するというのが、一般的な考え方である。

我々は、細胞内 1 分子計測法を開発し、細胞増殖・分化に係わる EGF-Ras-MAPK システムと呼ばれる細胞内情報処理ネットワークの解析を行っている。1 分子計測法によって、情報伝達分子反応が複雑なダイナミクスを持つことが分かってきた。たとえば、EGFR とその活性化を認識する蛋白質 Grb2 の結合速度に異常な濃度依存性が

見られ、反応記憶の存在も示唆されている。また、活性化型 Ras とそのエフェクターである Raf1 の分子認識が、Raf1 の構造変化と新規な反応中間体を含むことも明らかになってきた。これらの情報伝達分子間の認識の複雑性は、細胞内の蛋白質発現量の変動を補償したり、情報分子の誤った活性化を防いだりするなどの生理的な意味を持つと考えられる。

単純な素反応の組み合わせではなく、情報処理機能を持った素子をさらに有機的に組織化した反応ネットワーク構造が、細胞情報処理の柔軟性や頑健性をもたらしているのではないだろうか。

(10) マクロファージにおける TRPV2チャンネルの生理的機能

長澤 雅裕, 中川 祐子, 小島 至 (群馬大学生体調節研究所 細胞調節分野)

TRPチャンネル・スーパーファミリーのメンバーは、リガンド作動性、受容体活性化カルシウムチャンネル分子としてさまざまな生理的役割を担っている。その中のTRPVファミリーのメンバーであるTRPV2は、Purkinje細胞、肝臓・腎臓の上皮細胞、膵ランゲルハンス島の内分泌細胞、消化管の神経内分泌細胞、肺・脾臓のマクロファージなどに高発現している。マクロファージでは、主にTRPV2が発現し、血清・fMLPの投与でPI-3キナーゼ依存性にチャンネルの一部が細胞膜に移行して、持続的な細胞内カルシウムの上昇を生じる。さらに、TRPV2の細胞膜上の局在の検討により、TRPV2がfocal complex

の特殊な形態であるポドソームに局在すること、このポドソームにはRho, Rac, Cdc 42などの低分子量G蛋白、paxillin, Pyk2キナーゼなどが集積しTRPV2と共局在していることなどを報告した。今回、マクロファージにおけるTRPV2のノック・ダウンによる効果を検討した。それによりTRPV2のポドソーム局在は、チャンネル自身の活性化とそれに続くpyk2の活性化により制御されていることが明らかになった。TRPV2チャンネルによるカルシウム流入が、細胞膜におけるTRPV2チャンネルの局在を制御し、この機構がマクロファージの接着、細胞運動に重要であると考えられる。

(11) 小脳脊髄変性症14型 (SCA14) 発症に関与するPKCgamma 変異体の機能解析

足立 直子¹, 小林 剛², 高橋 英之¹, 川崎 拓実¹, 酒井 規雄³, 齋藤 尚亮¹

¹神戸大学 バイオシグナル研究センター

²名古屋大学大学院 医学系研究科 細胞生物物理学

³広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 神経・精神薬理学)

脊髄小脳変性症 (SCA) 14型はPKCgammaのアミノ酸変異によって引き起こされる優勢遺伝型の神経変性症である。今回我々は、これらの変異がPKCgammaの酵素学的機能にもたらす影響を検討した。野生型PKCgamma発現細胞では、非発現細胞に比べ、刺激後、一過性に上昇した細胞内Ca²⁺は酵素活性依存的に速やかに減少する。一方、SCA14変異体は、*in vitro*活性測定において高い酵素活性を有したが、細胞外からのCa²⁺流入時間は延長したままであった。この現象は2-APB, SKF-96395によって阻害されることから、Ca²⁺流入にはTRPCチャンネルの関与が考えられた。さらに、TRPC3チャンネルを基質として*in vivo*酵素活性測定を行った結果、野生型

PKCgammaはチャンネルをリン酸化するのに対し、変異体では有意なリン酸化は確認できなかった。そこで、全反射顕微鏡を用いて、PKCgammaの一分子における細胞質膜上での動態を観察したところ、変異体の膜滞在時間が野生型に比べて有意に短縮した。これらの結果より、野生型PKCgammaでは刺激後、TRPCチャンネルをリン酸化し、細胞外からのCa²⁺流入を止めるが、変異体はチャンネルのリン酸化ができず、細胞内のCa²⁺濃度を適切に調節できないと考えられた。このような過剰なCa²⁺流入がSCA14において神経細胞死を引き起こす1つの原因になる可能性が示唆された。

(12) 異種 GPCR 相互作用による中枢シナプス可塑性の調整

田端 俊英¹, 上窪 祐二², 狩野 方伸^{1,3} (¹ 阪大・院・医・細胞神経科学,
² 阪・院・生命機能・神経可塑性生理学, ³ 東大・院・医・神経生理)

近年, 中枢ニューロンにおいて異種の G タンパク共役型受容体 (GPCR) が近接発現/複合体化することが分ってきた。異種 GPCR は相互作用を通じて複雑なシグナリングを行うが, その生理的意義は殆ど知られていなかった。

我々は小脳プルキンエ細胞において, 1 型代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR1) が B 型 γ アミノ酪酸受容体 (GABA_BR) と複合体化していることを明らかにした。また脳髄液レベルの GABA や Ca²⁺ を受容した GABA_BR が, G タンパク非依存的に mGluR1 のリガンド感受性を増強することを発見した。一方, 介在ニューロン・シナプスから spillover した高濃度の GABA を受容した GABA_BR が G タンパク依存的に mGluR1 シグナルを増強すること

が報告されている (Hirono et al., 2001)。さらに我々は, アデノシンが A1 受容体を介して mGluR1 シグナルを G タンパク依存的/非依存的に増強/抑制することを発見した。

Ca²⁺-GABA_BR 相互作用を遮断すると, mGluR1 によってトリガーされる小脳長期抑圧 (LTD) が誘導されなくなった。また GABA 類似体により GABA_BR を活性化すると LTD が促進された。この促進効果は小脳スライスでも観察された。さらに促進効果は GABA_BR と mGluR1 の下流のクロストークに起因することが分った。これらの結果は GPCR 相互作用が中枢シナプス可塑性の調整に寄与することを示唆している。

(13) 低分子量 GTP 結合蛋白の細胞内小胞上での活性変化の可視化

松田 道行 (京都大学大学院生命科学研究所生体制御)

細胞内小胞輸送は, 細胞の生存に必須であるのみならず, 細胞表面受容体の発現量のコントロールや, 増殖因子の放出などを介して細胞内外の情報伝達を制御する重要な機構である。演者らは, 蛍光共鳴エネルギー移動 (Fluorescence resonance energy transfer, FRET) の原理を用いた分子プローブを開発し, Ras ファミリーや Rho ファミリー-GTP 結合蛋白による小胞輸送の制御機構を研究している。Rho ファミリー-G 蛋白のひとつ TC10 は, グルコーストランスポーターの細胞表面への輸送に必須の分子である。この TC10 が細胞内小胞上で高い活性を保ったまま存在すること, そして小胞が細胞膜に融合する直前に不活性化されることを FRET プローブと全反射蛍光顕微鏡との組み合わせを用いて可視化することに成功し

た。一方, Ras ファミリー-G 蛋白の R-Ras も開口放出を制御するという知見を最近得ている。R-Ras は他の Ras ファミリー-G 蛋白とは異なり, 細胞内小胞に多く局在している。その分布は初期エンドソームマーカーと共局在を示した。FRET プローブを使ってその活性化状態を調べたところ, 小胞では活性が高く, 細胞膜では活性が低いことがわかった。さらに R-Ras の標的分子を解析したところ, R-Ras が Rgl2/Rlf を介して RalA を活性化し, これが開口放出を制御していることが分かった。これらの成果は, FRET プローブが低分子量 GTP 結合蛋白の時空間制御機構を解析する上で非常に強力なツールであることを示しているといえよう。

(14) 接着斑におけるメカノトランスダクション：力学刺激によるアクチン重合の制御機構

平田 宏聡^{1,2}, 辰巳 仁史³, 曾我部 正博^{1,2,3}

(¹JST・ICORP/SORST「細胞力覚」, ²生理研・細胞内代謝, ³名大・医院・細胞生物物理)

繊維芽細胞や内皮細胞は、接着斑と呼ばれる超分子構造を形成し、細胞外基質と接着する。接着斑では、細胞外基質の受容体であるインテグリンが、クラスターを形成し、多様な細胞質タンパク質の集積を介してアクチン骨格と結合している。接着斑における分子組成、およびインテグリン-アクチン骨格間結合強度は細胞内外の力学的環境に応じて変化する。しかし、力学因子による接着斑モジュレーションの分子機構はほとんど不明である。接着斑ではアクチン重合が盛んであり、接着斑におけるF-アクチン量の調節はインテグリン-アクチン骨格間結合強度の調節に重要であると考えられている。そこで我々は、力学刺激が接着斑でのアクチン重合に及ぼす効果について調べた。繊維芽細胞について、ミオシンIIの阻害により細胞の収縮力発生を阻害すると、接着斑に

おけるアクチン重合活性は喪失した。ミオシンIIを阻害した状態で、細胞に持続伸展刺激を加えると、接着斑でのアクチン重合活性の回復がみられた。これらのことから、接着斑におけるアクチン重合は力学的負荷に依存していることが示唆された。また、接着斑でのアクチン重合活性は、アクチン調節関連タンパク質zyxinが多く集積した接着斑において高かった。zyxinの接着斑局在配列を過剰発現させることでzyxinの接着斑への集積を抑制すると、接着斑におけるアクチン重合活性が低下した。zyxinの接着斑への集積は、ミオシンIIの阻害で喪失し、持続伸展刺激で回復した。以上の結果から、力学的負荷依存的にzyxinが接着斑に集積し、それによって接着斑におけるアクチン重合が促進されることが示唆された。

(15) 内耳蝸牛内高電位の成立機構

日比野 浩, 任 書晃, 倉智 嘉久 (大阪大学大学院医学系研究科)

内耳蝸牛は、外リンパ液・内リンパ液という細胞外液により満たされている。内リンパ液は150 mMのK⁺と、+80 mVの高電位(蝸牛内高電位: EP)を帯びる。蝸牛側壁を介したK⁺循環が、EP成立を司ると示唆されてきた。蝸牛側壁の上皮組織、血管条はEPに不可欠であり、基底・中間細胞を含む外層、辺縁細胞を有する内層と、血管条から成る。血管条の4つのK⁺輸送装置-中間細胞と辺縁細胞の頂上膜に各々分布するK⁺チャネルKir4.1とKCNQ、辺縁細胞の基底側膜に局在するK⁺輸送体Na⁺,K⁺-ATPaseとNa⁺,K⁺,2Cl⁻共輸送体-がK⁺循環に重要である。

血管条の細胞外空間 (Intrastrial Space:IS) を満たす液

は、高Na⁺・低K⁺であるがEPと同程度の高電位(ISP)を呈する。これがEPの起源とされてきたが、詳細は不明であった。我々はK⁺輸送装置の阻害下において、イオン電極法により蝸牛側壁の各部位の電位・K⁺濃度・組織抵抗を測定し、EPの成立機構を解析した。実測値と各々の膜のEK変化の予想値から、(1)ISの電氣的隔絶、(2)ISPは中間細胞頂上膜のKir4.1を介したK⁺拡散電位により成立し、それにはK⁺輸送体でISのK⁺濃度が低く維持されることが必要であること、(3)EPはISPと辺縁細胞頂上膜のKCNQによるK⁺拡散電位の和であることが示された。

(16) 膜電位一細胞長変換素子プレスティンの分子構築と動的構造変化

Kristin Rule^{1,2}, 立山 充博¹, 山本 友美¹, 久保 義弘¹¹生理学研究所・神経機能素子研究部門, ²Caltec

内耳外有毛細胞は、10kHz 超という速い膜電位変化に追従して細胞長を変える。その分子基盤として、プレスティンという膜蛋白が、近年同定された。プレスティンは、Cl⁻トランスポーター蛋白群に属し、分子内に抱え込んだCl⁻イオンの電位依存的な動きにより、分子の「かさ」を変え、それが、外有毛細胞の長さの変化に結びつくと考えられている。我々は、プレスティンを対象として以下の研究を進めている。

[1] 精製蛋白を用いた単粒子構造解析

FLAG tag をつけたレコンビナント蛋白を Baculo virus - Sf9 細胞を用いて発現させ、精製した。Native PAGE のデータ等は、4 量体であることを示唆した。精製蛋白を負染色後、電顕撮影し、多数の粒子画像から3次元像

を構築した。粒子サイズは、外耳内有毛細胞の表面に多数存在する粒子のサイズと同程度であった。この研究は、産総研・構造生理の、三尾和弘氏、小椋利彦氏、佐藤主税氏との共同研究による。

[2] FRET 法による電位依存的構造変化の解析

C末細胞内領域にCFPもしくはYFPを付加したプレスティン分子を HEK 細胞に発現させ、全反射照明により FRET の変化をモニターした。細胞の脱分極に伴う FRET の低下が観察された。この低下は、プレスティンによる非線形容量を失わせる薬剤、および点変異により消失したため、プレスティンの構造変化を反映しているものと考えられる。

(17) HCN チャネルによる骨代謝制御

納富 拓也^{1,2}, Tim Skerry², John Burford², 川脇 順子³, 久野 みゆき¹¹大阪市立大学大学院 医学研究科 分子細胞生理学²シェフィールド大学 医学部 骨生物学部門 ³大阪市立大学医学部共同研究室

骨代謝回転は、多様な分子の影響を受けながら、骨形成と骨吸収のバランスで保たれている。それに関して、われわれはイオンチャネルの一種 Hyperpolarization activated Cation-Nonselective channel (HCN) の骨組織での発現を確認した。HCN は生体活動に重要な役割を担っているが、骨組織での機能は明らかになっていない。そこで、HCN の骨代謝に及ぼす影響を検討した。

免疫染色法により、破骨細胞には HCN1 と HCN4 の陽性像、骨髄細胞には HCN2 の陽性像、骨芽細胞には HCN3 の陽性像が認められた。特に HCN1 は骨基質との接着部位である明帯と酸放出部位である波状縁に豊富に局在していた。パッチクランプ法による検討の結果、HCN は破

骨細胞の膜電位決定に寄与しており、酸性環境下において、その活性を高めることで酸放出に影響を与えていた。

次に HCN の骨髄細胞分化における役割と骨髄細胞に発現している HCN2 の骨構造に及ぼす影響を検討した。その結果、HCN は骨芽細胞および破骨細胞への分化に関与しており、野生型マウスに比べて HCN2 遺伝子欠損マウスの海綿骨・皮質骨の骨量減少と骨構造変化および骨強度の低下が認められた。

本研究の結果より、HCN1-4 の骨組織での存在が始めて明らかにされた。さらに、HCN は骨芽細胞への分化と破骨細胞の膜電位調節をおこない、骨量・骨構造・骨強度の決定に関与していた。

4. 細胞死研究の新たな展開と関連する素過程

2007年8月15日-8月16日

代表・世話人：高橋 良輔 (京都大学大学院医学研究科)

所内対応者：岡田 泰伸 (生理学研究所機能協関部門)

- (1) TGF- β による細胞死誘導活性および細胞死誘導阻害活性の分子機構と制御機構
米原 伸 (京都大学大学院生命科学研究科)
- (2) 遺伝学的研究によるカスパーゼの生物学
三浦 正幸 (東京大学大学院薬学系研究科遺伝学教室)
ショートトーク ショウジョウバエ外感覚器発生過程における生と死の運命決定機構
古藤 日子 (東京大学大学院薬学系研究科遺伝学教室)
- (3) 新規アポトーシス関連蛋白質の分子機能
清水 重臣 (東京医科歯科大学難治疾患研究所病態細胞生物学)
- (4) 高等植物のプログラム細胞死を制御する液胞プロセッシング酵素 VPE
西村 いくこ (京都大学大学院理学研究科生物科学専攻)
- (5) 神経変性疾患 ALS における非細胞自律性の神経細胞死
山中 宏二 (理化学研究所脳科学総合研究センター 山中研究ユニット)
- (6) 組織・細胞種特異的小胞体ストレス応答と疾患
今泉 和則 (宮崎大学医学部解剖学講座分子細胞生物学分野)
- (7) 直鎖状ポリユビキチン鎖による NF- κ B 活性制御メカニズム
岩井 一宏 (大阪市立大学大学院医学研究科分子制御)
- (8) TRAF ファミリー分子による免疫制御
中野 裕康 (順天堂大学医学部免疫学)
ショートトーク 大量の空胞形成を伴う細胞死に見られたミトコンドリアの細胞外排出
中島 章人 (順天堂大学医学部免疫学)
- (9) 抗原受容体を介する B リンパ球アポトーシスの分子メカニズム
鏑田 武志 (東京医科歯科大学疾患生命科学研究部)
- (10) アポトーシス細胞の貪食
長田 重一 (京都大学大学院医学研究科)
- (11) ドーパミンニューロンの生と死におけるパエル受容体の役割
高橋 良輔 (京都大学大学院医学研究科臨床神経学)
- (12) ポリグルタミン病における蛋白質構造異常・凝集を標的とした治療戦略
永井 義隆 (大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝学)
ショートトーク 神経細胞死における熱ショック転写因子 (HSF) の役割—生存と死の制御—
藤掛 伸宏 (大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝学)
- (13) ストレス応答性 SAPK/JNK 活性化と細胞の核内イベント
仁科 博史 (東京大学大学院薬学系研究科細胞情報学教室, CREST)
- (14) ASK ファミリーによるストレス応答と細胞死の制御
一條 秀憲 (東京大学大学院薬学系研究科細胞情報学教室)
- (15) 非アポトーシス型細胞死の解析
辻本 賀英 (大阪大学大学院医学系研究科遺伝子学, SORST of JST)

(16) 脳ニューロンの虚血再灌流性アポトーシス/過興奮毒性ネクローシスは容積感受性アニオンチャネル
活性ブロックによって救済される

岡田 泰伸 (生理学研究所機能協関部門)

ショートトーク スタウロスポリン誘導性アポトーシスは高浸透圧刺激活性化型カチオンチャネル活性
によって救済される

沼田 朋大 (生理学研究所機能協関部門)

【参加者名】

米原 伸・菊池 弥奈・桐山 真利亜・戸田 雅人・福岡 あゆみ・高田 顕徳・高橋 涼香 (京都大学大学院生命科学研究科), 三浦 正幸・古藤 日子・山口 良文 (東京大学大学院薬学系研究科遺伝学教室), 清水 重臣 (東京医科歯科大学難治疾患研究所病態細胞生物学), 西村 いくこ (京都大学大学院理学研究科生物学専攻), 山中 宏二 (理化学研究所脳科学総合研究センター), 今泉 和則 (宮崎大学医学部解剖学講座分子細胞生物学分野), 岩井 一宏・坂田 真 (大阪市立大学大学院医学研究科分子制御), 中野 裕康・中島 章人 (順天堂大学医学部免疫学), 鏑田 武志・石井 優輝 (東京医科歯科大学疾患生命科学研究部), 長田 重一 (京

都大学大学院医学研究科), 高橋 良輔・江川 斉宏・小林 芳人・田代 善崇・山門 穂高・村上 学 (京都大学大学院医学研究科), 永井 義隆・藤掛 伸宏・岡本佑馬 (大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝学), 藤掛 伸宏 (大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝学), 仁科 博史・根岸 崇大・沢登 健治・山崎 世和 (東京医科歯科大学難治疾患研究所発生再生生物学), 一條 秀憲・石倉 聖子・寺田 優美・福富 尚・丸山 順一・山内 翔太 (東京大学大学院薬学系研究科細胞情報学教室), 辻本 賀英 (大阪大学大学院医学系研究科), 岡田 泰伸・沼田 朋大 (生理学研究所機能協関部門)

【概要】

本研究会では「細胞死研究の新たな潮流と疾患研究への展開」と題して、細胞死研究および各種疾患の分子細胞生物学的研究の領域の第一線で活躍する 21 名が講演を行った。細胞死関係では米原は TGFβによるアポトーシスへの Slug, Bim の関与を, 清水はミトコンドリア依存性細胞死でのセリンプロテアーゼの関与を, 辻本はシクロフィリンDの非アポトーシス細胞死における重要な役割をそれぞれ明らかにした。三浦はショウジョウバエを用いたカスパーゼ活性化, 長田はマクロファージの貪食の低分子 G タンパク質の, それぞれライブイメージングの成果が発表し, イメージングにより細胞死制御の精緻なメカニズムが解明されつつある現状が示された。西村は植物のアポトーシスに液胞のプロテアーゼが重要であるとの知見を述べた。鏑田は B 細胞アポトーシスの分子機構について, 仁科, 一條は JNK-ASK1 経路について, 岡田は細胞死におけるアニオンチャネルの役割について

それぞれ興味深い新知見を発表した。一方疾患研究では, 山中は遺伝性 ALS が非細胞自律的に生じることを明らかにし, 高橋は小胞体ストレスと遺伝性パーキンソン病, 今泉は小胞体ストレスセンサーの骨形成への関与について述べ, 永井はポリグルタミン病の蛋白質構造異常を標的とした治療戦略を提示した。中野は TRAF family が腸管のバイエル板形成に重要であることを示し, 岩井は新規に見出した直鎖状ポリユビキチン鎖が NFκB 活性化に関わるとの新知見を発表した。これ以外にもいくつかの研究室から大学院生を含む若手研究者による発表も 4 題あった。多岐にわたる内容であったにもかかわらず, 大変興味深い新規の知見の発表が相次ぎ, 研究室主任のみならず, 大学院生をはじめとした若手も積極的に議論に参加し, 分子細胞生物学を基盤とした細胞死研究と疾患研究の相互交流と若手研究者の育成という両面で大いに収穫があった。

(1) TGF- β による細胞死誘導活性および細胞死誘導阻害活性の分子機構と制御機構

米原 伸 (京都大学大学院生命科学研究所)

TGF- β は細胞の増殖抑制や分化誘導に機能するが、ある種の細胞ではアポトーシスを誘導する。マウス B 細胞株や脾臓 B 細胞を用いて、TGF- β がアポトーシスを誘導する条件を検討した結果、IFN- γ の前処理や TGF- β が活性化する JNK 抑制の条件下で、アポトーシスの誘導されることを見いだした。そこで、TGF- β 刺激によって発現が誘導されるが JNK 活性抑制条件下ではその発現上昇が抑制される遺伝子を DNA アレイ法で網羅的に解析し、107 種類の遺伝子を同定した。その中で、線虫で抗細胞

死遺伝子として同定された *ces-1* の相同遺伝子である *snail-2* (Slug タンパク質をコードする) に注目し、解析を行った。また、細胞死を実行する因子としては BH3-only タンパク質である Bim が重要であることも見いだした。TGF- β は、Bim を介するアポトーシス誘導シグナルを導入するが、同時に Slug の発現誘導を介する抗アポトーシスシグナルを導入し、Slug の作用が強い細胞ではアポトーシスは阻害され、他の生理機能が発揮されるという生理的な制御機構を明らかにした。

(2) 遺伝学的研究によるカスパーゼの生物学

三浦 正幸 (東京大学大学院薬学系研究科遺伝学教室)

カスパーゼは分子ファミリーを形成し様々な刺激によって活性化することでアポトーシスを実行する中心分子である。私たちはカスパーゼ 1 がほ乳類においては細胞死のみならず炎症反応といった免疫系との接点を持つことに注目し、カスパーゼがアポトーシス以外の生理機能をもつことに興味を抱いていた。その後、私たちは遺伝学的な研究に優れたショウジョウバエを用いてカスパーゼの生理機能に関する研究を行ってきたが、その結果としてカスパーゼは細胞死に関わる機能に加え、細胞増殖、分化、移動といったアポトーシス以外の様々な生理機能を果たすことが明らかになってきた。そしてこのようなカスパーゼの様々な生理機能は段階的なカスパーゼ活性

化によってなされることが示唆されてきた。カスパーゼの生理機能を生体で明らかにするためには、その活性化動態を知ることが不可欠である。そこでショウジョウバエ変態時における唾腺の退縮に関わるカスパーゼの活性化を生体イメージングによって詳細に観察した。その結果、エクジソンサージによって開始されるカスパーゼ活性化シグナルが唾腺の前端から後方へと伝播する様子が観察された。生体では一様に分布すると考えられていた変態ホルモンが濃度勾配をもって標的組織に作用し、パターンを持ったカスパーゼ活性化の引き金を引いていることが示唆された。

ショウジョウバエ外感覚器発生過程における生と死の運命決定機構

古藤 日子, 倉永 英里奈, 三浦 正幸 (東京大学大学院薬学系研究科遺伝学教室)

プログラム細胞死の制御因子はこれまでに数多く同定され、細胞死実行因子である caspase やその阻害因子の IAP ファミリータンパク質はショウジョウバエからヒトまで保存されていることが明らかになった。また、近年これらの細胞死調節因子が細胞増殖や細胞移動などにも

関与することが報告されており、その役割は多岐に渡り重要であると考えられる。しかしながら、発生過程において細胞死シグナルが「いつ」「どこで」進行するのかについては未だ明らかでない。そこで我々は蛍光タンパク質を利用した細胞死シグナルの可視化を試みた。ショ

ウジョウバエにおける IAP (DIAP1) は caspase に結合、分解することで細胞死を抑制するが、一旦細胞死刺激が入ると DIAP1 自身の分解が促進され、caspase の活性化、及び細胞死が誘導されると考えられている。そこで DIAP1 の分解を検出するプローブ (PRAP; pre-apoptosis signal detecting probe based on DIAP1 degradation) を作成し、ショ

ウジョウバエ中胸背毛の発生における細胞死シグナルのイメージング解析を行っている。中胸背毛は 1 個の前駆細胞から非対称分裂により生ずる 4 種の細胞群から形成される。今回、中胸背毛の発生過程において PRAP が非対称な局在パターンを示すことが明らかとなったので、そのパターン解析と生理的意義について報告する。

(3) 新規アポトーシス関連蛋白質の分子機能

清水 重臣 (東京医科歯科大学 難治疾患研究所 病態細胞生物)

1. アポトーシスのシグナル伝達機構にはミトコンドリアの膜透過性変化が関与している。これまで、ミトコンドリア膜透過性を制御している分子は Bcl-2 ファミリー蛋白質のみであると考えられてきたが、我々は Bcl-2 ファミリー蛋白質とは独立の制御機構が存在する事を見いだした。また、この独立した制御機構には、①ミトコンドリア膜に局在するセリンプロテアーゼ PARL が関与する事、② PARL の欠損により、Bcl-2 ファミリー蛋白質非依存的なアポトーシスが緩和される事、を発見した。

2. Bcl-2 ファミリー蛋白質のメンバーである Bax がアポトーシスの際にどのような機構でミトコンドリアに移動するかは、未だ不明の点が多い。我々は、ミトコンドリアに Bax のレセプター様の分子が存在すると考え、これを探索したところ、VDAC2 が同定された。実際、①VDAC2 欠損細胞では Bax を介したアポトーシスが緩和され、② Bax 欠損細胞において VDAC2 のサイレンシングをすると、種々のアポトーシスが抑制された、また③VDAC2 を欠損すると、アポトーシス時の Bax 移動が抑制された。

(4) 高等植物のプログラム細胞死を制御する液胞プロセシング酵素 VPE

西村 いくこ (京都大学大学院理学研究科生物科学専攻・植物学系)

液胞プロセシング酵素 (VPE) は、高等植物の様々な液胞タンパク質の成熟化や活性化を制御する酵素として私達が見いだしたシステインプロテアーゼである。最近、VPE が高等植物のプログラム細胞死に関与していることが分かってきた。免疫系をもたない植物は、過敏細胞死によって感染した病原体を封じ込める。過敏細胞死には、動物プログラム細胞死と共通した分子機構が働いていると考えられてきた。例えば、動物細胞死の実行因子である caspase の活性は、植物の細胞死でも検出されている。しかし、caspase 活性をもつ分子の実体は不明のままだった。私達はタバコモザイクウイルスの感染による過敏細胞死を解析し、caspase-1 活性を示す酵素が VPE であることを見出した (Science, 305, 855, 2004; JBC, 280, 32914, 2005)。VPE 遺伝子の発現を抑制すると、ウイルス

感染による過敏細胞死が抑えられた。VPE は液胞膜の崩壊を引き起こし、これによって細胞を死に至らしめる。VPE は、生体防御としての細胞死のみならず、発生に伴う細胞死も制御していた (Plant Cell, 17, 876, 2005)。細胞死の実行を制御する酵素が、植物では液胞に存在し、動物では細胞質ゾルに存在すること、そして両者がプロテアーゼとして同じ活性をもっていたことは進化的に興味深い。動物は死細胞を貪食細胞によって分解するが、細胞壁に囲まれた植物細胞は死んだ後も死細胞内の成分を自らの力で分解する必要がある。そのため、多種多様な分解酵素を含む液胞を破壊するという戦術を獲得したと考えられる (Curr. Opinion Plant Biol., 8, 404, 2005; Apoptosis, 11, 905, 2006)。

(5) 神経変性疾患 ALS における非細胞自律性の神経細胞死

山中 宏二 (理化学研究所脳科学総合研究センター 山中研究ユニット)

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は運動ニューロン変性をきたす神経変性疾患であり, 変異 SOD1 (superoxide dismutase 1) は優性遺伝性 ALS の原因遺伝子である。変異 SOD1 が未知の毒性を獲得して, 運動ニューロン死を来することが知られている。

運動ニューロンにおける変異 SOD1 毒性が神経変性に必要十分であるという自律性神経細胞死の仮説を検証するため, 運動ニューロンを作れない *Olig1/2^{-/-}* マウスと, すべての細胞群に変異 SOD1 を発現する SOD1^{G37R} マウスとのキメラを作成したところ, 運動ニューロン変性の遅延と著明な生存期間の延長を認めた。野生型の非神経細胞が, 変異 SOD1 の運動ニューロンへの毒性を軽減する

ことから, 運動ニューロン死は非細胞自律性におこることが示された。

さらに変異 SOD1 毒性が神経系のどの細胞種に由来するかを解明するため, Cre-lox システムにより細胞種特異的に変異 SOD1 の発現を除去できる *LoxSOD1^{G37R}* マウスを作成した。*LoxSOD1^{G37R}* マウスを細胞群特異的に発現する Cre マウスと交配して各細胞種特異的に変異 SOD1 の発現を抑制し, マウスの発症と進行時期を検討した。運動ニューロンとグリア細胞における変異 SOD1 の毒性発現がそれぞれ ALS の発症と進行の規定因子であることが示された。

(6) 組織・細胞種特異的小胞体ストレス応答と疾患

今泉 和則 (宮崎大学医学部解剖学講座分子細胞生物学分野)

膜貫通領域を有する CREB/ATF ファミリーに属する転写因子の一群が, 小胞体 (ER) ストレストランスデューサーとして働くことがわかってきている。それらは発現分布に特異性があり, 「組織特異的 ER ストレス応答」の情報伝達分子として機能している可能性がある。我々はこれまでアストロサイトおよび骨芽細胞で発現する OASIS と, 脳では神経細胞に発現する BFB2H7 を同定しそれぞれの機能について解析を進めてきた。OASIS および BFB2H7 はいずれも小胞体ストレスに応じて小胞体から

ゴルジ体へ輸送され, そこで膜内切断を受ける。切断された N 末端断片は核内へ移行し, ターゲット遺伝子の発現を調節する。OASIS 欠損マウスでは全身の骨組織において皮質骨および海面骨とも骨量が著しく減少し, 骨粗鬆症に極めて類似した病変を示す。一方, BFB2H7 欠損マウスでは発育遅滞を伴って胎生期に死亡する。このような知見も含めこれまで得られた *in vivo* および *in vitro* 解析データを紹介し, 両分子の生体内での役割と疾患との関連性について述べたい。

(7) 直鎖状ポリユビキチン鎖による NF- κ B 活性制御メカニズム

岩井 一宏 (大阪市立大学 大学院医学研究科 分子制御)

近年, ユビキチン修飾系は蛋白質分解のみならず, 多彩な様式で標的タンパク質の機能を制御しており, 結合するポリユビキチン鎖の種類によりタンパク質の制御様式が異なることが知られつつある。我々はユビキチンの N 末端のメチオニンの α -アミノ基にユビキチンの C 末端

が結合した直鎖状ポリユビキチン鎖を生成する LUBAC ユビキチンリガーゼ (HOIL-1L/HOIP からなる) を同定し, その機能解析を進めている。その過程で, LUBAC が TNF- α 依存的に NEMO と結合して直鎖状ポリユビキチン鎖を付加し, NF- κ B を活性化させることを見出した。

さらに、HOIL-1L 欠損 MEF では TNF- α 依存的に NF- κ B によって誘導される分子の発現が抑制されていた。マウス肝細胞では NF- κ B の活性化が傷害された場合には、TNF- α 刺激によってアポトーシスすることが知られて

いる。そこで、成獣 HOIL-1L 欠損マウスに TNF- α を投与したところ、肝細胞でアポトーシスが観察された。以上の結果から、直鎖状ポリユビキチン化は TNF- κ 依存的な NF- κ B 活性化に関与することが明らかとなった。

(8) TRAF ファミリー分子による免疫制御

中野 裕康 (順天堂大学医学部 免疫学)

二次リンパ組織形成には、リンフォトキシン-ベータレセプター (LT- β R) により誘導される非古典的 NF- κ B 活性化経路が必須であることが明らかにされている。しかしながら、LT- β R に会合する TRAF2 および TRAF5 の二次リンパ組織形成における役割は明らかとなっていない。そこで、我々は *traf2*^{-/-}, *traf5*^{-/-}, *traf2*^{-/-} *traf5*^{-/-} マウスを用いて、二次リンパ組織形成における TRAF2 および TRAF5 の役割を検討した。いずれのノックアウトマウスにおいても腸間膜リンパ節は正常に認められたが、*traf2*^{-/-} および *traf2*^{-/-} *traf5*^{-/-} マウスではパイエル板形成に著明な障害が認められた。そのメカニズムを解析したところ、パイエル板原基における VCAM1 陽性細胞が減少

し、さらにパイエル板形成に必須のケモカインである CXCL13 の発現が低下していることが明らかとなった。一方、パイエル板の形成障害は *tnfr1*^{-/-} マウスでも認められた。そこで TNF α により *cxcl13* の発現が誘導されるかどうかを検討したところ、これまでの報告と異なり TNF α 刺激により *cxcl13* mRNA の発現が誘導され、その誘導は *traf2*^{-/-} および *rela*^{-/-} マウス由来の細胞で低下していた。さらに TNF α 刺激により RelA が *cxcl13* プロモーターにレクルートされることが明らかとなった。以上より、TNFR1-TRAF2-RelA 依存性のシグナルが *cxcl13* の発現を直接制御し、パイエル板形成に必須の役割を果たしていることが初めて明らかとなった。

大量の空胞形成を伴う細胞死に見られたミトコンドリアの細胞外排出

中島 章人 (順天堂大学医学部 免疫学)

ミトコンドリアは絶えず融合と分裂を繰り返すダイナミックな細胞内小器官であるが、アポトーシス誘導に伴い、分断化(fragmentation)が誘導されることが知られている。今回我々は、*cellular FLICE-inhibitory protein (c-Flip)*^{-/-} マウス由来の胎児線維芽細胞を用いた実験から、TNF α によって急速にアポトーシスが誘導されるのにもない分断化されたミトコンドリアが空胞によって包まれ、細胞外に選択的かつ積極的に排出されることを見いだした。これらの変化は細胞死を起こした約 30%の細胞で認められ、核はクロマチンの凝集が認められることよりア

ポトーシスの亜型と考えられた。種々のマーカーを用いた染色より、細胞質に形成された大量の空胞は主に細胞膜に由来するものと考えられた。さらにこの現象は *c-Flip*^{-/-} 細胞だけではなく、抗 Fas 抗体を投与し劇症肝炎を誘導したマウスの肝細胞においても空胞変性と細胞からのミトコンドリアの放出が認められた。何故アポトーシス誘導に伴い一部の細胞ではミトコンドリアが選択的に排出されるのか、また生理的条件下でも同じようにミトコンドリアが排出されているのかについては今後の検討課題である。

(9) 抗原受容体を介する B リンパ球アポトーシスの制御機構と免疫応答

小野寺大志, 于潔, 満栄勇, 佐藤元彦, 鏑田武志

(東京医科歯科大学疾患生命科学研究所免疫学, 難治疾患研究所免疫疾患)

成熟 B 細胞は抗原と反応するとアポトーシスをおこし, 活性化して抗体産生をおこすには, CD40を介する抗アポトーシスシグナルが必要である。CD22 および CD72 は B 細胞抗原受容体 (BCR) シグナル伝達を負に制御する抑制性共受容体で, 抗原による B 細胞アポトーシスを制御する。ナイーブ B 細胞は IgM と IgD を発現し, B 細胞が抗原と反応して活性化すると, IgE, IgG, IgA のいずれかのクラスの免疫グロブリン (Ig) を産生し, 記憶 B 細胞はもっぱら IgG を産生する。いずれのクラスの Ig も BCR を構成する。我々は, CD22 が IgM-BCR および

IgD-BCR を介するシグナル伝達を負に制御するが, IgG-BCR や IgE-BCR を介するシグナル伝達は弱くしか制御しないことを明らかにした。さらに, CD22 欠損マウスを用いた解析により, CD22 欠損により B 細胞の分裂が亢進し, IgG 陽性 B 細胞や胚中心 B 細胞, さらにプラズマ細胞への分化が早くなり, 迅速で大量の抗体産生を誘導することを明らかにした。この結果は, 記憶 B 細胞での IgG-BCR 発現による CD22 のシグナル制御の減弱が, 記憶免疫応答の際の迅速大量の抗体産生に関与することを強く示唆する。

(10) アポトーシス細胞の貪食

長田 重一 (京都大学大学院医学研究科)

アポトーシスを起こした細胞は速やかにマクロファージなどの貪食細胞に取込まれ分解される。私達は以前にマクロファージが分泌し, アポトーシス細胞を貪食細胞に橋渡しする分子 (MFG-E8) を同定した。この因子はアポトーシス細胞に暴露されるリン脂質 phosphatidylserine, 貪食細胞の integrin に結合する。今回, integrin を発現する NIH3T3 細胞を用いて, 貪食における低分子量 G-蛋白質の関与を解析した。その結果, 貪食細胞で活性化される Rac1, RhoG, Rab5 が貪食を正に促進するのに対し, RhoA はこの過程を負に制御することが示された。そこ

で, Rac1 の活性化を FRET プローブを用いて検討したところ, アポトーシス細胞は Rac1 が活性化されている Lamellipodia から貪食されること, NIH3T3 細胞内でアポトーシス細胞を貪食する場所は決まっており, 一種のゲートを形成していることが示された。また, アポトーシス細胞を貪食する際, actin が重合し, phagocytic cup を形成するが, 死細胞が細胞内に取込まれるためには Rac1 が不活化し, actin が脱重合することが必要であることも示された。

(11) ドーパミンニューロンの生と死におけるパエル受容体の役割

高橋 良輔 (京都大学大学院医学研究科臨床神経学)

ドーパミン神経選択的変性を特徴とする常染色体劣性若年性パーキンソン病 (AR-JP) はユビキチンリガーゼである Parkin 遺伝子の欠損により発症する家族性パーキンソン病である。我々は Parkin の基質, Pacl 受容体 (Pacl-R) の蓄積により小胞体ストレスが惹起されて細胞

死が誘発されることを示してきた。本年は Pacl-R をアデノウイルスベクターでマウス黒質に感染させると, 小胞体ストレスによって細胞死が生じることを示した。またドーパミンが Pacl-R 誘導性細胞死を増強することを明らかにした。さらに Pacl-R トランスジェニックマウスと

Parkin ノックアウトマウスの掛けあわせで緩徐進行性の黒質ドーパミン神経および青斑核ノルアドレナリン神経細胞死が生じ、2年齢で40%もの細胞脱落が観察された。変性領域の神経細胞では小胞体シャペロン BiP や転写因子 CHOP の発現誘導が見られ、細胞死が小胞体ストレスによるものであることが示唆された。さらに Pacl-R の生

理的役割としてドーパミン量を増やす作用があることを明らかにし、Pacl-R 過剰発現により増加するドーパミンおよびその代謝産物由来の酸化的ストレスが、ドーパミン神経が特に選択的に変性する理由になっているものと考えられた。

(12) ポリグルタミン病における蛋白質構造異常・凝集を標的とした治療戦略

永井 義隆 (大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝学)

近年、アルツハイマー病、パーキンソン病、ポリグルタミン (PolyQ) 病などの多くの神経変性疾患において、蛋白質の構造異常・凝集が病態に深く関与することが明らかになった。PolyQ 病では、PolyQ 鎖の異常伸長により原因蛋白質のミスフォールディングを生じ、その結果難溶性の凝集体を形成して神経変性を引き起こすと考えられている。私達は、異常伸長 PolyQ 蛋白質の構造異常・凝集体形成が治療標的となると考え、PolyQ 蛋白質の構造解析を行った。その結果、異常伸長 PolyQ 蛋白質モノマーが β シート構造への異常コンフォメーション変移を経て、アミロイド線維状凝集体を形成し、 β シート変移したモノマーが細胞毒性を発揮することを明らかにし

た。そして、異常伸長 PolyQ 鎖特異的結合ペプチド QBP1 を同定し、QBP1 が異常伸長 PolyQ 蛋白質の毒性 β シート変移・凝集体形成を阻害し、PolyQ 病モデルショウジョウバエの神経変性を抑制することを明らかにした。さらに薬物治療確立へ向けて、低分子化合物ライブラリー (45,000 化合物) からハイスループットスクリーニングを行い、約 100 種類の新規 PolyQ 凝集阻害化合物を同定し、ショウジョウバエモデルの神経変性を抑制する化合物を同定した。私達の治療戦略は PolyQ 病のみならず、蛋白質構造異常・凝集に起因する他の神経変性疾患にも共通した治療法開発につながると考えられる。

神経細胞死における熱ショック転写因子 (HSF) の役割—生存と死の制御—

藤掛 伸宏, 永井 義隆 (大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝学)

神経変性疾患ポリグルタミン (PolyQ) 病では、PolyQ 鎖の異常伸長により原因蛋白質のミスフォールディングが生じ、その結果難溶性の凝集体を形成して神経細胞死を引き起こすと考えられている。これまでの研究で、分子シャペロン Hsp40 や Hsp70 の遺伝子発現により、異常伸長 PolyQ 蛋白質のミスフォールディングが抑制され、神経細胞死が抑制されることが示されている。しかし、分子シャペロン群は熱ショック転写因子 (HSF) により同調的に発現制御されて協調的に働くため、単独の分子シャペロンの過剰発現では細胞毒性が生じることが知られている。そこで本研究では HSF 活性化剤の投与、ある

いは HSF の遺伝子発現という二つの方法を用いて分子シャペロン群の同調的発現誘導を試み、PolyQ 病に対する治療効果を検討した。その結果、HSF 活性化剤 17-AAG は Hsp40, Hsp70 の発現を誘導して、PolyQ 病モデルショウジョウバエの神経細胞死を抑制することを明らかにした。一方、HSF の遺伝子発現では、Hsp40, Hsp70 とは異なる遺伝子の発現を誘導し、予想に反して神経細胞死を増悪することを明らかにした。本研究から、HSF はその活性化様式により異なる遺伝子を発現誘導し、その結果神経細胞死に相反する影響を及ぼすことが明らかとなった。

(13) ストレス応答性 SAPK/JNK 活性化と細胞の核内イベント

仁科 博史 (東京医科歯科大学難治疾患研究所)

SAPK/JNK シグナル伝達系は様々なストレスに応答し、細胞死誘導・細胞増殖促進、さらに細胞の老化抑制などの様々な細胞応答を制御する。受容体刺激など細胞膜を介する SAPK/JNK 活性化誘導の分子機構に比べて、DNA 損傷によって誘導される核から細胞質への SAPK/JNK 活性化シグナル経路については未だ不明の点が多い。最近我々は、DNA 損傷によって誘導される持続的な SAPK/JNK 活性化に核内に存在する Daxx と癌抑制遺伝子産物 Ras Ras association domain family 1C (RASSF1C) が関与することを見出した。すなわち、1) 核内に存在す

る Daxx は DNA 損傷によってユビキチン化された分解される、2) Daxx と結合していた RASSF1C は核から細胞質に移行する、3) 細胞質に移行した RASSF1C は SAPK/JNK 活性化の誘導に関与することを見出した。また、RASSF1 と結合する MST1 は細胞核の凝縮を誘導するが、SAPK/JNK の活性化が必須に役割を果たすことを見出した。これらの研究成果は、シグナル系の新たなクロストークと細胞死誘導における SAPK/JNK の役割解明に貢献すると考えられる。

(14) ASK ファミリーによるストレス応答と細胞死の制御

一條 秀憲 (東京大学・大学院薬学系研究科・細胞情報学教室, CREST)

Apoptosis Signal-regulating Kinase (ASK) 1 は JNK と p38MAP キナーゼの上流に存在する MAPKKK である。これらの MAP キナーゼ経路は、様々な環境ストレスに応答して細胞の生死や分化をはじめとする多様な生物活性をコントロールするためのシグナル伝達系として機能している。ASK1 ノックアウトマウスの解析により、ASK1 が酸化ストレスや小胞体ストレスによるアポトーシスに必要なシグナルであることが明らかになり、また ASK1 がアルツハイマー病において認められる神経細胞

死のメディエーターとしてこれらの疾患に関わっていることも示唆されている。一方、ASK1 は皮膚損傷ストレスに応答して炎症性サイトカインの産生ならびにマクロファージの遊走・活性化を伴う発毛促進に必要なことも明らかになってきた。本研究会では、活性酸素 (ROS) による ASK1, ASK2 の活性制御機構について紹介するとともに、ASK ファミリー経路を介するアポトーシス経路の破綻と発がんのメカニズムについて報告する。

(15) 非アポトーシス型細胞死の解析

辻本 賀英 (大阪大学大学院医学系研究科・遺伝子学, SORST of JST)

我々は、哺乳動物細胞が有する細胞死機構の包括的な理解を目指し、アポトーシスの解析と同時に非アポトーシス細胞死機構の解析を行ってきた。非アポトーシス型細胞死としてこれまでに、オートファジー依存的な細胞死機構、虚血・再灌流障害において重要な役割を演じるミトコンドリア膜透過性遷移現象 (MPT) 依存的なネクローシス、低酸素・低グルコースで誘導され、ユニーク

な形態を伴い、カルシウム非依存的なフォスホリパーゼ A2 に依存した細胞死機構などの解析を行ってきた。

本研究会では、特に、MPT 依存的なネクローシスについて、これまでの知見を整理しつつ、最近の進展を紹介した。シクロフィリン D 欠損マウスの作成・解析を通し、ミトコンドリアが最終的に脱機能に陥る MPT にミトコンドリア局在のシクロフィリン D が必須であること、ま

た MPT はアポトーシスには関与せず、酸化ストレスなどにより誘導されるネクローシスに関与すること、またシクロフィリン D 欠損マウスは心筋梗塞モデルにおいて強い耐性を示すことなどを紹介した。さらに、最近の研究成果として、シクロフィリン D と阻害剤であるシクロ

スポリン A の複合体の結晶構造解析に成功したこと、MPT が疾患発症に関与することが示唆されていた *mnd2* 変異症には MPT が関与しないこと、さらに、シクロフィリン D が認知機能や情動性などの行動に関与することなどを報告した。

(16) 脳ニューロンの虚血再灌流性アポトーシス／過興奮毒性ネクローシスは容積感受性アニオンチャンネル活性ブロックによって救済される

岡田 泰伸, 井上 華 (生理学研究所機能協関部門)

大滝 博和, 塩田 清二 (昭和大学医学部解剖学)

グルタミン酸受容体の過剰刺激による神経細胞死は過興奮毒性と呼ばれ、虚血やてんかん等の病態に深く関与する。グルタミン酸受容体の持続的活性化が神経細胞の膨張をもたらしてネクローシスを引き起こすメカニズムを、初代培養系とスライス標本中の皮質ニューロンを用いて検討した。容積感受性外向整流性アニオンチャンネル (VSOR) は細胞膨張によって活性化され容積調節を担うチャンネルであるが、過興奮刺激によっても活性化された。過興奮時に見られるニューロンの持続的な膨張には、VSOR を介するクロライドの流入が必要で、このチャネ

ルを薬剤により抑制すると、過興奮によるニューロンの膨張が抑制され、その後のネクローシスも救済された。VSOR は海馬ニューロンにも発現しているため、*in vivo* マウスの一過性前脳虚血による CA1 ニューロンの遅発性神経細胞死にも関与していることが考えられた。事実、VSOR ブロッカーを虚血前と再灌流後に投与することによって CA1 ニューロンのアポトーシス性細胞死が著しく抑制された。VSOR をターゲットにした脳虚血およびその後の再灌流による神経細胞障害の救済法開発の可能性が示唆された。

スタウロスポリン誘導性アポトーシスは高浸透圧刺激活性化型カチオンチャンネル活性によって救済される

沼田 朋大, ベーナー フランク, 岡田 泰伸 (生理学研究所機能協関部門)

アポトーシス性細胞容積減少 (AVD: Apoptotic Volume Decrease) は、アポトーシス死の初期過程に起こる特徴的な現象の一つである。一方、調節性容積増加 (RVI: Regulatory Volume Increase) は、主に高浸透圧刺激活性化型カチオンチャンネル (HICC: Hypertonicity-Induced Cation Channel) が活性化することで細胞容積縮小からの細胞容積の回復をもたらす現象である。HeLa 細胞にスタウロスポリン (STS: Staurosporine) 誘導性 AVD と同時に高浸透圧刺激誘導性 RVI を起こさせたところ、高浸透圧刺激に従い AVD の抑制が見られた。次に STS 誘導性 AVD 時の HICC 活性を電気生理学的に調べたところ、STS 処

理時間によって HICC 活性の減少が見られた。実際に細胞死とカスパーゼ 3/7 活性を STS 誘導性アポトーシスと同時に高浸透圧刺激をした細胞で調べたところ、細胞死、カスパーゼ 3/7 活性は抑制された。また、HICC の阻害剤を用いた場合、高浸透圧刺激による AVD、細胞死、カスパーゼ 3/7 活性の抑制は消失した。以上から、アポトーシス死は、HICC 活性の抑制による RVI の機能不全で起こるが、逆に HICC 活性を高浸透圧刺激で亢進させて RVI を起こさせておくと、AVD が抑制されることによってアポトーシス性細胞死から救済されることが分かった。

5. 視知覚研究の融合を目指して—生理, 心理物理, 計算論

2007年6月14日—6月15日

代表・世話人：西田 眞也 (NTT コミュニケーション科学基礎研究所)

所内対応者：小松 英彦 (生理学研究所)

- (1) サル前部下側頭皮質における「顔」の記憶のニューロン表現
永福 智志 (富山大学医学薬学研究部統合神経科学)
- (2) 運動情報を利用した色の知覚
西田 眞也 (NTT コミュニケーション科学基礎研究所人間情報研究部感覚運動研究グループ)
- (3) 側頭葉のニューロンの集団ダイナミクス
岡田 真人 (東京大学新領域創成科学研究科複雑理工学専攻)
- (4) 乳児の視実験から視知覚機能の形成過程を知る
山口 真美 (中央大学文学部教育学科心理学コース・JST)
- (5) 視床におけるクロスモーダル信号処理
小村 豊 (産業技術総合研究所脳神経情報研究部門システム脳科学グループ)
- (6) 運動視処理における二つの皮質経路
林 隆介 (京都大学医学研究科認知行動脳科学)
- (7) fMRI を用いたサル視覚皮質における機能地図計測
郷田 直一 (生理学研究所感覚認知情報部門)
- (8) 大きさ知覚の恒常性と V4 野両眼視差選択性細胞
藤田 一郎 (大阪大学生命機能研究科認知脳科学研究室)
- (9) 視聴覚の時間順序判断における同時性のバイズ校正
山本 慎也 (産業技術総合研究所脳神経情報研究部門システム脳科学研究グループ)
- (10) 空間知覚の環境適応のための方略
金子 寛彦 (東京工業大学理工学研究科附属像情報工学研究施設)
- (11) 高空間解像度 fMRI による大流出静脈中の方角選択性信号検出
程 康 (理化学研究所脳科学総合研究センター認知機能表現研究チーム)
- (12) 霊長類と鳥類の視覚的補間と錯視
藤田 和生 (京都大学文学研究科心理学研究室)
- (13) ネコ一次視覚野における刺激文脈依存的反応修飾の時空間特性
佐藤 宏道 (大阪大学医学系研究科認知行動科学・生命機能研究科)
- (14) 周辺変調による図方向検出—計算論的アプローチ
酒井 宏 (筑波大学システム情報工学研究科コンピュータサイエンス専攻)

【参加者名】

西田 眞也 (NTT コミュニケーション科学基礎研究所), (筑波大学), 青山 俊弘 (鈴鹿高専), 浅田 稔 (大阪大学), 永福 智志 (富山大学), 岡田 真人 (東京大学), 山口 眞美 (中央大学), 小村 豊 (産業技術総合研究所), 林 隆介 (京都大学), 郷田 直一 (生理学研究所), 藤田 一郎 (大阪大学), 山本 慎也 (産業技術総合研究所), 金子 寛彦 (東京工業大学), 程 康 (理化学研究所), 藤田 和生 (京都大学), 佐藤 宏道 (大阪大学), 酒井 宏 (豊橋技術科学大学), 宇賀 貴紀 (順天堂大学), 内川 恵二 (東京工業大学), 岡澤 剛起 (京都大学), 岡本 正博 (大阪大学), 沖 めぐみ (鈴鹿高専), 荻野 正樹 (JST),

沖山 夏子 (東京工業大学), 小倉 知子 (中京大学), 勝亦 憲子 (理化学研究所), 金沢 創 (淑徳大学), 蒲池 みゆき (工学院大学), 川崎 喜弘 (JST), 川島 祐貴 (東京工業大学), 観音 隆幸 (豊橋技大), 気仙 拓也 (筑波大学), 北岡 明佳 (立命館大学), 栗木 一郎 (東北大学), 小濱 剛 (近畿大学), 小峰 央明 (豊橋技術科学大学), 堺 浩之 (RIKEN-BSI), 定金 理 (基生研), 佐藤 多加之 (理化学研究所), 佐藤 雅之 (北九州市立大学), 佐藤 俊治 (理研 BSI), 塩入 諭 (東北大学), 繁榎 博昭 (豊橋技術科学大学), 篠森 敬三 (高知工科大学), 鈴木 一隆 (浜松ホトニスク), 瀬川 かおり (東京工業大学), 高井 英明 (豊橋技術科学大学), 高瀬 慎二 (中京大学), 高橋 伸子 (愛知淑徳大学), 高橋 成雄 (東京大学), 竹井 成和 (NTT コミュニケーション科学基礎研究所), 武田 二郎 (東京工業大学), 田嶋 達裕 (東京大学), 田中 慎吾 (大阪大学), 谷藤 学 (理化学研究所), 田村 公紀 (豊橋技術科学大学), 張 恵 (本田・リサーチ・インスティテュート・ジャパン), 寺尾 将彦 (関西学院大学), 豊田 敏裕 (豊橋技大), 内藤 智之 (大阪大学), 仲泊 聡 (神奈川リハビリテーション病院), 根岸 一平 (東工大), 秦 重史 (京都大学), 林 勲 (関西大学), 原 真一郎

(大阪大学), 原澤 賢充 (NHK), 廣川 純也 (基生研), 鬢櫛 一夫 (中京大学), 吹野 徳彦 (東京工業大学), 福島 邦彦 (関西大学), 福屋 貴之 (東京工業大学), 福家 佐和 (大阪大学), 藤井 芳孝 (東工大), 藤井 正樹 (中京大学), 藤崎 和香 (NTT コミュニケーション科学基礎研究所・学術振興会), 藤本 清 (関西学院大学), 堀口 浩史 (東京慈恵医科大学), 本郷 由希 (神戸大学), 前川 亮 (東工大), 松宮 一道 (東北大学), 水科 晴樹 (東京工業大学), 南 明宏 (東工大), 宮川 尚久 (理化学研究所), 宮崎 由樹 (中京大学), 明治 涼子 (筑波大学), 目黒 孝平 (早稲田大学), 本吉 勇 (NTT コミュニケーション科学基礎研究所), 八木 哲也 (大阪大学), 行松 慎二 (中京大学), 吉田 歩 (前田眼科), 渡邊 淳司 (NTT コミュニケーション科学基礎研究所) 以下, 生理学研究所 池田 琢郎, 伊佐 正, 浦川 智和, 岡 さち子, 加藤 利佳子, 木田 哲央, 坂谷 智也, 佐々木 章宏, 田中 絵実, 豊田 浩史, 林 正直, 平井 真洋, 村瀬 未花, 吉田 正俊, 渡辺 昌子, 小松 英彦, 伊藤 南, 鯉田 孝和, 平松 千尋, 横井 功, 安田 正治, 松茂良 岳広, 原田 卓弥, 坂野 拓, 浅川 晋宏, 西尾 亜希子

【概要】

生理学研究所研究会「視知覚研究の融合を目指してー生理, 心理物理, 計算論」は, 平成 19 年 6 月 14 日, 15 日に岡崎コンファレンスセンター中会議室において開催された。第 3 期の 1 回目となる今回の参加者は約 120 名で, 着実にその数が増えている。「招待講演者のみによる厳選された発表」「学会の壁を越えた分野横断的人選」「余裕のある発表時間」「(基本的に) 日本語での講演」などの本研究会の特徴が, 通常の学会にはない魅力となっており, 若手からベテランまで多くの参加者を呼んでいる。また, 本年度の研究会の特徴として (企画者の意図する以上に) 講演間の相互関連があり, 聴衆の理解を助けるとともに, 講演者間の活発な議論を生むこととなった。関連性という視点を含めて今回の発表を概観すると以下のようになる。(1) 顔の神経表現についての神経生理 (永福) と視覚概念の神経表現を解析するための数学理論 (岡田)。(2) 運動対象の色の知覚 (西田) と運動に誘導され

る眼球運動 (林)。(3) 運動錯視の知覚に関する乳児の視覚発達 (山口, 金沢) と, 遮蔽錯視に関するハトのサイコフィジックス (藤田和生), さらに大きさの錯視についてのサル電気生理 (藤田一郎)。(4) fMRI 研究の最先端。サルの見事な機能地図の報告 (郷田) と, 人間を被験者とした解剖学的構造と機能デコーディングの関連性の解明 (程康)。(5) クロスモーダル知覚に関わる大脳辺縁系の神経機構 (小村)。(6) 時間知覚 (山本) と空間知覚 (金子) における環境適応的可塑性。基本論理は非常に類似していることが興味深い。(7) 初期視覚野神経活動の文脈依存性 (佐藤) とその理論的意義のモデルによる考察 (酒井)。マスキングや知覚体制化といった核心的な視覚現象が説明できる可能性が議論された。総括すれば, 今回も視覚研究者の学際的な意見交換の場として非常に有益な会となった。

(1) サル前部下側頭皮質における「顔」の記憶のニューロン表現

永福 智志, 小野 武年, 田村 了以 (富山大学大学院医学薬学研究部統合神経科学)

霊長類の腹側視覚経路は主に物体視・形態視を司り、最前部に位置する前部下側頭皮質は、複雑な物体・図形や「顔」の視覚認知・記憶に重要な脳部位である。サル前部下側頭皮質には「顔」の情報処理に特化した「顔」ニューロンの存在も報告されている。先行研究でわれわれは前部下側頭皮質腹側部 (TEav 野) が、「顔」の見え方に依存しない「顔」のアイデンティティ (view-independent facial identity) の認知に重要であることを示した (Eifuku et al., 2004)。しかし、前部下側頭皮質における「顔」の表

現が view-independent か view-dependent かは議論がある。本研究では、「顔」のアイデンティティに基づく非対称的対連合課題遂行中のサル TEav 野ニューロン活動を記録した。その結果、TEav 野において、①「顔」のアイデンティティに関する view-dependent な表現が形成されること、②「顔」のアイデンティティの記憶は view-independent な想起信号により検索されることが示された。これらの知見に基づき、サル前部下側頭皮質における「顔」の記憶表現とダイナミクスについて考察する。

(2) 運動情報を利用した色の知覚

西田 眞也 (NTT コミュニケーション科学基礎研究所人間情報研究部感覚運動研究グループ)

運動中に交代する2色が網膜上で異なる位置に提示されているにもかかわらず混じって見えるという運動混色効果は、色情報の処理が運動情報の処理とは別々におこなわれるという従来の考え方に疑問を投げかけるとともに、運動軌道に沿って色情報を統合する運動物体の色知覚にとって機能的に有用なメカニズムの存在を示唆する。視覚信号を各網膜位置で時間加算することは、S/N比の向上という観点からは望ましいが、対象が運動する

場合に運動ぼけを生じる。対象の運動軌道に沿って信号を統合すれば、運動中に色が変わらない通常の状態では、ぼけなしにS/N比を上げることができるのである。この考えから予測されるとおり、2色からなる格子刺激が色を保ちながら運動した結果として網膜上で2色が一定の時間周期で交代するような状況では同じ周期で交代するフリッカー刺激に比べて混色が生じにくいという運動色分離効果が確認された。

(3) 側頭葉のニューロンの集団ダイナミクス

岡田 真人 (東京大学大学院新領域創成科学研究科複雑理工学専攻)

我々は、Sugaseらの側頭葉の顔応答細胞の単一細胞記録からニューロンの集団ベクトルを構成し、その動的過程を主成分分析と混合正規分布によるクラスタリングで解析した。その結果、構造を持つ画像セットを入力として、集団ベクトル空間に埋め込まれた構造を探ることは、受容野の同定が難しい高次視覚野への有望なアプローチであることがわかった。

単一細胞記録では、本格的な測定の前にニューロンを選別できる。これは、実験者が集団ベクトル空間をあら

かじめ次元圧縮していることに対応する。このような手続きが行えない多ニューロン同時記録では、何からの手法で、いま取り扱っている画像の情報表現とは関係ないニューロンの寄与を自動的に削除し、集団ベクトルの次元を圧縮する必要がある。我々は、次元圧縮とクラスタリングを同時に行う手法を提案し、集団ベクトルの空間から、外界の構造が埋め込まれている低次元空間を自動的に抽出する手法を提案した。

(4) 乳児の視実験から視知覚機能の形成過程を知る

山口 真美 (中央大学文学部・JST)

私たちの研究室はこれまで、高次な視覚機能の形成過程を解明するため、乳児を対象とした視覚実験を行ってきた。具体的には、放射運動、運動透明視、主観的輪郭、形の補完、陰影情報の統合、などである。こうした複数の知覚発達の成立時期を検討すると、刺激の質的な違いを超え、月齢による知覚世界の違いが浮かび上がる。本発表では、主に5ヶ月前後に成立する知覚特性にスポットをあて、その特徴を考えていく。具体的には、運動透

明視や運動からの形態補完などの過程がちょうどこの時期に成立することから、運動情報と形態情報を統合し、なんらかのグローバルで高次な視覚過程が、この時期に成立することを示してみたい。さらには、我々が明らかにしてきたこれらの知覚発達が、先行研究が明らかにしてきた両眼立体視や絵画的奥行き手がかりの成立時期と比較し、どのような意味をもっているのかを検討し、乳児の総合的な知覚発達を検討していく。

(5) 視床におけるクロスモーダル信号処理

小村 豊 (産業技術総合研究所脳神経情報研究部門)

我々が、認識する一つ一つの対象、例えば「時計」「雨」「映画のワンシーン」、には形、色、動きなどの視覚属性や周波数などの聴覚属性が、「統合」されて感じる。過去の分析的な研究から、眼、耳などから入った感覚情報は、自動的に形、色、動きなどの視覚属性や、周波数などの聴覚属性にしたがって、各々大脳新皮質の異なる領域で分散処理されていることが、明らかになった。では、分散表現された感覚情報はどのようにして統合されるの

か？ この問いに対して、注意を伴う統合と、注意を伴わない統合を行動学的に評価できる動物モデルを確立し、脳の深部に位置する視床領域に、微小電極を挿入して、実験を行ってきた。本講演では、従来、感覚情報を中継する機能しかもたないと思われてきた視床領域においても、異なる感覚情報が相互作用している実態を紹介し、視床が、感覚情報間だけでなく、異なるイベントのつなぎ役になっている可能性について議論する。

(6) 運動視処理における二つの皮質経路

林 隆介 (京都大学医学研究科)

脳内の視覚情報処理は大きく背側経路と腹側経路に分かれ、前者は空間知覚や行動に、後者は物体認識に関わると考えられている。一方、運動視には少なくとも二種類の処理システムがある。一つは一次運動視と呼ばれる輝度変調を検出するメカニズムで、もう一つは二次運動視と呼ばれるコントラスト変調など、一次運動検出器では検出できない刺激特徴を検出するメカニズムである。一次運動視はさらに単眼性システムと両眼性システムに

分けられる。本研究では視覚誘導性の追従眼球運動が1) 単眼性一次運動視、2) 両眼性一次運動視、3) 二次運動視刺激によって誘発されるか検証した。その結果、三つの刺激はいずれも運動方向が知覚されていたにも関わらず、二次運動視刺激だけは眼球運動を誘発しなかった。このことから、皮質における運動視処理は、運動に関わる経路と意識的な知覚に関わる経路に分かれ、前者は一次運動視だけが寄与することが示唆された。

(7) fMRI を用いたサル視覚皮質における機能地図計測

郷田 直一 (生理学研究所感覚認知情報部門)

近年、サルを用いた fMRI 実験が開始され、運動・色・顔等の情報処理に関わる高次視覚領域についての新しい発見がいくつか報告されている。これらの発見は、ヒト・サルの視覚情報処理の理解に新しい展開を与える可能性があるが、これらを含むサル高次視覚領野の区分や機能にはまだ不明な点も多い。我々は、2頭のサルについて fMRI 実験を行い、運動ランダムドット刺激や物体画像刺激、色モンドリアン刺激等の種々の視覚刺激を用いて、

運動・形・色情報処理に関する機能地図及び視野地図の計測を行っている。その結果、運動・形・色に強い選択性を示す領域は下側頭皮質内においてそれぞれ複数の領域に局在していること、またその分布には違いがみられることが明らかになってきた。本発表ではこれまでに得られた結果を合わせて報告し、視覚皮質内の機能地図について考察する。

(8) 大きさ知覚の恒常性と V4野両眼視差選択性細胞

藤田 一郎 (大阪大学大学院・生命機能研究科・認知脳科学研究室)

物体の網膜投影像は、観察者から物体までの距離に応じて変化するにもかかわらず、われわれの知覚する物体の大きさは安定している。この心理現象(大きさ恒常性)において、脳は、物体までの距離情報を用いて、知覚される大きさを補正する。たとえば、距離情報を与える視覚てがかりの一つである両眼視差を操作すると、大きさの知覚は系統的に影響を受ける。脳のどこで、両眼視差情報と大きさ情報は相互作用するのだろうか。マカカ属

サルにおいて、V4野が立体視および物体の大きさ弁別に関わる証拠があることから、われわれは、ニホンザルのV4野において神経細胞反応を調べた。V4野には、刺激サイズに対する選択性が刺激の持つ両眼視差によって変化する細胞があり、その変化の度合いや方向は、ヒトを対象とした心理物理学実験の結果と一致していた。V4野の神経細胞が大きさ恒常性の形成に関与していることを提案する。

(9) 視聴覚の時間順序判断における同時性のベイズ較正

山本 慎也 (産業技術総合研究所脳神経情報研究部門)

連続して提示される音刺激と光刺激の時間順序の判断において、刺激の時間差の分布が偏っているとき、頻繁に起こる順序が同時に知覚される傾向があることが知られている(時差順応: Fujisaki et al., 2004; Miyazaki et al., 2006)。一方、両手に1発ずつ与えられた機械刺激の時間順序の判断においては、刺激の時間差の分布が偏っているとき、同時に与えられた刺激が頻繁に起こる順序に知覚される傾向にある(ベイズ較正: Miyazaki et al., 2006)。

今回我々は、視聴覚の時間順序判断にもベイズ較正が存在することを証明するために、2種類の音刺激(音Aは音刺激先行傾向、音Bは光刺激先行傾向)と1種類の光刺激を用い、各音刺激と光刺激の時間順序判断を交互に行った。その結果、それぞれの音刺激と光刺激の時間順序判断がベイズ較正方向に変化し、視聴覚の時間順序判断においてもベイズ較正が生じていることが示された。

(10) 空間知覚の環境適応のための方略

金子 寛彦 (東京工業大学像情報工学研究施設)

人間の空間知覚は視覚環境に適応して変化する。この適応変化はいくつかの方略に基づいて行われるが、その一つは、空間知覚手がかりの統合過程における各手がかりの寄与度（重み）の変化によるものである。ある手がかりの空間情報としての信頼性が高い環境において空間知覚に基づく課題を繰り返し行くと、その手がかりの重みが増加する。この性質は空間知覚の個人差と大きく関わっていると考えられ、ある手がかりの信頼性が高い環

境に長年いたと推定される個人の空間知覚では、その手がかりの重みが大きい。この他にも、ある手がかりと空間知覚の対応関係の再校正、あるいは新たな空間知覚手がかりの獲得といった方略によっても空間知覚の適応変化が起こると考えられる。今回は、成人の空間知覚における適応変化に関わる心理物理学的研究データを紹介し、この機能の重要性や各方略が用いられる条件や範囲などについて考察する。

(11) 高空間解像度 fMRI による大流出静脈中の方位選択性信号検出

程 康 (独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター)

近年、いくつかの研究室では V1 の fMRI 信号から縞状刺激の方位を検出するために、一般的な解像度 (3mm 程度) の fMRI 計測を使ったクラス判別解析が行われています。いくつかの voxel から、有意に方位選択性信号が検出されています。1mm 以下と考えられる皮質コラム構造に表現されている神経表現を探ることができるということは、大変興味深い事実です。私たちは空間解像度によりクラス判別性能がどれだけ変化するかを調べることによって検討しました。高空間解像度撮像 (面内解像度 0.75x0.75mm) を行い、面内解像度およそ 1x1cm に

至るまで再サンプリングされた voxel について刺激の方位に依存した信号を正確にクラス判別する事が可能でした。高空間解像度におけるクラス判別解析の結果を調べたところ、残された方位選択特性は流出静脈によるものでした。皮質面に沿って一方向に長くのびた領域が解析の中で大きく影響しており、一様に再現性の高い方位偏向性を示していることがわかりました。流出静脈は多くの異なる方位選択コラムを含む広い皮質領域から血液を集めていると考えられるので、この結果は驚くべきことでした。

(12) 霊長類と鳥類の視覚的補間と錯視

藤田 和生 (京都大学文学研究科)

ヒト以外の動物たちは、この物理的世界をどのように見ているのだろうか。この問いは単に博物学的興味を満たすだけのものではなく、知覚の進化を明らかにし、ヒトのそれがなぜ現在のようになっているのかを考察する上で重要である。本講演では、霊長類と鳥類の視覚的補間と錯視について演者がおこなった一連の研究を簡潔に紹介する。視覚的補間に関しては、霊長類 (チンパンジー, アカゲザル, フサオマキザル) はほぼヒト同

様に部分隠蔽図形を補間して認識することがわかったが、鳥類 (ハト) では、補間を促進すると思われる多様な刺激操作にもかかわらず、肯定的な結果は得られなかった。錯視については、ポンズ錯視, ミュラーリヤー錯視, エビングハウス錯視について種比較をした。霊長類も鳥類も錯視自体は経験するが、いくつかの側面では大きな種差が見られた。視知覚のありようと、系統ならびに生活史の関連について論じる。

(13) ネコ一次視覚野における刺激文脈依存的反応修飾の時空間特性

佐藤 宏道, 七五三木 聡, 石川 理子, 木田 裕之
(大阪大学医学系研究科認知行動科学・生命機能研究科)

一次視覚野 (V1) ニューロンの受容野刺激に対する応答は受容野周囲に呈示した刺激により抑制性修飾 (刺激文脈依存的反応修飾) を受ける。この修飾は受容野内外の刺激の図形特徴に強く依存し, 知覚的な「視野の分節化」の元になっていると考えられる。この現象のメカニズムを検討する目的でネコの V1 において生理実験を行い, ニューロンの受容野内に円形グレーティング, 受容野周囲にグレーティングアニュラスを呈示し, 反応の時

間経過と刺激パラメータ依存性について解析した。その結果, 受容野に隣接した狭い範囲の周囲刺激による抑制とさらにその外側の領域を刺激したときの抑制とでは, 潜時, 持続性, 方位選択性, 低空間周波数選択性, 空間加算性に差が見られた。この結果は, 時間特性, 刺激チューニング特性, 空間特性を異にする入力チャンネル間の相互作用が V1 レベルで存在することを示唆している。ヒトの視覚マスキング実験の結果と併せて解説したい。

(14) 周辺変調による図方向検出—計算論的アプローチ

酒井 宏 (筑波大学大学院システム情報工学研究科)

輪郭のどちら側に図があるか (Border Ownership) を決定することは, 形状知覚にとって重要なプロセスである。V2, V4 の BO 選択性細胞の起源が周辺変調である可能性が示唆されている。本研究では, 頑健な BO 決定に必要とされる周囲構造の特徴を計算論的に求めた。疑似ランダム・ブロック刺激と, ランダムな周囲構造をもつモデル細胞を使ったシミュレーション実験を行ったところ, 最適図方位に促進領域, その逆側に抑制領域をもつ

約 75% のモデル細胞が高い頑健性を示した。また, 高い頑健性を示すモデル細胞の全てが, 最適図方位の逆側に抑制領域にもっていた。これらの結果は, 古典的受容野に対して非対称な周囲構造があれば頑健な BO 知覚が可能であることを示す。さらに, 同様の刺激群の BO 判定に要するヒトの反応速度と, モデル細胞の頑健性には, 有意な負の相関が観察された。これらの結果は, BO 選択性が周囲構造によって生起していることを支持する。

6. シナプス可塑性の分子的基盤

2007年6月21—6月22日

代表・世話人：真鍋 俊也（東京大学 医科学研究所）

所内対応者：井本 敬二（神経シグナル研究部門）

- (1) 神経伝達物質放出において RIM1 と電位依存性 Ca^{2+} チャンネル β サブユニットとの結合がもたらす 2 つの機能

清中 茂樹¹, 若森 実^{1,2}, 三木 崇史¹, 瓜生 幸嗣¹, 野中 美央³
尾藤 晴彦³, Beedle, Aaron M⁴, 森 恵美子¹, 原 雄二^{1,4}, De Waard, Michel⁵, 金川 基⁴
板倉 誠⁶, 高橋 正身⁶, Campbell, Kevin P⁴, 森 泰生¹
(¹京大・工, ²東北大・歯, ³東大・医, ⁴アイオワ大学・医, ⁵Inserm U607, ⁶北里大・医)

- (2) LKS/CAST Regulates Synaptic Short-Term Plasticity by Recruiting bMunc13-2 to Active Zones

Hiroshi Kawabe (川辺 浩志)

(Max-Planck-Institut fuer Experimentelle Medizin Abteilung Molekulare Neurobiologie)

- (3) シナプス小胞の分子解剖学的解析からみたグルタミン酸取込過程の制御機構

高森 茂雄（東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 脳神経病態学分野）

- (4) ラフトアンカー型神経特異的 CaM キナーゼ, CLICK-III/CaMKI γ による樹状突起形成制御

上田（石原）奈津実, 竹本-木村 さやか, 野中 美応, 尾藤 晴彦
(東京大学 大学院医学系研究科 神経生化学教室)

- (5) 新規リガンド・受容体 LGI1/ADAM22 によるシナプス機能制御

深田 優子（生理学研究所 生体膜研究部門）

- (6) L-type voltage-dependent Ca^{2+} -channel gamma (Cacng) ファミリーの解析

板倉 誠（北里大学 医学部）

- (7) Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II による海馬シナプス可塑性の制御

山肩 葉子（生理学研究所 神経シグナル研究部門）

- (8) 発達期小脳におけるシナプス選別・除去に対する GABA 作動性シナプス伝達の役割

狩野 方伸, 中山 寿子, 橋本 浩一

(大阪大学大学院 医学系研究科 細胞神経科学)

【参加者名】

真鍋俊也（東京大学医科学研究所），川辺浩志（Max-Planck-Institute），澤田光平，畠中謙（エーザイ 創薬第一研究所），篠江徹，片山憲和，海津正賢，（東京大学医科学研究所），小林静香，尾藤晴彦，上田（石原）奈津実（東京大学医学系研究科），板倉誠，高橋正身（北里大学医学部），井ノ口馨，新堀 洋介（三菱化学生命科学研究所），畑裕，高森茂雄（東京医科歯科大学），大塚

稔久（富山大学医学薬学研究部），片岡正和（信州大学工学部），森泰生，森恵美子，三木崇史，瓜生幸嗣，清中茂樹（京都大学工学研究科），狩野方伸（大阪大学医学系研究科），山肩葉子，宮田麻理子，沼田朋大，井上剛，佐竹伸一郎，南雲康行，中川直，竹内雄一，川上良介，瀬藤光利，釜澤尚美，古家園子，鍋倉淳一，石橋等，深澤有吾，深田正紀，深田優子，井本敬二（生理研）

(1) 神経伝達物質放出において RIM1と電位依存性 Ca²⁺チャネルβサブユニットとの結合がもたらす2つの機能

清中 茂樹¹, 若森 実^{1,2}, 三木 崇史¹, 瓜生 幸嗣¹, 野中 美央³
尾藤 晴彦³, Beedle, Aaron M⁴, 森 恵美子¹, 原 雄二^{1,4}, De Waard, Michel⁵, 金川 基⁴
板倉 誠⁶, 高橋 正身⁶, Campbell, Kevin P⁴, 森 泰生¹
(¹京大・工, ²東北大・歯, ³東大・医, ⁴アイオワ大学・医, ⁵Inserm U607, ⁶北里大・医)

神経線維を伝播してきた活動電位に正確に反応して「神経伝達」が生じるためには、前シナプスから後シナプスへの厳密な神経伝達物質の放出が必要である。それを実現するために、プレシナプスのアクティブゾーンと呼ばれる構造体においては、シナプス小胞、電位依存性 Ca²⁺チャネル (VDCC), Ca²⁺依存的に膜融合を制御する SNARE タンパク質等が、「足場」タンパク質を介して集積していると考えられている。今回、我々はアクティブゾーンタンパク質として知られる RIM1 の C 末端と VDCC のβサブユニットが相互作用していることを明らかにした。BHK 細胞の組み換え発現系を用いてその影響を電気生理学的に評価したところ、Ca²⁺チャネルの不活性化の性質において大きな影響を観測できた。通常 VDCC においては、活性化開口した後に不活性化状態へと移行して Ca²⁺流入が減衰してしまうが、RIM1 がβサブユニットに結合すると不活性化状態への移行は阻害され

Ca²⁺流入が持続することがわかった。また、蛍光標識した neuropeptide Y (NPY) を発現させた PC12 細胞の細胞膜近傍の dense core vesicle 数を全反射顕微鏡を用いて評価したところ、全長の RIM1 を過剰発現させた際において vesicle 密度が増加し、一方その結合を阻害させるドミナントネガティブ体を過剰発現させると vesicle 密度が減少した。これらの結果は、PC12 細胞を用いた神経伝達物質の放出機構からも支持され、RIM1 全長や C 末端を過剰発現させた場合にはアセチルコリン放出が増加され、一方ドミナントネガティブ体を発現させた際には放出が減少した。以上の結果から、アクティブゾーンにおける RIM1-VDCCβサブユニットの結合は、シナプス小胞を Ca²⁺チャネル近傍につなぎとめ、Ca²⁺チャネルの不活性化を防ぐことで Ca²⁺流入を持続させるという、神経伝達物質放出における 2 つの重要な役割を有していると考えられる。

(2) LKS/CAST Regulates Synaptic Short-Term Plasticity by Recruiting bMunc13-2 to Active Zones

Hiroshi Kawabe (川辺 浩志)

(Max-Planck-Institut fuer Experimentelle Medizin Abteilung Molekulare Neurobiologie)

Active zones are unique subcellular structures at neuronal synapses. They contain a network of specific proteins that mediates and coordinates synaptic vesicle docking, priming, and Ca²⁺ triggered fusion, and spatially restricts these processes to presynaptic terminals. Six active zone specific proteins have been cloned; Bassoon, Piccolo, RIMs, Munc13s, ELKS/CAST, and Liprin. The Munc13 proteins Munc13-1, ubMunc13-2, bMunc13-2, and Munc13-3 are among the best characterized active zone components. Our group has reported that deletion of Munc13-1 and Munc13-2

genes abolishes synaptic vesicle priming, resulting in a complete block of spontaneous and evoked synaptic transmission in hippocampal neurons. This result indicates that 1) Munc13s are essential for priming and that 2) there are only three Munc13s expressed in hippocampal neurons, Munc13-1, bMunc13-2, and/or ubMunc13-2. The active zone specific localization of different Munc13s and their functional differences are key contributors to the active zone restriction of transmitter release, to the speed of excitation secretion coupling, and to short-term plasticity characteristics of

individual synapses. In my talk, I would like to show that bMunc13-2 is sorted to a limited population of synapses in hippocampal neurons, where they mediate short-term synaptic facilitation and may determine neuronal network characteristics. I will also show that in contrast to Munc13-1, which is recruited to synapses and regulated by RIMs, active zone recruitment of bMunc13-2 and bMunc13-2 dependent

short-term plasticity are regulated by direct ELKS/CAST binding. I would like to discuss an alternative sorting machinery of Munc13 proteins and the possibility that active zone proteinaceous networks containing either RIMs or ELKS/CAST may serve as platforms for the differential recruitment and regulation of Munc13-1 and bMunc13-2, respectively.

(3) シナプス小胞の分子解剖学的解析からみたグルタミン酸取込過程の制御機構

高森 茂雄 (東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 脳神経病態学分野)

シナプス小胞は、神経終末に存在し、神経伝達物質を貯蔵する細胞内小器官である。神経伝達物質を充填したシナプス小胞はアクティブゾーンに移動し、形質膜と物理的に接着する。その後、プライミングと呼ばれる過程を経て膜融合可能な状態になり、刺激が終末に到達すると、電位依存性カルシウムチャネルからのカルシウム流入が引き金となり小胞膜と形質膜の膜融合が喚起され、小胞内腔の神経伝達物質の放出が起こる。これをエキソサイトosisと呼ぶ。形質膜と融合した小胞の膜構成成分は、エンドサイトosisと呼ばれる過程により、新たに合成されたシナプス小胞に組み込まれ、再度神経伝達物質を取り込むことで、次のエキソサイトosisに備える。このようなシナプス小胞のライフサイクルを支える小胞膜タンパク質の同定を目指す研究は、1980年代より盛んに行われて来ており、膜融合に必須な SNARE タンパク質である Synaptobrevin, エキソサイトosisのカルシウムセンサーである Synaptotagmin, 神経伝達物質の取込に関わるトランスポータータンパク質等、重要な分子群が相次いで同定され、個々のタンパク質の性状解析に

関しては顕著な進展が達成されてきた。一方で、これらのタンパク質群は他の分子と相互作用して機能を発現したり、タンパク質の発現量がシナプス伝達効率を左右する可能性が示唆されているものの、シナプス小胞の構成成分の定量的なデータは、これまでほとんど皆無であった。また、直径約 40 ナノメートルの小さな膜構造体であるシナプス小胞に、タンパク質や脂質がどのように空間的に配置されているか、その細胞内小器官としての構造的全体像は不明であった。我々は、ラット脳より高度に精製したシナプス小胞を材料として用い、生化学的定量・物理化学的手法・電子顕微鏡等を組み合わせることにより、平均的なシナプス小胞に存在する主要な構成成分の分子数を算出し、それぞれの構成成分の三次元構造情報(占有体積の推定)を組み込んだシナプス小胞分子構造モデルの構築を行った。

本セミナーでは、上記の研究成果を概説すると共に、神経伝達物質のシナプス小胞への取込過程の制御機構に関して、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸に焦点を当て、最近の研究成果も交えて考察したい。

(4) ラフトアンカー型神経特異的 CaM キナーゼ, CLICK-III/CaMKI γ による樹状突起形成制御

上田 (石原) 奈津実, 竹本-木村 さやか, 野中 美応, 尾藤 晴彦
(東京大学 大学院医学系研究科 神経生化学教室)

神経細胞は遺伝的因子ならびに環境因子に基づき軸索と樹状突起を適切に発達させ、神経回路を形成する。この際、神経活動や神経成長因子などのリガンド刺激によ

る細胞内 Ca²⁺上昇が形態変化誘導において重要な役割を果たすとされるが、Ca²⁺上昇を細胞骨格変化へと結びつける分子機構に関する知見は少ない。さらに軸索、樹状

突起という一見類似するが全く異なる性質を持つ2種類の突起が選択的に形成、伸展する分子的機構については不明点が多い。

我々が同定した、カルシウム/カルモデュリン依存性タンパク質リナーゼ (CaMK) γ /CLICK-III (CL3) は神経突起形成が盛んである胎生後期のマウス大脳皮質に多く発現していた。そこで CaMKK-CaMKI 経路が神経細胞形態形成や突起伸展調節の機能を有しているという可能性を検討した。

まず我々は cortical neuron を用い、CL3 のノックダウンを行った。その結果、樹状突起の数および合計長が有意に減少したが、軸索形成、軸索伸展に全く影響はなかった。また、CL3 ノックアウトマウスから作成した cortical neuron においても同様の表現型が得られ、CL3 機能低下

と樹状突起形成の抑制の相関が見出された。

続いて、CL3 による樹状突起形成制御に関与するシグナル伝達経路を探索したところ、CL3 が BDNF 刺激の下流で樹状突起形成に関与することを見出した。また、CL3 は CaMKI アイソフォームの中でも唯一 CaaX モチーフを持つため、膜局在を示し、さらに、パルミトイル化修飾も受けることにより脂質ラフトに局在することが明らかとなった。さらに、CL3 の下流で働く Rac GDP-GTP 交換因子である STEF と Rac も共にラフトに存在することを示し、CL3 のラフト局在が樹状突起形成に重要であることも示した。このことから、ラフトアンカー型 CL3/CaMK γ は BDNF 刺激の下流で STEF, Rac を介して樹状突起形成を制御していることが示唆された。

(5) 新規リガンド・受容体 LGI1/ADAM22によるシナプス機能制御

深田 優子 (生理学研究所 生体膜研究部門)

AMPA 型グルタミン酸受容体は脳内の主要な興奮性神経伝達を司り、その機能発現がシナプス伝達効率と密接に関連することから、AMPA 受容体を制御する分子機構の解明は極めて重要な命題である。最近、私共は脳組織より AMPA 受容体複合体を精製することに成功し、Stargazin と PSD-95 が主要構成蛋白質として AMPA 受容体と関連することを見出した。この生化学的知見は Stargazin が AMPA 受容体の附属サブユニットであることを示唆していた遺伝学的知見と一致し、Stargazin と PSD-95 が AMPA 受容体機能の中心的な制御分子であることを明らかにした。一方、PSD-95 はポストシナプス蛋白質の数パーセントを占めるといわれる足場蛋白質であるが、実際生体内でどのような蛋白質複合体を形成して機能しているのかは完全には明らかにされていなかった。今回、私共は PSD-95 を含む蛋白質複合体をラット脳より精製し、その主要な構成蛋白質として LGI1, ADAM22 および Stargazin を同定した。これら3つの蛋白質はいずれも神経組織に特異的に発現し、ヒトあるいは

マウスの遺伝学的解析によりてんかん・けいれん関連遺伝子として報告されており、機能的にも互いに関連していると考えられた。複合体の機能解析により分泌蛋白質 LGI1 が細胞膜貫通蛋白質 ADAM22 のリガンドとして機能し、AMPA 受容体を介したシナプス伝達を促進することを見出した。LGI1・ADAM22 は AMPA 受容体機能を制御する新たな経路を担っていると考えられる。さらに、LGI1 の作用機構を明らかにするために、独自に開発した Tandem Affinity Purification 法にて LGI1 複合体を脳組織より精製したところ、ADAM22 の類縁蛋白質 ADAM23 が LGI1 のもう一つの受容体であり、LGI1, ADAM22, ADAM23 がひとつの蛋白質複合体として存在することを見いだした。また、LGI1 は固有のファミリー (LGI1, 2, 3, 4) を形成しており、LGI1 および LGI4 のみが ADAM22, ADAM23 と結合することを見いだした。現在、LGI ファミリーの各受容体の探索、分泌機構の解明を進めている。これらの知見を踏まえて LGI1 がどのようにして AMPA 受容体機能を制御しているかを議論したい。

(6) L-type voltage-dependent Ca^{2+} -channel gamma (Cacng) ファミリーの解析

板倉 誠 (北里大学 医学部)

骨格筋の L-type voltage-dependent Ca^{2+} -channel gamma subunit (Cacng1) は、1つの N 型糖鎖結合部位と 4 つの膜貫通領域を持った膜タンパク質である。Cacng1 には他に 7 つの相同な遺伝子が存在し、Cacng ファミリーを形成している。さらに Cacng ファミリーのうち、Cacng2, 3, 4 および 8 はイオンチャンネル型グルタミン酸受容体である AMPA 型受容体に結合することから、transmembrane AMPA receptor regulatory proteins (TARPs)とも呼ばれている。我々は Cacng ファミリーそれぞれの特異抗体を製作し、生化学的解析を行っている。Cacng ファミリーの脳での発現パターンはファミリーごとに非常に異なっており、それぞれの領域のシナプス伝達制御の多様性に関わっていると考えられる。

海馬では主に Cacng2 と Cacng8 が発現している。Cacng2 と Cacng8 の細胞内局在を検討したところ、共にポストシナプス膜に存在しているが Cacng8 は細胞内小胞系にも比較的多く局在していることが明らかとなった。また、細胞膜においても Cacng2 はポストシナプス膜に局在しているのに対し、Cacng8 はポストシナプス膜

だけでなくエクストラシナプス膜にも存在していた。Cacng8 はカルボキシ末端の細胞内領域が Cacng2, 3, 4 より長く、この領域が Cacng8 の特異的な機能に関与していると考えられる。そこで、Cacng2 と Cacng8 のシナプス伝達制御機構の違いを明らかにするために、Cacng2, Cacng8 のキメラ分子を用いた解析や C 末領域のリン酸化サイトの同定および解析を行っている。

また、Cacng8 を含有している細胞内小胞を単離したところ AMPA 型受容体の GluR1, GluR2 サブユニットが共局在していた。含有する GluR2 の糖鎖は Endo H 耐性であり Cacng8 を含有する小胞は小胞体ではないことがわかった。そこでこの小胞が含有しているタンパク質を MALDI-TOF-MS および LS/ESI-MS/MS によって同定した。その結果、ER-Golgi 輸送タンパク質および Endosomal recycling に関係するタンパク質が同定されてきた。GluR2 は小胞体に蓄積されていることが知られており、Cacng8 は AMPA 型受容体の recycling だけでなく小胞体から細胞膜までの輸送制御にも関与している可能性が示された。

(7) Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II による海馬シナプス可塑性の制御

山肩 葉子 (生理学研究所 神経シグナル研究部門)

海馬 CA1 領域におけるシナプスの長期増強 (LTP) は、高次脳機構のひとつである学習・記憶の細胞・分子メカニズムを解明するための基本モデルと考えられ、LTP に関与する分子について、多くの研究が進められてきた。中でも、 Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMKII) は LTP に必要な分子として注目を集めている。GFP ラベルした CaMKII α を培養細胞へ導入し、その動態を観察した実験や、CaMKII α の自己リン酸化部位を非リン酸化型に変異させたノックインマウス (T286A, T305D, TT305/306VA) の解析から、自己リン酸化による CaMKII α の持続的な活性化と刺激依存的なシナプス部への移行が、重要であることが明らかとなってきた。しかしながら、CaMKII がどのような過程を経て、

最終的にシナプスの増強を引き起こすのかについては、未だ不明な点が多い。

そこで、我々は、CaMKII α の ATP 結合に必要なアミノ酸残基を置換することにより不活性型としたノックインマウス (K42R) を新たに開発し、このマウスを用いて上記シナプス可塑性のメカニズムの解明に取り組んでいる。

本研究会では、CaMKII α (K42R) マウスについて、生化学的解析、海馬スライス標本を用いた電気生理学的解析 (東大医科研, 真鍋研究室との共同研究)、海馬培養神経細胞を用いた細胞生物学的解析 (東京医科歯科大, 岡部研究室との共同研究) の結果を紹介し、CaMKII α が海馬シナプス可塑性に果たす役割と今後の展望について考察したい。

(8) 発達期小脳におけるシナプス選別・除去に対する GABA 作動性シナプス伝達の役割

狩野 方伸, 中山 寿子, 橋本 浩一

(大阪大学大学院 医学系研究科 細胞神経科学)

脳機能の発現には、生後発達期に、神経細胞が“適切な相手”と“適切な強さ”のシナプスを形成することが重要である。発達初期には一時的に過剰なシナプス結合が形成されるが、必要なシナプスの強化と不必要なものの除去という過程を経て、しだいに機能的な神経回路網が形成される。この過程には神経活動が重要な役割を果たすと広く考えられているが、そのメカニズムの詳細は必ずしも明らかではない。中枢神経系では個々のニューロンに極めて多くの多様なシナプス入力が存在するため、この課題を定量的に解析できる実験系はほとんど存在しないが、小脳登上線維-プルキンエ細胞シナプスは、末梢の神経筋シナプスに匹敵する定量的解析を電気生理学と形態学の両面から行なうことが可能なモデル系である。これまでの研究から、生直後のマウスのプルキンエ細胞は同等な強度を持った複数の登上線維によって多重支配されているが、生後1週目に起こる1本の登上線維の選択的強化に続いて、他の登上線維の形態的なシナプス除去が起こり、マウスでは生後20日で殆どのプルキンエ細胞が単一の登上線維による支配を受けるようになることが知られている。先行研究から、小脳平行線維-プルキンエ細胞シナプスにおける代謝型グルタミン酸受容体を介した細胞内シグナル伝達が生後2週目に起こる登上線維シナプスの除去過程に重要であることが報告されている。それに対して、プルキンエ細胞の興奮性に大きく影響を与える抑制性シナプス伝達の関与については全く検討されていない。

本研究では、GAD67-GFP (Δ neo) knock-in mouse (GAD67^{+/GFP}, GABA合成酵素のひとつであるGAD67の遺伝子座にGFPを挿入したマウス)を用いて、GABA作動性伝達が小脳登上線維-プルキンエ細胞間シナプスの生後発達に果たす役割を調べた。(1) GAD67^{+/GFP}マウスでは、生後11日目以降の登上線維の除去過程に異常が認められた。(2) GADインヒビター(3-メルカプトプロピオン酸)を含むElvax片を生後10日目に小脳皮質表面に処置した動物でも、登上線維による多重支配の残存が認められた。従って、小脳皮質におけるGAD活性の低下が多重支配の原因であると考えられた。(3) GABA_A受容体を介したプルキンエ細胞の活動制御は、生後発達に伴い興奮性から抑制性に大きく変化したが、生後10日目では抑制性であったことから、GAD67^{+/GFP}ではGAD活性の低下によってプルキンエ細胞への抑制が減弱している可能性が考えられた。(4) そこで、生後10-15日目で微小抑制性シナプス電流(mIPSC)を比較したところ、GAD67^{+/GFP}マウスではmIPSCの振幅がコントロールと比べて有意に減少していた。(5) mIPSCの減弱が多重支配の原因であるかを調べるために、GABA_A応答を増進するジアゼパムを、生後10日目からGAD67^{+/GFP}の小脳皮質に投与したところ、シナプス除去の障害がレスキューされた。以上の結果から、生後10日目以降のGABA_A受容体を介する抑制性シナプス伝達が、小脳登上線維-プルキンエ細胞間シナプスの除去に重要であることが示唆された。

7. 生体システム間境界領域における ATP・アデノシン情報伝達の役割

2007年9月6日-9月7日

代表・世話人：南 雅文（北海道大・薬・薬理学）

所内対応者：井本 敬二（神経シグナル）

- (1) 【特別講演】P2Y₁₂受容体拮抗薬における抗血小板作用
梅村和夫（浜松医大・薬理学）
- (2) 心臓の線維化における ATP 受容体の役割
西田基宏，上村綾，大串真理子，黒瀬等
（九州大学・大学院薬学研究院・薬効安全性学分野）
- (3) 腎循環病態におけるアデノシン A1 受容体の役割
矢尾幸三（協和発酵工業(株) 医薬研究センター 薬理研究所）
- (4) 血管内皮 P2X₄ を介した循環機能調節
山本希美子，安藤譲二（東京大学 大学院医学系研究科 システム生理学）
- (5) 細胞外ヌクレオチドを介した損傷神経細胞-グリア細胞連関
小泉修一¹，最上由香里²，多田 薫²，篠崎陽一²，大澤圭子³，津田 誠⁴，高坂新一³，井上和秀⁴
（¹山梨大学・医・薬理，²国立衛研・薬理，³国立精神神経センター，⁴九州大・院・薬・薬理）
- (6) 神経-泌尿器システム間情報伝達におけるプリン作動性シグナルの役割
河谷 正仁（秋田大学医学部機能制御医学講座）
- (7) 表皮ケラチノサイトから感覚神経への温度情報伝達機構：ATP の役割
富永真琴（岡崎統合バイオサイエンスセンター（生理学研究所）細胞生理研究部門）
- (8) 細胞外 ATP による細胞周期と遊走性の調節
尾松万里子（滋賀医科大学・生理学講座・細胞機能生理学部門）
- (9) 皮膚・結合組織の知覚終末グリア細胞における ecto-ATPase の局在とその役割について
岩永ひろみ（北海道大学 大学院医学研究科 組織細胞学分野）
- (10) 神経因性疼痛発症過程における P2Y₁₂ 受容体の関与
齊藤 秀俊，津田 誠，井上 和秀（九州大学大学院 薬学研究院薬理学分野）
- (11) 孤束核シナプス前 P2X 受容体の意義-その再検討 Revisiting the presynaptic P2X receptors
in the nucleus of the solitary tract
加藤総夫¹，井村泰子¹，繁富英治¹，安井豊¹，山本清文¹，山田千晶¹，
武田健太郎¹，山本希美子²，安藤譲二²（¹東京慈恵会医科大学・神経生理学，
²東京大学大学院・医・医用生体工学・システム生理学）
- (12) Astrocytic control of synaptic NMDA receptors
Changjoon Justin Lee (Center for Neural Science, Division of Life Sciences, KIST
(Korea Institute of Science and Technology), Seoul 136-791, Korea)
- (13) シナプス小胞の分子解剖学的解析
高森 茂雄（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・脳神経病態学分野・COE 特任講師）
- (14) 小脳におけるニューロン-グリア細胞間の情報伝達
松井 広（自然科学研究機構 生理学研究所 脳形態解析研究部門）

- (P 1) カフェイン誘発 ATP 放出への小胞体-ミトコンドリア Ca^{2+} 連関の関与
桂木 猛 (福岡大・医・総医研), 佐藤千江美 (同 薬理),
薄根貞治 (同 機能研), 右田啓介, 上野伸哉 (弘前大・脳研・生理)
- (P 2) マウスマクロファージ J774 細胞におけるプリン受容体作動性シグナルと
プロスタグランジン E_2 シグナルとのクロストーク
伊藤 政明, 松岡 功 (高崎健康福祉大学・薬学部・薬効解析)
- (P 3) マウス T 細胞における ATP ならびに NAD による $P2X_7$ 受容体活性化の相違
前畑真知子, 原田 均, 出川雅邦 (静岡県立大・薬)
- (P 4) ATP 刺激によるアンジオテンシン受容体の発現低下の分子メカニズム
大串真理子, 須田玲子, 西田基宏, 黒瀬等
(九州大学大学院 薬学府 創薬科学専攻 薬効安全性学分野)
- (P 5) ミクログリアからの ATP 誘発ケモカイン放出における NFAT の関与
片岡彩子, 齊藤秀俊, 津田誠, 井上和秀 (九州大学大学院薬学研究院・薬理学分野)
- (P 6) ATP および神経細胞傷害によるミクログリアでの MIP-1 α 産生誘導
片山貴博¹, 大日方千紘¹, 岡村敏行^{1,2}, 上原 孝¹, 大谷賀一², 中村美香², 佐藤公道², 南 雅文
(¹北海道大学薬学研究院薬理学研究室, ²京都大学薬学研究所生体機能解析学分野)
- (P 7) ATP 誘発アロディニア発症機構-グリシン作動性抑制系の関与
森田克也, 本山直世, 北山友也, 土肥敏博
(広島大学大学院医歯薬学総合研究科病態探究医科学講座歯科薬理学)
- (P 8) 脊髄運動ニューロンにおけるプリン受容体を介するシナプス前性および後性作用
青山 貴博, 中塚 映政, 古賀 秀剛, 藤田 亜美, 熊本 栄一
(佐賀大学医学部生体構造機能学講座神経生理学分野)
- (P 9) 原子間力顕微鏡を用いた $P2X_4$ 受容体の一分子イメージング
篠崎陽一¹, 住友弘二¹, 津田誠², 小泉修一³, 井上和秀², 鳥光慶一¹
(¹NTT 物性研・生体機能, ²九大・院・薬理, ³山梨大・院・医・薬理)

【参加者名】

南雅文 (北海道大学薬学研究院), Lee, Changjoon Justin (Korea Institute of Science and Technology), 岩永ひろみ (北海道大学医学研究科), 河谷正仁 (秋田大学医学部), 伊藤政明, 松岡功 (高崎健康福祉大学薬学部), 今井利安 (日本ケミファ創薬研究所), 高森茂雄, 半場道子 (東京医科歯科大学医歯学総合研究科), 加藤総夫 (東京慈恵会医科大学総合医科研), 川村将仁, 西晴久 (東京慈恵会医科大学医学部), 山本希美子 (東京大学医学系研究科), 篠崎陽一 (NTT 物性科学基礎研究所), 矢尾幸三, 比護勝哉 (協和発酵工業医薬研究センター), 藤下加代子, 小泉修一 (山梨大学医学工学総合研究部), 原田均 (静岡県立大学薬学部), 梅村和夫 (浜松医科大学医学部), 古家喜四夫 (科学技術振興機構 SORST/ICORP),

Lopez-Redobdo, Fernando, 田中基樹 (名古屋大学医学部), 尾松万里子 (滋賀医科大学医学部), 山下勝幸 (奈良県立医科大学 医学部), 小林希実子 (兵庫医科大学医学部), 土肥敏博, 森田克也 (広島大学医歯薬学総合研究科), 井上和秀, 大串真理子, 齊藤秀俊, 津田誠, 西田基宏 (九州大学薬学研究院), 北野順子, 辻川智子, 長谷川茂雄, 増田潤哉, 増田隆博, 宮田広行, 山下智大, 片岡彩子, 下山裕 (九州大学薬学府), 桂木猛 (福岡大学医学部), 青山貴博, 中塚映政 (佐賀大学医学部), 野中茂紀 (基生研), 富永真琴 (岡崎統合バイオ・生理研), 松井広, 加勢大輔, 竹内雄一, 中川直, 南雲康行, 井上剛, 佐竹伸一郎, 竹林浩秀, 古家園子, 深田正紀, 深田優子, 高橋信之, 井本敬二 (生理研)

(1) 【特別講演】 P2Y₁₂受容体拮抗薬における抗血小板作用

梅村和夫 (浜松医大・薬理学)

血小板の活性化は血栓性疾患において重要な役割をしている。血小板を活性化させるものとして、トロンボキサン A₂, ADP, トロンビン, セロトニン等の生理活性物質だけでなく、膜表面に存在する接着分子を介するものや、ずり応力によるメカニカルな刺激によっても血小板は活性化する。血小板は血管内皮細胞が損傷され、内皮下組織が露出するような動脈硬化病変に粘着し、凝集を起こし血小板血栓を形成する。その際に活性化した血小板膜上で凝固系が活性化し、フィブリンネットを形成し血栓を強固なものにし、成長すると血管を閉塞し心筋梗塞や脳梗塞を引き起こす。血小板の活性化を抑制する薬物として、アスピリンやクロピドグレルが代表的である。アスピリンはシクロオキシゲナーゼを抑制することでアラキドン酸から産生されるトロンボキサン A₂ の産生を抑制し活性を抑制する。一方、クロピドグレルは血小板膜上の ADP 受容体の 1 つである P2Y₁₂ 受容体をブロックすることで活性化を抑制する。P2Y₁₂ 受容体は Gi 蛋白と共役した膜 7 回貫通型の受容体である。ADP 刺激により細胞内の cAMP レベルが低下するが、この経路は血小板の形状の変化や細胞内カルシウム濃度の変化には影響

しないと報告されている。P2Y₁₂ 受容体が刺激され、PI3K を介した GPIIb/IIIa 受容体の活性化が血小板凝集を引き起こすと考えられている。

我々は、ローズベンガルと緑色光による光化学反応を応用して血栓モデルを開発した。つまり、ローズベンガルを静脈内へ投与し、血管の外から緑色光を照射することでローズベンガルが励起状態へ移行し、そのエネルギーを酸素へ移すことで一重項酸素が産生される。この一重項酸素が血管内皮細胞を傷害し内皮下組織が露出することで血小板が粘着し血栓が形成される。このモデルを用いて、クロピドグレルの薬理作用を検討してきたので、その薬理作用について紹介する。また、血小板の活性化は、炎症と関連して動脈硬化を増悪すると言われている。我々は、動脈移植後の動脈硬化病変は臓器移植後の慢性拒絶に大きく関与していると考えられている。その慢性拒絶に活性化血小板の関与を考え、頸動脈移植後の動脈硬化モデルを用いて活性化血小板の役割、特に P2Y₁₂ 受容体を介した血小板活性化との関係を検討してきたので紹介する。

(2) 心臓の線維化における ATP 受容体の役割

西田基宏, 上村綾, 大串真理子, 黒瀬等

(九州大学・大学院薬学研究院・薬効安全性学分野)

高血圧や虚血などの負荷により生じる心臓の形態変化(心肥大や間質の線維化)は、心機能不全を引き起こす要因の 1 つとして考えられている。心臓の病態形成における三量体 G₁₂ ファミリー蛋白質 (G₁₂/G₁₃) の役割を明らかにするため、我々は G₁₂/G₁₃ の α サブユニット (G α_{12} /G α_{13}) の機能を特異的に阻害するポリペプチド (p115-RGS) を心筋特異的に発現させたトランスジェニック (TG) マウスを作成した。p115-RGS-TG マウスの横行大動脈を狭窄し、4 週間の圧負荷を行ったところ、野生型マウスと同程度の心重量の増大(心肥大)が確認された。ところが、圧負荷により誘発されるコラーゲンの

蓄積(線維化)と拡張機能の低下は p115-RGS-TG マウスで有意に抑制された。以上の結果から、圧負荷による心筋細胞の G α_{12} /G α_{13} 活性化が心臓の線維化を引き起こす可能性が示された。

G タンパク質の活性化が受容体刺激によってのみなされるとすると、G α_{12} /G α_{13} を活性化する G タンパク質共役型受容体が圧負荷により活性化されると考えられる。そこで、初代培養心筋細胞に機械伸展刺激を行い、圧負荷により活性化される G₁₂/G₁₃ 蛋白質共役型受容体の特定を試みた。我々は以前、ラット新生仔培養心筋細胞に発現するアンジオテンシン (AT1) 受容体、エンドセリン

(ETA) 受容体, $\alpha 1$ アドレナリン受容体が $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ と共役しうることを報告している。しかし, AT1 受容体阻害剤, ETA 受容体阻害剤, $\alpha 1$ 受容体阻害剤を処置しても, 伸展刺激による $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ シグナリングの活性化は全く抑制されなかった。一方, アデノシン $5'$ -三リン酸 (ATP) の脱リン酸化酵素を細胞外に処置すると, 機械伸展刺激による $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ シグナリングの活性化が顕著に抑制された。実際に, 細胞外液中の ATP 含量を測定したところ, 機械伸展刺激により ATP 濃度が著しく増加し

た。伸展刺激による細胞外 ATP 濃度の上昇および $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ シグナリングの活性化は, 細胞間のギャップジャンクションを構成するコネキシンの阻害剤 (carbenoxolone および 1-heptanol) によって完全に抑制された。

以上の結果から, 我々は, 機械伸展刺激により細胞から放出された ATP が心筋細胞の $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ シグナリングを活性化し, 線維化を引き起こすという可能性を初めて明らかにした。

(3) 腎循環病態におけるアデノシン A1受容体の役割

矢尾幸三 (協和発酵工業(株) 医薬研究センター 薬理研究所)

アデノシンは細胞膜上に存在するアデノシン受容体に結合して生理作用を発現する。循環器においては, 心臓の A_1 受容体を介し, 徐脈作用や房室伝導抑制作用, 心収縮力抑制作用を発現する。冠血管や末梢血管では A_2 受容体を介し, 血管拡張作用を発現する。一方, 腎臓においてアデノシンは A_1 受容体を介して, 輸入細動脈およびメサンギウム細胞の収縮, レニン分泌およびエリスロポエチン産生の低下, 尿細管における水およびナトリウムの再吸収の亢進を引き起こす。また, A_2 受容体を介して輸出細動脈の拡張, レニン分泌およびエリスロポエチン産生の増加を引き起こす。しかし, 病態時の腎臓におけるアデノシンの役割については不明な点が多く残されている。我々は, アデノシン A_1 受容体を選択的に拮抗する 8-(noradamantan-3-yl)-1,3-dipropylxanthine (KW-3902) を見出した。KW-3902 のアデノシン A_1 受容体結合阻害作用の K_i 値は 0.19 nmol/L で, A_2 受容体結合阻害作用と比較して 800 倍以上の選択性を有する。KW-3902 は, アデノシンアゴニスト N-ethylcarboxamidoadenosine により誘発される心拍数および血圧低下のうち, A_1 受容体を介した心拍数低下のみを抑制したことから, *in vivo* においても A_1 受容体を選択的な拮抗作用を示す。この KW-3902 を用いて, 腎循環病態におけるアデノシン A_1 受容体の役

割について検討した。腎機能が正常状態においては, KW-3902 は腎血行動態には影響せず, 尿細管での水やナトリウムの再吸収を抑制して利尿作用を示した。虚血性および薬剤性の急性腎不全状態においては, 利尿作用に加え腎保護作用を有した。種々の動物実験モデルを用いた検討から, 急性腎不全の発症および進展において, 虚血などにより増加したアデノシンが, アデノシン A_1 受容体を介して腎機能の低下に関与することが明らかとなった。その機序の一つに, アデノシン A_1 受容体を介した尿細管-糸球体フィードバック機構の増強の関与が示唆された。また, 薬剤性誘発急性腎不全の発症においては, 内因性アデノシンによるアデノシン A_1 受容体を介した腎への薬物の蓄積促進作用の関与が示された。以上のように, アデノシンはアデノシン A_1 受容体を介して異なる機序により種々の急性腎不全を発症・進展させると考えられている。また, KW-3902 がアデノシン A_1 受容体拮抗作用に基づく新しいタイプの腎保護薬として有用であると期待される。臨床試験では, 腎機能障害を有する急性心不全患者において, KW-3902 は利尿作用に加え, 腎保護作用を有することが認められた。現在, 急性うっ血性心不全患者を対象にした第3相試験で KW-3902 の効果が評価されている。

(4) 血管内皮 P2X4 を介した循環機能調節

山本希美子, 安藤謙二 (東京大学 大学院医学系研究科 システム生理学)

血管内面を一層に覆う内皮細胞は血管のトーンスを調節し、高い抗血栓性を示すなど、循環系の恒常性の保持に中心的な役割を果たしている。近年の研究から、血管内皮細胞の機能がホルモンやサイトカインなどの化学的刺激だけでなく、血流に起因する流れずり応力などの機械的刺激によっても調節を受けることが明らかとされた。最近我々は流れずり応力の感知に ATP 受容性チャネルである P2X4 受容体が関わっていることを明らかとした。血流センサー分子の生理的意義を評価する為、P2X4 受容体欠損マウスを作製した。P2X4^{-/-}マウスの血管内皮細胞を培養し、流れずり応力による細胞内 Ca²⁺濃度及び、NO 産生量の変化を、それぞれ蛍光指示薬である Indo-1 及び DAF-2 を用いて観察した所、流れずり応力に依存的に惹起される Ca²⁺流入反応が消失し、それに引き続いて起こる NO 産生も顕著に減少した。骨格筋細動脈の血流を約 50% 上昇させた際の血管径の変化を測定した所、P2X4^{+/+}での血管拡張率は約 45% であるのに対して、P2X4^{-/-}では約 21% であった。左外頸動脈を結紮し、左総頸動脈の血流を右総頸動脈の約 2/3 に減少させるモデルを作製し、2 週間後、還流固定した血管の断面を HE 染色し、血管径と壁厚を左右の総頸動脈と比較、定量した。P2X4^{-/-}では、左総頸動脈のリモデリングはほとんど観察されなかった。また、テレメトリー法による覚醒時の血圧は P2X4^{+/+}の平均血圧が約 105 mmHg であるのに対して、P2X4^{-/-}では約 125 mmHg であった。尿中に含まれる NO の代謝産

物である NO_x の量は P2X4^{-/-}では P2X4^{+/+}より有意に減少していた。以上の結果から、血流センサーである P2X4 受容体は血圧の恒常的な維持など、循環機能に重要な役割を果たすことが確認された。更に本研究では、P2X4 受容体が流れずり応力によって活性化される機序について検討を行った。培養血管内皮細胞に流れずり応力を負荷させると、内因性の ATP が灌流液中に放出され、その濃度は流れずり応力の大きさに依存的に上昇増大した。ATP 合成酵素の阻害剤 (angiotatin, piceatannol, ATP 合成酵素の中和抗体) を作用させると、流れずり応力依存的な ATP 放出反応が有意に抑制され、更に、流れずり応力による Ca²⁺流入反応が消失した。これは流れずり応力依存的な ATP 放出を抑制すると、P2X4 受容体が活性化されず、流れ刺激に伴う Ca²⁺流入反応が減少したためと考えられる。そこで、ATP 合成酵素の局在を免疫染色により確認した所、ミトコンドリアだけでなく、細胞膜に存在するラフト/カベオラ膜に局在している事が確認された。コレステロールを多く含むラフト/カベオラ構造を除去する試薬 (MβCD, caveolin-1 siRNA) を処理すると、細胞外に放出される内因性 ATP の量が顕著に減少し、細胞膜にコレステロールを再導入させると、ATP 放出量は元のレベルに戻った。以上の結果から、P2X4 を介する流れずり応力の感知機構に、ラフト/カベオラ膜に局在する ATP 合成酵素の働きに基づく内因性 ATP 放出が重要な役割を果たしていることが示唆された。

(5) 細胞外ヌクレオチドを介した損傷神経細胞ーグリア細胞連関

小泉修一¹, 最上由香里², 多田 薫², 篠崎陽一², 大澤圭子³, 津田 誠⁴, 高坂新一³, 井上和秀⁴
(¹山梨大学・医・薬理, ²国立衛研・薬理, ³国立精神神経センター, ⁴九州大・院・薬・薬理)

グリア細胞の新しい役割に注目が集まっており、脳機能、特にその病態がグリア細胞に注目することに解き明かされる可能性が強い (Miller の総説, Science, 2005)。ミクログリアは種々の脳疾患と密接な関係にあると考えられており、その機能調節には ATP など細胞外ヌクレオチドが中心的な役割を果たす。例えば、神経細胞が損傷すると、その周辺部位に活性化したミクログリアの集積

が認められるが、これは細胞内 ATP が漏出し、これが化学誘引物質としてミクログリアの P2Y₁₂ 受容体を介した化学走性を誘発すること (Honda et al., J. Neurosci., 2001) に起因している。集合したミクログリアは、神経細胞が修復不可能であると判断すると、その細胞や残片を貪食作用によって脳内から除去し、脳内環境を整える。しかし、これまでミクログリアが神経細胞のダメージの程度

をどの様に見分け、またどの様なシグナルで食食を開始するのかよくわかっていなかった。今回我々は、ラットの海馬神経細胞を kainic acid (KA)で傷害すると、ATPだけでなく UDP (uridine 5'-diphosphate) が放出されることを *in vivo* 及び *in vitro* の実験系で明らかとした。また傷害された海馬 CA3 領域では、UDP の特異的受容体『P2Y₆受容体』の発現がミクログリア特異的に亢進していた。ミクログリアを UDP で刺激すると、P2Y₆受容体依存的にミクログリアの食食が即時的に開始され、これは傷害された神経細胞から漏れ出た UDP によっても模倣され

た。ATP も UDP も神経細胞の傷害を周辺細胞に知らせる重要な分子として働き、共にミクログリアのダイナミックな動きを制御している。しかし ATP は化学走性を制御するが食食能には全く影響せず、逆に UDP は食食能を亢進させるが化学走性には関与していない。このように、ミクログリアは、細胞外ヌクレオチド ATP 及び UDP をそれぞれ厳密に見分け、それぞれの分子特異的な応答を呈することにより、病態時の脳機能を極めて巧妙に制御していることが明らかとなった。

(6) 神経—泌尿器システム間情報伝達におけるプリン作動性シグナルの役割

河谷 正仁 (秋田大学医学部機能制御医学講座)

膀胱は腎臓で作られた尿をためて排出するだけの臓器という考え方が一般的で、膀胱上皮細胞での分泌・吸収機構は考えられていなかった。これは膀胱上皮細胞の内腔側で Umbrella cell があり、それを tight junction で結合している構造のほかに、細胞膜にウロプラキシンがあり物質の移動できなくなっている構造があるからである。最近の研究では、膀胱の伸展によって膀胱上皮細胞が神経細胞のように ATP, NO が放出され知覚神経機構や平滑筋収縮に作用することが明らかとなった。伸展だけでなく、ノルアドレナリン (NA), プロスタグランジン E2

(PGE2), アセチルコリンによっても ATP 放出が認められてきている。膀胱の知覚神経終末には P2X₃ 受容体があり、上皮細胞性の ATP はこれを介して排尿反射を亢進させている。また、膀胱上皮細胞と平滑筋との間にある myofibroblasts には P2Y₆ を主とする受容体が存在し、やはり膀胱知覚を増幅して排尿反射を亢進させている。したがって、畜尿によっておこる膀胱上皮の伸展だけでなく、尿中にたまる NA, PGE2 はいずれも ATP を放出し膀胱知覚神経を興奮させ、過活動膀胱や間質性膀胱炎の症状を作っていると予測される。

(7) 表皮ケラチノサイトから感覚神経への温度情報伝達機構：ATP の役割

富永真琴 (岡崎統合バイオサイエンスセンター (生理学研究所) 細胞生理研究部門)

哺乳類において6つのサブファミリーから形成され多くのホモログが存在する TRP チャネルスーパーファミリーのうち、9つは温度感受性があることが知られている。2つ (TRPV1, TRPV2) は 40°C を超える高い温度によって、2つ (TRPM8, TRPA1) は低い温度によって活性化されるが、5つ (TRPV3, TRPV4, TRPM2, TRPM4, TRPM5) は体温近傍の温かい温度を感知すると報告されている。中でも、TRPV3, TRPV4 は皮膚に発現が強いことから、表皮ケラチノサイトでの温度感知に働いているものと推定されている。私達の温度感覚は感覚神経の発火によっ

て生じると考えられているが、表皮ケラチノサイトが温度を感知しているとする、その温度情報は感覚神経へと伝達されなければならない。電子顕微鏡による観察では、ケラチノサイトと感覚神経終末の間にシナプス様の構造は認められない。そこで、拡散性の分子が存在すると仮定して、バイオセンサーを用いてその分子の同定を試みた。まず、マウス皮膚からケラチノサイトの培養系を確立して、感覚神経との共培養を行った。40°C までの温度刺激によってケラチノサイト、感覚神経の両方で細胞内 Ca²⁺濃度の上昇が観察された。その温度刺激による

神経細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が複数の ATP 受容体阻害薬で抑制されたことから、ケラチノサイトから温度刺激によって ATP が放出されているものと推定された。ケラチノサイトからの ATP 放出を確かめるために P2X2 を強制発現させた HEK293 細胞をバイオセンサーとして用いることにした。HEK293 細胞を whole-cell mode にしてカバーガラスから浮かせ、ケラチノサイトのごく近傍に移動させた。そこで、ケラチノサイトに温度刺激を加えると、HEK293 細胞において内向き整流性を有する電流の活性化が観察された。この電流は、HEK293 細胞をケラチノ

サイトから離すと観察されないことから、P2X2 チャネルが局所的な ATP 放出を感知しているものと推定された。このバイオセンサーが機能していることは、ケラチノサイトから離れた HEK293 細胞に ATP 投与にして電流が見られることによって確認した。これらの事実は、温度刺激によってケラチノサイトから局所的に ATP が放出されて感覚神経を活性化している可能性を示唆する。野生型マウス、TRPV1 欠損マウス、TRPV3 欠損マウス、TRPV4 欠損マウスのケラチノサイトを用いて、どの温度感受性 TRP が最も重要かを検討した。

(8) 細胞外 ATP による細胞周期と遊走性の調節

尾松万里子 (滋賀医科大学・生理学講座・細胞機能生理学部門)

マウス胎児由来 3T3-L1 細胞は脂肪細胞分化のモデルとして広く用いられている。終末分化に移行させるためには通常コンフルエントになるまで培養して増殖を停止させた後にホルモン等の分化誘導因子を加える方法が行われ、細胞密度の低い状態で因子を加えても分化は起こらないことが知られている。我々は、50%以下の密度の未分化 3T3-L1 細胞に ATP を加えてインキュベートした後、分化誘導因子を添加して培養を続けたところ、増殖を続けながら脂肪細胞に分化することを見出した。この現象の細胞内情報伝達経路を調べるために、Focused proteomics 法を用いて ATP によって変化するリン酸化タ

ンパク質を同定したところ、細胞周期のライセンシング因子である nucleophosmin の T199 部位のリン酸化を抑制されていることがわかり、ATP が未分化 3T3-L1 細胞に対して細胞周期を一時的に停止させた状態を作り出して分化へのプロセスを開始させる作用を持つ可能性が示唆された。また、未分化 3T3-L1 細胞は ATP に対して正の走化性示したが、成熟脂肪細胞に分化すると細胞の移動は観察されなかった。これらのことから、前駆脂肪細胞は遊走性を持ち、その化学走性に従って生体内を移動し、定着した場所で脂肪細胞の成熟が起こる可能性が示唆された。

(9) 皮膚・結合組織の知覚終末グリア細胞における ecto-ATPase の局在とその役割について

岩永ひろみ (北海道大学 大学院医学研究科 組織細胞学分野)

マイスナー小体など皮膚感覚装置のグリア細胞は、複数の薄板突起を異なる軸索終末にのばした、特異な形態を示す。私たちはこれまでに、ラット頬ひげの動き受容器 槍型神経終末の分離組織標本を用いた実験によって、この細胞がプリン受容体 P2Y_2 を発現していることを示した。このタイプの受容体の ADP・UDP に対する感受性が比較的低い事実と、酵素組織化学でマイスナー小体に強い ATPase 活性が検出されるとの Ide and Saito (1980) の報告は、ATP を介した知覚終末グリア細胞と周囲細胞

との相互作用に、この組織酵素が調節的役割を果たす可能性を示唆する。そこで今回は、種々の知覚神経終末における ecto-ATPase の分布を調べるとともに、上記分離標本の Ca^{2+} 画像解析によって、槍型終末局所に機械刺激を与えたとき放出される ATP に対するグリア細胞の応答を、培養液に ecto-ATPase 阻害剤 ARL67156 を加えた場合とそうでない場合とで比較した。酵素組織化学では、指腹皮膚マイスナー小体の他、歯根膜ルフィニ知覚終末、頬ひげ毛包槍型終末のグリア細胞表面に ATPase 活性が

検出され、陽性反応は、とくに、軸索終末を包むグリア細胞の薄板突起で強かった。分離標本の実験で、正常培養液中の槍型終末の一つに接触刺激を与えると、Ca²⁺信号が、刺激点から30 μm以内の槍型終末を包むグリアの薄板突起間に広がった。信号は、各薄板突起固有の生成焦点に始まり、その薄板内に限って伝播した。一方、ARL67156を300 μM含む培養液中で同様の実験を行なう

と、細胞間信号が刺激点から60 μm以上離れた終末のグリア薄板にまで及び、各薄板の生成焦点に始まるCa²⁺濃度上昇は、細胞体にまで広がった。これらの観察結果は、知覚神経終末グリア細胞の薄板突起が、独自のCa²⁺信号生成焦点を内蔵しecto-ATPaseで信号を突起内に区域化することによって局所のATP刺激に独立して応答する機能単位を構成することを示す。

(10) 神経因性疼痛発症過程におけるP2Y₁₂受容体の関与

齊藤 秀俊, 津田 誠, 井上 和秀

(九州大学大学院 薬学研究院薬理学分野)

ミクログリアは障害を受けた神経細胞を速やかに認識し、その貪食能をもって神経回路の再構築を担うことが予想されている。近年、細胞外ヌクレオチドは傷害の伝達物質としての役割を持ち、ミクログリアはP2Y₁₂受容体を介して傷害部位を認識することが示唆されている。一方で末梢神経の傷害によって活性化される脊髄ミクログリアは神経因性疼痛の発症メカニズムに深く関わっていることが示されており、P2X₄受容体を第一要因として細胞外ヌクレオチドと神経因性疼痛が関連付けられている。しかしながら、神経因性疼痛におけるミクログリアのP2Y₁₂受容体の役割は未だよく分かっていない。

我々は、P2Y₁₂受容体 mRNA 発現のレベルが神経損傷側脊髄で著しく増加することを見出し、その発現は高頻度でIba1陽性細胞と共局在することを確認した。脊髄ミクログリアに発現するP2Y₁₂受容体の活性化を抑制する目的で阻害薬であるAR-C69931MXを病態ラットに髄腔

内投与したところ神経因性疼痛の発症は有意に抑制され、またP2Y₁₂受容体ノックアウトマウスにおいても同様であった。免疫組織学的手法によりP2Y₁₂受容体ノックアウトマウスの神経損傷側脊髄後角では野生型と比べミクログリアの活性化、集積のわずかな減少が認められたが、非損傷側との比較では明らかなミクログリアの細胞数増加が観られた。そこで、AR-C69931MX 髄腔内単回投与、clopidogrel 経口単回投与を神経損傷後7日目の病態ラットに対して行ったところ、すでに形成された神経因性疼痛が緩和されることを見出した。

本研究は、脊髄ミクログリアのP2Y₁₂受容体の活性化が神経因性疼痛発症のための重要な過程の一つであることを示唆し、ミクログリアのP2Y₁₂受容体の阻害が神経因性疼痛に対する新たな治療法となる可能性を示している。

(11) 孤束核シナプス前 P2X 受容体の意義—その再検討

Revisiting the presynaptic P2X receptors in the nucleus of the solitary tract

加藤総夫¹, 井村泰子¹, 繁富英治¹, 安井豊¹, 山本清文¹,
山田千晶¹, 武田健太郎¹, 山本希美子², 安藤譲二²

(¹東京慈恵会医科大学・神経生理学,

²東京大学大学院・医・医用生体工学・システム生理学)

細胞外 ATP 活性化カチオンチャンネル P2X 受容体は脳内の多くの領域でシナプス伝達および神経細胞の興奮性

制御に関与している(加藤, 井村, 繁富, 神経精神薬理, 2007)。一般に脳組織における P2X 受容体サブタイプの

薬理的な同定は (1) 組織内アゴニスト濃度の高速制御の困難性, (2) アゴニスト, アンタゴニストの高速分解, (3) アゴニスト, アンタゴニストによる代謝・取込分子群の活性修飾, (4) リン酸化・糖鎖化などによる受容体特性修飾, (5) 未同定サブユニット構成の可能性,あるいは, (6) サブタイプ特異的な膜局在化制御などのために困難である。

延髄孤束核シナプス前 P2X 受容体の活性化は, 活動電位非依存的かつ細胞外 Ca^{2+} 依存的にグルタミン酸放出を促進する (Kato and Shigetomi, 2001; Shigetomi and Kato, 2004)。孤束核内には P2X₁ から P2X₇ までのすべてのサブユニットが発現しており, 興奮性シナプス前 P2X 受容体のサブタイプは未同定である。今日までに我々は, (1) ATP の EC50 は 340 μ M, (2) α,β -methylene-ATP ($\alpha\beta$ mATP) が有効 (EC50=81 μ M), (3) UTP は無効, (4) PPADS (40 μ M) によってほぼ完全に抑制, および, (5) サブタイプ特異的遮断薬 TNP-ATP の IC50 が 1 μ M, という薬理的性質に基づき, 介在ニューロン軸索終末に発現する P2X_{1/5} もしくは P2X_{4/6} サブタイプからの Ca^{2+} 流入が高頻度の multivesicular のグルタミン酸放出を誘発すると推察し, この特性から, P2X 受容体の活性化は孤束核内介在ニューロン軸索終末からのグルタミン酸放出を誘発すると結論していた。

我々は, 今回, 下記の新知見を得た。(1) P2X4 サブユ

ニット欠損マウス (Yamamoto et al., Nat Med, 2006) において, $\alpha\beta$ mATP は, 野生型マウスとほぼ同程度, 同時間経過の微小興奮性シナプス後電流 (mEPSC) 頻度増大を引き起こした。(2) Caged ATP と laser photolysis 法を用いたシナプス近傍 P2X 受容体の短時間活性化による mEPSC 頻度増大は緩徐な脱感差しか示さなかった。そして, (3) P2X₃ および P2X_{2/3} サブタイプを特異的に遮断する A-317491 (3 μ M) はほぼ完全に $\alpha\beta$ mATP の mEPSC 頻度増大効果を抑制した。

以上の知見は, 孤束核シナプス前 P2X 受容体のサブタイプが P2X_{2/3} である可能性を強く示唆する。P2X₂ サブユニットは孤束一次求心細胞体破壊によって孤束核から消失し, 孤束核内ニューロンに発現していない。したがってこの結果は, シナプス前 P2X 受容体活性化による活動電位非依存的グルタミン酸放出促進が一次求心線維終末から生じている可能性を示している。一方, 我々は, 一次求心線維刺激による活動電位依存的グルタミン酸放出が ATP から細胞外産生される adenosine によって, アデノシン A₁ 受容体活性化を介して抑制される事実を既に報告している。

Novel questions: いったい, 細胞外 ATP は一次求心線維→二次ニューロン間のシナプス伝達を促進するのか, 抑制するのか? この機構は何のために存在するのか?

(12) Astrocytic control of synaptic NMDA receptors

Changjoon Justin Lee

(Center for Neural Science, Division of Life Sciences, KIST

(Korea Institute of Science and Technology), Seoul 136-791, Korea)

Astrocytes express a wide range of G-protein coupled receptors that trigger release of intracellular Ca^{2+} , including P2Y, bradykinin, and protease activated receptors (PARs). By using the highly sensitive sniffer-patch technique, we demonstrate that the activation of P2Y receptors, bradykinin receptors, and protease activated receptors all stimulate glutamate release from cultured or acutely dissociated astrocytes. Of these receptors, we have utilized PAR1 as a model system because of favourable pharmacological and molecular tools, its prominent expression in astrocytes, as

well as its high relevance to neuropathological processes. Astrocytic PAR1-mediated glutamate release *in vitro* is Ca^{2+} -dependent and activates NMDA receptors on adjacent neurones in culture. Activation of astrocytic PAR1 in hippocampal slices induces an APV-sensitive inward current in CA1 neurones and causes APV-sensitive neuronal depolarization in CA1 neurones, consistent with release of glutamate from astrocytes. PAR1 activation enhances the NMDA receptor-mediated component of synaptic miniature EPSCs, evoked EPSCs, and evoked EPSPs in a

Mg²⁺-dependent manner, which may reflect spine head depolarization and consequent reduction of NMDA receptor Mg²⁺ block during subsequent synaptic currents. The release of glutamate from astrocytes following PAR1 activation may also lead to glutamate occupancy of some perisynaptic

NMDA receptors, which pass current following relief of tonic Mg²⁺ block during synaptic depolarization. These results suggest that astrocytic G-protein coupled receptors that increase intracellular Ca²⁺ can tune synaptic NMDA receptor responses.

(13) シナプス小胞の分子解剖学的解析

高森 茂雄 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・脳神経病態学分野・COE 特任講師)

シナプス小胞は、神経終末に存在し、神経伝達物質を貯蔵する細胞内小器官である。神経伝達物質を充填したシナプス小胞はアクティブゾーンに移動し、形質膜と物理的に接着する。その後、プライミングと呼ばれる過程を経て膜融合可能な状態になり、刺激が終末に到達すると、電位依存性カルシウムチャンネルからのカルシウム流入が引き金となり小胞膜と形質膜の膜融合が喚起され、小胞内腔の神経伝達物質の放出が起こる。これをエキソサイトシスと呼ぶ。形質膜と融合した小胞の膜構成成分は、エンドサイトシスと呼ばれる過程により、新たに合成されたシナプス小胞に組み込まれ、再度神経伝達物質を取り込むことで、次のエキソサイトシスに備える。このようなシナプス小胞のライフサイクルを支える小胞膜タンパク質の同定を目指す研究は、1980年代より盛んに行われて来ており、膜融合に必須な SNARE タンパク質である Synaptobrevin, エキソサイトシスのカルシウムセンサーである Synaptotagmin, 神経伝達物質の取込に関わるトランスポータータンパク質等、重要な分子群が相次いで同定され、個々のタンパク質の性状解析に

関しては顕著な進展が達成されてきた。一方で、これらのタンパク質群は他の分子と相互作用して機能を発現したり、タンパク質の発現量がシナプス伝達効率を左右する可能性が示唆されているものの、シナプス小胞の構成成分の定量的なデータは、これまでほとんど皆無であった。また、直径約 40 ナノメートルの小さな膜構造体であるシナプス小胞に、タンパク質や脂質がどのように空間的に配置されているか、その細胞内小器官としての構造的全体像は不明であった。我々は、ラット脳より高度に精製したシナプス小胞を材料として用い、生化学的定量・物理化学的手法・電子顕微鏡等を組み合わせることにより、平均的なシナプス小胞に存在する主要な構成成分の分子数を算出し、それぞれの構成成分の三次元構造情報(占有体積の推定)を組み込んだシナプス小胞分子構造モデルの構築を行った。

本セミナーでは、上記の研究成果を概説すると共に、シナプスの分子レベルでの heterogeneity の一端として、エンドサイトシス関連分子の分子多様性に関して、最新の知見を紹介する。

(14) 小脳におけるニューロン-グリア細胞間の情報伝達

松井 広 (自然科学研究機構 生理学研究所 脳形態解析研究部門)

小脳における神経細胞からグリア細胞への情報伝達には、少なくとも二つの経路が存在することが判明している。ひとつは、登上線維・平行線維からグルタミン酸が放出され、バグマン・グリア細胞の Ca²⁺透過型 AMPA 受容体が活性化されるという経路。もうひとつは、バグマン・グリア細胞の ATP 受容体が活性化される経路で

ある。後者の場合、どの細胞から ATP が放出されているのか、議論が分かれるところだが、少なくとも神経細胞の活動が ATP 放出の引き金となっていることは、明らかになっている (Beierlein and Regehr, 2006; Piet and Jahr, 2006)。

我々はこれまで、主に第一の経路に関して研究をして

きた。この経路を阻害すると、バーグマン・グリア細胞が、シナプス部位から解離するという事は知られている (Iino et al., 2001)。しかし、神経細胞から放出されるグルタミン酸が、そもそもどうして、グリア細胞の低親和性 AMPA 受容体を活性化できるのか、明らかになっていなかった。これまで、神経細胞から放出された伝達物質は、シナプス間隙から溢れ出て (スピルオーバー)、グリア細胞まで拡散することによって、神経細胞からグリア細胞への情報伝達が成立すると考えられてきた。しかし、溢れ出てきた低い濃度のグルタミン酸では、グリア細胞の AMPA 受容体を活性化させるのに、十分であるとは考えにくい。そこで我々は、いくつかの電気生理学的実験を通して、シナプス前細胞からグリア細胞に向けても、シナプス小胞の直接的な放出 (異所放出) が生じており、これこそが、神経細胞-グリア細胞間の素早い情報伝達を担っていることをつきとめた (Matsui and Jahr, 2003; 2004; 2005; 2006)。

この素早い情報伝達過程が、グリア細胞によるシナプス包囲率に関わっている可能性が示唆されている (Iino et al., 2001)。そこで我々は、バーグマン・グリア細胞の形態がどのように制御されているのかに関して、二光子イメージング法を用いて調べた。その結果、グリア細胞の微小突起の形態は、数分単位で刻々と変化しているこ

とが明らかになった。現在、AMPA 受容体の活性化の程度に従って、シナプス前細胞からグリア細胞までの距離がどのように変化するのかに関して、研究を進めている。また AMPA 受容体を完全に阻害しても、形態変化は完全には止まらないことも明らかにしており、グリア細胞の形態変化に前述の ATP 受容体の活性が関与する可能性も検討している。さらに、グリア細胞の形態変化が、生体内でも観察できるかどうかに関する予備実験も開始した。

なぜ、我々は、グリア細胞によるシナプス包囲率に注目しているのか。シナプス前終末部から放出された伝達物質は細胞外空間を拡散し、その広がり方によって、神経細胞間の情報伝達特性は決定される。特に、シナプス間隙を越えた伝達物質の広がりを制御する要素として、グリア細胞に高密度で発現しているトランスポーターによる伝達物質回収機構が大きな役割を果たしていると考えられる。実は、シナプス辺縁の受容体こそが、学習や記憶に重要であるとも考えられており、これらの受容体の活性を制御できる格好の位置にグリア細胞が存在することになる。グリア細胞の形態はシナプス周辺で刻々と変化するが、この形態変化によって、伝達物質の時空間分布がいかに制御され、シナプスの多様性が生まれているのかに関して、シミュレーションを使った検討も最後に紹介したい。

(P1) カフェイン誘発 ATP 放出への小胞体 - ミトコンドリア Ca^{2+} 連関の関与

桂木 猛 (福岡大・医・総医研), 佐藤千江美 (同 薬理),
薄根貞治 (同 機能研), 右田啓介, 上野伸哉 (弘前大・脳研・生理)

ATP はオートクリン/パラクリン分子として細胞外に放出され、極めて広汎な生理機能を示すことが知られているが、どのようなメカニズムで、また、どこから放出されるかについては、ほとんど不明のままである。本研究では、caffeine による初代培養精管平滑筋細胞からの ATP 放出とその Ca^{2+} シグナリングについて検討を行った。その結果、caffeine による ATP 放出作用は 2-APB では抑制されず、ryanodine および tetracaine によって、さらに、rotenone, oligomycin などのミトコンドリア阻害薬、niflumic acid, NPPB などの Cl^- channel blocker によって、いずれも拮抗された。Fluo 4 を用いての caffeine による

$[Ca^{2+}]_i$ の増加は、niflumic acid ではなく tetracaine によって拮抗された。また、rhod-2 処理後の同じく Ca^{2+} シグナルの増大は、oligomycin plus CCCP により、有意に抑制された。RT-PCR 実験から、精管細胞には、RyR-2 の発現が認められた。以上の結果、caffeine は筋小胞体上の RyR-2 を刺激し、 Ca^{2+} を遊離する。この Ca^{2+} シグナルがミトコンドリア内の Ca^{2+} を上昇させ、ATP 合成を促進する。次いで、何らかのシグナルが膜の Cl^- channel を活性化し、ATP の細胞外への膜輸送を促進するものと推論される。

(P2) マウスマクロファージ J774 細胞におけるプリン受容体作動性シグナルと プロスタグランジン E₂シグナルとのクロストーク

伊藤 政明, 松岡 功

(高崎健康福祉大学・薬学部・薬効解析)

細胞外ヌクレオチドは、多様なプリン作動性受容体を介して生体反応を媒介するメディエーターとして作用する。炎症巣では、組織より大量のアデノシン三リン (ATP) 分子とともに各種ケミカルメディエーターが放出されることから、プリン作動性シグナルは種々のメディエーターと相互に影響し合い炎症反応を制御していると考えられる。今回、炎症反応に関わるプリン作動性シグナルとプロスタグランジンシグナルとの相互作用をマウスマクロファージ細胞株 J774 細胞を用いて検討した。

J774 細胞におけるプリン受容体の遺伝子発現を real-time RT-PCR で測定した結果、イオンチャネル型 P2X₄ と P2X₇ 受容体、G タンパク質共役型 P2Y₂ と P2Y₆ 受容体の発現が認められ、特に P2Y₆ 受容体の発現が顕著であった。Fura-2 を用いて細胞内 Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i) 変化を指標に受容体機能を検討した。ATP は濃度依存的に [Ca²⁺]_i を上昇させ、1 mM の高濃度では P2X₇ 受容体を介すると考えられるより強力で持続的な [Ca²⁺]_i 上昇が認められた。低濃度の ATP (1~100 μM) による [Ca²⁺]_i 上昇は PLC 阻害剤の U73122 処理により抑制されたことから P2Y₂ 受容体の関与が示唆された。また、ATP に対する応

答は、P2X₄ 受容体活性化薬の ivermectin により増大したことから機能的な P2X₄ 受容体の存在が確認された。さらに、P2Y₆ の選択的アゴニストである UDP は、強力で持続的な [Ca²⁺]_i 上昇を起こし、その作用は U73122 により顕著に抑制された。以上のことから、J774 細胞には機能的なプリン受容体として P2X₄、P2X₇、P2Y₂ 及び P2Y₆ が発現していることが示唆された。

一方、PGE₂ は単独では [Ca²⁺]_i に影響せず、ATP や UDP による [Ca²⁺]_i 上昇作用を抑制した。この作用は、UDP によって既に [Ca²⁺]_i が持続的に上昇している状態に処理しても発揮された。さらに、U73122 存在下において ivermectin により増強される ATP の [Ca²⁺]_i 上昇作用に対しても PGE₂ は抑制作用を示した。しかし、P2X₇ 受容体を介する反応に対する PGE₂ の抑制作用は認められなかった。J774 細胞における PGE₂ 受容体 (EP) 遺伝子として EP2 と EP4 の発現が認められたことより、PGE₂ の作用にはこれらの受容体が関与すると推察された。これらの知見より、動脈硬化巣などの炎症部位において、PGE₂ はイオンチャネル型及び G タンパク質共役型のいずれの ATP 受容体を介する反応も抑制することが示唆された。

(P3) マウス T 細胞における ATP ならびに NAD による P2X₇ 受容体活性化の相違

前畑真知子, 原田 均, 出川雅邦 (静岡県立大・薬)

【目的】イオンチャネル内在型 ATP 受容体 (P2X 受容体) サブタイプの一つである P2X₇ 受容体は、マウス T 細胞に発現し、陽イオンチャネル活性に加えて分子量 300 程度までの陽陰両イオンを透過させる小孔形成活性を有する。また最近、T 細胞表面に発現する ecto-ADP-ribosyl-transferase 2 (ART2) が細胞外に放出された NAD を基質として P2X₇ 受容体を ADP リボシル化することにより活性化することも報告されている。P2X₇ 受容体の活性化は、T 細胞自身の細胞死を誘導するが、その詳細な機構は明らかではない。そこで、本研究ではマウス脾臓

由来 T 細胞における ATP ならびに NAD による P2X₇ 受容体活性化の相違について検討した。

【方法】4-5 週齢雄性 BALB/c マウスより調製した脾臓細胞を用い、ATP ならびに NAD 処置による小孔の形成、細胞径の変化、ホスファチジルセリン (PS) の細胞表面への露出ならびに細胞死の誘導への影響について比較検討した。

【結果および考察】ATP は、速やかな小孔の形成・ホスファチジルセリンの細胞表面ならびに細胞縮小を誘導し、その後細胞死を誘導した。NAD は、ATP に比べて小孔の

形成ならびにホスファチジルセリンの細胞表面への露出をより低濃度から誘導したが、細胞縮小はほとんど誘導せず、細胞死の誘導も ATP に比べて弱かった。また、ATP による細胞縮小と細胞死の誘導は、細胞外の Cl^- 濃度を低下させることにより抑制されたが、小孔の形成は影響されなかった。CD4 陽性 T 細胞を特異的抗体で染色し解析したところ、NAD はやはり細胞縮小を誘導しなかったが、制御性 T 細胞と考えられる CD4 陽性 CD25 陽性細

胞の存在比を著しく減少させた。一方、ATP は、速やかな細胞縮小を誘導した。

以上の結果から、マウス脾臓由来 T 細胞において、ATP と NAD による P2X_7 受容体活性化後の機構が同じでないことが示され、それぞれが果たす役割に違いがあるものと考えられた。また、ATP による細胞死誘導は細胞縮小の誘導と強く関連することが示唆された。

(P4) ATP 刺激によるアンジオテンシン受容体の発現低下の分子メカニズム

大串真理子, 須田玲子, 西田基宏, 黒瀬等

(九州大学大学院 薬学府 創薬科学専攻 薬効安全性学分野)

アデノシン-5'-三リン酸 (ATP) は細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) を上昇させる強力なアゴニストとして頻用されている。心臓の線維芽細胞においても、ATP 刺激は強い $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を誘発し、 Ca^{2+} 感受性の転写因子 nuclear factor of activated T cells (NF-AT) を強く活性化する。しかし、ATP 刺激による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇の分子メカニズム及び ATP の心線維芽細胞における生理的役割についてはよくわかっていない。今回我々は、G 蛋白質の $\beta\gamma$ サブユニット ($\text{G}\beta\gamma$) が ATP 刺激による NF-AT 活性化に関与することを明らかにした。ATP (100 μM) 刺激による NF-AT の活性化は、 $\text{G}\beta\gamma$ 阻害ペプチド (GRK2-ct)、ホスホリパーゼ C (PLC) 阻害剤 (U73122)、ジアシルグリセロール (DAG) キナーゼ β ($\text{DGK}\beta$) の発現により抑制され、 IP_3 受容体阻害剤 (xestospongin C) では抑制されなかった。また、ATP 刺激による NF-AT 活性化は、細胞外 Ca^{2+} の除去により完全に抑制された。しかしながら、 $\text{G}\alpha_q$ 蛋白質阻害ペプチド (GRK2-RGS) の発現および siRNA による $\text{G}\alpha_q$ のノックダウンでは ATP 刺激による NF-AT 活性化は抑制されなかった。以上の結果から、心線維芽細胞において、ATP 刺激は $\text{G}\beta\gamma$ -PLC-DAG- Ca^{2+} influx 経路を介して NF-AT を活性化する可能性が示された。さらに、ATP 刺激による NF-AT 活性化が suramin, PPADS により部分的に抑制されたこと、アデノシン刺激では $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が認められないことから、ATP は P2Y 受容体

を介して NF-AT を活性化することが示唆された。

心筋細胞において、NF-AT は心肥大を誘発する転写因子としてよく知られている。しかし、心線維芽細胞における NF-AT 活性化の役割については良く分かっていない。我々は、ATP 刺激による NF-AT の活性化がアンジオテンシン (Ang) type1 受容体 (AT1R) の発現量を減少させることを見出した。AT1R の転写活性は、ATP 刺激により著しく低下した。AT1R の転写活性は、NF- κB の活性化により増加することが知られている。そこで、ATP および NF-AT 活性化の NF- κB 活性に与える影響を調べた結果、ATP 刺激により NF- κB のレポーター活性が低下することを見出した。さらに、ATP 刺激および NF-AT 活性化が NF- κB の内因性阻害タンパク質である $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ の分解を抑制することを明らかにした。以上の結果から、NF-AT は $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ の分解を抑制することで NF- κB 活性を抑制し、AT1R 発現低下を引き起こす可能性が示された。

Ang II は、血管収縮性ホルモンの一つであり、心線維芽細胞の過増殖や筋線維芽細胞への分化、コラーゲンなどの細胞外基質タンパクの産生 (線維化) を引き起こすことが知られている。心臓の線維化は、拡張機能障害の原因になることが示唆されている。心線維化細胞における AT1R の発現増加は心臓の線維化応答を亢進させる一因になると考えられる。ATP は、Ang II シグナリングに対する負の制御因子として働いているのかもしれない。

(P5) ミクログリアからの ATP 誘発ケモカイン放出における NFAT の関与

片岡彩子, 齊藤秀俊, 津田誠, 井上和秀 (九州大学大学院薬学研究院・薬理学分野)

ミクログリアは中枢神経系においてサイトカインやケモカインの放出及び産生ネットワークを制御する中心的な役割を担っている。損傷した細胞より漏出した ATP はミクログリアを活性化し、数種のサイトカインを放出することが報告されている。一方で、ATP がミクログリアから放出するケモカインに関してはほとんど知られていない。

本研究では、ATP 刺激がマウスミクログリア細胞株 MG-5 より CC ケモカインの一つである MIP-1 α の放出を誘発することを新たに見出した。この放出促進作用は高濃度 (1mM 以上) の ATP 刺激に対し特徴的であることや P2X₇ 受容体アゴニスト 2'- and 3'-O-(4-benzoylbenzoyl) adenosine 5'-triphosphate (Bz-ATP) によっても顕著に認められること、更に P2X₇ 受容体アンタゴニスト Brilliant

Blue G (BBG) により拮抗されることより、P2X₇ 受容体の関与が想定された。また、MIP-1 α mRNA の増加も ATP 刺激後 30 分でピークを迎えた。この即時的な MIP-1 α 産生増加と一貫して、ATP は刺激後わずか 3 分で転写因子 nuclear factor activated T cell (NFAT) の脱リン酸化、核内移行を誘発し (この活性化は刺激後 30 分まで観察された) た。MIP-1 α の放出と同様に、ATP 刺激による NFAT 活性化は Bz-ATP 刺激によっても見られ、BBG により拮抗されたことから NFAT 活性化にも P2X₇ 受容体が関与していると考えられた。更に、ATP による MIP-1 α 放出及び mRNA の増加は NFAT の選択的阻害剤により抑制された。これらの結果より P2X₇ 受容体を介した MIP-1 α の放出に P2X₇ 受容体を介した NFAT の活性化が関与することが示唆された。

(P6) ATP および神経細胞傷害によるミクログリアでの MIP-1 α 産生誘導

片山貴博¹, 大日方千紘¹, 岡村敏行^{1,2}, 上原 孝¹, 大谷賀一², 中村美香², 佐藤公道², 南 雅文
(¹北海道大学薬学研究院薬理学研究室, ²京都大学薬学研究所生体機能解析学分野)

Macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α) は、多発性硬化症や虚血性脳細胞傷害へ関与が示唆されているケモカインの一つである。本研究では、MIP-1 α 産生誘導機構を明らかにすることを目的に、ラット由来初代培養ミクログリアおよびラット脳スライス培養系を用いて、MIP-1 α の mRNA 発現およびタンパク産生に対する ATP および神経細胞傷害の効果を検討した。

培養ミクログリアにおいて、ATP (300 μ M) は一過性かつ濃度依存的に MIP-1 α mRNA 発現を誘導した。一方で、培養アストロサイトにおいては、ATP による MIP-1 α mRNA 発現誘導は認められなかった。培養ミクログリアにおける諸種プリン関連化合物の MIP-1 α mRNA 発現に対する効果を検討したところ、ADP, BzATP, 2MeSATP, ATP γ S, UTP で顕著な発現誘導が見られたが、AMP, adenosine, α β -meATP ではコントロールと同程度であった。これらの結果から、プリン関連化合物によるミクログリアでの MIP-1 α mRNA 発現誘導には、複数種のプリ

ン受容体サブタイプが関与していることが示唆された。

一方、我々はこれまでに、ラット脳スライス培養系を用いた研究により、NMDA による神経細胞傷害によりアストロサイトにおいてケモカインの一種である MCP-1 の産生が誘導されること、さらに、この MCP-1 産生誘導は MEK/ERK 系の活性化を介したものであることを明らかにしてきた。本研究では、神経細胞傷害が MIP-1 α の発現におよぼす影響について検討した。NMDA 処置により MIP-1 α の mRNA 発現量は顕著に増加した。免疫染色により産生細胞を検討したところ MIP-1 α はミクログリアにおいて細胞種特異的に産生が見られた。NMDA 前処置により予め神経細胞を除去した脳スライスでは、ミクログリアに直接作用すると考えられる LPS による MIP-1 α mRNA 発現は誘導されたが、2 度目の NMDA 処置では MIP-1 α mRNA 発現誘導は観察されなかった。このことから NMDA による MIP-1 α mRNA 発現誘導は神経細胞への作用を介したものであると考えられた。各種

MAP キナーゼ阻害薬の効果を検討したところ、ミクログリアによる MIP-1 α mRNA 発現は MEK 阻害薬 U0126 では

抑制されず、JNK 阻害薬である SP600125 により部分的ではあるが有意に抑制された。

(P7) ATP 誘発アロディニア発症機構—グリシン作動性抑制系の関与

森田克也, 本山直世, 北山友也, 土肥敏博

(広島大学大学院医歯薬学総合研究科病態探究医科学講座歯科薬理学)

ATP は末梢ならびに中枢において痛覚伝導に極めて重要な役割を果たしていることは良く知られている。近年、ATP は DRG ニューロン、脊髄後角、脊髄ミクログリアなどに発現する様々な ATP 受容体サブタイプを介して痛み情報伝達に関与しており、神経因性疼痛の発症に深く関係する疼痛ターゲットとして注目が高まっている。私達は、血小板活性化因子 (PAF) の脊髄腔内投与によりアロディニア症状が引き起こされること、PAF の下流に ATP 受容体があり、PAF 誘発アロディニアの発現に NMDA 受容体—cGMP 系を介したグリシン作動性抑制系の脱抑制が関係することを報告している。そこで、脊髄 ATP のアロディニア発現における役割とその機序について検討した。

実験は ddy 系マウスを用い、薬物は、人工脳脊髄液 (ACSF) に溶解し、第 5、第 6 腰椎間から脊髄くも膜下腔内投与 (i.t. 投与) した。アロディニア反応は Minami らの方法に従い、paint brush で軽くなでる触覚刺激に対する逃避行動からスコア化して評価した。また、アロディニア閾値は von Frey hairs 刺激によるマウス後足引込め反射閾値より評価した。

α, β -Methylene ATP (α, β -MeATP) 誘発アロディニアは

NMDA 受容体阻害薬 MK801 および NO 合成酵素阻害薬である L-NAME の i.t. 投与により消失し、 α, β -MeATP 誘発アロディニアの発現には NMDA 受容体の活性化、NO カスケードが関与することが示唆された。さらに、 α, β -MeATP 誘発アロディニアは PKG 阻害薬により抑制され、NO-cGMP 系を介して作用することが示された。近年、グリシン受容体 $\alpha 3$ サブタイプ (GlyR $\alpha 3$) が痛覚伝達に重要な役割を果たすことが示されつつある。そこで、特異的 siRNA を用いた RNA 干渉により脊髄 GlyR $\alpha 3$ ノックダウンマウスを作成した。GlyR $\alpha 3$ ノックダウンにより α, β -MeATP および cGMP 誘発アロディニアは著明な抑制をみとめ、 α, β -MeATP は cGMP を介して GlyR $\alpha 3$ に作用してアロディニアを発現している可能性が示唆された。また、 α, β -MeATP 誘発アロディニアはグリシントランスポーター (GlyT) 1 および GlyT2 の特異的阻害薬あるいはノックダウンによるグリシン神経活性の活性化により寛解した。

以上、ATP によるアロディニア発現には cGMP によりメディエートされる GlyR $\alpha 3$ を標的とする抑性系が関与することを示唆した。

(P8) 脊髄運動ニューロンにおけるプリン受容体を介するシナプス前性および後性作用

青山 貴博, 中塚 映政, 古賀 秀剛, 藤田 亜美, 熊本 栄一

(佐賀大学医学部生体構造機能学講座神経生理学分野)

脊髄損傷による麻痺の主原因は直接外力による脊髄運動ニューロンの一次的な障害であるが、脊髄損傷の急性期に脊髄運動ニューロンは遅発的に細胞死に至り、四肢あるいは体幹の麻痺は進行する。直接外力による不可逆的な障害は治療困難であるが、急性期に進行する遅発性神経細胞死への対策は極めて重要である。現在、脊髄損

傷の急性期には副腎皮質ステロイドホルモン大量療法が施行されることがあるが、その有効性は乏しいだけでなく副作用も多い。したがって、新しい作用機序を有する治療薬の登場が待ち望まれている。近年、脊髄損傷の急性期に進行する脊髄運動ニューロンの遅発性神経細胞死に ATP 受容体が深く関与することが指摘された。しかし

ながら、脊髄運動ニューロンにおけるプリン受容体の機能的役割はほとんど知られていない。

今回、ラット脊髄横断スライス標本にホールセル・パッチクランプ法を適用し、脊髄運動ニューロンにおけるプリン受容体の役割を検討した。電位固定法を用いて膜電位を-70 mVに保持して、代謝安定型のATP受容体作動薬であるATP γ S (100 μ M)を灌流投与すると、約半数の脊髄運動ニューロンにおいて内向き電流が発生すると共に、グルタミン酸を介する興奮性シナプス後電流の発生頻度ならびに振幅は著明に増加した。ATP γ S (100 μ M)によって内向き電流が観察される細胞に、P2Y受容体作動薬である2-methylthio ADP (100 μ M)を灌流投与すると、内向き電流が観察されたが、興奮性シナプス後電流の発生頻度ならびに振幅に変化はみられなかった。また、ATP γ S灌流投与によって生じた内向き電流は、記録電極内にGDP β S (2 mM)を加えることによって有意に抑制さ

れた。一方、P2X受容体作動薬である α,β -methylene ATP (100 μ M)ならびにBzATP (100 μ M)は保持膜電流に全く影響を与えなかったが、 α,β -methylene ATP (100 μ M)は興奮性シナプス後電流の発生頻度ならびに振幅を著明に増加した。

以上の結果から、脊髄運動ニューロンのシナプス前には α,β -methylene ATP感受性のP2X受容体などプリン受容体が発現しており、その活性化によってグルタミン酸の遊離が増強する。さらに、シナプス後細胞にも2-methylthio ADP感受性のP2Y受容体などプリン受容体が発現しており、その活性化によって直接的に脊髄運動ニューロンを脱分極することが明らかとなった。脊髄損傷の急性期における脊髄運動ニューロンの遅発性神経障害にシナプス前ならびにシナプス後細胞のプリン受容体が関与している可能性が示唆された。

(P9) 原子間力顕微鏡を用いたP2X₄受容体の一分子イメージング

篠崎陽一¹, 住友弘二¹, 津田誠², 小泉修一³, 井上和秀², 鳥光慶一¹

(¹NTT物性研・生体機能, ²九大・院・薬理, ³山梨大・院・医・薬理)

【目的】ATPは中枢神経系における重要な情報伝達物質であり、ATP受容体は生理条件下及び病態時において多様な機能を発揮する事が明らかとなってきた。ATP受容体の機能的な重要性が明らかとなってきた反面、構造生物学的な情報についてはほとんど明らかとなっていない。ATP受容体はイオンチャネル型P2X受容体とGタンパク共役型P2Y受容体に大別されるが、特にP2X受容体については受容体活性化に伴いその構造を変化させ、形質膜を貫通するポアを形成し、細胞外液中の陽イオンを細胞内へ流入させると考えられている。原子間力顕微鏡 (Atomic force microscopy, AFM) は対象とするサンプルの表面構造をカンチレバーと呼ばれる探針で走査し、ナノメートルスケールの解像度で構造情報を得る事ができる装置である。AFMは大気中測定に加えて液体中での測定が可能である事から、我々は従来解析が難しいとされていた膜タンパクの解析に応用できるのではないかと考えた。今回、我々はP2X₄受容体に注目し、その構造及び構造変化をAFMを用いた直接的なイメージングにより明らかとする事を目的として研究を行った。

【方法】ラットP2X₄受容体タンパクはヒト1321N1アストロサイトーマ細胞に発現させたものから調製した。細胞をスクレーパーで回収後、テフロンホモジナイザーで破砕し、スクロースバッファー中にて遠心、膜画分を得た。膜画分をCHAPSバッファーに溶解し、抗P2X₄R抗体を用いて免疫沈降によりタンパクを精製した。原子間力顕微鏡を用いた解析では表面を剥離したマイカ上に精製P2X₄受容体タンパクを静置し、バッファー中にて観察を行った。

【結果と考察】SDS-, Native-PAGEよりP2X₄受容体は三量体として精製できている事を確認した。コントロールではP2X₄受容体のAFM像は丸、もしくは三角形の形状を示し、短い線状の構造を持っていた。ATP刺激後は、各パーティクルは三量体構造に変化した。これら三つの構造物はホモ三量体を形成する個々のサブユニットであると考えられる。実際、三つの構造物の中心にできた窪みが最も深く、この部分が膜貫通領域で形成されるポアであると推定される。断面解析では、P2X₄受容体のサイズはATP刺激に伴い幅、高さ共に大きくなった。タイムラ

ブスイメージング (2 frames/sec) により解析したところ, P2X₄受容体は ATP 刺激後速やかに (<0.5 秒) 構造を三量体構造へと変化する事を確認し, 確かにこれらの

構造変化が P2X₄受容体においてリガンド依存的に起こる一連の変化である事を明らかとした。

8. 理論と実験の融合による神経回路機能の統合的理解

2007年11月29日-11月30日

代表・世話人：深井朋樹（理化学研究所 脳科学総合研究センター）

所内対応者：井本敬二（神経シグナル）

(1) 研究会の目指すところ

深井朋樹（理化学研究所 脳科学総合研究センター）、井本敬二（神経シグナル）

(2) 同期スパイクの時間正確性に潜む神経回路基盤

池谷 裕二（東京大学・大学院薬学系研究科）

(3) 情報量最大化から見た神経ネットワークの回路構造と発火パターン

青柳 富誌生（京都大学情報学研究科）、田中 琢真、金子 武嗣（京都大学医学研究科）

(4) 大脳皮質の神経結合特異性

吉村由美子（名古屋大学環境医学研究所・視覚神経科学分野）

(5) Retinal spike bursts encode multiple quantities in a time-compressive manner

Toshiyuki Ishii^{1,2}, Tomonori Manabe¹ and Toshihiko Hosoya¹ (¹RIKEN Brain Science Institute)

(6) 眼優位性可塑性における抑制回路の動的役割：発達過程における視覚皮質の計算モデル

姜 時友（理化学研究所 脳科学総合研究センター）

(7) 二種類の同期タイミングを識別する神経回路

井上 剛、井本 敬二（生理学研究所 神経シグナル研究部門）

(8) ダイナミッククランプ実証システムの構築

— 摂動応答実験とリアルタイムシミュレーションによるハイブリッド回路の実現 —

青西亨、角田敬正、太田桂輔（東工大）

渡部重夫、宮川博義（東京薬科大）

(9) 眼球運動に誘発される LFP 振動とスパイク活動の間の位相ロッキング

伊藤淳司, Pedro Mardonado, Sonja Gruen（理化学研究所 脳科学総合研究センター

計算論的神経科学研究グループ Gruen 研究ユニット）

(10) 海馬 CA1 錐体細胞の細胞外電場に対する電位応答の観察と数値モデルによる解析

宮川 博義（東京薬科大学・生命科学部・脳神経機能学）

【参加者名】

深井朋樹（理化学研究所脳科学総合研究センター）、小村豊（産総研脳神経情報研究部門）、石金浩史、伊藤淳司、大森敏明、加藤英之、姜時友、竹川高志、坪泰宏、寺前順之介、細谷俊彦、森田賢治（理化学研究所脳科学総合研究センター）、青西亨、太田桂輔、角田敬正（東京工業大学総合理工学研究科）、深山理（東京大学情報理工学研究科）、田嶋達裕（東京大学新領域創成科学研究科）、池谷裕二、佐々木拓哉、高橋直矢（東京大学薬学系研究科）、宮川博義、毛内拓（東京薬科大学生命科学部）、荒木修、長門石晋、西垣泰宏（東京理科大学理学部）、吉村由美子（名古屋大学環境医学研究所）、田中基樹（名古屋大学医

学部）、神山齊己、齊藤広樹、桜木雄一郎（愛知県立大学情報科学部）、北野勝則（立命館大学情報理工学部）、伊賀志朗（京都大学工学部）、田中琢真、藤山文乃、金子武嗣（京都大学医学研究科）、青柳富誌生、太田絵一郎、野村真樹、青木高明（京都大学情報学研究科）、宋文杰（熊本大学医学薬学研究部）、木津川尚史、定金理、廣川純也（基生研）、小泉周、井上剛、岩崎広英、窪田芳之、深澤有吾、坂谷智也、中川直、加瀬大輔、南雲康行、竹内雄一、久保義弘、川上良介、吉田正俊、平井康治、重本隆一、西尾亜希子、南部篤、宮田麻理子、井本敬二（生理研）

(1) 研究会の目指すところ

深井朋樹 (理化学研究所 脳科学総合研究センター), 井本敬二 (神経シグナル)

脳の情報処理を理解するためには、局所神経回路でどのような情報の伝達・処理・統合が行われているかを知ることが必要である。シナプス・神経細胞レベルの機能に関する知見は急速に増加してきているが、それらを体系的に把握しシステムとしての神経回路機能を理解するには、単に実験的データの集積ではなく、シミュレーションや、非線形動力学、情報統計力学などの理論的研究との融合が不可欠となってきている。

本研究会は、主に脳スライスの電気生理学的実験を行っ

ている研究者と理論研究・シミュレーションを行っている研究者が一同に会し、それぞれの領域の現状、興味ある課題、方向性、問題点などを互いにぶつけ合い、研究連携を促進することを目的とする。

研究領域を異にする研究者は、使用する用語がかなり異なることもあり、すぐに相互理解が深まるとは予想していないが、2~3回継続することにより、共同研究に結びつくような連携が生まれてくるのではないかと期待している。

(2) 同期スパイクの時間正確性に潜む神経回路基盤

池谷 裕二 (東京大学・大学院薬学系研究科)

脳は多彩な個性をもつ神経細胞の集合体であり、それらは緻密なネットワークを構成し高度に組織化されている。近年急速に発展しつつある多ニューロンカルシウム画像法 functional Multineuron Calcium Imaging (fMCI) は、こうした神経ネットワーク活動を大規模に捉える実験技法である。fMCI では、カルシウム蛍光指示薬を脳標本にバルク負荷し、神経細胞のスパイク活動に伴って生じる細胞内カルシウム濃度の一過性上昇を蛍光シグナル変化としてモニターする。つまり、神経活動をリアルタイムで可視化し、単一細胞レベルの空間解像度を保持した巨大なネットワーク活動の時空パターンを再構築することが可能である。

我々は fMCI の時間分解能の向上に取り組んできた。現在では記録速度は最高 2000 Hz にまで達し、ミリ秒単位で刻まれる神経活動へのアプローチが可能となった。そこで、この高速 fMCI を海馬培養切片に適用し、CA3 野における神経ネットワークの自発活動を記録した。再構築された時空パターンを解析した結果、集団レベルで同期した活動を示す動的な集合ダイナミクスが観察され、それらのサイズ分布はベキ則に従うことを明らかにした。また個々の神経細胞に注目した場合、細胞間での同期発火にはミリ秒レベルの高い時間正確性が保持されていることを見出した。「同期」は神経活動を特徴づけ

る現象であり、脳における情報処理機能に大きく寄与することが示唆される。また回路システムの観点からも、不安定な出力素子である個々の神経細胞が高い正確性をもって協調した挙動を示すことは興味深い。

そこで神経細胞が受ける入力と発火出力との関係に着目し、高い時間正確性を生み出すメカニズムの解明を試みた。まず fMCI を用いて細胞活動を可視化し、同期発火を示す細胞ペアを同定した上で、それらの細胞ペアからパッチクランプ記録を行った。記録された出力・入力のそれぞれの時系列パターンについて、発火同期性の定量化と細胞間での入力相関の算出を行い両者の関係を比較した。その結果、抑制性入力は発火同期性の高い細胞ペア、低いペアのいずれにおいても一様に高い相関を示すのに対し、興奮性入力は同期性の高いペアにおいてより高い相関を示した。したがって共通した興奮性入力が発火出力の同期性に関与することが伺える。このことをより詳細に検討するため、段階的に相関を保持した人工の興奮性入力パターンを作成し、この擬似入力を細胞に注入した際の発火応答を記録した。解析の結果、入力パターンの相関の増大に伴い細胞間の出力パターンの同期性が増大することを見出した。以上の結果は、ネットワークレベルで協調した活動を示す動的な細胞集団 (cell assembly) が背景レベルに存在し、細胞間レベルでの時

間正確な活動が反映されていることを示唆している。

(3) 情報量最大化から見た神経ネットワークの回路構造と発火パターン

青柳 富誌生 (京都大学情報学研究科), 田中 琢真, 金子 武嗣 (京都大学医学研究科)

近年の実験技術の進歩により、活動中の神経スパイクパターンを複数同時記録することが可能となり、多数の興味深い実験データが集まっている。例えば、課題遂行中にスパイクの同期度が変化する現象や、自発発火活動中に繰り返し現れる特定のパターン (cortical song, synfire chain), 間欠的な発火活動に特徴的な統計法則 (scale-free 性) がある事などである。一方、理論はこれらのデータに対して個別的なアプローチはあるが、十分な統一的説明を与えるまでには至っていないように思える。神経ネットワークがある法則に従い形成され機能している以上、その未知の法則を理論モデルに取り入れる事ができれば、広い範囲の実験事実が同じ原理で系統的に説明できると期待される。日々新たに報告される局所回路レベルの興味深い実験結果や個別にそれを説明する理論も提案されつつある今、統一的観点で理論研究を育む土壌はできていると言える。本発表では、統一的観点で局所回路レベルの実験を説明し、神経ネットワークの形成過程や動作原理の理解をする事試みの一つを紹介する。その観点とは、情報表現から見た最適性を基準とした神経ネットワークの理解を試みるものであり、発火パターンの情報量最大化等の観点から神経現象を理解するトップダウン的アプローチと言えらる。fMRI などのイメージングの研究では、強化学習というマクロなレベルの理論的枠組みで、報酬の期待値や予測誤差などが脳のどの領域で表現されているか、統計的手法を用いて検証し大きな成果を上げている。しかし、局所回路レベルでの対応するマクロな理論の活用に関しては、系統的研究はほとんど無いように思える。ここでは、局所回路レベルでのマクロなトップダウン的理論として、神経系のネットワーク構造は、発火活動パターンの情報量の減少を最小にする様に決められる (情報量損失の最小化) を第一の仮説として検証する。これはフィードフォワードの層状神経回路の系では適用例があるが、リカレントネットワークに理論的に適用した例は、原理的な難しさから今まで無かった。しかし、予備的研究ではこの困難を一部克

服してシナプス結合の学習則を導出できた。この理論的枠組み (我々はこれを Recurrent Informax と呼びたい。) を元に、様々な条件でどのようなネットワーク構造が現れ、その発火活動は如何なる特徴があるのか系統的に調べた。外部刺激がある場合、視覚刺激の場合では、ニューロンは視覚野に見られるシンプルセルと同様の刺激選択性を示すようになる。興味深いのは、外部入力のない自発発火状態で同様の原理を適用すると、最終的に形成されるネットワークは、特定の繰り返し発火パターンや、間欠的に生じるバースト発火の規模が冪分布を示す (scale-free 性) など観測事実と合致する発火パターンが自己組織的に出現する点である。強調したいことは、刺激を処理する神経ネットワークや外部入力のない自発発火状態の神経ネットワークの両者の多様な発火特性を、一つの原理 (情報量損失最小化) で同時に説明できる点である。

【キーワード】

- ・ cortical song : 自発発火状態の神経系に於いて繰り返し出現するある決まった発火パターン、およびその組み合わせ。
- ・ synfire chain : ニューロンの同期的な発火の集合がニューロン群の間を連鎖的に伝搬する現象
- ・ scale-free : ここでの意味は、例えばバースト発火に関与しているニューロン数 k の頻度分布が $p(k) \propto k^{-\gamma}$ のべき乗則に従うことを言う。このような分布では、分布の偏りを特徴付ける平均的な尺度 (スケール) といったものが存在しない。ちなみに、スケールフリーネットワークとは、あるノードが持つ枝の総数がべき乗則に従うものである。
- ・ 情報量最大化 : 例えば二つの神経活動パターン X, Y を考えたとき、その相互情報量を最大化すること。直観的には、相互情報量は X と Y が共有する情報量の尺度である。一方の変数を知ることでもう一方をどれだけ推測できるようになるかを示す。例えば、 X と Y が独立であれば、 X をいくら知っても Y に関する情報は得られない

し、相互情報量はゼロである。逆に、XとYが同じであれば、XとYは全情報を共有していると言う事ができ、Xを知ればYも知ることになり、逆も同様である。

・フィードフォワードネットワーク：結合を辿ったときループする結合を持たず、入力ノード→中間ノード→

出力ノードというように単一方向へのみ信号が伝播するもの

・リカレントネットワーク：結合を辿っていったとき再帰的なループを許したネットワーク

(4) 大脳皮質の神経結合特異性

吉村由美子（名古屋大学環境医学研究所・視覚神経科学分野）

大脳皮質一次視覚野は、その複雑な神経回路を基盤として視覚情報処理を実現している。その神経回路を解析するために、我々は、ラット視覚野のスライス標本において、ケージドグルタミン酸による局所刺激法と、2細胞同時ホールセル記録法を組み合わせる実験を行った。スライス標本上の近傍にある2個の2/3層錐体細胞からホールセル記録を行い、記録した細胞間に機能的なシナプス結合があるかを調べた結果、約20%のペア間で興奮性結合が観察され、残りのペアでは興奮性結合はみられなかった。細胞ペアに対する共通の入力源の有無を調べるために、ケージドグルタミン酸を用いてスライス標本上の数百箇所を局所的に刺激し、各細胞ペアに誘発された興奮性シナプス後電流 (EPSC) に時間相関解析を適用した。記録している2個の細胞間に神経結合が見られた場合には、2/3層内の別の細胞や4層から高い割合で共通の興奮性入力を受けていたが、直接結合していないペアではこのような共通入力稀だった。一方、5層から2/3層への共通入力の割合は、2/3層細胞ペアの結合の有無にかかわらず、一定であった。

また、2/3層の抑制性細胞とその近傍にある興奮性細胞のペアについても同様な解析を行った。抑制性細胞のサブタイプの一つである fast-spiking 細胞 (FS 細胞) と錐体細胞間の神経結合を解析した結果、半数以上のペアでは FS 細胞が錐体細胞に抑制性入力を与えていた。錐体細胞が FS 細胞に興奮性入力を与えている確率はサンプル全体の約2割だったが、そのほとんどすべてが FS 細胞からも入力を受けており、非常に高い結合特異性を示した。上述したケージドグルタミン酸を用いた神経回路

解析を行った結果、双方向性に結合がみられたペアでは、別の2/3層錐体細胞および4層からの興奮性入力を高い割合で共有していた。結合がないペアや抑制性結合しかみられないペアでは、両細胞への共通入力は稀であった。

以上の結果より、1) 2/3層内および4層から2/3層への興奮性結合は、近傍の錐体細胞や FS 細胞からなる特定の神経細胞群を選択的に結合することによって従来報告されている機能コラムよりもはるかにファインスケールのサブネットワークを形成し、おそらく特異性の高い情報処理計算を実行していること、2) 5層からの興奮性入力は複数のサブネットワークにまたがっており、非特異的あるいは統合的な調節をしていること、が示唆された。視覚野内の層構造や機能コラムの中にさらに独立な計算単位となるサブネットワークが埋め込まれており、皮質の局所神経回路がこれまで考えられてきたよりもはるかに精密な機能的ネットワークの組み合わせと、それを統合する回路によって構成されている可能性が考えられる。

【キーワード】

・ケージドグルタミン酸による局所回路解析法：UV 照射によりグルタミン酸を放出するケージドグルタミン酸でスライス標本を灌流した状態で、解析対象の細胞をホールセル記録する。スライス標本上に UV スポット光を局所的に照射すると、その照射部位近傍に細胞体をもつごく少数の神経細胞が発火する。発火した神経細胞が記録細胞に興奮性入力を与えている場合には、記録細胞に EPSC が生じる。

(5) Retinal spike bursts encode multiple quantities in a time-compressive manner

Toshiyuki Ishii^{1,2}, Tomonori Manabe¹ and Toshihiko Hosoya¹ (¹RIKEN Brain Science Institute)

Spike bursts, generated by neurons in many parts of the brain, are assumed to encode a single time-varying quantity. Supporting this idea, bursts generated by retinal ganglion cells encode the stimulus amplitude using the number of spikes. We found, however, that the combinations of interspike intervals (ISIs) of retinal bursts differ depending on the preceding visual stimulus. When a burst has three spikes, the two ISIs encode two independent aspects of the stimulus. Although of only a few milliseconds' duration, the ISIs encode stimulus features extending to hundreds of milliseconds. Further, these burst patterns are accurately transmitted to the lateral

geniculate nucleus. Spike bursts in single retinal ganglion cells therefore transmit at least three time-varying quantities, with the conveyed message compressed in time by two orders of magnitude. These results raise the possibility that neurons in many brain areas communicate multiple, as-yet unidentified information components using burst patterns.

【キーワード】

• Burst: Brief bursts of high-frequency spikes, typically composed of a few spikes generated within tens of milliseconds separated by much longer periods of silence.

(6) 眼優位性可塑性における抑制回路の動的役割：発達過程における視覚皮質の計算モデル

姜 時友 (理化学研究所 脳科学総合研究センター)

一次視覚野錐体細胞における眼優位性は、発達過程に自己組織化されることが知られている。矢崎陽子・ヘンシュ貴雄らは、一次視覚野両眼性領域における細胞内記録を行い、臨界期に記録細胞とは反対側の眼に施した単眼遮蔽の効果が、閾値下膜電位よりもスパイク応答に対してより大きな変化を生じさせることを明らかにした。また、引き続き細胞内に GABA ブロッカーであるピクロトキシンを注入し抑制入力を阻害することによって、それらが眼優位性の維持において重要な役割をもたらすことを明らかにした。何よりも、発達過程における単眼遮蔽の程度に応じた経験依存可塑性が、視床から錐体細胞および介在細胞への入力が協調的に変化することによって生じる可能性が示唆された。実際に記録されたスパイク応答を再現するようなシナプス変化の詳細について明らかにすることが求められるが、一般に生体内においてそれらを記録することは非常に困難である。そこで我々は、視覚皮質神経回路のモデルを構築し計算機実験を行うことによって、経験依存可塑性がどのようなシナプス変化によって実現されるのかを調べた。具体的には、マルチコンパートメントから成る錐体細胞を用意し、その樹状突起には視床からの興奮性入力を、細胞体には介在

細胞からの順行性抑制入力をうける回路モデルを用いた。この回路網において、錐体細胞および介在細胞への視床-皮質シナプス荷重を様々に変えることによって、実験によって得られたスパイク応答を最もよく再現する領域を調べたところ、視床から抑制細胞への興奮性入力動的に変化することによって、その抑制細胞から抑制入力を受ける錐体細胞における眼優位性が実現できることを明らかにした。本発表では、生体内細胞内記録と計算機実験を相補的に行った結果を紹介し、双方から得られた知見から一次視覚野錐体細胞の眼優位性活動において経験依存可塑性を生じさせる局所回路の様式を同定できることを示す。

【キーワード】

• 眼優位性 (Ocular dominance; OD): 両眼性の応答を示す細胞における左右眼への視覚刺激に対する応答の優位性。
• 単眼遮蔽 (Monocular deprivation; MD): 視覚刺激の経験が一次感覚野の形成に及ぼす影響を調べるために、単眼への視覚入力を外科的あるいは薬理的に阻害する操作。
• 経験依存可塑性: 視覚刺激等の感覚入力の経験に依存した可塑性

(7) 二種類の同期タイミングを識別する神経回路

井上 剛, 井本 敬二 (生理学研究所 神経シグナル研究部門)

脳神経回路は、神経細胞とシナプスによって構築され、その回路構造に従って信号処理が行われる。すなわち、「どのような神経回路配線が、どのような信号処理を行うことができるのか」その構造―機能連関を明らかにすることは、神経回路研究において重要な課題である。我々は、視床―大脳皮質神経回路に注目し、この問題に取り組んでいる。

感覚入力（視覚・聴覚・体性感覚）は、視床に一旦集約し、大脳皮質へと運ばれる。視床―大脳皮質間の信号伝達が効率的に行われるために、視床からの入力がある程度“同期”する必要があることは良く知られている。しかしながら、「どのような神経回路配線があれば、同期信号は効率的に大脳皮質に伝わるのか」に関して、未だ十分に明らかにされていない。

この神経配線基盤を明らかにするため、まず我々は視床と大脳皮質が連結した脳スライス標本を用い、複数の視床細胞から複数の大脳皮質4層細胞へのシナプス配線図を調べた。大脳皮質細胞からトリプルパッチクランプ記録下、視床細胞の単一線維刺激を行うことにより、この問題にアプローチした。その結果、「複数の視床細胞が同じフィードフォワード抑制回路を共有する」という、特徴的なフィードフォワード抑制回路が存在することを見出した。

次に、視床―大脳皮質間の同期信号の伝達における、この抑制回路の役割を調べた。ダイナミッククランプ法を

併用してハイブリッド神経回路を構築することにより、この問題にアプローチした。その結果、この抑制回路内に存在する fast-spiking cell (FS 細胞) が過分極状態にある場合、時間のずれた同期入力 (synchronous but time-lagged input) が大脳皮質細胞を効果的に興奮させることがわかった。逆に FS 細胞が脱分極状態にある場合、正確に同期した入力 (coincident input) が大脳皮質細胞を効果的に興奮させた。

これらの結果は、FS 細胞の膜電位に応じて、二種類の同期入力のどちらかが視床から大脳皮質へ効率的に伝わることを示している。言い換えると、我々がある存在を明らかにした抑制回路は、二種類の同期タイミングを識別する能力を持っている。

【キーワード】

- ・フィードフォワード抑制回路：単シナプス性興奮経路に多シナプス性抑制経路がくっついた神経回路。二つの経路は同じ細胞に起因するため、受け手の細胞は興奮入力を受けた後、すぐに抑制入力を受けることになる。
- ・ダイナミッククランプ法：パッチクランプ法などを用いて膜電位記録された細胞に対し、コンピュータシミュレーションを用いて人工的な膜電流・シナプス電流を与える方法。この方法を用いると、リアルな細胞・シナプスと人工的な細胞・シナプスが組み合わさったハイブリッド回路を構築することが可能となる。

(8) ダイナミッククランプ実証システムの構築

―摂動応答実験とリアルタイムシミュレーションによるハイブリッド回路の実現―

青西亨, 角田敬正, 太田桂輔 (東工大)
渡部重夫, 宮川博義 (東京薬科大)

標本とは全体の中から取り出し観察・調査を行う一部分である。科学で重要なのは、如何に「標本」を作るかである。知りたい現象を保存しつつ単純であることが理想である。理想的な標本があれば、実験による観測が容易で有用なデータが得られる。また、単純であれば数理

モデルの構築が容易で理論的理解が進む。脳科学、特に局所回路研究で、実験と理論の観点から理想的な標本を作る手段は存在しないであろうか。その有力な手段の1つが「ダイナミッククランプ」である。

ダイナミッククランプとは制御工学のフィードバック

システムの拡張である。リアルタイムに「数理モデル」の数値計算を実行しながら、細胞の膜電位を測定してそれを数理モデルに入力し、数理モデルの出力を電流として細胞にフィードバックする。例えば本物の細胞のイオンチャンネルを数理モデルで置き換えたり、細胞同士を仮想シナプスで結合して仮想回路を構築したり、数理モデルで構築した仮想細胞と本物の細胞のハイブリット回路が構築できる。すなわち、コンピュータシミュレーションにおける数理モデルを本物の細胞に置き換えたことに対応し、パラメータが自由に設定できる理想的な「標本」を作ることが可能である。ダイナミッククランプは理論的研究と実験的研究の媒介となる。

しかしながら、日本でダイナミッククランプを使用している研究グループは数グループしか存在しない。そのほとんどは外国人研究者が開発したシステムを用いている。この技術は局所回路研究でのブレークスルーをもたらす可能性を秘めているので、日本独自でこの技術を開発することは意義深い。

我々は、ダイナミッククランプの実証システムを構築した。計算機は Celeron M 1.6GHz, AD-DA 変換器を搭載し、インターフェイス回路を経由して電気生理用アンプと接続した。OS は Red Hat Linux 9 の kernel-2.4.20 に RTlinux3.2-pre2 のパッチをあてリアルタイム化したものである。この構築したシステムを用いて以下に示す2つ

のベンチマーク実験を行った。

実験 1: ダイナミッククランプの利点として、コンピュータシミュレーションでしか行えなかった複雑なプロトコルの摂動応答実験を本物の細胞で実行できる点がある。我々はベンチマークとして、海馬 CA1 錐体細胞の位相応答曲線の測定をダイナミッククランプで行った。(注: 位相応答曲線の詳細は講演で)

実験 2: 介在細胞の Fast Spiking (FS) 細胞の数理モデルと海馬 CA1 錐体細胞のハイブリット回路を構築した。FS 細胞モデルの Na チャネルの活性化ゲートの時定数は最小であり、通常の数値積分法(オイラーやルンゲクッタなど)では時間刻みを十分に小さくしないと安定した結果が得られない。よって、膨大な繰返し計算が必要であり、リアルタイムに数値計算を実行するのは困難である。そこで、我々は「指数オイラー法」を用いて FS 細胞モデルのリアルタイムシミュレーションを行った。図 2 に生理実験の結果を示す。錐体細胞のスパイク発生直後、FS モデルがスパイクを発生し、仮想 GABA 入力により錐体細胞が過分極している。

最後に、お前たちは「箱庭」を作っているだけだと批判する人がいるのは事実である。しかし、この世に「箱庭」を研究しない科学は存在しない。「箱庭」=「標本」=「モデル」であることを強調しておく。

(9) 眼球運動に誘発される LFP 振動とスパイク活動の間の位相ロッキング

伊藤淳司, Pedro Mardonado, Sonja Gruen (理化学研究所 脳科学総合研究センター 計算論的神経科学研究グループ Gruen 研究ユニット)

我々は通常、1 秒間に約 4 回の頻度でサッカードと呼ばれる急速な眼球運動を行っているが、それに伴う視覚刺激の揺動はほとんど感じられることはない。これはサッカード抑制と呼ばれ、サッカード中の視覚刺激を抑制する働きによるものとされているが、その具体的なメカニズムはいまだ明らかになっていない(ただし[1]を参照)。これに関連して、古くから眼球運動に由来する視床・皮質の神経活動が調べられてきたが、その中で、サッカードに由来する一過性の局所電位 (local field potential, LFP) 振動が外側膝状体や視覚皮質において見られることが明らかにされている。この振動的活動は暗

視条件や盲状態においても観察されることから、網膜からの視覚刺激とは独立に、眼球運動に関する信号が視床・皮質に到達していることを示していると考えられる。視覚皮質における LFP 振動に関しては、ガンマ帯域振動 (30-100 Hz) の同期現象が広く知られており、視覚刺激の結びつけ問題やコーディングの問題との関連から活発に研究されている^[2,3]。

しかしながら、それらの研究で見られる顕著なガンマ帯域活動は、実験室内で広く用いられている moving grating などの視覚刺激では容易に誘発されるものの、自然の風景や動物やオブジェクト等を含む複雑なシーンの

知覚においてはあまり誘起されない。そのような動物や人間の日常活動における自然な状態により近い条件において支配的なのは、10-30 Hz 程度の周波数を持つ、よりゆっくりとした振動活動であり、その中には上記の眼球運動に由来する振動活動も含まれる。これらの振動活動が視覚情報処理において担っている機能的意義についてはまだほとんど理解されていない。

これらの知見を踏まえて本研究では、眼球運動に由来する LFP 振動が視覚皮質における情報処理に及ぼす影響を明らかにすべく、サルが自然イメージを自由に（即ち眼球運動を行いながら）眺めている状態における primary visual area の神経活動を計測し、LFP の振動活動と個々のニューロンのスパイク活動を、特に振動の位相とスパイク発火タイミングとのロッキング（同期）の観点から分析した。

サッカードによって誘発される LFP 振動は潜時約 100 ms の positive peak を持ち、これはニューロンの平均発火頻度のピークとほぼ同時である。サッカード終了時（＝固視開始時）以降に生じたスパイク、すなわち固視時の視覚刺激に由来すると考えられるスパイクについて、LFP 振動の位相とのロッキングの程度を解析したところ、有意なロッキングは固視開始後のどの時間帯におい

ても見出されなかった。しかしながら、固視開始後に生じた「最初の」スパイク (first spikes) に限って解析を行ったところ、固視開始後約 70 ms において非常に有意なロッキングが検出された。サッカードの平均持続時間は約 30 ms であるため、このタイミングは LFP 振動の positive peak の潜時と一致する。このような first spikes のみに見られる LFP 振動とのロッキングという現象は、Sorpe らによって提唱されている、スパイク潜時を用いた情報のコーディング仮説 (latency coding hypothesis) との関連が想起される^[4]。これに関連して、最近 Fries らが LFP のガンマ帯域振動による発火率コーディングから潜時コーディングへの変換というアイデアを提唱しているが^[3]、本研究の結果からは、眼球運動に由来する 16 Hz 程度の周波数をもつ振動活動が、潜時コーディングへの変換、もしくは潜時推定のための基準時の設定に関してより重要な役割を果たしていることが示唆される。

参考文献

- [1] Lee PH et al. (2007) PNAS 104:6824-6827.
- [2] Engel AK et al. (2001) Nat Rev Neurosci 2:704-716.
- [3] Fries P et al. (2007) Trends Neurosci 30:309-316.
- [4] VanRullen R et al. (2005) Trends Neurosci 28:1-4.

(10) 海馬 CA1 錐体細胞の細胞外電場に対する電位応答の観察と数理モデルによる解析

宮川 博義（東京薬科大学・生命科学部・脳神経機能学）

脳において情報は多数の神経細胞の集団的活動として表現されているとする考え方があります。この視点から神経活動を理解しようとするとき、神経細胞に活動を誘起する機序と、神経細胞間の活動の同期・非同期等の関係を決定する機序を知る必要があります。従来、興奮性および抑制性のシナプス入力統合によってこれらを理解しようとしてきました。しかし、神経細胞間の非シナプス的な相互作用も視野に入れ、シナプスを介する相互作用と合わせて理解する必要があると思います。私は化学的および電気的な二種類を想定して非シナプス相互作用の可能性を調べています。本発表では海馬錐体細胞樹状突起の電気的特性に基づく相互作用の可能性を議論したいと思います。

発生原因は未だよくわからないながら、脳内にはθ波

などの脳波が存在し、その際の電位勾配が神経細胞に対して何らかの影響を及ぼしている可能性があります。また、シナプス電流や樹状突起スパイクなどの発生に伴って局所的な電場が発生し、近隣の神経細胞がその影響を受ける可能性があります。そこで、海馬スライス標本の CA1 野に、錐体細胞の樹状突起に平行な方向に直流あるいは交流の弱い電場を負荷し、その際の電位応答を電気生理学的手法と高速電位イメージング法を用いて観察してみました。その結果、直流電場に対して、細胞体部ではゆっくりした 1 相性の、樹状突起先端部では 2 相性の応答が記録されました。また、交流電場に対しては、細胞体部では周波数に対して一様に応答の大きさが変化するのに対して、樹状突起先端部では特定の周波数に対して応答が最大になることを見出しました。

これらの応答は従来の単純な理解では解釈のつかないものであったので、その原因を説明しうる仮説を得るために数理モデルを用いたシミュレーションを行いました。その結果、受動的膜特性を持つケーブルの一端の膜抵抗を他の部分の膜抵抗よりも低くしておいて細胞外に直流あるいは交流の電場を負荷すると、実験的に得られた膜電位応答の特徴が再現されることを見出しました。この結果は、海馬 CA1 錐体細胞の樹状突起先端部の膜抵抗が他の部位よりも低くなっていることを示唆しています。実は、この可能性は以前から、電流注入に対する応答の電気生理的手法による測定 (Stuart & Spruston, 1998)、及びシナプス後電位の伝播の電位イメージングによる測定の結果 (Inoue et al., 2001; Omori et al., 2006) に基づいて示唆されており、我々の研究は、その可能性を電場刺

激に対する応答を解析することによって確かめたこととなります。先端部の低膜抵抗の原因となるイオンチャネルの実体の解明はこれからの課題です。

モデルシミュレーションの結果は、一端の膜抵抗が低いケーブルでは、細胞外電位勾配刺激に対する応答の振幅が、逆端において大きくなることを示しています。以上の研究の結果は、海馬 CA1 錐体細胞が細胞外電位勾配を検出するのに適した電気的特性を有すること、また、振動性細胞外電位に対して好適周波数が存在することを示しています。すなわち、脳波の位相によってシナプス応答の有効性が影響を受ける可能性や、錐体細胞自身の発生する電場を介して錐体細胞間が相互作用する可能性を示唆しています。

9. 脳波と脳磁図を用いたヒト脳機能の解明

2007年6月21日

代表・世話人：柿木 隆介（自然科学研究機構生理学研究所）

所内対応者：柿木 隆介（自然科学研究機構生理学研究所）

- (1) 視覚反応のグレーティング方位依存性の multifocal VEF 計測を用いた研究
大脇崇史（東京大学 新領域創成科学研究科 複雑理工学専攻）
- (2) 連続提示刺激の視覚誘発脳磁場反応
橋本章子（自然科学研究機構 生理学研究所 統合生理研究系）
- (3) 時間的に振幅変調された輝度変化パターンに対する脳磁界反応
岡本洋輔（独立行政法人産業技術総合研究所）
- (4) パターンリバーサル刺激による視覚誘発反応 N75-P100-N145 成分の起源の検討
豊田忠祐（岡山理科大学理学部応用物理学科医用科学専攻）
- (5) 多義的仮現運動の知覚交代を行う意図に統計的相関を示す MEG
下野昌宣（東京大学）
- (6) 双安定仮現運動における知覚交替に関連した皮質間ネットワークの解析
南 哲人（独立行政法人情報通信研究機構未来 ICT 研究センター）
- (7) 反復経頭蓋磁気刺激による多義図形の知覚交替についての研究
葛 盛（九州大学大学院システム情報科学研究院）
- (8) 経頭蓋磁気刺激による視覚探索課題時の時間特性
松岡 彬（九州大学大学院システム情報科学研究院）
- (9) 初期視覚野の活動を抑えるランダムドットブリンキング
三木研作（自然科学研究機構 生理学研究所 統合生理研究系）
- (10) 顔刺激を用いた自己認知に関する研究
山崎貴也（東京大学大学院 新領域創成科学研究科 複雑理工学専攻 武田研究室）
- (11) 色調知覚と脳活動の関係に関する研究
豊福哲郎（千葉大学大学院工学研究科）
- (12) オートステレオグラムを用いた奥行き知覚時の MEG 反応
古内康寛（東京大学大学院新領域創成科学研究科）
- (13) バイオロジカルモーション刺激に対する脳磁場反応：double-stimulus presentation 法による検討
平井真洋（自然科学研究機構 生理学研究所 統合生理研究系）
- (14) 視覚性運動刺激の大きさが脳磁場反応に与える影響について
浦川智和（自然科学研究機構 生理学研究所 統合生理研究系）
- (15) 様々な仮現運動刺激に対するヒト脳磁場反応
田中絵実（自然科学研究機構 生理学研究所 統合生理研究系）
- (16) 母音の視聴覚提示時の脳磁界反応
尾形エリカ（東京大学大学院医学系研究科耳鼻咽喉科学）
- (17) 文字・音声刺激を用いた MEG 研究
小林明裕（東京大学大学院 新領域創成科学研究科）
- (18) 仮名文字音読時に文字種の違いが処理過程に与える影響
東島 将（関西大学大学院工学研究科）

- (19) MCE 法による言語優位半球および言語特異的皮質領野の同定
太田 徹 (秋田大学医学部神経運動器学講座 脳神経外科学分野)
- (20) 文法由来の逸脱と単語由来の逸脱に対する反応計測
御代田亮平 (東京大学大学院 新領域創成科学研究科 複雑理工学専攻)
- (21) 漢字単語の意味処理への音韻の影響：音韻プライミング課題を使った MEG 研究
魏 強 (情報通信研究機構 バイオ ICT グループ)
- (22) 3-D SEF に基づく周波数の異なる指刺激による応答特性の検討
川瀬 啓 (東京電機大学大学院 理工学研究科)
- (23) 正中神経刺激による体性感覚誘発脳磁界と M 波との関係
大山峰生 (新潟医療福祉大学)
- (24) 触覚振動刺激の周波数判別における二次体性感覚野と聴覚野の相互連絡
井口義信 (東京都精神医学総合研究所 脳機能解析研究チーム)
- (25) 仙骨部表面電気刺激による体性感覚誘発脳磁界
松下真史 (東北大学大学院医学系研究科泌尿器科学)
- (26) 頸部脊髄誘発磁場からの信号源再構成
佐藤朋也 (首都大学東京大学院 システムデザイン研究科 生体信号処理研究室)
- (27) 舌前方と後方でみられる体性感覚処理機構の違い
坂本貴和子 (自然科学研究機構 生理学研究所 統合生理研究系)
- (28) 体性感覚二点識別の脳内処理機構
赤塚康介 (自然科学研究機構 生理学研究所 統合生理研究系)
- (29) 体性感覚刺激 Go/Nogo 課題における反応抑制過程：事象関連型 fMRI による検討
中田大貴 (自然科学研究機構 生理学研究所 統合生理研究系)
- (30) 空間的注意の視覚-体性感覚モダリティリンクに関わる脳磁場反応
木田哲夫 (生理学研究所 統合生理研究系 感覚運動調節研究部門)
- (31) 病変を持つ症例に対する pattern reversal 刺激を用いた視覚関連局所脳律動変化の解析
谷 直樹 (大阪大学 医学部 脳神経外科)
- (32) 脳腫瘍症例における体性感覚誘発磁場を用いた感覚機能評価
土谷大輔 (山形大学医学部脳神経外科)
- (33) シルビウス裂周囲症候群のてんかん外科における MEG の有用性
村上博淳 (国立病院機構 西新潟中央病院 脳神経外科)
- (34) Gastaut 型特発性小児後頭葉てんかんの脳磁図所見
齋藤なか (国立病院機構西新潟中央病院 小児科)
- (35) 陰性ミオクローヌスを呈したてんかん患者 2 例の脳磁図解
服部英司 (大阪市立大学大学院医学研究科発達小児医学)
- (36) 軽度アルツハイマー病患者における基礎律動減衰の評価：MEG 研究
栗本 龍 (大阪大学大学院医学系研究科精神医学教室)
- (37) 認知症診断のための自発性脳磁場データベースの構築
初坂奈津子 (金沢工業大学 先端電子技術応用研究所)
- (38) 標準脳座標に変換した脳表電流密度マップの ROI 解析による言語優位半球の同定
錦古里武志 (名古屋大学大学院医学系研究科 脳神経外科)
- (39) Multimodality - fMRI, MEG, NIRS - による言語優位半球同定の検討
太田貴裕 (東京大学医学部 脳神経外科)

- (40) MCGによる心疾患モデルマウスの経時的観察
葛西祐介（早稲田大学大学院理工学研究科）
- (41) Current Source Reconstruction of MCG Vector Data
De Melis Massimo (Department of electronic and computer engineering, Tokyo Denki University)
- (42) ウェーブレット変換と独立成分分析を用いた心磁図のノイズ低減に関する研究
宮内秀彰（岩手大学大学院工学研究科）
- (43) 運動負荷による三次元心磁図のST分節の検討
寒河江健（東京電機大学大学院 理工学研究科）
- (44) Early detection of coronary artery disease in patients with suspected acute coronary syndrome without ST elevation by magnetocardiography.
Hyukchan Kwon (Bio-signal Research Center, Korea Research Institute of Standards and Science, Daejeon, Korea)
- (45) Diagnostic performance of magnetocardiography parameters to detect patients with coronary artery disease I: non-ST-segment elevation myocardial infarction
Hyun Kyoon Lim (Korea Research Institute of Standards and Science, Daejeon, Korea)
- (46) シングルチップ集積型 SQUID マグネトメーターアレイ心磁計を用いたモルモット心磁・心電同時計測とQT間隔自動解析
駒村和雄（国立循環器病センター研究所 循環動態機能部）
- (47) 聴覚野における時間積分機構の検討
中川誠司（独立行政法人産業技術総合研究所 人間福祉医工学研究部門）
- (48) 定常聴覚刺激提示時における聴覚磁場応答
富田教幸（金沢工業大学大学院 システム設計工学専攻）
- (49) 音源の位置の知覚に関わる聴覚誘発脳磁界反応
添田喜治（産業技術総合研究所 人間福祉医工学研究部門）
- (50) 先行する音階にプライミングされた和音による脳磁界反応
大塚明香（東京大学 21 世紀 COE プログラム「心とことばー進化認知科学的展開」）
- (51) 異なる音階構造を持つ音列聴取時の MEG 計測
前島克也（東京電機大学大学院 情報環境学研究科 情報環境デザイン学専攻）
- (52) 音色のカテゴリー知覚の聴覚誘発 N1m 潜時への反映
水落智美（東京大学大学院 医学系研究科 感覚・運動神経科学）
- (53) 情緒的音声聴取時における早期聴覚情報処理過程；男女差に関する検討
矢倉晴子（情報通信研究機構未来 ICT 研究センター）
- (54) 音の特徴の情報処理に音楽経験が与える影響の検討
小野健太郎（国立長寿医療センター研究所 長寿脳科学研究部）
- (55) フレーズの変化の認識に対応する誘発脳磁界の研究ー変化のタイプとの関係
平井一弘（東京電機大学大学院 情報環境学研究科）
- (56) バースト長を変えたときの音列のテンポ認識とそれに伴う N1m の計測
笹本貴宣（東京電機大学大学院情報環境学研究科）
- (57) 聴覚皮質にみられる確率共鳴現象
田中慶太（東京電機大学）
- (58) 示指伸展運動時における運動誘発脳磁界第二成分について
大西秀明（新潟医療福祉大学医療技術学部）

- (59) ニューロイメージング PF 構想 (ニューロインフォマティクス)
鈴木良次 (NIMG-PF 委員会)
- (60) 力操作時の非協調的視覚変化に伴う擬似的力感覚生成過程の基礎的検討
青山敦 (慶應義塾大学大学院 理工学研究科)
- (61) 脳磁界応答から見た運動感覚が運動イメージ想起に与える影響
林 紘章 (関西大学大学院工学研究科)
- (62) 機能的 MRI を用いたヒトの嗅覚と味覚の脳活動に関する研究
宇野富徳 (東京電機大学)
- (63) ガムチューイングが短期記憶獲得時の θ 波活動に及ぼす影響
堂脇可菜子 (早稲田大学大学院理工学研究科)
- (64) 小脳経頭蓋磁気刺激によりヒラメ筋に誘発される筋電位への前庭系賦活の効果
～視運動性眼振を用いて～
藤原暢子 (大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻機能診断科学)
- (65) 刺激部位の違いによる経頭蓋磁気刺激時の誘発脳波計測
佐藤秀之 (九州大学大学院システム情報科学研究院)
- (66) 全力暗算時における局所脳律動変化 ～そろばん熟練者と非熟練者の比較～
木曾加奈子 (大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻機能診断科学)
- (67) 計算する脳ー計算式実行中の脳活動の解析
中村昭範 (国立長寿医療センター 長寿脳科学研究部)
- (68) 三次元脳磁界計測に基づく大脳皮質での複数信号源弁別に関する研究
金 鳳洙 (東京電機大学理工学部電子情報工学科)
- (69) N1m 振幅などに含まれる乗法的な個人の効果を前処理で除去したデータの分散分析について
根本幾 (東京電機大学情報環境学部)
- (70) MEG トポグラフにおける統計的有意な活動の抽出方法の開発
岩井裕章 (千葉大学大学院工学研究科人工システム科学専攻メディカルシステムコース)
- (71) 脳内信号源推定における遺伝的アルゴリズムパラメータの最適化
佐々木貴志 (早稲田大学大学院理工学研究科)
- (72) MEG 計測へのカルマンフィルタの応用
宇野 裕 (東京大学大学院 新領域創成科学研究科 複雑理工学武田常広研究室)
- (73) チホノフの正則化を用いた MEG 信号源推定
斎藤 優 (早稲田大学大学院理工学研究科)
- (74) 誘発脳磁界計測データを用いたアダプティブ、及び、ノンアダプティブな空間フィルターの比較
長野雅実 (首都大学東京大学院 システムデザイン学部)
- (75) Beamformer による時間相関を持つ複数信号源推定
及川敬敏 (早稲田大学大学院理工学研究科)
- (76) 平面型グラジオメータの等磁場線図
橋詰 顕 (広島大学大学院先進医療開発科学講座脳神経外科)
- (77) 電流双極子を2等辺3角形コイルで表現したファントムの試作
上原 弦 (金沢工業大学)
- (78) 心磁界計測データからの信号源推定
組橋 勇 (首都大学東京大学院 システムデザイン研究科)

- (79) 人とサルの心臓磁場の比較
宗行健太 (岡山大学 大学院自然科学研究科)
- (80) 高ダイナミックレンジ・広帯域型 FLL 回路の開発ーその 1 回路設計とシミュレーションー
小林宏一郎 (岩手大学 工学部)
- (81) 高ダイナミックレンジ・広帯域型 FLL 回路の開発ーその 2 試作回路の評価と心磁図計測ー
小山大介 (岩手大学 工学部)
- (82) 小動物生体磁気計測装置におけるノイズキャンセリング
宮本政和 (金沢工業大学 先端電子技術応用研究所)
- (83) 75ch SQUID 頸部脊髄誘発磁場計測システムの開発
足立善昭 (金沢工業大学 先端電子技術応用研究所)
- (84) 高精度 TMS 刺激部位解析システム
樋脇 治 (広島市立大学大学院情報科学研究科)
- (85) 超強磁場 MRI におけるヒト頭部 RF 電磁場の FDTD 解析
関野正樹 (東京大学大学院新領域創成科学研究科)
- (86) 骨再生の実用化に向けた永久磁石磁気回路の検討
齋藤大輔 (東京電機大学 先端工学研究所)
- (87) 骨形成に関わる細胞系パターンニングにおける反磁性的な磁気作用
岩坂正和 (千葉大学工学部)
- (88) 中間周波磁界 (2,20kHz) の生物影響評価
池畑政輝 (財団法人鉄道総合技術研究所 環境工学研究部 生物工学)
- (89) 磁気誘発筋電図による施灸効果の検出
千葉 惇 (近畿大学医学部生理学 1)
- (90) 交番磁気刺激による神経栄養因子産生の促進: アルツハイマー型痴呆等脳疾患の治療の可能性
木下 香 (株式会社メディカル・アプライアンス 技術開発センター)
- (91) 大腸菌 SOD 欠損株の遺伝子変異誘発に基づく定常磁場の影響評価
吉江幸子 (財団法人鉄道総合技術研究所 環境工学研究部 生物工学)
- (92) 細胞磁界測定法を用いた Refractory Fiber の有害性評価
工藤雄一朗 (北里大学医学部衛生学公衆衛生学)
- (93) 光酸化を利用したリポソーム内包薬物の放出制御に関する研究
中川秀紀 (東京大学大学院医学系研究科)

【参加者名】

大脇崇史 (東京大学新領域創成科学研究科複雑理工学専攻), 橋本章子 (自然科学研究機構 生理学研究所), 岡本洋輔 (独立行政法人産業技術総合研究所), 豊田忠祐 (岡山理科大学理学部応用物理学科医用科学専攻), 下野昌宣 (東京大学), 南 哲人 (独立行政法人情報通信研究機構未来 ICT 研究センター), 葛 盛 (九州大学大学院システム情報科学研究院), 松岡 彬 (九州大学大学院システム情報科学研究院), 三木研作 (生理学研究所統合生理研究系), 山崎貴也 (東京大学 新領域創成科学研究科 複雑理工学専攻 武田研究室), 豊福哲郎 (千葉

大学大学院工学研究科), 古内康寛 (東京大学大学院新領域創成科学研究科), 平井真洋 (自然科学研究機構 生理学研究所), 浦川智和 (自然科学研究機構 生理学研究所 感覚運動調節部門), 田中絵実 (自然科学研究機構 生理学研究所), 尾形エリカ (東京大学大学院医学系研究科耳鼻咽喉科学), 小林明裕 (東京大学大学院新領域創成科学研究科), 東島将 (関西大学大学院), 太田徹 (秋田大学医学部神経運動器学講座 脳神経外科学分野), 御代田亮平 (東京大学大学院新領域創成科学研究科複雑理工学専攻), 魏 強 (情報通信研究機構 パイ

オ ICT グループ), 川瀬啓 (東京電機大学大学院理工学研究科), 大山峰生 (新潟医療福祉大学), 井口義信 (東京都精神医学総合研究所 脳機能解析研究チーム), 松下真史 (東北大学大学院医学系研究科泌尿器科学), 佐藤朋也 (首都大学東京大学院 システムデザイン研究科 生体信号処理研究室), 坂本貴和子 (自然科学研究機構 生理学研究所), 赤塚康介 (自然科学研究機構 生理学研究所), 中田大貴 (自然科学研究機構 生理学研究所), 木田哲夫 (生理学研究所 統合生理研究系 感覚運動調節研究部門), 谷直樹 (大阪大学 医学部 脳神経外科), 土谷大輔 (山形大学医学部脳神経外科), 村上博淳 (国立病院機構 西新潟中央病院 脳神経外科), 齋藤なか (国立病院機構西新潟中央病院 小児科), 服部英司 (大阪市立大学大学院医学研究科発達小児医学), 栗本 龍 (大阪大学大学院医学系研究科精神医学教室), 初坂奈津子 (金沢工業大学 先端電子技術応用研究所), 錦古里武志 (名古屋大学大学院医学系研究科脳神経外科), 太田貴裕 (東京大学医学部 脳神経外科), 葛西祐介 (早稲田大学大学院理工学研究科), De Melis Massimo (Department of electronic and computer engineering, Tokyo Denki University), 宮内秀彰 (岩手大学大学院工学研究科福祉システム工学専攻), 寒河江健 (東京電機大学大学院理工学研究科), Hyukchan Kwon (Bio-signal Research Center, Korea Research Institute of Standards and Science, Daejeon, Korea)Hyun Kyoon Lim (Korea Research Institute of Standards and Science, Daejeon, Korea), 駒村和雄 (国立循環器病センター研究所), 中川誠司 (独立行政法人産業技術総合研究所 人間福祉医工学研究部門), 富田教幸 (金沢工業大学大学院 システム設計工学専攻), 添田喜治 (産業技術総合研究所 人間福祉医工学研究部門), 大塚明香 (東京大学 21 世紀 COE プログラム「心とことばー進化認知科学的展開」), 前島克也 (東京電機大学大学院 情報環境学研究科 情報環境デザイン学専攻), 水落智美 (東京大学大学院 医学系研究科 感覚・運動神経科学), 矢倉晴子 (情報通信研究機構 情報通信研究機構 未来 ICT 研究センター), 小野健太郎 (国立

長寿医療センター研究所 長寿脳科学研究部), 平井一弘 (東京電機大学大学院 情報環境学研究科), 笹本貴宣 (東京電機大学大学院情報環境学研究科), 田中慶太 (東京電機大学), 大西秀明 (新潟医療福祉大学医療技術学部), 鈴木良次 (NIMG-PF 委員会), 青山敦 (慶應義塾大学大学院 理工学研究科), 林紘章 (関西大学大学院工学研究科), 宇野富徳 (東京電機大学), 堂脇可菜子 (早稲田大学大学院理工学研究科), 藤原暢子 (大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻機能診断学), 佐藤秀之 (九州大学大学院システム情報科学研究院), 木曾加奈子 (大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻機能診断科学), 中村昭範 (国立長寿医療センター 長寿脳科学研究部), 金鳳洙 (東京電機大学理工学部電子情報工学科), 根本幾 (東京電機大学情報環境学部), 岩井裕章 (千葉大学大学院工学研究科人工システム科学専攻メディカルシステムコース), 佐々木貴志 (早稲田大学大学院理工学研究科), 宇野 裕 (東京大学大学院新領域創成科学研究科複雑理工学武田常広研究室), 齋藤 優 (早稲田大学大学院理工学研究科), 長野雅実 (首都大学東京システムデザイン学部), 及川敬敏 (早稲田大学大学院理工学研究科), 橋詰 顕 (広島大学大学院脳神経外科), 上原弦 (金沢工業大学), 組橋 勇 (首都大学東京大学院システムデザイン研究科), 宗行健太 (岡山大学大学院自然科学研究科), 小林宏一郎 (岩手大学工学部), 小山大介 (岩手大学工学部), 宮本政和 (金沢工業大学先端電子技術応用研究所), 足立善昭 (金沢工業大学先端電子技術応用研究所), 樋脇 治 (広島市立大学大学院情報科学研究科), 関野正樹 (東京大学大学院新領域創成科学研究科), 齋藤大輔 (東京電機大学先端工学研究所), 岩坂正和 (千葉大学工学部), 池畑政輝 ((財)鉄道総合技術研究所環境工学研究部生物工学) 千葉 惇 (近畿大学医学部生理学 1), 木下 香 (株式会社メディカル・アプライアンス技術開発センター), 吉江幸子 (財団法人鉄道総合技術研究所環境工学研究部生物工学), 工藤雄一朗 (北里大学医学部衛生学公衆衛生学), 中川秀紀 (筑波大学大学院システム情報工学研究科)

【概要】

本年の研究会は, 参加者が約 100 名であり, 94 の一般演題が発表され, 極めて活発な議論が行われた。演題数の増加のため, 各演題ともに 4 分間の口演を行っていたが, その後はポスター発表をしていただいた。これに

より, 口演とポスターの長所と短所を補うことができたと思われる。発表の半数近くは大学院生によるものであり, 若い研究者達の熱心な討論は非常に印象深いものであった。

生理学研究所に日本で初めての大型脳磁計が導入されたから、15年が過ぎようとしている。その間に、日本では脳磁図研究が著しく進み、現在では、日本は世界で最も脳磁図研究の盛んな国といっても過言ではない。現在は、全国の主要大学の大学病院に脳磁計が設置され臨床応用の試みが盛んに行われている。それと平行して、生理学研究所をはじめとする多くの研究機関にも脳磁計が設置され、ヒトの脳機能の解明を目指して研究が続けられている。

今回の研究会では、演題は「視覚」、「聴覚」、「体性感覚」、「嗅覚」、「運動」、「言語」、「臨床応用」、「工学」と

いった幅広いジャンルから発表され、わが国における脳磁図研究の裾野の広がりを実感させられた。しかし、脳磁図という共通の手法によって行われた研究ばかりであり、例え自分の専門外であっても十分に理解可能であり、また勉強になる発表ばかりであった。

この10年間は機能的MRIの熱狂的なブームが、特に米国と英国においておこり、日本でも近年、研究者が著しく増加してきている。しかし、脳磁図の持つ高い時間分解能による時間情報の詳細な検討は、機能的MRIでは行えないものであり、今後も脳磁図の長所を十分に生かした研究の発展をのぞんでやまない。

(1) 視覚反応のグレーティング方位依存性の multifocal VEF 計測を用いた研究

大脇崇史, 武田常広 (東京大学 新領域創成科学研究科 複雑理工学専攻)

グレーティング刺激に対する脳活動の強度はグレーティングの方位によって変化し、強い脳活動を誘発する方位はグレーティング刺激を呈示した視野中の位置によって変化することが、fMRI を用いた研究で最近報告された。それによれば、固視点と呈示位置とを結ぶ方位に対して強い脳活動が誘発される。そこで、視野中の複数の刺激に対する応答を短時間で計測できる手法である multifocal VEF 計測を用いて、MEG においても同様の方

位依存性があるかを調べた。正方形のグレーティングを固視点の周囲12ヶ所に配置し、これらの白黒パターンを互いに位相のみが異なるM系列に従って反転させ、個々のグレーティング刺激に対する応答を得た。グレーティングの方位には0,45,90,135°の4種類を用いた。その結果、脳磁場応答強度がグレーティングの方位に依存して変化することがわかった。その方位依存性は先行研究と矛盾していなかった。

(2) 連続提示刺激の視覚誘発脳磁場反応

橋本章子, 乾 幸二, 渡邊昌子, 柿木隆介 (自然科学研究機構 生理学研究所)

同一視野に異なる2つの視覚刺激S1とS2を連続して提示したときの、視覚誘発脳磁場反応を検討した。S1を16ms提示した直後にS2を提示すると、S2を提示する長さによってS1の見え方は変化した。そのときの2つの刺激の誘発脳磁場成分は分離することができず、S1の見え方に関わりなくS1の提示開始後180ms周辺に一貫して観察された。そこで、S1とS2の提示時間間隔を変えて比較した。その結果、2つの刺激の提示間隔が短いと

きには誘発成分は分離できないが、間隔が長くなると、S2の誘発成分は観察できた。しかし、単独で提示した場合に比べ、S2に対する応答の頂点潜時は遅延した。S1の処理はS2の処理に影響を与えるが、誘発成分の結果は、行動レベルのバックワードマスキング現象や、S2の反応時間が短縮するプライミング現象とは異なることを示唆した。

(3) 時間的に振幅変調された輝度変化パターンに対する脳磁界反応

岡本洋輔^{1,2)}, 中川誠司¹⁾, 藤井健司¹⁾, 矢野 隆²⁾, 安藤四一²⁾

(¹⁾ 独立行政法人産業技術総合研究所 (²⁾ 熊本大学 自然科学研究科)

時間周波数の異なる複数の信号を合成した点滅刺激を呈示すると、刺激の輝度変化パターンのエンベロープに相当する時間周波数が知覚される。しかし、その知覚に信号の構成周波数をもたらす違いについて詳しく調べた例はなく、エンベロープの抽出メカニズムの詳細は明らかにされていない。本実験では、振幅変調刺激のキャリア周波数、変調周波数およびその変調度を変化させて変調周波数の知覚閾値を測定すると共に、脳磁界計測を行

った。解析の結果、変調周波数に対応する脳反応成分の大きさは、キャリア周波数が低い場合は変調度の増大と共に大きくなったが、キャリア周波数が高い場合は変調度の増加に伴う変化は見られなかった。これはキャリア周波数が高くなると変調周波数に対応する成分が知覚されにくくなるという閾値測定の結果に対応している。また正弦波刺激に対する脳活動との比較から、両者の知覚に関する視覚系の処理の違いが示唆された。

(4) パターンリバーサル刺激による視覚誘発反応 N75-P100-N145成分の起源の検討

豊田忠祐¹⁾, 畑中啓作¹⁾, 仲間大貴¹⁾, 北村吉宏²⁾

(¹⁾ 岡山理科大学理学部応用物理学学科医用科学専攻 (²⁾ 岡山療護センター)

チェッカーボードパターンの反転を視覚刺激とするパターンリバーサル刺激法の特徴は、N75-P100-N145とよばれる三相波が観測されることである。われわれは、パターンリバーサル刺激による視覚誘発磁界を単一雙極子モデルで解析し、信号源がいずれも一次視覚野(V1)鳥距溝底の同一場所に推定されることから、三相波は視覚情報が網膜から経時的にV1に伝えられ生じるのではなく、高次視覚野で処理された後に、再度V1に戻る際生じる

のではないかという仮説を提唱した。この仮説を検証するため、パターンリバーサル刺激の構成要素であるパターンオンセット/オフセット刺激や、複数双極子モデルによる検討を行った。その結果P100, N145波に関しては、頂点潜時の10~15ms前に、それぞれ高次視覚野V3/V5, V4における活動を認め、これらの活動がP100, N145波の生成に関与しているのではないかという示唆を得た。

(5) 多義的仮現運動の知覚交代を行う意図に統計的相関を示す MEG

下野昌宣^{1,2)}, 武田常広¹⁾ (¹⁾ 東京大学 (²⁾ 日本学術振興会特別研究員)

本発表は、多義的仮現運動の知覚交代に関する研究で、3つの要素から構成される。第一に、我々は、この刺激で生起される知覚状態が、特定条件の下で被験者の意図によりコントロール可能である事を心理物理実験で示した。その条件とは刺激1フレームの提示時間が275ms付近よりも長くなる事である。第二に、MEG計測により、275ms以前の誘発成分は知覚交代を起こそうとする意図

と関連して変調し、また275ms以降の誘発成分は、結果として知覚交代が起きた事に関連して変調する事を示した。これらの結果の解釈は会場に委ねる。第三に、単独試行のMEG信号から知覚交代が起こるタイミングを予測する事を目標とした解析結果も報告する。現段階で、“知覚交代が能動的に起こせるかどうか”の事前予測が、70%以上の精度で可能である事を示している。

(6) 双安定仮現運動における知覚交替に関連した皮質間ネットワークの解析

南 哲人¹⁾, 村田 勉¹⁾, 矢野史朗¹⁾, 宗網信治¹⁾, 鈴木良次^{1,2)}

(¹⁾ 独立行政法人情報通信研究機構未来 ICT 研究センター (²⁾ 金沢工業大学人間情報システム研究所)

脳の認識機能の特徴は、同じ感覚入力に対しても、さまざまなとらえ方を見出す柔軟性にある。1つの図形の観察において複数の見えが意識に昇る知覚闘争現象は、この脳の柔軟性を理解する上でも、重要な知覚現象である。機能的磁気共鳴画像法 (fMRI) により、この切り替わりに関連する部位は、脳内の広範囲の部位が活動しており、これらの部位の大規模統合が深く関わっている可

能性が示唆されている。そこで本研究では、双安定性仮現運動刺激を用いて、知覚闘争時における MEG 信号を計測した。解析手法としては、単一試行ベースで、特定周波数帯の脳内空間における実信号と虚信号を求め、それらを利用して、試行ごとのパワーと位相が求めた。その結果、ガンマ帯において、右前頭部と後頭部の有意な位相同期現象をとらえることができた。

(7) 反復経頭蓋磁気刺激による多義図形の知覚交替についての研究

葛 盛¹⁾, 上野照剛²⁾, 伊良皆啓治¹⁾

(¹⁾ 九州大学大学院システム情報科学研究院 (²⁾ 九州大学大学院工学研究院)

Past research about perceptual reversals of ambiguous figures indicated that the superior parietal lobule is involved in perceptual reversals. To investigate the rTMS effect over the right superior parietal lobule on perceptual reversals, three kinds of trials, i.e., Target, Control and No-TMS trials were performed in the present study. In the Target trial, rTMS was applied over the right superior parietal lobule. In the Control

trial, rTMS was applied over the right posterior temporal lobe. In the No-TMS trial, no TMS was applied over the subject's skull. The inter-reversal times of perceptual reversals between these three trials were compared. It was suggested that the right superior parietal lobule plays a critical role in perceptual reversals of ambiguous figures.

(8) 経頭蓋磁気刺激による視覚探索課題時の時間特性

松岡 彬¹⁾, 川村祐司¹⁾, 葛 盛¹⁾, 上野照剛²⁾, 伊良皆啓治¹⁾

(¹⁾九州大学大学院システム情報科学研究院 (²⁾九州大学工学研究院)

経頭蓋磁気刺激, TMS とは脳の刺激方法の1つで、痛みが少なく非侵襲的で比較的深部の刺激も可能であるといった長所を持ち、脳機能ダイナミクスの研究に有用とされている。視覚探索とは目的の物体を探す、ヒトの視覚的注意の一種で、TMS を用いた過去の視覚探索の研究では右後頭頂葉が関与していることが示唆されている。しかし視覚探索の時間特性はまだ十分わかっていない。

本研究では TMS を視覚探索課題に用い、ヒトの視覚機能のダイナミクスを調べることが目的である。本研究では視覚探索時の右後頭頂葉の時間的關係を、TMS を利用して調べたところ、画像提示から 150ms 後で TMS による反応時間の有意な遅れが観測された。視覚探索は画像提示後 150ms 前後において右後頭頂葉で処理されている可能性が考えられる。

(9) 初期視覚野の活動を抑えるランダムドットプリンキング

三木研作^{1,2)}, 渡邊昌子¹⁾, 竹島康行¹⁾, 照屋美加¹⁾, 本多結城子^{1,3)}, 柿木隆介^{1,2,3)}

¹⁾ 生理学研究所 統合生理研究系 ²⁾ 社会技術研究システム 独立行政法人 科学技術振興機構

³⁾ 総合研究大学院大学 生命科学研究所

初期視覚野の活動を抑えるランダムドットプリンキング (RDB) を用い、顔認知過程を反映する誘発脳波を調べた。3種類の視覚刺激を用いた。(1) Upright: 輪郭, 目, 口からなる模式的な正立顔。(2) Inverted: Upright 条件を逆さにしたもの。正立顔としての全体性は失われているが, 空間的配置は Upright と同じ。(3) Scramble: Upright や Inverted と構成要素は同じだが, 内部構造の空間的配

置自体が異なる。T5, T6 電極で, 頂点潜時が刺激提示後 250 ミリ秒の陰性波 (N250) が各条件でみられた。N250 の頂点潜時は, Inverted と Scramble 条件で, Upright に比べ有意に延長していた。また最大振幅に関しては, 条件間に有意な差はみられなかった。この結果より, 正立顔を構成する要素が失われていくことで, 顔認知過程の情報処理が遅れることが示唆された。

(10) 顔刺激を用いた自己認知に関する研究

山崎貴也, 武田常広 (東京大学大学院 新領域創成科学研究科)

自己顔認知とは, 自分の顔を識別する機能のことであり, 自己意識の指標になると考えられている。しかし, 自己顔認知のメカニズムには解明されていない部分が多く, これらに関連した EEG 及び MEG による研究も少ないのが現状である。EEG における先行研究において2つの異なる結果が報告されている。一方は知人と他人の顔の提示に対する誘発反応では差がなく, 自己と知人の顔

の提示に対する誘発反応でのみ差が見られたという報告, もう一方は自己, 知人と他人の顔の提示に対するすべての誘発反応で差が見られたという報告である。そこで, 本研究では MEG を用いて同様の実験を行い, 得られた結果を特に後期成分 (200~700ms) の反応強度に注目することで二つの異なった知見に対する検討を行った。

(11) 色調知覚と脳活動の関係に関する研究

豊福哲郎, 岩井裕章, 三分一史和, 外池光雄 (千葉大学大学院工学研究科)

近年, 様々な色彩技術の発展に伴って人間の色知覚機能を正確に予測することが重要となっている。これまでの研究により人間は網膜錐体では赤, 緑, 青の三原色で, 網膜の神経節細胞以降大脳皮質では赤と緑, 青と黄が対になった4色の成分に変換され反対色で知覚しているといわれている。また, 自然な色の物体を知覚するとき記憶や, 学習に関係があることも分かっている。これにより, S.Zeki は抽象的な色の物体を知覚するときにも記憶

などに関連があるのかを fMRI を用いて, 補色画像を刺激とした実験を行っている。そこで本実験ではこれらの空間分解能に優れた fMRI の結果に対し時間分解能に優れた MEG 計測によって脳内の色知覚, 認識のメカニズムを明らかにすることを目的とする。この実験の結果, 通常色における賦活が右紡錘状回に約 100ms 前後に起こることが示唆されるなど, 継時的な応答を得ることができた。

(12) オートステレオグラムを用いた奥行き知覚時の MEG 反応

古内康寛, 大脇崇史, 武田常広 (東京大学大学院新領域創成科学研究科)

両眼視差による奥行き知覚の研究は数多く報告されているが、偏光フィルタや赤緑眼鏡を使った研究が多い。また、オートステレオグラムを用いた研究では、EEG、部分的な MEG による先行研究があるが、いずれも輻輳運動中の脳活動を記録したものになっている。本研究は、被験者が輻輳運動を終了させた状態で、奥行き知覚が起きた時の脳活動を全頭型 440chMEG を用いて計測した。

視覚刺激はダイナミックに変化しているランダムドットパターンを 1800ms 間提示した後に、1200ms 間ランダムドットステレオグラムを提示した。結果は、奥行き知覚ができる刺激提示後、約 280ms 付近で頭頂付近に大きな誘発磁場が観測された。このデータをもとに、ウェーブレットによる時間周波数解析、ダイポール推定による位置推定を行った。

(13) バイオロジカルモーション刺激に対する脳磁場反応：
double-stimulus presentation 法による検討平井真洋^{1,2)}, 金桶吉起¹⁾, 中田大貴¹⁾, 柿木隆介¹⁾

(1) 自然科学研究機構 生理学研究所 (2) 日本学術振興会

これまで、fMRI を用いた研究により biological motion (BM) 刺激提示時における脳活動部位が明らかにされてきた。しかしながら、神経活動の時間的側面は十分に明らかにされていない。本研究では、double-stimulus presentation 法を用いることにより BM 知覚処理に関連した神経活動を明らかにすることを試みた。実験では第一刺激 (S1) として、scrambled point-light walker (sPLW) を用

い、続けて第二刺激 (S2) として、upright PLW, inverted PLW および sPLW 刺激を提示した。その結果、S1 に対する MEG 反応は後側頭部において 200-300msec で検出されたのに対し、S2 に対する MEG 反応は右後側頭部において 380msec 付近で検出され、PLW 刺激で有意に強い活動を示した。これより BM 知覚処理は運動視処理とは異なることが示唆された。

(14) 視覚性運動刺激の大きさが脳磁場反応に与える影響について

浦川智和^{1,2)}, 田中絵実¹⁾, 柿木隆介^{1,2)}, 金桶吉起^{1,2)}

(1) 自然科学研究機構 生理学研究所 (2) 総合研究大学院大学 生命科学研究所

限られた視野内で視覚性の運動情報を処理するとき、その刺激のもつ大きさは重要であると考えられる。このことを検討するために今回種々の大きさ ($2.2^\circ \times 2.9^\circ \sim 44.8^\circ \times 57.4^\circ$ の 4 段階) と速度を持つ運動刺激を用いて実験を行ったところ、これまで知られている速度増加 ($2.9^\circ/s \sim 23.5^\circ/s$ の 4 段階) に伴う脳磁場反応の潜時短縮・振幅増大といった傾向に加えて、刺激大きさの増大に対し

ても潜時が短縮した。このとき振幅の有意な変動は認められなかった。これらの結果から、視覚性運動情報処理過程において運動刺激の大きさは神経活動レベルではなくその時間的側面に反映されており、その処理は刺激大きさが増大することにより時間的に短縮することが明らかになった。

(15) 様々な仮現運動刺激に対するヒト脳磁場反応

田中絵実, 野口泰基, 柿木隆介, 金桶吉起 (自然科学研究機構 生理学研究所)

異なる視覚属性で定義された仮現運動刺激の運動知覚に関わる情報処理が視覚属性依存的か否かを検討するために, 1st-order 属性 (luminance) と3種類の 2nd-order 属性 (contrast, texture, flicker) で定義された仮現運動刺激に対する MEG 反応を比較した。Motion onset 反応のピーク潜時と振幅からは, 属性間で反応特性が異なることが

示されたが, 信号源は全て MT+付近に推定された。さらに, 輝度変化を付加した 2nd-order 刺激に対する反応との比較より, 輝度付加の影響は 2nd-order の属性によって異なることが示された。これらの結果から, 属性に関わらず仮現運動知覚には MT+の活動を必要だが, その活動の時間動態は属性依存的であることが示唆された。

(16) 母音の視聴覚提示時の脳磁界反応

尾形エリカ¹⁾, 湯本真人²⁾, 伊藤憲治³⁾, 関本荘太郎³⁾, 狩野章太郎¹⁾, 伊藤 健¹⁾, 加我君孝¹⁾

¹⁾ 東京大学大学院医学系研究科耳鼻咽喉科学 ²⁾ 東京大学大学院医学系研究科病態診断医学

³⁾ 東京大学大学院医学系研究科認知・言語医学)

母音の口形と音声を提示して脳磁界反応を計測することで, 母音聴取時の聴覚処理過程を修飾する要因について検討した。視覚刺激と音刺激を時間差提示してボタン押しによるマッチング課題を行い, 聴覚刺激後の脳磁界反応を解析した。その結果, 聴覚刺激後の反応で, 視覚

刺激と音刺激が一致している提示条件と不一致の提示条件とで有意差が認められ, 一致条件で聴覚野応答が低下した。このことから, 口形の視覚刺激を見たことによって聴覚野を修飾するような感覚予測が生じ, 聴覚野応答の早い潜時に対して反映される可能性が示唆された。

(17) 文字・音声刺激を用いた MEG 研究

小林明裕, 武田常広 (東京大学大学院 新領域創成科学研究科)

McGurk 刺激 (McGurk et al., 1977) のように, 視覚と聴覚の意味が互いに矛盾する刺激を被験者に提示すると, 矛盾しない刺激が与えられた時に比べて, 反応時間が遅延すること (Norrix et al., 2006) が知られている。Mcgurk 類似刺激を利用した fMRI 実験 (Attenveldt et al., 2004) により, この脳活動に関連して賦活する, 視覚野や聴覚野を含む領域が示された。そこで本研究では, MEG を用

いて, 視覚・聴覚間の矛盾の有無に伴う脳磁場活動の変化について検討した。その結果, 視聴覚間の矛盾が存在すると, 反応時間が遅延することが確認された。また, その矛盾に伴って, 視覚野および聴覚野の信号強度の時間積分値 (SSP (signal space projection) を利用することにより取得した) が減少する可能性が示された。

(18) 仮名文字音読時に文字種の違いが処理過程に与える影響

東島 将¹⁾, 小谷賢太郎¹⁾, 堀井 健¹⁾, 岩木 直²⁾

(1) 関西大学大学院工学研究科 (2) 独立行政法人産業技術総合研究所

ヒトが文字を音読する際、直音よりも拗音の音読に時間がかかると報告されている。しかしその理由を文字読みの処理過程から検討した研究はない。本研究では、文字読み処理過程において直音と拗音の音読時間の差が生じる要因が音韻処理、構音処理のどちらであるのかを明らかにすることを目的としている。音韻処理については各文字の音読に関連した MEG を計測し、音韻処理に関連して活動する左縁上回に注目し、RMS 解析を行った。

構音処理については、予め教示した文字を呈示刺激にしたがってできる限り速く音読してもらう課題を設定し、その呈示刺激から音読までの時間を文字種で比較した。その結果、音韻処理での活動潜時では、直音と拗音で大きな差は見られなかったが、構音処理では、両者に差が見られた。本研究の結果は、直音と拗音の音読時間の差が生じる要因として構音処理が強く関与している可能性を支持するものである。

(19) MCE 法による言語優位半球および言語特異的皮質領野の同定

太田 徹, 柴田憲一, 東山巨樹, 笹嶋寿郎, 溝井和夫
(秋田大学医学部神経運動器学講座 脳神経外科学分野)

【目的】単純な言語課題と簡便な解析法を用いること、空間・時間分解能に優れる脳磁図を用いることで、より簡便に言語優位半球や言語特異的皮質領野を同定し、その経時的伝播をも明らかにすることを目的とした。

【対象・方法】手術症例を含む右利きの成人男性 8 例を対象とし、「しりとり」遂行時の脳磁界 (60 波形) を全頭型脳磁計で計測した。信号源推定にはソフトウェア「MCE」を用いた。両側シルビウス裂周囲領域を関心領域とし、信号強度 3.5 nAm 以上の反応を有意な言語関

連誘発反応として採用した。

【結果】全例、左大脳半球が言語優位であった。関心領域の誘発反応の潜時や持続時間は対象毎にばらつきがみられたが、その傾向は 2 群に大別できた。また、手術症例ではより低侵襲な手術アプローチの決定に寄与できた。

【結語】言語機能局在を簡便に同定できたが、時間的要素の検討には、さらなる計測条件の最適化が必要と思われた。

(20) 文法由来の逸脱と単語由来の逸脱に対する反応計測

御代田亮平, 武田常広 (東京大学大学院 新領域創成科学研究科 複雑理工学専攻)

fMRI や PET による研究によって人間の言語野が同定される一方、MEG や EEG を用いた研究によって言語処理の過程が解明されつつある (Friederici, 2002 など)。これらの研究で主に用いられる手法としては、文法または単語に関して逸脱した文の視覚刺激や聴覚刺激の呈示時の誘発反応を測定するものである。しかし逆に文中における言語的に逸脱した箇所に対する誘発反応が文法由来のものか、または単語由来のものかを調べた研究は少な

い。そこで我々は日本語において文法上の非正常文と単語上の非正常文に対する誘発反応の違いを 2 種類の実験を用いて調べた。各実験において文の最後の一文字において、文法上もしくは単語上で逸脱する文をそれぞれ数十種類作り、その一文字に対する誘発反応を測定した。文法に関する課題と単語に関する課題に対する誘発反応の差異を潜時と活動部位の両側面から考察した。

(21) 漢字単語の意味処理への音韻の影響：音韻プライミング課題を使った MEG 研究

魏 強^{1,2)}, 井原 綾¹⁾, 早川友恵^{1,3)}, 村田 勉¹⁾, 藤巻則夫^{1,2)}

(¹⁾情報通信研究機構 バイオ ICT グループ,

²⁾九州工業大学 生命体工学研究科 ³⁾帝京大学 文学部心理学科)

The current study investigated the neural mechanisms of the effect of phonological information on the lexico-semantic process during silent reading of kanji (morphogram) words by using magnetoencephalography (MEG). We conducted an experiment in which subjects were presented prime-target word pairs that consisted of two kanji characters. The paired words were presented for 100 ms and 1000 ms respectively, with a stimulus onset asynchrony of 1000 ms. The primes were phonologically same (homophone) as or different (non-homophone) from the following target words, or pseudo-characters randomly in each epoch. Subjects were instructed to read the target words silently. Brain responses

were recorded using a 148-channel whole-head MEG system. Differences in neural activities between conditions were observed in the left posterior temporal and inferior parietal areas, and became weaker by the phonological repetition as expected from a previous report. Furthermore, we found that activity was larger for non-homophone condition in the anterior temporal lobe, and for homophone condition in Broca's area, as compared with the other two conditions in a latency-window of 400-500 ms. This suggests that these regions are related to the integration of context /the selection of appropriate meaning for ambiguous words.

(22) 3-D SEF に基づく周波数の異なる指刺激による応答特性の検討

川瀬 啓¹⁾, 金 鳳洙²⁾, 内川義則¹⁾, 小林宏一郎³⁾

(¹⁾東京電機大学大学院 理工学研究科 ²⁾東京電機大学 理工学部, ³⁾岩手大学 工学部)

脳磁界 (MEG) 計測では大脳皮質から発生する微弱な磁界を多点同時に高い時間分解能で計測することが可能である。そこで、外界からの刺激によって誘発される MEG を計測し解析することで、ヒトの脳内における感覚や認知などの伝達過程の解明に関する研究が行われている。本研究では、三つの異なる指での刺激間隔 (ISI) 変化に対する体性感覚野の応答特性を検討するため、右手の親指、薬指、小指に ISI を変化させながら体性感覚誘

発脳磁界 (SEF) 計測を行った。得られた SEF 波形に相互相関関数を用いて刺激に対する時間遅れを求め、各 SEF の刺激周波数一位相特性を検討した。また、刺激周波数一位相特性から求めた各潜時における信号源推定を行った。さらに、体性感覚野における刺激周波数-位相特性についてシミュレーションによる検討を行ったので報告する。

(23) 正中神経刺激による体性感覚誘発脳磁界と M 波との関係

大山峰生¹⁾, 大西秀明¹⁾, 相馬俊雄¹⁾, 大石 誠²⁾, 亀山茂樹³⁾

(¹⁾新潟医療福祉大学 ²⁾新潟大学医歯学総合病院 ³⁾独立行政法人国立病院機構西新潟中央病院)

正中神経の電気刺激により、刺激後約 20msec で体性感覚誘発脳磁界 (SEF) 第一成分が明確に観察され (N20m)、その電流発生源は中心溝を同定する際の基準と

して用いられることが多い。一方、N20m の他に刺激後 30msec 以降においても明確な磁界波形を認めるが、これが腱、筋、関節、皮膚のどの受容器に起因した反応かは

明確でない。本研究では、正中神経刺激による SEF と短母指外転筋の M 波を同時に計測し、SEF の第二、第三成分に寄与する要因を検討した。対象は健常男性 8 名とした。SEF 計測には Neuromag を使用し、計測時の正中神経刺激は、運動閾値下から 0.5mA 間隔で M 波が最大に

達するまでの強度とした。計測時は手関節、母指を固定し、関節運動を抑制した。その結果、SEF 第二成分の振幅値は、刺激強度の増大に伴い増加したが、最大 M 波に達する以前のある刺激強度で一定になるかあるいは低下する傾向を示した。

(24) 触覚振動刺激の周波数判別における二次体性感覚野と聴覚野の相互連絡

井口義信¹⁾，星 詳子¹⁾，根本正史¹⁾，橋本 勲²⁾

¹⁾東京都精神医学総合研究所 脳機能解析研究チーム

²⁾金沢工業大学 人間情報システム研究所 (東京分室)

我々は、触覚振動刺激の周波数判別において、刺激の 1.3 秒後に音 feedback を呈示することによって識別精度が向上し、その触覚情報の処理に聴覚野が関与することを見出した。今回は、この音 feedback に対する脳反応が、SII 領域との連絡を含むか否かを検討した。対象は健常者 9 名。触覚振動刺激の周波数判別 (3 種の刺激間の判別) と二値弁別 (触感の差の検出) での音 feedback、および、同じ音の受動的聴取での AEFs を計測した。3 条件で共通

に聴覚反応 N100m を認めた。これに加えて振動周波数の判別下では、7 例が SII 領域の反応を示した。一方、二値弁別下での SII 反応は 3 例、音の受動的聴取ではゼロであった。音 feedback 自体には課題がなく、SII 反応の time-lock は緩い (潜時 100~300 ms) が、触覚刺激の周波数情報の必要性によって、聴覚野-SII 領域の連絡が発現すると考えられた。

(25) 仙骨部表面電気刺激による体性感覚誘発脳磁界

松下真史¹⁾，中里信和²⁾，中川晴夫¹⁾，菅野彰剛²⁾，荒井陽一¹⁾

¹⁾ 東北大学大学院医学系研究科泌尿器科学 ²⁾ 広南病院脳神経外科 東北療護センター

【目的】近年、難治性の尿失禁や頻尿の治療法として、仙骨部表面 (S) の治療的電気刺激が導入されつつある。今回、刺激の至適条件の設定の一助とすべく S 刺激による体性感覚誘発脳磁界を計測した。

【方法】健常男性 6 名において、S に加えて正中神経 (M) と後脛骨神経 (T) の電気刺激による誘発脳磁界を測定した。それぞれの第 1 波の頂点潜時における信号源を、電流双極子モデルで推定し、被験者ごとの MR 画像上に表

示した。

【結果】S 刺激の第 1 波は、潜時が 30ms であり M より長く T より小さい。S 刺激の第 1 波の等価双極子は、頭頂部の中心溝付近に推定された。

【考察】以上の結果は、S 刺激においても一次体性感覚野由来の信号が測定できたことを示す。今後、異なる刺激条件下での本反応を調べることによって、S 刺激治療の至適条件設定に役立つ可能性がある。

(26) 頸部脊髄誘発磁場からの信号源再構成

佐藤朋也¹⁾, 足立善昭²⁾, 友利正樹³⁾, 富澤将司³⁾, 川端茂徳³⁾, 関原謙介¹⁾

¹⁾ 首都大学東京大学院 システムデザイン研究科 生体信号処理研究室

²⁾ 金沢工業大学 先端電子技術応用研究所 ³⁾ 東京医科歯科大学 整形外科

頸部脊髄誘発磁場から、その磁場の発生源である信号源を再構成することは、非侵襲的に頸部脊髄機能を診断する画期的な手法といえる。そこで、頸部脊髄誘発磁場データに対して空間フィルターを用いた電流源再構成法を適用し、脊髄周囲の電流分布の可視化を行い、頸部脊髄伝導障害部の非侵襲的特定への可能性を見出した。また、空間フィルターとして、空間マッチトフィルター、Minimum-Norm フィルター、sLORETA フィルターの3

種類の空間フィルターを適用し、性能比較を行った。さらに、頸部脊髄誘発磁場データの x 成分, y 成分それぞれに対して空間フィルターを適用し信号源再構成を行ったところ、脊髄内部を伝播する細胞内電流、脊髄に流入する膜電流の2つの電流についてそれぞれ独立して再構成することに成功し、z 成分に対して適用した場合よりも、より精度の高い障害部位診断への可能性を見出した。

(27) 舌前方と後方でみられる体性感覚処理機構の違い

坂本貴和子^{1,2,3)}, 中田大貴^{1,2)}, 乾 幸二²⁾, 柿木隆介^{2,3)}, Gian Luca Romani¹⁾

¹⁾ ITAB-Institute for Advanced Biomedical Technologies, University of Chieti, Italy,

²⁾ 自然科学研究機構 生理学研究所 感覚運動調節研究部門 ³⁾ 総合研究大学院大学 生命科学研究所

The somatic sensation of the tongue is necessary for daily life, but it is difficult to know the underlying neural mechanisms. In particular, because of the vomiting reflex and several morphological problems, there has been no systematic attempt to examine somatosensory processing by stimulating the posterior of the tongue. This is the first study to clarify the human cortical processing for sensory perception by the posterior part of the tongue with a newly developed device and functional magnetic resonance imaging. Stimulation of the left and right postero-lateral parts of the tongue induced significant activity in the primary somatosensory cortex (SI) and Brodmann area 40 in the right hemisphere and the

anterior cingulate cortex (ACC). In contrast, antero-lateral stimulation produced activity only in the right SI. The activated region in SI was significantly larger following stimulation of the posterior than anterior part. These results indicate that a clear difference exists in somatosensory processing between stimulation of the antero-lateral and postero-lateral parts of the tongue, and a right hemisphere is dominant for the stimulation of both antero-lateral and postero-lateral areas. The activity in BA40 and ACC may imply that the posterior of the tongue belongs to the visceral system.

(28) 体性感覚二点識別の脳内処理機構

赤塚康介, 柿木隆介 (自然科学研究機構 生理学研究所)

This is the first functional magnetic imaging (fMRI) study that investigated the neural mechanisms related to somatosensory spatial discrimination, so-called two-point discrimination. During fMRI scanning, we examined two

discrimination tasks using four types of electrical stimuli which applied to one or two points with strong or weak intensity. In the two point discrimination task (TPD), subjects were required to discriminate stimuli whether it applied to one

or two points. In the intensity discrimination task (ID), subjects were required to discriminate stimuli whether its intensity was strong or weak. In each task, they pressed the button to report their choice. Comparing the both discrimination task with control, we found significantly activated regions in the bilateral pre-frontal gyrus, pre-motor cortex, anterior insula, pre-supplementary motor area, anterior

cingulate cortex, inferior parietal lobule (IPL) (Brodmann area 40), anterior lobe of the cerebellar vermis, and striatum and contralateral secondary somatosensory cortex. Between TPD and ID, IPL was more activated during TPD than ID. Therefore, the IPL is considered to play an important role for two-point discrimination task.

(29) 体性感覚刺激 Go/Nogo 課題における反応抑制過程：事象関連型 fMRI による検討

中田大貴^{1,2,3)}, 坂本貴和子^{1,2)}, 柿木隆介²⁾, Romani GL¹⁾

¹⁾Institute for Advanced Biomedical Technologies, University of Chieti, Italy

²⁾自然科学研究機構 生理学研究所 ³⁾名古屋大学医学部保健学科)

Inhibiting inappropriate behavior and thoughts is an essential ability for humans, but the responsible regions for the inhibitory process are a matter of continuous debate. This is the first present study of event-related functional magnetic resonance imaging (fMRI) using somatosensory go/nogo tasks. Fifteen subjects performed two different types of go/nogo task, (1) movement and (2) count to compare with previous studies using visual go/nogo tasks. That is, to confirm whether the inhibitory process is dependent on sensory modalities. Our data indicated that the response inhibition network involved dorsolateral (DLPFC) and ventrolateral (VLPFC) prefrontal cortices, pre-supplementary motor area (pre-SMA), anterior cingulate cortex (ACC),

inferior parietal lobule (IPL), Insula and temporoparietal junction (TPJ), which were consistent with previous results using visual go/nogo tasks. These activities existed in both Movement and Count Nogo trials. Therefore, our results suggest that the network for the inhibitory process is not dependent on sensory modalities but reflects common neural activities. In addition, a direct comparison between Movement and Count Nogo trials showed the difference of activation in prefrontal cortex, temporal lobe, ACC and pre-SMA. Thus, the inhibitory control process would consist of two neural networks, common and uncommon regions depending on response mode.

(30) 空間的注意の視覚-体性感覚モダリティリンクに関わる脳磁場反応

木田哲夫, 乾 幸二, 和坂俊昭, 赤塚康介, 田中絵実, 柿木隆介

(生理学研究所 統合生理研究系 感覚運動調節研究部門)

空間的注意による皮質活動の変化はよく知られているが、近年この注意効果は他の感覚モダリティにも及ぶこと(クロスモダリティリンク)が報告されている。本研究では、脳磁場記録により視覚-体性感覚間のクロスモダリティリンクに関わる皮質処理について検証した。視覚、体性感覚ともに標的、非標的刺激を右視野(右手2指)、左視野(左手2指)に約1秒間隔でランダム順に提示した。被験者は4つの注意条件をランダム順に行った(右体性

感覚・左体性感覚・右視覚・左視覚注意)。右手体性感覚刺激に対する二次体性感覚野(SII)付近の脳磁場反応(潜時80ms~)は、右体性感覚注意時だけでなく右視覚注意時にも増大したが、一次体性感覚野の反応には有意な変化は認められなかった。左手刺激でも同様の結果が得られた。体性感覚入力に対するSII近辺の脳磁場反応は、注意された感覚モダリティに関係なく、空間的注意により変化することが示唆された。

(31) 病変を持つ症例に対する pattern reversal 刺激を用いた視覚関連局所脳律動変化の解析

谷 直樹, 平田雅之, 加藤天美, 齋藤洋一, 貴島晴彦, 押野 悟, 吉峰俊樹
(大阪大学 医学部 脳神経外科)

【目的・方法】 先行研究にて視覚関連局所脳律動変化は γ 帯域の ERS (Event-related synchronisation)が一次視覚野を中心に出現するという知見を得ている。今回、視覚経路に病変を持つ症例 22 例に対し広視野角刺激を施行し、開口合成脳磁図を用いて局所脳律動変化を調べた。内 1 例では術中 cortical VEP を測定、MEG の結果と比較した。【結果】 病変が視覚関連領野に局在する場合、high- γ 帯域の ERS は鋭敏に影響を受け、特に視野障害が 1/2 以上の

場合、視野障害のない場合と比べ high- γ ERS は有意な減弱を認めた。cortical VEP にても腫瘍周囲での γ ERS の減弱、消失を認めた。

【考察】 γ 帯域の ERS は主に一次視覚野の活動を反映すると考えられるが、視覚障害がある場合、視野障害の程度に一致した減弱、消失を認め、感度の高い視覚機能の指標となりうると考えられる。

(32) 脳腫瘍症例における体性感覚誘発磁場を用いた感覚機能評価

土谷大輔, 毛利 渉, 櫻田 香, 嘉山孝正 (山形大学医学部脳神経外科)

【はじめに】 脳腫瘍例での体性感覚誘発磁場 (somatosensory evoked fields; SEF) による感覚機能評価と MRI 所見を比較した。

【対象と方法】 前頭葉の脳腫瘍連続 15 例を対象とした。SEF は全頭型 306 チャンネル脳磁界計を用い、正中神経を刺激し 200 回平均加算した。

【検討項目】 1. N20m の遅延及び d/m の低下, 2. 感覚障害の有無, 3. 中心後回の浮腫及び圧排の有無, これらを 1 を中心として検討した。

【結果】 [1] 全 15 例中、N20m 遅延及び d/m 低下を認めたものは 4 例で、全例で感覚障害 (+)、浮腫 (+)及び圧排 (+)であった。[2] N20m 遅延は認めないが、d/m 低下を認め

たものは 3 例で、全例で感覚障害 (-)、浮腫 (-)であったが、圧排 (+)であった。[3] N20m 遅延及び d/m 低下を認めなかったものは 8 例で、全例で感覚障害 (-)であった。中心前回に主座を置く anaplastic glioneuronal tumor 例のみで圧排 (+)と浮腫 (+)であったが、他では浮腫 (-)、圧排 (-)であった。

【結論】 N20m 及び d/m はともに腫瘍による感覚機能障害を反映すると考えられたが、腫瘍による圧排がある場合、d/m 低下がより鋭敏であると考えられた。また、glioma では機能を保ちながら浸潤する例がある可能性が示唆された。

(33) シルビウス裂周囲症候群のてんかん外科における MEG の有用性

村上博淳, 藤本礼尚, 杉山一郎, 増田 浩, 亀山茂樹
(国立病院機構 西新潟中央病院 脳神経外科)

【目的】 congenital bilateral/unilateral perisylvian syndrome (CB/UPS) に随伴するてんかんは難治であり治療法が確立していない。我々は多角的検査診断に基づいて発作焦点を同定し皮質切除を行って良好な結果を得た。この際 MEG 所見が非常に有用であり ECD の集積部位を基に切

除計画を立てた症例も経験したので報告する。

【方法】 症例は男性 2 例, 女性 1 例。発症時年齢 3-13 歳 (平均 9 歳), 手術時年齢 4-21 歳 (平均 14 歳)。MRI 上の polymicrogyria 両側性 2 例, 片側性 1 例。全例で発作間欠時に MEG 施行, 1 例で発作時 SPECT 施行, 2 例で慢性

硬膜下記録施行。4歳の小児例では慢性硬膜下記録を行わずに皮質切除した。

【結果】術後1年以上経過した2例はEngel class I, 術後4ヶ月の小児も発作を認めていない。慢性硬膜記録を行った2例では発作起始部位とMEGのECD集積部位が一

致した。発作時SPECTを施行できた1例では血流増加部位とECD集積部位, 発作起始部位がすべて一致した。

【結論】CB/UPSに対する発作焦点切除術の切除部位決定にMEGが有用であった。小児例ではMEGガイド下の皮質切除術も選択肢のひとつとなり得る。

(34) Gastaut型特発性小児後頭葉てんかんの脳磁図所見

齋藤なか, 遠山 潤, 赤坂紀幸 (国立病院機構西新潟中央病院 小児科)

【はじめに】Gastaut型特発性小児後頭葉てんかん (Gastaut type idiopathic childhood occipital epilepsy: G-ICOE) は視覚発作を主症状とする小児てんかんの1型である。後頭部の突発波を特徴とするが, 脳磁図に関する報告は殆どなく視覚症状との関連は明らかではない。G-ICOE例に対して脳磁図による電流源解析を行った。

【対象と方法】対象はG-ICOEの3例, 男児2例女児1例である。306channel全頭型脳磁型を用い, 発作間歇期における棘波のピークで等価電流双極子 (equivalent current

dipole: ECD) を推定しMRI画像に投影した。

【結果】2例ではECDは後頭葉内に散発的な集積を示し, もう1例では頭頂後頭溝周囲にやや広がりを持った集積として認めた。

【考察】3例とも視覚症状が主症状であったが一次性視覚皮質であるcalcarine sulcus周囲への集積は認めず, 発作波が視覚野を含む後頭葉内に伝播して視覚症状を生じている可能性を示唆する所見であった。

(35) 陰性ミオクローヌスを呈したてんかん患者2例の脳磁図解

服部英司¹⁾, 川脇 寿²⁾, 九鬼一郎²⁾, 佐久間悟¹⁾, 横井俊男¹⁾, 松岡 収¹⁾, 山野恒一¹⁾

(¹⁾ 大阪市立大学大学院医学研究科発達小児医学 (²⁾ 大阪市立総合医療センター小児神経内科)

陰性ミオクローヌス発作を呈した2例の脳磁図解析を行った。症例1は11歳女児, 左上肢のピクツとする発作を繰り返し, 物を持つと誘発された。発作間歇時脳波は右頭頂部優位の全般性棘徐波を示した。症例2は5歳女児, 右に傾いて転倒する発作, 脱力して転倒する発作を呈した。発作間歇時脳波は, 睡眠時にCzを中心に棘徐波を認めた。発作間歇時脳波の棘波の立ち上がりの部分

で解析すると, 症例1では右の頭頂部中心後回, 右手の一次感覚野に内前方に向いたダイポールがクラスターした。症例2では右頭頂部中心後回の足の一次感覚野にダイポールがクラスターした。両者とも, 一次感覚野の狭い領域にダイポールが推定され, 陰性ミオクローヌス発作には一次感覚野が強く関係すると考えられた。

(36) 軽度アルツハイマー病患者における基礎律動減衰の評価: MEG研究

栗本 龍¹⁾, 石井良平¹⁾, 池澤浩二¹⁾, 疇地道代¹⁾, Leonides Canuet¹⁾,

岩瀬真生¹⁾, 数井裕光¹⁾, 吉峰俊樹²⁾, 武田雅俊¹⁾

(¹⁾ 大阪大学大学院医学系研究科精神医学教室 (²⁾ 大阪大学大学院医学系研究科脳神経外科教室)

軽度アルツハイマー病 (以下 AD) 患者の脳波・脳磁 図では基礎律動の徐波化, 広汎化, 徐波の増加などの典

型的な所見を認めないことがある。今回我々は健常高齢者（以下NC）と、基礎律動の徐波化を認めない軽度AD群の脳磁図を測定し、基礎律動の減衰を評価した。対象はAD7人、NC7人。CTF社製全頭型64チャンネル脳磁計を用い、安静開閉眼時10秒間ずつの脳磁図をそれぞれ8試行測定した。オフラインでBESAを用いて閉眼に伴う基礎律動の事象関連同期(ERS)を求めた。基礎律動の

ピーク周波数はAD群で $9.8 \pm 0.9\text{Hz}$ 、NC群で $10.5 \pm 0.4\text{Hz}$ と有意差を認めなかった。しかし基礎律動のERSは、NC群では α 帯域に明瞭に認められたが、AD群では他の帯域で認められたりERS自体が減少・消失する傾向が見られた。当日は空間フィルターを用いた解析結果、神経心理検査との相関についても述べる予定である。

(37) 認知症診断のための自発性脳磁場データベースの構築

初坂奈津子¹⁾、樋口正法¹⁾、鶴谷奈津子¹⁾、町谷知彦²⁾、山田正仁²⁾、賀戸久¹⁾

(¹⁾ 金沢工業大学 先端電子技術応用研究所 (²⁾ 金沢大学 神経内科)

これまでMEGを用いたアルツハイマー病(AD)に関する研究がいくつか報告されている。自発性脳磁場の周波数解析、例えばslow wave (δ, θ) の変化を検討したものが多く、実用的なものはまだない。我々はMEGを用いたADの早期診断プロトコルの開発を目指し、自発性脳磁場を中心としたデータベースの構築を行っている。

本データベースを用いてslow waveに限らず多くの特徴パラメータを抽出しADと健常者の比較・検討を行っている。今回はその一部として、開眼・閉眼時自発性脳磁場の解析を行い過去の報告例との比較を行った。また、聴覚刺激時自発性脳磁場については加算平均処理を行い聴覚誘発脳磁場の検討を行った。

(38) 標準脳座標に変換した脳表電流密度マップのROI解析による言語優位半球の同定

錦古里武志^{1,2)}、文堂昌彦³⁾、中村昭範²⁾、Diers Kersten²⁾、竹林成典³⁾、加藤隆司²⁾、梶田泰一¹⁾、吉田純¹⁾、伊藤健吾²⁾

(¹⁾ 名古屋大学大学院医学系研究科 脳神経外科 (²⁾ 国立長寿医療センター研究所 長寿脳科学研究部

³⁾ 国立長寿医療センター病院 脳神経外科)

【目的】MEGによる言語優位半球の同定法はPapanicolaouらによる単一雙極子解析法が知られているが、多元的な言語機能を単一雙極子モデルで解析することには疑問もある。我々は、distributed source modelを用いて優位半球を同定する方法を試みた。

【方法】脳腫瘍患者12名を対象に、かな黙読による誘発磁場を測定し、最小ノルム法によって算出した脳表電流密度マップを標準脳座標へ変換した。そして、1) 古典的

言語野、2) 健常人にてかな黙読により有意に賦活された領域、にROIを設定し、ROI内の電氣的活動の左右差から優位側を推定し、fMRIや和田テストの結果と比較した。

【結果】本法では、後部側頭葉・後頭側頭葉境界下部・角回に設定したROIが、左右差の判定に有用であった。12例中10例が左半球優位、2例が右半球優位と判定され、11例中9例でfMRIや和田テストの結果と一致した。

(39) Multimodality - fMRI, MEG, NIRS -による言語優位半球同定の検討

太田貴裕¹⁾, 鎌田恭輔¹⁾, 川合謙介¹⁾, 青木茂樹²⁾, 斉藤延人¹⁾¹⁾ 東京大学医学部 脳神経外科 ²⁾ 東京大学医学部 放射線科)

非侵襲的な皮質機能 mapping 法である機能 MRI (fMRI) と脳磁図 (MEG) とにより術前に言語優位半球を同定することが可能となってきた。2006 年末に当施設に光トポグラフィ (NIRS) および 3.0Tesla MRI が導入されており 3 つの modality を用いた術前言語優位半球同定の信頼性について報告する。対象は 23 例 (男 10, 女 13)。年齢は 16~75 歳, 疾患は AVM2, 動脈瘤 1, 主幹動脈狭窄症 4,

脳腫瘍 9, てんかん 7 例。全 23 例で fMRI, MEG, NIRS を施行し, Wada Test は 4 例に施行した。これらの結果を 2006 年に 1.5Tesla MRI と MEG を用いて言語優位半球同定を行った 26 例と比較した。fMRI, MEG, NIRS と機序の異なる 3 つの modality を用いる非侵襲的な言語優位半球同定は信頼性が高く, Wada test に替わる方法として検討を重ねていきたい。

(40) MCG による心疾患モデルマウスの経時的観察

葛西祐介¹⁾, 加古真祥¹⁾, 及川敬敏¹⁾, 斎藤 優¹⁾, 小野弓絵²⁾, 石山敦士³⁾, 葛西直子⁴⁾, 茅根一夫⁵⁾¹⁾ 早稲田大学大学院理工学研究科 ²⁾ 神奈川歯科大学学生体機能学講座 ³⁾ 早稲田大学理工学術院⁴⁾ 産業技術総合研究所 ⁵⁾ エスアイアイ・ナノテクノロジー (株))

現在, 疾患の発生機序の解明や, 薬効の検証のため, 遺伝子改変技術の応用や, 薬物投与により, 種々の疾患モデルマウスが供試されている。従来, これらのマウスの検査法として侵襲的な方法が多く用いられているが, 非侵襲的な検査法が確立されれば, 疾患に関する新しい情報を与えるものとして期待される。そこで我々はマウス用生体磁気計測システムを用いて, 心疾患モデルマウ

スの心磁図計測を経時的に計測し, 疾患発生に伴う心磁図変化を捉えることができた。また, 新生児や子供のマウスは体長も小さく体力も弱いため計測が困難であったが, 生後間も無いマウスの計測法を開発し, 疾患の発生や進展を知る上で重要な, 新生児から生体までの一貫した心磁図計測法の開発を行うことができた。

(41) Current Source Reconstruction of MCG Vector Data

De Melis Massimo, Kim Bong Soo, Uchikawa Yoshinori

(Department of electronic and computer engineering, Tokyo Denki University)

In the study of the biomagnetic inverse problem, the data obtained from the recorded magnetic fields are used in order to compute the sources that generate the measured fields distributions. Typical multichannel SQUID systems that are currently used in magnetocardiography (MCG) and magnetoencephalography (MEG) are planar systems that are able to detect only one component of the magnetic fields. However, using a multichannel system that can measure the three components of the fields allows to obtain a more

complete information about the electrical activity of the sources. In MCG studies the cardiac activation can be modeled in terms of current density, since a distributed sources model is a more realistic representation than a single or multiple dipole model for the heart activation wavefront. The source reconstruction can be performed using all components of the measured fields, or using only the z-component, thus obtaining the equivalent results of a planar system. We can directly compare the results of the vector and

planar data of the same subject, obtained with the same system. This procedure allows us to show what is the

contribution of the information gain given by the vector data in terms of current source reconstruction.

(42) ウェーブレット変換と独立成分分析を用いた心磁図のノイズ低減に関する研究

宮内秀彰¹⁾, 小林宏一郎¹⁾, 中居賢司²⁾, 伊藤 学³⁾, 吉澤正人¹⁾, 内川義則⁴⁾

(¹⁾岩手大学 工学部 ²⁾岩手医科大学 医学部 ³⁾株式会社 ICS ⁴⁾東京電機大学 理工学部)

現在, 心磁図を用いて心臓血管手術後の患者の心筋障害や不整脈の性状を評価することが試みられている。しかし開胸心臓手術後の患者の肋骨部分にはワイヤが装着されており, MRI 検査などで磁化されたワイヤは心磁図測定時に大きな磁気ノイズとなり問題である。その為, 本来の心臓の情報を失わずにノイズのみを低減させることが重要な課題となっている。今回この磁気ノイズの低減するために, デジタルフィルタとウェーブレット変換,

独立成分分析を組み合わせたアルゴリズムを考案した。シミュレーションで最適な条件を検討して, このアルゴリズムを心臓手術後5例に応用しノイズ低減を試みた。その結果, 可逆変換可能なリフティングスキームを用いたウェーブレット変換後に fast-ICA を組み合わせたアルゴリズムは, 信号とノイズの分離精度が向上して磁気ノイズ低減に有効であることが証明された。

(43) 運動負荷による三次元心磁図の ST 分節の検討

寒河江健¹⁾, 金 鳳洙²⁾, 内川義則¹⁾, 小林宏一郎³⁾

(¹⁾東京電機大学大学院 理工学研究科 ²⁾東京電機大学 理工学部 ³⁾岩手大学 工学部)

SQUID 磁束計による生体磁気計測では, 生体の活動に伴う微弱な磁界を多点同時にリアルタイムに計測することが可能である。そこで, 心磁図 (MCG: magnetocardiogram) での刺激伝導系が体表面から非侵襲で計測可能となって以来, その臨床応用が期待されている。また, 心疾患患者の運動負荷によって誘発される虚血状態の MCG 計測を行い, ST 分節の解析により心筋虚血部位の評価なども行われている。そこで本研究では, 自作した非磁性のエ

ルゴメータを用いて, 安静状態での MCG と運動負荷による健常者の MCG 計測を三次元磁界計測システムを用いて行った。ST 分節の詳細な検討のために特異値分解 (SVD: Singular Value Decomposition) を適用し, 安静状態 (Rest) 及び運動負荷直後 (HR1) の ST 分節での心筋活動の空間分布変化に関する検討を行ったので報告する。

(44) Early detection of coronary artery disease in patients with suspected acute coronary syndrome without ST elevation by magnetocardiography

Hyukchan Kwon¹⁾, Kiwoong Kim¹⁾, Yong-Ho Lee¹⁾, Jin-Mok Kim¹⁾, Hyun Kyoong Lim¹⁾, Yong Ki Park¹⁾, Namsik Chung²⁾, Young-Guk Ko²⁾, Boyoung Joung²⁾, Jin-Bae Kim²⁾, Jung-Rae Cho²⁾

(¹⁾ Bio-signal Research Center, Korea Research Institute of Standards and Science, Daejeon, Korea

²⁾ Yonsei University Medical college, Seoul, Korea)

In a preliminary study, we proposed a classification method

(weighted maximum posteriori: wMAP) of MCG parameters

on the basis of its probability distribution. The aim of the present study is to confirm the method in a relatively large population. To do that, we examine the classification performance of the conventional binary decision and the wMAP methods for the detection of coronary artery disease (CAD) in suspected acute coronary syndrome patients without ST-segment elevation. We used four MCG parameters representing the changes in direction and magnitude of the electrical activity during T wave. The study included 603 subjects: 320 patients with angiographically documented CAD

(stenosis $\geq$ 50 %), 118 symptomatic patients (stenosis < 50 %) and 165 normal subjects. As results, wMAP was about 3 % better than the binary decision method. The classification performance of wMAP was noticeable in healthy subjects (94.5 %) and patients with myocardial infarction (93.8 %), compared to 87.9 % and 87.5 % obtained by the binary decision method. This study demonstrates that the MCG can be used to detect coronary artery disease in patients with acute chest pain by the classification of the MCG parameter on the basis of its prior probability distribution.

(45) Diagnostic performance of magnetocardiography parameters to detect patients with coronary artery disease I: non-ST-segment elevation myocardial infarction

Hyun Kyoon Lim ¹⁾, Namsik Chung ^{2)*}, Kiwoong Kim ¹⁾, Young-Guk Ko ¹⁾
Hyukchan Kwon ¹⁾, Yong-Ho Lee ¹⁾, Jin-Mok Kim ¹⁾, Boyoung Joung ²⁾
Jin-Bae Kim ²⁾, Jung-Rae Cho ²⁾, In-Seon Kim ¹⁾, Yong Ki Park ¹⁾

¹⁾ Korea Research Institute of Standards and Science, Daejeon, Korea

²⁾ Cardiovascular Center, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea)

In this study, we evaluated the parameters of magnetocardiography (MCG). The purpose of this study is to find the MCG parameters that are sensitive enough to detect the non-ST-segment elevation myocardial infarction (NSTEMI) patients from control subjects. MCG data were recorded and analyzed from 165 young controls (mean age = 27.2 $\pm$ 9.0 years), 57 age-matched controls (mean age = 55.9 $\pm$ 10.5 years) and 83 NSTEMI patients (mean age = 59.7 $\pm$ 11.1 years). The MCG recordings were obtained using a 64-channel MCG system in a magnetically shielded room. Statistical analyses were performed for 24 parameters derived from QRS-, R-, T-wave, and ST-T period. Binary boundaries

to detect NSTEMI patients out of control subjects were found using the receiver operating characteristic (ROC) curve for each parameter. Fifteen parameters showed a significant difference ($p < 0.05$ and $p < 0.01$) between NSTEMI and both of control groups. For the detection of NSTEMI, the angle of the maximum current on T-wave peak showed the highest diagnostic performance, 84% to 93 % for young controls (area under ROC curve=0.93), and the field map angle on T-wave peak for age-matched controls with the diagnostic performance of 75% to 86% (area under ROC curve=0.87). Our study showed that a number of MCG parameters are useful for screening NSTEMI patients in a clinical setting.

(46) シングルチップ集積型 SQUID マグネトメーターアレイ心磁計を用いた モルモット心磁・心電同時計測と QT 間隔自動解析

駒村和雄 ¹⁾, 足立善昭 ²⁾, 河合 淳 ²⁾, 宮本政和 ²⁾, 上原 弦 ²⁾, 春田康博 ³⁾

¹⁾ 国立循環器病センター研究所 循環動態機能部 ²⁾ 金沢工業大学先端電子技術応用研究所

³⁾ 横河電機 (株) MEG センター)

日米欧医薬品規制調和国際会議の規定により、医薬品

開発における QT 延長を含む催不整脈性に関する前臨床

試験が義務化された。今回我々はモルモットを対象にシングルチップ SQUID マイクロ MCG を用いて、心磁・心電同時計測の下に QT 延長計測とその自動解析を行ったので報告する。体重 200-300g の Hartley 系雄性モルモットをペントバルビタールにて麻酔後白金電極を装着して、正中線上剣状突起頭側 10mm を標準計測位置として

マイクロ MCG のセンサー下に保定し心磁・心電同時計測を行った。QTc は心磁・心電共に自動解析が可能で、 $r^2=0.831$, $p=0.0312$ と良好な相関を呈した。抗不整脈薬キニジンの過剰投与 (60mg/kg) により QTc は心磁において $27.9 \pm 0.46 \text{ msec} \rightarrow 31.2 \pm 0.47 \text{ msec}$, $28.1 \pm 0.63 \text{ msec} \rightarrow 33.0 \pm 0.87 \text{ msec}$ と有意に延長した。

(47) 聴覚野における時間積分機構の検討

中川誠司 (独立行政法人産業技術総合研究所 人間福祉医工学研究部門)

ヒトの聴覚には聴取した音をある時間にわたって積分する機能があり、刺激音の持続時間の延長に伴ってラウドネスの増大や検出閾の低下が生じる。また、このような時間積分機構は脳聴覚野活動においても観察されることが知られている。聴覚野における時間積分機構におよぼす刺激音周波数の影響を調べることを目的として、聴覚誘発脳磁界計測を行った。1kHz から 12.5kHz までの気導音、さらには 30kHz 骨導超音波を呈示し、聴覚誘発

反応 N1m の活動強度および潜時を推定した。すべての刺激音において持続時間の増加に伴う活動強度の上昇と潜時の減少が観察されたが、その上昇/減少は持続時間が 40 ms において飽和した。少なくとも N1m レベルにおいては時間積分機構は刺激音周波数によらないこと、骨導超音波であっても気導可聴音と同様の時間積分機構を有していることが示される。

(48) 定常聴覚刺激提示時における聴覚磁場応答

富田教幸¹⁾, 田森佳秀²⁾ (¹⁾金沢工業大学大学院 システム設計工学専攻 ²⁾人間情報システム研究所)

N1m や P2m 等の聴覚誘発磁場応答は、提示音が長く続いている場合にも、数十ミリ秒程度の幅で終わる単峰の応答になっている。音提示が続いており、その知覚が存在しているにもかかわらず、応答が消えてしまっている時間区間において、様々な周波数の純音を提示したときの脳磁場を計測した。解析の結果、このサイレントな

時間区間に得られた N1m は、周波数の相対的な差によって応答の振幅が異なっていた。このことから、見かけ上応答が無い時間区間においても、音提示が続いている限り、なんらかの神経活動が存在していることが示唆された。

(49) 音源の位置の知覚に関わる聴覚誘発脳磁界反応

添田喜治, 中川誠司 (産業技術総合研究所 人間福祉医工学研究部門)

音源の位置を知る能力は、人間にとって重要である。頭の一方側に一つの音源がある時、遠い方の耳に到達する音は近い方の耳に到達する音に比べて、時間的に遅れ、強さは弱くなる。この場合、音源の位置に関する手がかりは、両耳間時間差と両耳間強度差である。また、両耳

に到達する音の相関度は音像の広がり感と関係があり、両耳間相関度が低いほど広い音像が知覚される。つまり、両耳間相関度が低いほど音像が広がってしまい、音源の位置は不明瞭になる。本研究では、音源の位置の知覚に重要な要素である、両耳間時間差と両耳間相関度を変化

させて脳磁界計測を行い、N1m 反応に注目して解析を行った。解析の結果、両耳間相関度が高いときに、両耳間時間差の増加に伴い N1m 振幅が大きくなる傾向が見ら

れた。しかしながら、両耳間相関度が低いときには、両耳間時間差の効果は見られなかった。このことは、N1m 振幅に音源定位能が反映されたと考えられる。

(50) 先行する音階にプライミングされた和音による脳磁界反応

大塚明香^{1,2)}, 栗城真也²⁾, 村田昇³⁾, 長谷川寿一¹⁾

⁽¹⁾ 東京大学 21 世紀 COE プログラム「心とことば – 進化認知科学的展開」

²⁾ 北海道大学電子科学研究 ³⁾ 早稲田大学理工学部

We investigated the effects of priming of Western tonal schema on the perception of chords and their auditory evoked magnetic fields. Two types of chords tuned in major and minor modalities were presented alone in the control condition. In the task session, the major or minor chord was preceded by either a major or minor scale. When there was a modality shift between the scale and chord, i.e., a major chord preceded by a minor scale or a minor chord preceded by a major scale, the root of the chord corresponded to the sixth note of the scale (submediant), whereas when there was no

modality shift, i.e., major chord preceded by a major scale or minor chord preceded by a minor scale, the root of the chord and the first note of the scale were identical, i.e., tonic. Nine musically trained subjects participated in the experiments. The perceptual stability of the chords judged by the subjects decreased for the submediant chords in both major-minor and minor-major conditions. Enhanced amplitude of N1m and P2m peaks was observed in the left hemisphere in the responses to the submediant (minor) chords preceded by the major scale.

(51) 異なる音階構造を持つ音列聴取時の MEG 計測

前島克也¹⁾, 柴 玲子²⁾, 根本 幾^{1,2)}

⁽¹⁾ 東京電機大学大学院 情報環境学研究科 情報環境デザイン学専攻

²⁾ 東京電機大学 先端工学研究所

本研究では、長音階でできた音列の認識および調性構造が定まりにくい音列の認識の違いについて調べるため、音列中の楽音変化による脳磁界 (MEG) のミスマッチ反応 (MMF) を比較検討した。1 オクターブの楽音を用い、Krumhansl らの研究で示された音階層のモデルを基に、ハ長調を構成する 6 音の音列と、この音列の一部を半音変化させた、調性を定めにくい音列を作成した。それぞれの音列を被験者の両耳に繰り返し提示し誘発

MEG を平均加算で求めた。その際 0.2-0.25 の確率で第 6 音を変化させ MMF を求めた。聴覚誘発反応が最も大きく計測された右側頭の測定点での MMF を比較したところ、調性を定めにくい音列聴取時の MMF の方が小さい傾向が見られた。この傾向は被験間でほぼ共通して観察され、調性構造の存在が音列認識を容易にすることが脳活動上に現れたものと考えられる。

(52) 音色のカテゴリ一知覚の聴覚誘発 N1m 潜時への反映

水落智美¹⁾, 湯本真人²⁾, 狩野章太郎³⁾, 伊藤憲治⁴⁾, 山川恵子⁴⁾, 加我君孝^{1,3)}

(東京大学大学院 医学系研究科 ¹⁾ 感覚・運動神経科学 ²⁾ 病態診断医学

³⁾ 耳鼻咽喉科学 ⁴⁾ 認知・言語医学)

音色の定常的な要素であるスペクトル包絡の違いが聴覚誘発磁場に与える影響を調べるため、3つの音色(vocal, instrumental, linear)のスペクトル包絡と、2つの基本周波数(F0)以外は音響要素が全て一致した24種の複合音を無視条件下で両耳提示し誘発されるN1mのピーク潜時と、その後極小となる潜時をオフセット潜時として解析した。この結果、ピーク潜時、オフセット潜時共にvocal音ではF0非依存性が、instrumental音及びlinear

音ではF0依存傾向がみられた。また、ピーク潜時には音色ごとの差は認められなかったが、instrumental音に対するオフセット潜時はlinear音に対するものより有意に長かった。以上より、同じ複合音でもスペクトル包絡の違いにより聴覚情報処理に要する時間は異なり、その過程はN1mのピークからオフセットまでの長さに反映されると考えられた。

(53) 情緒的音声聴取時における早期聴覚情報処理過程；男女差に関する検討

矢倉晴子^{1,2,3)}, 岩木直³⁾, 中川誠司³⁾, 外池光雄^{3,4)}, 荻野敏²⁾

(¹⁾ 情報通信研究機構未来ICT研究センター バイオICTグループ脳情報プロジェクト

²⁾ 大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻 ³⁾ 独立行政法人産業技術総合研究所人間福祉医工学研究部門

⁴⁾ 千葉大学工学部メディカルシステム工学科)

発話理解時における脳活動の性差が多く報告されているが、怒りや悲しみなどの音声の情緒的な特徴(Emotional Characteristics: EC)認知に関与する脳活動の性差についてはほとんど言及がない。そこで我々は、音声におけるPositiveとNegativeの2種類の感情的特徴(EC)に注目する課題を、男性8名(平均26歳)・女性7名(平均25.6歳)に対して行い、神経活動を脳磁界計測(MEG)

により測定した。解析は、男性と女性の聴覚誘発信号を(p50m, N1m), T-testにより検定した。その結果、女性は男性よりも有意に早く聴覚P50m成分が誘発されることを検証した(右聴覚野, Latencyfemale>Latencymale, p=0.0003)。本研究により、情緒的音声理解時の神経活動の非常に早い段階において、音声のECへの注意による性差が生じていることを示唆した。

(54) 音の特徴の情報処理に音楽経験が与える影響の検討

小野健太郎¹⁾, 中村昭範¹⁾, 吉山顕次²⁾, 錦古里武志¹⁾, 文堂昌彦³⁾, 伊藤健吾¹⁾

(¹⁾ 国立長寿医療センター研究所 長寿脳科学研究部 ²⁾ 国立長寿医療センター病院 精神科

³⁾ 国立長寿医療センター病院 脳神経外科)

音楽の3要素として音の高さ・リズム・和音が知られているが、これらの特徴を処理する際の脳内メカニズムや音楽経験が与える影響については不明な点が多い。今回我々は、10年以上の音楽経験者と特別な音楽経験を持たない成人を被験者として、ピッチ・リズム・和音・音

色という4種類の音の特徴における脳内処理過程に音楽経験が与える影響を検討した。Oddball課題を用いてそれぞれの特徴におけるミスマッチ反応(MMF)を74ch dual head型MEGを用いて測定したところ、音楽経験の有無に関わらずそれぞれの特徴に対するMMFピークの潜時

は左右半球で異なり、左半球では特徴間に潜時の違いが見られた。また、音楽経験者では左半球の MMF が右に比べて大きな傾向がみられたが、未経験者では逆に右半

球の反応が大きな傾向が見られ、音楽経験が自動的な音の特徴処理に影響を与えていることが示唆された。

(55) フレーズの変化の認識に対応する誘発脳磁界の研究 —変化のタイプとの関係

平井一弘¹⁾, 柴 玲子²⁾, 根本 幾^{1,2)}

(¹⁾ 東京電機大学大学院 情報環境学研究科 (²⁾ 東京電機大学 先端工学研究所)

本研究では、フレーズの輪郭について単調関係の定義を与え、その定義に基づいて、輪郭変化を認識する際の脳活動を MEG により計測した。実験課題は、基本フレーズと、続けて呈示される試験フレーズが同じフレーズかどうか判断する課題で、試験フレーズには (1) 同一フレーズ, (2) 単調変化 (輪郭一致), (3) 非単調変化 (輪郭不一致) の 3 種類を作成した。その結果、聴覚誘発反応が最も大きかったチャンネルの MEG 信号について、非単調

変化させた楽音呈示後 120ms 付近に、単調変化よりも有意に大きい振幅が観察された。この活動の信号源の位置は、試験フレーズのタイプによらず一定であった。被験者の平均課題正答率は、上記のフレーズのそれぞれについて (1)59%, (2)54%, (3)90% であり、輪郭変化によってフレーズの違いを認識していたと考えられる。これは、輪郭変化認識に必要な脳活動を捉えたものと考えられる。

(56) パースト長を変えたときの音列のテンポ認識とそれに伴う N1m の計測

笹本貴宣¹⁾, 柴 玲子²⁾, 根本 幾^{1,2)}

(¹⁾ 東京電機大学大学院情報環境学研究科 (²⁾ 東京電機大学先端工学研究所)

我々はテンポの認識に音列の時間間隔だけでなく音の長さも影響すると考え、刺激の間隔 (SOA) が一定で 1 音の長さ (duration) が異なる 5 種類の音に対する、心理実験と脳磁界計測を行った。心理実験は一対比較法を用いた。心理実験 1 では SOA を 500ms とし、5 種類の音の長さに対するテンポのとりやすさを -2 から +2 の 5 段階評価で判断した。心理実験 2 では SOA 500ms の標準刺激 5-6 音に 1 回の割合で刺激呈示感覚を 400ms とした逸脱刺激を呈

示し、テンポのずれの感覚を 5 段階評価で判断した。脳磁界計測は心理実験 2 と同様のタスクを使用した。標準刺激に対しては、音の長さが 50ms の時に N1m 成分振幅が最大となり、心理実験でのテンポのとりやすさも最大となった。逸脱音に対しては、N1m 成分振幅の脳活動、テンポのずれの感覚を判断する心理評価ともに音の長さによる違いは認められなかった。

(57) 聴覚皮質にみられる確率共鳴現象

田中慶太, 川勝真喜, 根本 幾 (東京電機大学)

確率共鳴現象とは、微小信号が外部雑音と共鳴して、確率的に増幅し、かつその増幅率を最大にする最適雑音強度が存在する現象である。本研究は、聴覚皮質における確率共鳴現象の存在の有無を確認するため、刺激音で

ある AM 変調音 (変調周波数 40Hz, 搬送周波数 1kHz) の雑音対信号比 (N/S) の違いによる 40Hz 成分脳磁界聴性定常応答 (ASSR) を計測した。その結果、ASSR の刺激に対する位相同期は、すべての被験者で N/S=0 (AM

変調音のみ) 時に比べ、わずかな雑音混入時により強い同期を示した。この結果は、ASSR の発生に最適雑音強

度が存在することを示唆しており、ヒトの聴覚皮質における確率共鳴現象を表す。

(58) 示指伸展運動時における運動誘発脳磁界第二成分について

大西秀明¹⁾, 相馬俊雄¹⁾, 大山峰生¹⁾, 亀山茂樹²⁾, 大石 誠²⁾, 黒川幸雄¹⁾

(¹⁾新潟医療福祉大学医療技術学部 (²⁾独立行政法人国立病院機構西新潟中央病院)

自発運動を行うことにより運動準備磁場、運動磁場、運動誘発磁場第一・二・三成分 (MEF I・II・III) から構成される一連の運動関連脳磁界を計測することができる。運動直後の MEF I は大きな振幅を示し、電流発生源についても多くの議論が行われている。一方、MEF II および III についての報告は少なく、波形の意義や電流発生源については明らかでないのが現状である。本研究の目的は、示指伸展運動時に誘発される MEF II の意義を検討

することである。対象は健常男性7名である。脳磁界計測には Neuromag306 を用い、3種類の示指伸展運動時(通常の示指伸展、強負荷での示指伸展、可動範囲が小さい示指伸展)における脳磁界を計測した。示指伸展運動は5秒間に1回程度の頻度で自発的に行い、運動関連脳磁場波形を50回以上加算平均処理した。その結果、可動範囲が小さい示指伸展運動時において MEF II は最も大きな振幅を示すことが判明した。

(59) ニューロイメージング PF 構想 (ニューロインフォマティクス)

鈴木良次¹⁾, 仁木和久¹⁾, 藤巻則夫¹⁾, 正木信夫¹⁾, 市川一寿¹⁾, 臼井支朗²⁾

(¹⁾NIMG-PF 委員会 (²⁾RIKEN BSI NIJC)

ニューロイメージング・プラットフォーム (NIMG-PF) 委員会では、日本各地の研究拠点の幹事と十数名の委員により、神経情報基盤センター (NIJC) の下で、脳イメージングに関するニューロインフォマティクス (NI) ・プラットフォームの H19 年度公開を目指して準備を行っており、会員の協力を仰ぐために内容を紹介したい。既に fMRI 等に関するニューロイメージングの NI サイトが世の中に存在することから、当 NIMG-PF では、NIJC

共通の NI システムである XooNIps を利用して、MEG を含む各種ニューロイメージングとその統合化手法を扱う。この方針のもとで、チュートリアル情報、網羅的でなく主要な論文や生データ等の論文関連情報、表示・検索に便利な可視化・モデル・ツールなどの手法を収集し独自の NI を構築する。また世界の NI に対するポータルサイトとして研究関連情報にリンクする予定である。

(60) 力操作時の非協調的視覚変化に伴う擬似的力感覚生成過程の基礎的検討

青山 敦¹⁾, 遠藤博史²⁾, 本多 敏¹⁾, 武田常広³⁾

(¹⁾慶應義塾大学大学院 理工学研究科 (²⁾産業技術総合研究所

(³⁾東京大学大学院 新領域創成科学研究科)

脳磁場解析によって操作力と視覚変化の非協調性に伴う擬似的な力感覚生成過程の基礎的検討を行った。力操作においては、加力量に応じてスクリーン上に呈示され

た正方形のカーソル速度が協調的に変化するような一方向性のスティック型力量計を開発し使用した。被験者には、右示指での加力によって右視野に置かれたカーソル

を左視野のターゲット位置に一定速度で移動させるよう指示した。この協調動作中にカーソルが予測に反して右方向へ移動した際に、加力量が不変にもかかわらず内的な力感覚が付加的に生じ、視覚変化後 100ms 付近から一次体性感覚野の活動増大が観測された。一方で変化が予

測可能な場合には、このような感覚も皮質活動も存在しなかった。従って協調状態においては、予測不可能な視覚入力変化によって体性感覚情報処理を早期に駆動でき、この処理過程が擬似的な力感覚生成に深く関わっていると考えられた。

(61) 脳磁界応答から見た運動感覚が運動イメージ想起に与える影響

林 紘章¹⁾, 古田大祐¹⁾, 作山 努¹⁾, 小谷賢太郎¹⁾, 堀井 健¹⁾, 中川誠司²⁾, 山田 誠³⁾

(¹⁾ 関西大学大学院工学研究科 (²⁾ 独立行政法人産業技術総合研究所 (³⁾ 大阪医科大学)

近年、運動イメージは、随意運動が困難な者でも可能であり、運動能力の向上に有効であることから、リハビリテーションに応用することが検討されている。リハビリテーションの一つであるミラーセラピーは、実際に動かしていない肢位に運動感覚を付加し、明瞭な運動イメージを支援する治療法であると考えられている。しかし、未だ明瞭な運動イメージが運動感覚によって支援されているのか明らかではない。運動イメージをより明瞭に行

うほど運動関連領域において脳活動強度が強くなるといった報告より、本研究では、健常者 11 名に対して運動イメージ時と運動感覚を付加し運動イメージを行った時の脳磁界応答を計測した。運動関連領域における RMS 解析結果より、運動感覚を付加し運動イメージを行った時の脳磁界応答の活動強度が高いことがわかった。以上より、運動感覚が明瞭な運動イメージを支援している可能性が示唆された。

(62) 機能的 MRI を用いたヒトの嗅覚と味覚の脳活動に関する研究

宇野富徳¹⁾, 三分一史和²⁾, 外池光雄²⁾, 町 好雄³⁾, 小谷 誠³⁾

(¹⁾ 東京電機大学工学研究科 (²⁾ 千葉大学工学部 (³⁾ 東京電機大学工学部)

ヒトの嗅覚及び味覚に対する脳機能研究は MEG, fMRI, PET 等を用いて主に嗅覚・味覚中枢の部位同定等が行われているが、知覚後の認知、判断、記憶といった高次脳機能についてはまだ十分に解明されていない。筆者らは簡易型の嗅覚刺激装置および味覚刺激装置を試作し、fMRI を用いて匂い刺激と味刺激に対する各々の脳活動を計測し、これらの中核部位の同定と相互の関連性についての検討を行った。提示刺激は嗅覚実験では果物の

匂いを、味覚実験は柑橘類の味溶液を用いた。SPM での解析の結果、嗅覚実験では主に梨状前皮質、梁下野、鈎、味覚実験では主に島皮質、扁桃体等に賦活が認められた。また、嗅覚刺激と味覚刺激に共通して梁下野、島皮質、側頭極等の賦活も認められた。これについては、味溶液に含まれるフレーバー成分が発生する匂いの知覚による脳活動によるものと考えられ、匂いと味の関連性についての考察も行う。

(63) ガムチューイングが短期記憶獲得時のθ波活動に及ぼす影響

堂脇可菜子¹⁾, 小野弓絵²⁾, 石山敦士³⁾, 小野塚実²⁾

(¹⁾ 早稲田大学大学院理工学研究科 (²⁾ 神奈川歯科大学生理学 (³⁾ 早稲田大学理工学術院)

本研究では Sternberg Task の遂行時の MEG データから

短期記憶の遂行に関連して発生するθ波成分を抽出し、

その強度の時間変化と頭表における空間的分布について調べた。社会の高齢化に伴い認知症の予防への関心が高まっている。近年の fMRI の研究により咀嚼活動（ガムチューイング）が空間認知や短期記憶の獲得時に活動する海馬や頭頂連合野、前頭前野の賦活を増大させることがわかってきており、認知症の予防法として注目されてきている。本研究と同様の測定をした先行研究より、短

期記憶課題を行っているときに特徴的に現れる前頭葉の θ 波活動の強度を指標とすることによって、ガムチューイングが短期記憶活動に与える影響について調べられると考えられる。本実験では5人（22～29歳の男女）の被験者が実験に参加した。短期記憶課題の合間にガムチューイングを行うと前頭葉の θ 波が減少し、記憶活動を円滑に行えるようになることがわかった。

(64) 小脳経頭蓋磁気刺激によりヒラメ筋に誘発される筋電位への前庭系賦活の効果 ～視運動性眼振を用いて～

藤原暢子¹⁾、崎原ことえ¹⁾、平田雅之^{1,2)}、柳星伊¹⁾、荒木俊彦¹⁾、
魚川江津子¹⁾、梅川夕佳¹⁾、甲津彩子¹⁾、依藤史郎¹⁾

(¹⁾ 大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻機能診断科学 (²⁾ 大阪大学大学院医学系研究科脳神経外科学)

【背景】我々は左小脳 TMS により左ヒラメ筋に誘発される約 100ms の長潜時筋電位を見出し(Sakihara ら, 2003)、この経路を明らかにするため、前庭脊髄路に注目した。

【目的】視運動性眼振を用いて前庭脊髄路の起始核である前庭神経核を賦活した条件下で、小脳 TMS による筋電位の影響を検討した。

【方法】健常者に active 刺激（縦縞が角速度 $10^\circ/s$ 及び $30^\circ/s$ で右に移動する画像）、control 刺激（固視点・静止画）を

呈示し、立位で Ugawa ら (1995) に準じた小脳 TMS による誘発筋電位を 30 回加算平均した。

【結果】固視点と $10^\circ/s$ 及び $30^\circ/s$ 、静止画と $30^\circ/s$ の比較で、active はピーク潜時が有意に短縮した ($p<0.01$)。

【考察】小脳 TMS で誘発される筋電位の潜時が、前庭神経核を賦活する条件下で有意に短縮したことから、この誘発筋電位に前庭脊髄路が関与していると考えられた。

(65) 刺激部位の違いによる経頭蓋磁気刺激時の誘発脳波計測

佐藤秀之¹⁾、有松 孟¹⁾、葛 盛¹⁾、上野照剛²⁾、伊良皆啓治¹⁾

(¹⁾ 九州大学大学院システム情報科学研究科 (²⁾ 九州大学大学院工学研究院)

本研究では、経頭蓋磁気刺激直後の脳波を全頭で測定し、脳波マッピングを求めることで脳神経ネットワークを解析している。脳波は、Sample and Hold 回路を導入した脳波計を使用することによりアンプの飽和状態を防ぎ磁気刺激時のアーチファクトを大きく減らした。刺激部位を変化させたときのトポグラフィーを比較し神経伝達の特徴を調べた。刺激後 10ms くらいまでは、まだアー

チファクトの混入が見られるが、その後、脳波の変化が測定されている。トポグラフィーより左右間での刺激の伝播の様子がわかる。また、刺激部位の変化による伝播の様子の変化も観察された。ここでは、刺激部位の変化による活動電位の伝達パターンを示した。また、大脳の刺激と小脳の刺激の反応の違いを示した。

(66) 全力暗算時における局所脳律動変化～そろばん熟練者と非熟練者の比較～

木曾加奈子¹⁾, 平田雅之¹⁾²⁾, 魚川江津子¹⁾, 崎原ことえ¹⁾, 依藤史郎¹⁾

(1) 大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻機能診断科学 (2) 大阪大学大学院医学系研究科脳神経外科学)

かけ算の全力暗算時における脳律動変化から、脳内計算処理過程を明らかにすることを目的とし、そろばん熟練者と非熟練者を比較した。被験者が3秒間で計算できるレベルの桁数のかけ算を課題として視覚呈示し、黙読暗算させた。解析には開口合成脳磁図 (SAM: Synthetic aperture magnetometry) を用いた。その結果、非熟練者と熟練者の双方で右頭頂間溝・右上頭頂小葉と両側後頭葉に脱同期反応を認めた。また非熟練者に特異的に左前頭

前野内側に同期反応を認めた。また熟練者に特異的に両側感覚運動野の脱同期反応と左側頭葉の同期反応と後頭葉の同期反応を認めた。この結果より、非熟練者は両側の頭頂葉を用いて九九をしながら計算処理をおこなうが、熟練者はそろばんの記憶を側頭葉に保管し、感覚運動野でそろばんをはじくイメージをしながら頭頂葉で視空間的に計算処理をおこなうことが示唆された。

(67) 計算する脳—計算式実行中の脳活動の解析

中村昭範¹⁾, ディアース ケアステン¹⁾, マエス ブルカード²⁾, 文堂昌彦³⁾, 吉山顕次⁴⁾, 小野健太郎¹⁾, 伊藤健吾¹⁾

(1) 国立長寿医療センター 長寿脳科学研究部 (3) 同 脳外科

(4) 同 精神科 (2) マックスプランク認知脳科学研究所)

【目的】計算式の実行に関わるヒト脳活動を時空間的に詳細に描出する。

【方法】健常ボランティア 20 名を対象に、難易度を揃えた二桁と一桁の足し算または引き算 (例 $78 - 3 = 75$) を計算中の脳磁場反応を測定した。計算式の各オペランド、オペレーター及び答えは分離して逐次的に視覚呈示し、答えが正しいかどうかボタン押し反応を行わせた。また、コントロールとして計算の必要のない数字や演算記号の単純な呈示に対する反応も記録した。データは最小ノル

ム法により脳表電流密度を計算し、SPMにより有意な賦活部位を検討した。

【結果】各オペランド及びオペレーター全てに対して、呈示後約 200-400ms に左背外側前頭前野が有意に賦活された。これに加え実際の計算が行われるタイミングの「B」提示後約 300ms には、左右の上頭頂小葉も有意に賦活され、暗算実行には頭頂前頭ネットワークが重要な役割を担っていることが示唆された。

(68) 三次元脳磁界計測に基づく大脳皮質での複数信号源弁別に関する研究

金 鳳洙, 内川義則 (東京電機大学理工学部電子情報工学科)

高感度磁気センサである SQUID 磁束計を用いた生体磁気計測では、外界からの刺激によって誘発される脳内の反応 (誘発反応) を計測し、ヒトの感覚、運動、認知などの脳内の情報伝達過程を捕らえる試みが行なわれている。脳磁界 (MEG) 計測において複数の信号源が存在すると複雑な磁界分布が得られ、信号源の数や位置が一

意的に決定できなくなるため、様々な弁別法の提案と検討が行われている。著者らは右手の三つの指 (親指、薬指、小指) への電気刺激による SEF を、二次勾配型三次元磁界検出コイルを内蔵する 39ch SQUID 磁束計を用いて計測した。各 SEF に対して特異値分解を適用し、大きい値を示した 5 つの特異値を用いて再構成した SEF 波形

より, 第1次 (SI) と第2次 (SII) 体性感覚活動の弁別を行った。さらに, 時間-周波数解析と信号源推定を用い

て薬指のSEFにおける複数信号源の弁別について検討したので報告する。

(69) N1m 振幅などに含まれる乗法的な個人の効果を前処理で除去したデータの分散分析について

根本 幾 (東京電機大学情報環境学部)

誘発脳波や脳磁界の各成分の振幅には, 刺激に対する被験者の感度や, 信号源とセンサーとの位置関係などに起因する, 乗法的な個人の効果が含まれていると考えられる。通常の分散分析では加法的な効果のみを扱っているので, 乗法的な効果を除去する前処理法を提案した。本報告はその続報である。理論的な面に関しては, 前処理後に繰り返しのない二元配置分散分析を行う場合の F

値と, それに伴う多重比較に用いられる Student 化された範囲 q の分布について興味ある結果が得られた。また, シミュレーションによると, 実験条件数が少ないほど提案した方法の効果が大きいことがわかった。従って, いわゆる paired t 検定 (実験条件数 2) の前に本前処理を施すと, モデルが正しい場合には, 大きな効果が得られることが分かった。

(70) MEG トポグラフにおける統計的有意な活動の抽出方法の開発

岩井裕章, 豊福哲郎, 三分一史和, 外池光雄 (千葉大学大学院 工学研究科)

MEG では様々なアーチファクトに起因するノイズや脳波の背景信号を相殺させるために加算平均法が用いられている。しかしこの方法は平均値のみの議論であり, 背景の分散構造を考慮しない上, 統計学有意性を客観的に評価できない。また, 刺激の位相に同期しない induced potential も相殺されてしまい, その抽出を行うことがで

きないという問題点がある。本研究では wavelet 変換を用いた時間一周波数領域における統計解析において evoked potential ならびに induced potential の抽出と統計的評価の可能性をシミュレーションならびに実データ解析において示した。

(71) 脳内信号源推定における遺伝的アルゴリズムパラメータの最適化

佐々木貴志¹⁾, 嶋田裕介¹⁾, 安斉和久¹⁾, 及川敬敏¹⁾, 葛西祐介¹⁾, 斎藤 優¹⁾, 石山敦士²⁾, 渡邊 裕³⁾, 葛西直子⁴⁾

¹⁾ 早稲田大学大学院理工学研究科 ²⁾ 早稲田大学理工学術院

³⁾ 東京歯科大学オーラルメディスン・口腔外科学講座 ⁴⁾ 産業技術総合研究所

MEG データを用いた脳内の複数信号源を精度よく推定するためのアルゴリズムである遺伝的アルゴリズムは, 大域的探索性に優れた確率的探索法で, また探索時間も比較的短いという利点があるが, 初期に設定するパラメータが推定解に大きな影響を与えるという特徴をもつ。そこで本研究では, 遺伝的アルゴリズムのパラメー

タの最適な値をシミュレーションによって検討した。また, 実データとして聴覚誘発 MEG データによる信号源推定を行い, シミュレーションによる結果との比較を行ったので本報告する。さらに, 遺伝的アルゴリズムとシミュレーテッド・アニーリングを組み合わせた手法とも比較・検討したので合わせて報告する。

(72) MEG 計測へのカルマンフィルタの応用

宇野 裕, 武田常広 (東京大学大学院 新領域創成科学研究科 複雑理工学専攻)

生の MEG データは一般に S/N が悪く, 1 トライアルデータでは有意な脳活動情報が取り出せない場合がほとんどである。これを改善するため, 現在は数百トライアル分のデータを加算平均することで S/N を改善している。データ取得のコスト削減と MEG データの時間情報精度の劣化を防ぐ目的で, カルマンフィルタを応用した MEG 計測データのノイズリダクションが先行研究(Okawa et al., 2005)において提案されている。カルマンフィルタと

は, 与えられた制約条件のもとで誤差の分散を最小とする推定値を得るフィルタである。カルマンフィルタは, 1960 年代に Kalman によって提案されてから, 航空・宇宙分野での応用をはじめ, 現在では様々な分野で利用されている。本研究では, このカルマンフィルタを実際に構成し, フィルタ構成時の問題点・ノイズリダクションの性能・応用上の問題点等について検討した。

(73) チホノフの正則化を用いた MEG 信号源推定

齋藤 優¹⁾, 及川敬敏¹⁾, 葛西祐介¹⁾, 石山敦士²⁾, 渡邊 裕³⁾, 葛西直子⁴⁾¹⁾ 早稲田大学大学院理工学研究科 ²⁾ 早稲田大学理工学術院³⁾ 東京歯科大学オーラルメディシン・口腔外科学講座 ⁴⁾ 産業技術総合研究所

本研究の目的は, チホノフの正則化による信号源推定は, 最小二乗法による信号源推定よりも雑音耐性があるかを検討することである。今回, チホノフの正則化における正則化パラメータを定量的に選択する方法として, P.C.Hansen の L-カーブ法を適用した。聴覚誘発 MEG に対して L-カーブ法を適用し, チホノフの正則化におけるパラメータ選択法の妥当性を検討したので報告する。さ

らに, 加算平均回数を変化させることにより作成した S/N の異なる聴覚誘発 MEG データに対して, チホノフの正則化を用いて信号源推定した場合と, 用いずに信号源推定した場合を比較することで, チホノフの正則化には雑音耐性があるか比較検討を行ったので合わせて報告する。

(74) 誘発脳磁界計測データを用いたアダプティブ, 及び, ノンアダプティブな空間フィルターの比較

長野雅実¹⁾, 田中博昭²⁾, 関原謙介¹⁾¹⁾ 首都大学東京大学院 システムデザイン学部 ²⁾ 横河電機 ライフサイエンス事業部

本研究では, アベレージデータ, Raw データからそれぞれ計算した共分散行列を用いたアダプティブな空間フィルター, そして共分散行列を用いないノンアダプティブな空間フィルターの 3 種類を用い, 2 種類の実験のデータを解析することにより再構成結果の比較を行った。1 つ目の実験は, 6 人の被験者に対し, 右手首の正中神経を電気刺激することにより得られた体性感覚誘発脳磁界データ, 2 つ目の実験は, 7 人の被験者に対し, トーンバ

ースト音を聞かせた場合の聴覚誘発脳磁界データである。そして, 比較を行った結果, 体性感覚誘発脳磁界データに対しては, アベレージデータより計算した共分散行列を用いたアダプティブな空間フィルターが空間分解能の点で最も優れており, 聴覚誘発脳磁界データに対しては, ノンアダプティブな空間フィルターならば全センサーの測定データを用いても正確な再構成ができるという結果を得た。

(75) Beamformerによる時間相関を持つ複数信号源推定

及川敬敏¹⁾, 木村壮志¹⁾, 齋藤 優¹⁾, 葛西祐介¹⁾,
石山敦士³⁾, 渡邊 裕²⁾, 葛西直子⁴⁾

¹⁾早稲田大学大学院理工学研究科 ²⁾東京歯科大学オーラルメディスン 口腔外科学講座
³⁾早稲田大学理工学術院 ⁴⁾産業技術総合研究所

Beamformer法は、複数信号源の位置や強度の変化を時間的に緩やかな変化として推定できる逆問題推定手法である。しかし、時間的な相関を持った複数信号源を推定する際に、推定解が悪化する欠点がある。そこで当研究室では、データ共分散行列から信号空間固有ベクトルを分解することで時間相関成分を除去する手法を考案した。固有ベクトル分解の際に逆問題解析を行うが、優決定手法では先見情報として信号源数を把握する必要があ

る。そのため前報では、劣決定手法である L2 ノルム最小化法を用い、シミュレーションデータに適用したが、ノイズによる空間分解能の悪化が明らかになった。そこで、ノイズの影響を軽減させるために、前処理として特異値分解を行った L2 ノルム最小化法を導入した。シミュレーションデータに適用した結果、前報の手法に比べ、より精度良く推定できた。また、実験データにも適用し、実用性を確認したので報告する。

(76) 平面型グラジオメータの等磁場線図

橋詰 顕, 栗栖 薫, 飯田幸治, 花谷亮典, 白水洋史
(広島大学大学院先進医療開発科学講座脳神経外科)

Elekta-Neuromag 社のマニュアルには平面型グラジオメータから等磁場線図をどのように作成されるのかの簡単な記述があるのみで詳細は不明である。そこで具体的にどのようなアルゴリズムで平面型グラジオメータの情

報から等磁場線図が作図されているかについて試行錯誤を行なったところ、Elekta-Neuromag 社の提示する等磁場線図様の図を作成することが可能となったので、そのノウハウを公開する。

(77) 電流双極子を2等辺3角形コイルで表現したファントムの試作

上原 弦¹⁾, 橋本 勲¹⁾, 湯本真人²⁾, 田中博昭³⁾, 木村友哉³⁾, 成田憲道³⁾, 宮本政和¹⁾, 足立善昭¹⁾
(¹⁾金沢工業大学 ²⁾東京大学 ³⁾横河電機)

MEG装置の性能を評価し維持するためには、評価標準となるべき Sarvas のモデルを模すファントムが必要であると考えられる。従来、Sarvas のモデルを模すものとして、生理食塩水で満たされた球形の容器の中に電流双極子の電極を配置したものが多く使われてきたが、我々は、このタイプには、電気二重層の電気分解による非線形性の問題などがあることを明らかにしてきた。一方、Ilmoniemi らの2等辺3角形コイルの頂角対辺を無限小に

したタイプのファントムは、電流駆動の線形性が保証されており、評価標準として良い候補であることに着目し、頂角対辺を有限の 5mm にすれば発生する磁場は Sarvas のモデルと誤差 0.2% で一致することを示した。今回はこのコイルを実際に製作し、発生する磁場を MEG 装置で計測して電流双極子の位置とモーメントを計算し、それらの精度の分析を行ったのでこれについて報告する。

(78) 心磁界計測データからの信号源推定

組橋 勇¹⁾, 緒方邦臣²⁾, 神鳥明彦²⁾, 関原謙介¹⁾

(¹⁾首都大学東京大学院 システムデザイン研究科 (²⁾日立製作所 基礎研究所)

心疾患の診断のため心臓での電気生理学的活動を可視化することが求められている。本研究では心磁界計測によって得られる磁場分布から、空間フィルタにより電流源分布を3次元的に再構成し可視化する。心磁界計測には平面に配置された心磁計を用いて身体正面と背面から

行うことを仮定し、空間フィルタは minimum-norm filter と spatial matched filter そして sLORETA を用いその再構成結果を比較した。さらに再構成を行う空間を心臓モデル表面に制約し、制約の有無による再構成結果の比較を行った。

(79) 人とサル的心臓磁場の比較

宗行健太¹⁾, 塚田啓二¹⁾, 関 悠介²⁾, 神鳥明彦²⁾, 揚山直英³⁾, 寺尾恵治³⁾

(¹⁾岡山大学大学院 自然科学研究科 (²⁾(株)日立製作所 基礎研究所

³⁾医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター)

現在、心臓や脳の疾患を診断する方法の一つとして、超伝導量子干渉素子 (SQUID) を利用した手法が注目されている。特に心磁計は心電計に比べ、微小電位による感受性が高い、体表面での多点計測が可能といった数多くの利点を有している。本研究では、実験用サル類を対象として心磁計測を行った。これにより、人の前臨床試験に最も適しているサル類の健常値を人のそれと比較し、その違いを明らかにすることを目的とした。サル類

の心電図はヒトに比べて体が小さいが故に胸部誘導が困難であり、さらには低電位でもあるため、雑音に埋もれ易く診断も困難である事が多いが、心磁図ではその有意差を確認することができた。今回の測定により、QRS 幅、PQ 間隔、RR 間隔はともに人の健常値に比べて半分程度であることがわかり、また、サルの雌雄の有意差も確認することができた。

(80) 高ダイナミックレンジ・広帯域型 FLL 回路の開発

—その1 回路設計とシミュレーション—

小林宏一郎¹⁾, 小山大介¹⁾, 吉澤正人¹⁾, 内川義則²⁾,

Simon Hattersley³⁾, Quentin Pankhurst³⁾

(¹⁾岩手大学 工学部 (²⁾東京電機大学 理工学部 (³⁾University College London)

近年、生体磁気計測の臨床応用が進み、安価で使い易い装置開発が求められている。著者らは、磁気シールドルームを必要とせず、ベッドサイドで動作可能な高感度ワイドレンジ型 SQUID 磁束計の開発を行ってきた。しかし、デジタル制御による帯域の制約が問題であった。そこで本報告では、磁気シールドルーム外で安定して動

作し、かつ広帯域を実現するため、アナログ・デジタルハイブリッド型フィードバックを用いた FLL を新たに提案する。その 1 では、回路の設計思想とシミュレーションを用いた特性評価を行い。その 2 では、実際に試作したハイブリッド型 FLL の特性評価と心磁図計測結果について報告する。

(81) 高ダイナミックレンジ・広帯域型 FLL 回路の開発 —その2 試作回路の評価と心磁図計測—

小山大介¹⁾, 小林宏一郎¹⁾, 吉澤正人¹⁾, 内川義則²⁾, Simon Hattersley³⁾, Quentin Pankhurst³⁾
(¹⁾岩手大学 工学部 ²⁾東京電機大学 理工学部 ³⁾University College London)

近年, 生体磁気計測の臨床応用が進み, 安価で使い易い装置開発が求められている。著者らは, 磁気シールドルームを必要とせず, ベッドサイドで動作可能な高感度ワイドレンジ型 SQUID 磁束計の開発を行ってきた。しかし, デジタル制御による帯域の制約が問題であった。そこで本報告では, 磁気シールドルーム外で安定して動

作し, かつ広帯域を実現するため, アナログ・デジタルハイブリッド型フィードバックを用いた FLL を新たに提案する。その 1 では, 回路の設計思想とシミュレーションを用いた特性評価を行い, その 2 では, 実際に試作したハイブリッド型 FLL の特性評価と心磁図計測結果について報告する。

(82) 小動物生体磁気計測装置におけるノイズキャンセリング

宮本政和¹⁾, 河合 淳¹⁾, 足立喜昭¹⁾, 駒村和雄²⁾, 上原 弦¹⁾
(¹⁾金沢工業大学 先端電子技術応用研究所 ²⁾国立循環器病センター研究所 循環動態機能部)

生体磁気計測では, 設置環境からの雑音の影響を最小限に抑えることはデータの効率的な収集および実験の再現性の面から重要な要素である。我々は現在開発中の小動物用生体磁気計測装置において, リファレンスセンサから得られる環境雑音信号を SQUID センサのフィードバックコイルに直接フィードバックすることで計測時にリアルタイムでノイズキャンセリングを行う回路を組み

込んだ。同回路を用いて実際の使用環境における効果を確認したところ, ハムノイズとその高調波において 15dB 程度のノイズキャンセリング効果があることが確認された。また, リファレンスセンサと生体磁場信号検出用センサ間での外部環境磁場に対する周波数特性の違いがあることを確認した。この周波数特性の差は外部環境磁場の信号源位置によっても変化することが確認された。

(83) 75ch SQUID 頸部脊髄誘発磁場計測システムの開発

足立善昭¹⁾, 宮本政和¹⁾, 河合 淳¹⁾, 上原 弦¹⁾, 尾形久直¹⁾,
川端茂徳²⁾, 富澤将司²⁾, 友利正樹²⁾, 佐藤朋也³⁾
(¹⁾金沢工業大学 先端電子技術応用研究所 ²⁾東京医科歯科大学 整形外科
³⁾首都大学東京 システムデザイン学部)

非侵襲的な脊髄機能診断の確立をめざした脊髄誘発磁場計測システムを開発した。開発した計測システムはセンサアレイとデュワに大きな特徴がある。SQUID センサアレイは磁束伝達型の低温 SQUID を適用した 25 個のベクトル差分型磁束計を装備し, 約 80mm×90mm の観測領域において, 体表面に対して法線方向と接線方向の磁場を同時に観測可能である。センサアレイは被験者の頸部形状に適合するように緩やかな円筒面を有している。

円筒状の液体ヘリウム容器の側面からセンサ格納部が突き出た特殊な形状を有するデュワを開発した。この構造は座位の被験者の頸部後方にセンサを近づけるのに適している。センサ面の cool-to-warm 距離は 7mm である。計測システムの性能確認のために, 健常被験者の手首正中神経刺激にともなって誘発する磁場信号を頸部にて観測した。後シナプス電位, 活動電位に由来する磁場を検出することができた。

(84) 高精度 TMS 刺激部位解析システム

樋脇 治, 井上朋紀, 池田太郎 (広島市立大学大学院情報科学研究科)

経頭蓋磁気刺激 (TMS) において脳の刺激部位を正確に特定できるシステムを開発した。すなわち, 大脳皮質の解剖学的特徴と神経線維の磁気刺激における興奮特性を考慮し, 脳内に誘導される電界から刺激部位を特定し可視化するシステムを構築した。このシステムは, 三次元スキャナと頭部 MRI 情報から脳の位置を計測するモジ

ュールとメカニカルアームにより刺激用コイルの位置を計測するモジュールを具備している。これらのモジュールを用いて得られる脳内の正確な電界分布をもとにして, 脳の表面に垂直な方向の電界分布を算出し, その強度の強い部位を刺激部位として可視化するシステムを開発した。

(85) 超強磁場 MRI におけるヒト頭部 RF 電磁場の FDTD 解析

関野正樹¹⁾, キムドンミン¹⁾, 上野照剛²⁾, 大崎博之¹⁾

(¹⁾東京大学大学院新領域創成科学研究科 (²⁾九州大学大学院工学研究院)

近年, 10T を超える強磁場 MRI の開発が議論されており, その磁気共鳴周波数は 500MHz に達する。そのような高周波数では, 測定対象内部の RF 電磁場が複雑な空間分布を示す結果, 画像に著しい不均一が生じ, また比吸収率 (SAR) が従来装置に比べて増大する可能性が指摘されている。本研究では有限差分時間領域 (FDTD) 法を用いた数値解析により, ヒト頭部の RF 電磁場分布を求

め, 画像の信号不均一や SAR を評価した。磁気共鳴周波数の上昇にしたがって画像の不均一は顕著になり, 500MHz の装置では, 脳深部の信号が強く, その周囲が弱く, 脳表面付近がやや強い画像となった。また, 磁気共鳴周波数の上昇にしたがって頭部平均 SAR は増加したが, 局所 SAR は複雑な増減を示した。

(86) 骨再生の実用化に向けた永久磁石磁気回路の検討

齋藤大輔¹⁾, 斎藤智之¹⁾, 篠原 肇¹⁾, 青木雅昭²⁾, 小谷 誠¹⁾

(¹⁾東京電機大学 (²⁾株式会社 NEOMAX)

骨組織再生には, 生体骨の構造と類似させるために強磁場により配向させたコラーゲンゲル中で細胞を培養し石灰化させることが有効であると報告されている。一般に強磁場を得る場合には超伝導磁石を用いるが, 現状のまま実用化することは骨作成コストが大きな問題となる。そこでこれまでに本研究では, 骨作成コストを低下させるためにコラーゲン配向に必要な磁場強度を検討し, 永久磁石でハルバツハ磁気回路を構成することで強磁場発生装置を試作し, コラーゲン配向が得られること

を確認した。しかし, ハルバツハ磁気回路を実用サイズに大型化するためには磁石量が大量となり大きさや重量の問題が生じることがわかった。そこで今回は, 少量の磁石で強磁場を得ることが可能な磁気回路を検討し, 実際に骨組織を作成可能な大きさの強磁場発生装置を作成した。さらに, 作成したコラーゲンゲルに骨芽細胞を播種し, 永久磁石磁気回路の有効性を検討したので報告する。

(87) 骨形成に関わる細胞系パターンニングにおける反磁性的な磁気作用

岩坂正和, 阿部俊秀, 仲二見信吾 (千葉大学工学部)

培養骨芽細胞および破骨細胞形成系における反磁性的な力学効果が細胞集団の構造形成に与える影響を調べた。最大5テスラおよび12テスラの超伝導磁石空間を用い、地球重力に対する磁気力の重量環境が骨芽細胞あるいは破骨細胞の成長に与える影響を観測した。磁場下で

の細胞形態のリアルタイム観察および光学計測を用い細胞動態計測を行った。さらに、細胞構成成分および細胞外マトリックスに作用する反磁性的な磁気トルクによる細胞凝集状態変化についても検討を進めた。骨形成の磁气的支援技術の探索を進めた。

(88) 中間周波磁界 (2,20kHz) の生物影響評価

池畑政輝, 鈴木敬久, 吉江幸子, 中園 聡, 和氣加奈子, 早川敏雄

(¹) (財) 鉄道総合技術研究所 環境工学研究部 (²) (財) 電力中央研究所 環境科学研究所

(³) 首都大学東京 都市教養学部 (⁴) (独) 情報通信研究機構 第三研究部門

インバータなどに用いられる中間周波 (2 及び 20kHz) の電磁界に関して、その安全性の基礎的な知見を得るため、特に変異原性に着目し評価をおこなった。マウスリンフォーマ細胞 L5178Y TK+/-3.7.2c 細胞を培養後、磁界曝露群、対照群、陽性対照群 (メタンスルホン酸メチル処理) の3群に分けて処理をおこない、突然変異頻度を求めた。磁界曝露には樹脂製の炭酸ガスインキュベーターと平面コイルを組み合わせた曝露装置を製作し、周波

数2および20kHz・磁界強度最大約800 μ Tの磁界を曝露した。その結果、対照群と磁界曝露群の間には有意な突然変異頻度の差は認められなかった。また、コロニーの形成についても両群で差異は認められなかった。したがって、本研究で検討した磁界曝露の条件では、中間周波磁場はMLAで検出される種々の突然変異 (点突然変異、染色体レベルの変異) 誘発能を持たないことが明らかとなった。

(89) 磁気誘発筋電図による施灸効果の検出

千葉 惇, 生塩研一, 稲瀬正彦 (近畿大学医学部生理学1)

We demonstrated a technique in which the magnetic pulse stimulation of the rat spinal nerves to cause a spinal reflex is measured after moxibustion. Magnetic stimulation was produced by a figure eight coil over the L4-L5 vertebrae that had a maximum magnetic strength of 2.2 Tesla were recorded from the gastrocnemius and tibialis anterior muscles EMGs. The maximum temperature produced by the indirect application of moxibustion was $65 \pm 2^{\circ}\text{C}$ on the skin, and $45 \pm 5^{\circ}\text{C}$ in the subcutaneous layer. Moxibustion was administered indirectly on the dorsal epidermis at L4-L5 on the supraspinal column. Magnetic stimulation at the L4-L5

vertebrae generated 3 response waves: M (1.1 msec), H (3.7 msec) and F (1.8 msec) waves. After moxibustion, H-slopes (Hslps) in both the two muscles were larger than those before moxibustion. The Hslp ratio of the tibialis anterior muscle was larger than that of the gastrocnemius muscle. The increase in Hslp/Mslp on the gastrocnemius muscle after moxibustion was larger than that of the tibialis anterior muscle. The facilitating effects of moxibustion on the H-reflex suggest the elevation of the excitatory state in the spinal reflex.

(90) 交番磁気刺激による神経栄養因子産生の促進：アルツハイマー型痴呆等脳疾患の治療の可能性

木下 香, 角田浩一, 谷崎綾美, 木下 巖, 西 光晴
(株式会社メディカル・アプライアンス 技術開発センター)

【目的】我々は、交番磁気刺激による脊髄のアストロサイト増殖を報告した。これを応用し、脳由来アストロサイトで神経栄養因子が産生促進されるかを検討した。

【方法】生後 8 日マウスの脳からアストロサイトを分離培養し、約 1 マイクロ T の交番磁界 (20M~1GHz) を 60 分間照射した。その培養ろ液を PC12 細胞に作用させ、神経突起の伸展を観察した。また細胞内 Ca 濃度、mRNA

の定量も行った。

【結果】磁気刺激群は対照の約 3 倍の陽性率であり、周波数の特異性も確認された。また約 50%の細胞で Ca 濃度上昇がみられた。以上の結果から磁気刺激によるアルツハイマー型痴呆等の神経変性疾患、うつ病などの脳疾患の治療の可能性が示唆された。

(91) 大腸菌 SOD 欠損株の遺伝子変異誘発に基づく定常磁場の影響評価

吉江幸子, 池畑政輝, 早川敏雄
(財) 鉄道総合技術研究所 環境工学研究部 生物工学)

強磁場曝露と酸化ストレスの関係を検討するため、Superoxide dismutase (SOD) 遺伝子を欠損する大腸菌 QC774 株を用いて、定常強磁場 (SMF) の変異原性ならびに SMF と同時に活性酸素種を発生する Plumbagin との同時曝露による SMF の助変異原性を評価することを目的とした。Plumbagin (0, 25, 50 μ M) を含む LB 培地に懸濁した QC774 株に対し、SMF (5T) を 24hr, 37 $^{\circ}$ C 条件下

にて曝露し、Thy-変異体を検出することにより、遺伝子変異誘発への影響を調べた。この結果、Plumbagin との同時曝露による SMF の助変異原性は認められなかったが、Plumbagin 0 μ M の場合に SMF 曝露系の遺伝子変異率が減少する傾向がみられた。これは、本評価系にて Plumbagin を溶解するため添加している DMSO が何らかの影響を及ぼしていると推察された。

(92) 細胞磁界測定法を用いた Refractory Fiber の有害性評価

工藤雄一朗, 杉浦由美子, 三村剣司, 日吉沙千代, 太田悦子, 小山美智代, 角田正史, 相澤好治
(北里大学医学部衛生学公衆衛生学)

【はじめに】本研究では石綿代替繊維の一つである三種の RF (RF1, RF2, RF3) の安全性を検討するため、マウス由来腹腔マクロファージ様培養細胞株 RAW264.7 を用いて、細胞磁界測定法、LDH 酵素測定法、電子顕微鏡による形態学的観察により細胞毒性評価を行った。

【方法】RAW264.7 細胞に、細胞磁界測定の指標として Fe₃O₄ を添加し、実験群には RF1, 2, 3 を各 250, 500, 1000 μ g/ml となるように添加し、コントロール群には PBS を添加した (細胞数 25 $\times$ 10⁴ 個/ml, 液量 1ml, 各群 n=6)。

48 時間培養後、細胞磁界測定では外部より磁化を行った。その後、磁化中止後 20 分間の残留磁界をフラックスゲート磁束計にて測定した。群毎に平均値を算出し一元配置分散分析で比較した。

【結果・考察】細胞磁界測定及び LDH 酵素測定で、RF 添加量と細胞毒性の間に量影響関係が認められた。形態学的観察では、RF1, 2, 3 ともに RAW264.7 細胞が繊維を不完全に貪食している像が観察された。

(93) 光酸化を利用したリポソーム内包薬物の放出制御に関する研究

中川秀紀¹⁾, 松本竜樹¹⁾, 椎名 毅²⁾, 小谷 誠³⁾, 上野照剛¹⁾

(¹⁾東京大学大学院医学系研究科 ²⁾筑波大学大学院システム情報工学研究科 ³⁾東京電機大学工学部)

近年、光と磁界の複合作用に関する研究分野が活発化し、光応答性磁性ベシクルを始めとする多くの人工生体膜モデル（リポソーム）が、細胞レベルでの検討に広く利用されている。一方、常磁性イオンであるラジカルは、生体内における多くの重要な反応に関与することから、生体膜に対しての積極的な利用も期待される。本研究では、ドラッグデリバリーへの応用を目的に、光惹起ラジカルによる膜酸化を利用して、リポソーム内包薬物を放

出制御する方法を検討した。膜酸化に伴い変化する脂質分子の流動性を¹³C-T1から評価し、膜曲率および膜透過性の変化は³¹Pを始めとする多核NMR法によって解析した。その結果、構成脂肪酸の不飽和度のみならず、薬物とともにリポソームに内包したイオン種の違いにより、膜透過性に大きな差異が生じることを見出した。現在、リポソーム粒径やホスホリパーゼ内包時の影響についても検討中である。

10. 大脳皮質—大脳基底核連関と前頭葉機能

2008年1月17日—1月18日

代表・世話人：宮地重弘（京都大学霊長類研究所）

所内対応者：南部 篤（生体システム研究部門）

(1) 非錐体細胞の樹状突起の計算特性 —形態的な考察—

窪田 芳之（生理研）

(2) 傍細胞記録法によるラット運動野ニューロンの機能のおよび形態学的同定

磯村 宜和（理研・BSI）

(3) 覚醒下モデルマウスからニューロン活動を記録し、ジストニアの病態を解明する

知見 聡美（生理研）

(4) 運動皮質—視床下核投射選択的破壊による運動の障害

瀬藤 大輔（京大・霊長研）

(5) delay-discounting に基づいた行動課題におけるラットの衝動的選択行動の分子生物学的基盤

林崎 誠二（東京都神経研）

(6) 脳幹—中脳神経回路による報酬予測誤差生成機構

小林 康（大阪大・基礎工）

(7) 線条体のコリン作動性細胞の同定と行動課題における情報表現

井之川 仁（京都府医大）

(8) 両手順序動作課題を用いて明らかになった前補足運動野細胞活動の新たな側面

中島 敏（東北大・医）

(9) 認知と運動を統合する神経基盤

星 英司（玉川大・脳研）

【参加者名】

稲瀬正彦（近畿大学）、丹治順、鮫島和行、星英司（玉川大学 脳科学研究所）、高田昌彦、林崎誠二（東京都神経科学総合研究所）、虫明元、中島敏（東北大学）、磯村宜和、一戸紀孝（理化学研究所 脳科学総合研究センター）、小林康、八十島安伸、岡田研一、篠原祐平（大阪大学）、井之川仁、榎本一紀（京都府立医科大学）、宮地重弘、瀬藤大輔、半田高史、平井大地、鴻池菜保（京都大学霊長類研究所）、小川正（京都大学）、田中真樹、

田代真理、松嶋藻乃（北海道大学）、中村加枝、松崎竜一、中尾和子（関西医科大学）、喜多均（米国テネシー大学）、定金理、廣川純也（基生研）、川口泰雄、南部篤、伊佐正、窪田芳之、畑中伸彦、橘吉寿、知見聡美、佐野裕美、高良沙幸、岩室宏一、高原大輔、金田勝幸、齊藤紀美香、吉田正俊、関和彦、坂谷智也、加藤利佳子、坪井史治、高浦加奈、坂野拓、牛丸弥香、森島美絵子（生理研）

【概要】

大脳基底核は、大脳皮質の広い領域から入力を受け、大脳基底核内で情報処理を受けた後、一部、脳幹に投射するものの、大部分は視床を介して大脳皮質、とくに前頭葉に戻るというループ回路をなしている。大脳基底核内でどのような情報処理が行われているか不明であったし、今でも多くの謎があるが、それでも以下のような様々な研究から、徐々にではあるが着実に明らかになりつつ

ある。

- 1) 主に霊長類を用いた研究から、大脳基底核は、適切な運動あるいは動作様式を選択、実行するのに関わっている。
- 2) また、工学的な手法によって解析したところ、大脳基底核の神経活動や神経回路は適切な行動の自立的な選択・学習に適している。

- 3) 霊長類の基底核回路を解剖学的に解析することにより、大脳基底核が運動機能ばかりでなく、認知機能や情動に関わることが明らかとなってきた。
- 4) 遺伝子改変動物(げっ歯類)を用いることにより、大脳基底核に発現している受容体や神経伝達物質と機能との関係が、個体レベルで調べられるようになった。
- 5) ヒトの大脳基底核疾患や、様々な大脳基底核疾患モデル動物の解析により、このような疾患の病態およびその基礎となる基底核の生理が明らかになりつつある。
- 6) 脳深部刺激療法(DBS)や遺伝子治療など、大脳基底核疾患の新たな治療法も開発されてきた。

このように、神経生理学、神経解剖学はもちろんのこ

と、臨床医学、分子生物学、情報工学的な手法により大脳基底核や、大脳皮質—大脳基底核連関の機能が明らかになりつつある。しかし、それらは個別になされておき、各専門分野を横断的かつ統合的に捉え、相互理解を深める機会が少ない。そこで、本研究会では大脳皮質—大脳基底核連関、前頭葉機能、さらにはその周辺の研究について、広く神経生理学、神経解剖学、臨床医学、分子生物学、情報工学など多岐にわたる専門分野の若手あるいは中堅の研究者が、最新の知見を紹介し、各分野における研究の趨勢、問題点、及び今後の展開に関する忌憚のない意見を活発に交換したい。

(1) 非錐体細胞の樹状突起の計算特性 —形態的な考察—

窪田 芳之 (生理学研究所)

皮質の代表的な4種類の非錐体細胞(FS basket cell, Martinotti (MA) cell, double bouquet (DB) cell, large basket (LA) cell)の樹状突起の形態特性を検討した。ラットの大脳皮質を使った電気生理スライス実験で単一の非錐体細胞の生理的な特性を抽出した後、染色し、NeuroLucidaで3次元的に樹状突起を再構築した。そして、電子顕微鏡観察によりその樹状突起を再構築し、その形態を詳細に測定した。その結果、まず、樹状突起へのシナプス入力、細胞体近傍の50-100 μm あたりまでは密度が低かったが、それより遠位部は一定の密度である事がわかった。また、サブタイプにより、密度は異なっており、FS細胞とMA細胞の樹状突起上のシナプス密度が他の2種類よりも2~3倍程高かった。また、GABA postembedding免疫組織化学法を使って、GABA陽性シナプスの密度を見たところ、樹状突起の位置や細胞のサブタイプに関係なく、ほぼ一定の入力密度を示したため、上述のサブタイプによるシナプス密度の違いは、興奮性のシナプスの入力密度の違いを反映している事がわかった。次に、樹状突起の太さに関する解析を行った。樹状突起の太さは、細胞体からの距離には相関せず、むしろその部分から遠位部の樹状突起の総延長に相関して太さが決まる事がわかった。また、樹状突起の分岐部分の前後でその形状を

測定したところ、下記の2つの法則が同時に成立する事がわかった。(1)親樹状突起の断面積は2つの娘樹状突起の断面積の和に等しい。(2)Rall model(親樹状突起のインピーダンスは2つの娘樹状突起のインピーダンスの和に等しいという法則)が成立する。即ち、親樹状突起のインピーダンスは2つの娘樹状突起のインピーダンスの和に等しいという事である。

神経細胞シミュレーションソフト「Neuron」を使って、測定した形態に忠実に、上記の4つの非錐体細胞を再構築し、epspの伝搬特性に関してシミュレーションを行った。その結果、シナプスが細胞体から200 μm 以上離れている樹状突起上にある場合は、どの分岐にあったとしても、細胞体で観察されるepsp反応のピークはほぼ一定であった。また、シナプスが細胞体から200 μm 以内に存在する場合は、細胞体で観察されるepsp反応は、遠方のシナプスと比較して2倍-3倍以下である事がわかった。

以上の結果は、神経細胞の基本的な樹状突起の特性を示すものであり、シナプス信号の統合を理解する上で重要な情報であると考えている。

(2) 傍細胞記録法によるラット運動野ニューロンの機能的および形態学的同定

磯村 宜和 (理化学研究所 脳科学総合研究センター 脳回路機能理論研究チーム)

金属微小電極をもちいた従来の単一ユニット記録法はさまざまな機能に関連する脳領域を特定することに大きな威力を発揮したものの、記録した神経細胞のサブタイプの同定をおこなうことは不可能に近かった。そのため一次運動野でさえ各層の錐体細胞や介在細胞が実際にどのような機能的役割を担っているのかほとんど解明されていない。一方、近年になって単一ユニット活動を記録し詳細な細胞形態も観察できる傍細胞記録法 *juxtacellular recording* や、同時に多数の神経細胞からユニット活動を記録できるマルチユニット記録法 *multiunit recording* が開発・改良されつつある。

そこで我々は、運動の実行を必要とする課題を訓練したラットにこれらの新しい記録技術を適用し、運動の発現に関与する大脳皮質の錐体細胞と介在細胞を機能的かつ形態的に同定して、運動機能を担う大脳皮質内の局所神経回路を詳細に解明することを目指してきた。まず、頭部を脳定位固定装置に固定した複数の被検ラットに単純なレバー押し課題の訓練を効率よく施す「脳定位固定オペラント訓練装置」を独自開発し、訓練完了ラットを毎週2頭の割合で記録実験に安定して供給する体制を確立した。このような被検ラットをもちいて、運動野の前

肢領域から傍細胞記録法により課題に関連した単一細胞活動を記録し、同時にテトロド電極やシリコンプローブをもちいたマルチユニット記録法により近傍にある複数の細胞活動を記録した。傍細胞記録中にパイオサイチンやニューロピオチンを電気浸透的に負荷した記録細胞は、灌流固定後に介在細胞マーカーであるパルバルブミンやカルレチニンとの蛍光三重染色を施し、次いでABC-DAB法により細胞形態を再構築した。

現在、約45頭の課題遂行ラットから運動関連活動を示して可視化同定された神経細胞を20細胞ほど得ている。このなかには、バースト発火を示す第3層錐体細胞、レバー動作時に発火活動が低下する第4層星状錐体細胞、レバー保持期間にのみ発火する第5層錐体細胞などの興味深い興奮性神経細胞が含まれる。また、パルバルブミン陽性で高い発火活動を示す(FS)介在細胞もいくつか同定され、そのすべてがレバー動作時に発火活動が上昇した。このように、本研究において開発された「慢性傍細胞記録法」は、行動に関連する神経細胞の各サブタイプの機能を直接的に調べることができる非常に有用な研究アプローチであるといえる。

(3) 覚醒下モデルマウスからニューロン活動を記録し、ジストニアの病態を解明する

知見 聡美 (生理学研究所 生体システム研究部門)

ジストニアは、持続性または反復性の筋収縮により、体幹、四肢の異常姿勢や異常運動を示す神経疾患である。病態を解明するためには、疾患モデル動物を解析することが非常に有効な手段であるが、これまで適当なモデルが存在しなかったことから、正確な病態については不明である。しかしながら、近年、数種類のマウスがジストニアのモデルとして提唱されている。私達は、麻酔の影響を排除して覚醒条件下でマウスのニューロン活動を記録、解析するシステムを、これらのモデルマウスに用いることにより、ジストニアの病態を解明することを目指している。これまでに2種類のモデルマウスについて解

析を行ったので、その結果について報告する。

1) *Wriggle Mouse Sagami* : 形質膜カルシウムポンプ2型(PMCA2)の点変異を持ち、体幹・四肢の筋緊張の亢進と不随意運動を示すミュータントマウスである。淡蒼球外節・内節、黒質網様部の自発発火頻度、および発火パターンは正常であった。一方、小脳プルキンエ細胞では、自発発火頻度、特に単純スパイクの発火頻度が著しく低下していることがわかった。これまでに小脳由来のジストニアモデル動物が数多く報告されていることから、ヒトにおいても小脳由来のジストニアが存在するかもしれない。

2) DYT1 変異マウス：ヒト早期発症全身性ジストニアの原因遺伝子である DYT1 変異遺伝子を組み込むことによって作製されたトランスジェニックマウス (Shashidharan et al. Hum Mol Genet 2005, 14: 125-33) であり, hyperactivity などの異常行動や, 筋の持続収縮などの異常運動を示す。淡蒼球外節・内節および黒質網様部ニ

ューロンの活動を調べたところ, 自発発火頻度が著しく低下しており, 長い活動休止期間を持つ異常な発火パターンが観られた。また, 大脳皮質運動野の刺激に対しても異常な応答パターンを示すことがわかり, これらがジストニア症状の出現に関与していることが示唆された。

(4) 運動皮質－視床下核投射選択的破壊による運動の障害

額 額 大輔 (京都大学 霊長類研究所 行動発現分野)

運動の発現は大脳皮質の運動野からの脊髄への神経線維, すなわち錐体路が司る。この系を多くの神経回路が制御し, 微妙な, あるいはダイナミックな動きを可能にしている。こうした神経回路の1つに皮質－大脳基底核－視床ループがある。このループ中の基底核内には (皮質からの入力→) 線条体→淡蒼球内節 (→視床への出力) へと繋がる「直接路」と, 間に淡蒼球外節 (GPe) と視床下核 (Stn) を介し, 線条体→GPe→Stn→淡蒼球内節 (GPi) へと繋がる「間接路」, そして皮質から直接に Stn へ入力し, Stn→GPi へと繋がる「ハイパー直接路」の3つの神経連絡路が存在している。これまで大脳基底核が運動制御に果たす役割を考える場合には主に「直接路」と「間接路」について論じられてきたが, 近年「ハイパー直接路」が重要な役割を担っていることを示唆する報告が為されて来ている。「ハイパー直接路」はその生理学的データから, 運動が発現する前に運動野内の不必要なニューロンの活動を抑制する役割があることが推測されてる。しかし行動レベルで「ハイパー直接路」の機能を示した研究はない。そこで本研究ではマウスの運動皮質→Stn 投射を選択的に破壊することで大脳基底核内の3経路のうち「ハイパー直接路」だけを遮断し, 生理学的, 行動学的なレベルでの変化を調べた。

まず運動皮質→Stn 投射を破壊したマウスの GPe で皮

質電気刺激に対する細胞活動を記録した。正常なマウスの GPe は皮質刺激に対して早い興奮－抑制－遅い興奮の三相性の反応を示す。しかし皮質→Stn 破壊マウスでは早い興奮だけが抑えられた, これは早い興奮は「ハイパー直接路」由来だとするこれまでのデータと一致した。また運動皮質→線条体破壊マウスでも細胞活動を記録したが, この場合は三相性反応のうち抑制の程度が小さくなった。これは皮質→線条体破壊によって「間接路」が遮断され, 線条体から GPe への抑制性の入力が無くなったことによるものと考えられる。

更に運動皮質→Stn 破壊マウスの運動量の測定を行った。その結果, 皮質→Stn 破壊マウスでは正常マウスに比べて運動量が増加していた。これは皮質→Stn 投射を破壊したことでまず大脳基底核の出力部である GPi の活動が弱まり, GPi から視床への抑制性の出力の程度が小さくなり, 視床の活動が強くなったと考えられ。続いて視床から皮質への興奮性の出力が大きくなり, 結果として運動皮質の活動を増強することによるものと考えられる。これは細胞活動のデータとも一致する。

以上の結果は「ハイパー直接路」が運動皮質の不必要なニューロン活動を抑制する役割を持つという考えを支持するものと思われる。

(5) delay-discounting に基づいた行動課題におけるラットの衝動的選択行動の分子生物学的基盤

林崎 誠二, 今西 美知子, 高田 昌彦 (東京都神経科学総合研究所 統合生理部門)

実験動物にレバー押し等の操作をさせることは

instrumental behavior (道具的行動) と呼ばれ, これを報

報酬獲得と組み合わせた実験系は自然界に生きる多くの動物達にとって基本的かつ必須の行動である捕食を模倣している。自然界では実際には道具的行動による働きかけから報酬の獲得までに遅延がある場合も多く、この遅延がある程度長い場合は道具的行動が見送られることもあると考えられる。このことは実験動物によってすでに確認されている。これは道具的行動後の待ち時間が長くなると結果として得られる報酬の価値が減少するため、この現象は **delay-discounting** と呼ばれる。健常な被験者は **delay-discounting** に抗した自己制御的行動をとることができるが、注意欠損多動性障害 (ADHD) を抱える被験者は **delay-discounting** に強く支配されることが知られるためこの現象が注目を集めるようになった。近年になって **delay-discounting** を用いた実験系が衝動性の計測法として提案されている。これは **delay-discounting** と報酬の大きさという二つの要素を組み合わせることによって動物に選択の判断をさせるというものである。この系にお

いて研究がなされた結果、いくつかの脳内の責任領域のうち、大脳基底核の側座核の **core** と呼ばれる領域が重要な役割を果たしていることが判ってきた。一方で薬物の全身投与によってドーパミンが非常に重要な役割を担っているものの一つであることも判っている。側座核の **core** にはドーパミンニューロンが多く投射しているのでそこでのドーパミンの作用が重要であると予想されるが、これまでに検証がなされてこなかった。そこで本研究ではこの仮説を検証した。ドーパミンはその受容体によって活性がネットワークの次の部分に伝達されるわけであるが、ここですべてのドーパミン受容体が代謝型であることを考慮するとセカンドメッセンジャーが情報伝達の担い手であることは明らかである。そこで我々はセカンドメッセンジャーとそれに連なるシグナル伝達因子の阻害剤を用いて衝動性選択行動の分子的基盤を探った。

(6) 脳幹—中脳神経回路による報酬予測誤差生成機構

小林 康 (大阪大学大学院 生命機能研究科)

近年、報酬に基づく強化学習の神経生理学的研究の発展には神経科学のみならず、自律的に行動するロボットの開発、脳科学に基づく新しい経済学理論の創発等に対して非常に強力なインパクトを与えるという期待の強まりから、広い分野から注目が集まっている。

中脳の黒質緻密部や腹側被蓋野のドーパミン細胞 (DAcell) は報酬との連合で学習された手がかり刺激や与えられた報酬に対して **phasic** なバースト応答をすることによって大脳基底核などに報酬予測誤差信号 (報酬に対する予測と現実で得られた報酬の差) を送り、強化学習におけるシナプス可塑性を制御していると考えられている。DAcell において報酬予測誤差がどうやって計算されるか (誤差の計算過程) ということは学習計算アルゴリズムを含めた強化学習機構を解明する上で最も重要な問題の一つであると思われる。DAcell はドーパミン放出によるシナプス可塑性の制御という形で強化学習に重要な役割を果たしており、さまざまな部位から興奮性、抑制性入力を受けているということが明らかになってきたが、DAcell に対する入力信号の性質が明らかにされてい

ないために、いまだに報酬予測誤差の計算過程がわかっていない。さらに、DAcell に対して興奮性入力がないと DAcell はバースト応答をすることが困難であるため、とりわけ DAcell に対する興奮性入力の重要性が浮かび上がってくる。

脚橋被蓋核 (PPTN) は脳幹のもっとも主要なアセチルコリン性細胞の核であり、古くから睡眠覚醒の調節、運動制御、注意や学習と関係が深いと考えられてきた。また、DAcell に対して PPTN が最も強力な興奮性入力を供給していることから PPTN からの興奮性入力が、DAcell における報酬予測誤差信号の生成に重要な役割を果たしていることが示唆される。

本研究ではサルに手がかり刺激で報酬量を予測させるような視覚誘導性サッカー課題を行わせ、PPTN のニューロン活動を記録し、報酬予測誤差に対する PPTN のニューロン活動の寄与を調べた。

報酬予測サッカー課題中のサル PPTN ニューロンの活動を記録すると、PPTN の独立したニューロン群で、1) 報酬予測の度合いによって大きさが変わる、手がかり

刺激呈示から始まり、報酬後まで続く持続的応答、2) 報酬予測の度合いに無関係で一時的な報酬に対する直接の反応がみられるという実験結果が得られた。そして、1) の活動が「報酬予測信号」で2) の活動が「実報酬信号」であるということを経験報酬逆転実験、ROC、相互情報量、多変量解析によって多面的に検証した。これらの解析より、PPTN のニューロン活動が「報酬の予測」と「実際に与えられた報酬」の両方の情報に関与することが明

らかになった。さらに、PPTN で見られた持続的な報酬予測信号は報酬予測誤差計算に必要な「報酬予測のワーキングメモリー」であり、PPTN の実報酬信号を組み合わせると PPTN のニューロン活動で報酬予測信号が計算できることが示唆される。

以上の結果から、報酬予測誤差信号計算、あるいは DAccl に対する報酬予測信号、実報酬信号の最終共通路としての PPTN の重要性が確かめられた。

(7) 線条体のコリン作動性細胞の同定と行動課題における情報表現

井之川 仁, 山田 洋, 松本 直幸, 榎本 一紀, 木村 實
(京都府立医科大学 生理学教室 神経生理学部門)

大脳基底核線条体には電気生理学的に同定される相同的放電型細胞(Phasically Active Neuron, PAN) と持続放電型細胞 (Tonically Active Neuron, TAN) があり, PAN は淡蒼球や黒質への投射細胞, TAN はコリン作動性の介在細胞であると考えられている。更に TAN にはほぼ一定で規則的な放電間隔を持つものと、間隔の長い放電と短い放電パターンを持つものがあることが知られている。これまでに、ラット脳切片標本を用いて持続放電型の細胞がアセチルコリン含有の、大型で樹状突起に棘のない細胞であることが示されているが、in vivo で PAN と TAN を記録し、TAN がアセチルコリン含有細胞であることを直接証明する研究はなされていない。我々は、in vivo で記録される TAN の形態的特長、アセチルコリン含有の有無を明らかにし、さらに、動機づけや学習、行動選択などの行動課題における TAN の機能的役割を明らかにすることを試みた。

Juxtacellular labeling 方法を用い麻酔下ラットの線条体から持続放電神経細胞を記録し、ChAT 染色により同細胞が Ach 含有細胞であることを明らかにした。また持続放電パターンはサル線条体で見られる TAN とよく似た性質を持っており、TAN がコリン作動性であることをより強固に支持する結果を得た。サル線条体 TAN は、報酬や行動結果に重要な意味をもつ感覚刺激に対して一過性の抑制応答を示し、応答は報酬との連合学習により獲得されドーパミン依存性がある。また、報酬関連のみならず行動文脈に依存した応答性を持つ。さらに、報酬・報酬の予測誤差や動機付けの信号を線条体に送るとされ

るドーパミン細胞 (DAN) と同調した応答を示すが TAN 応答は予測誤差を反映しないといった性質が明らかになってきている。これらの結果は TAN が DAN と協調して働く、報酬に基づく学習信号の一端を担うことを示唆している。

報酬に基づく行動選択の学習における TAN の役割を調べるため、3 個のボタンの中から試行錯誤しながら 1 つの正解ボタンを探し、正解発見後にはもう一度同じボタンが正解となる課題を行わせた。TAN は課題開始を知らせる LED の点灯と強化信号 (ブープ音) に対して選択的応答した。負の強化信号に対しては一過性の抑制が主であったが、正の強化信号に対しては一過性の興奮応答を示しており、正負の強化信号を応答の時間的パターンにより区別していた。正の強化信号に対して、試行錯誤期には強く応答したが繰り返し期では非常に弱い応答であった。この応答は 2 個のボタンから正解を探す 2 択課題から 3 択課題に変えた初期には増強した。また、2 択の繰り返し期ではほとんど応答しなかったにもかかわらず、3 択の繰り返し期では応答するようになりこの応答は学習経過に伴い減弱した。行動開始を知らせる LED に対する応答は試行錯誤期でも繰り返し期でも同様に応答していた。

これらの結果は、報酬に基づく行動選択の学習において強化信号に特異的な TAN の役割を示唆する。また TAN がアセチルコリンを介した強化信号の調節作用を考えさせるものである。さらに同じ課題を用いて記録された DAN の活動と比較して考察する。

(8) 両手順序動作課題を用いて明らかになった前補足運動野細胞活動の新たな側面

中島 敏¹, 保坂 亮介², 丹治 順³, 虫明 元¹

(¹ 東北大・院・医・生体システム生理学分野, ² 科学技術振興機構・ERATO・合原プロジェクト,

³ 玉川大・脳科学研究所・脳科学研究施設)

我々が行動を行って目的を達するためには、いくつかの動作を時間的に正しい順序で遂行することが求められる。さらに、複数の効果器を用いる（例えば左右の手）場合には、これらを適切に組み合わせて使うことが必要である。これまでの研究から、前補足運動野 (Pre-SMA)、補足運動野 (SMA) が順序動作の遂行に重要な役割を果たしていることが明らかにされているが、順序動作が両手で行われたときの Pre-SMA, SMA の細胞活動の詳細は明らかにされていなかった。

そこで我々は、両手順序動作遂行中における Pre-SMA, SMA の細胞活動を比較するため、ニホンザル 2 頭を訓練し、両手順序動作課題を行わせた。課題は 9 試行を 1 ブロックとする単位で構成され、同一のブロック内では、1 種類の順序動作が連続して行われた。ブロックの最初の 3 試行では、行うべき順序動作が視覚信号を用いて指示され、残りの 6 試行では、直前に行った順序動作を記憶に基づいて行うことが求められた。1 回の試行の中では、右腕あるいは左腕の回内、もしくは回外を含む 2 回の動作が、遅延期間をはさんで行われた。課題全体で行われた順序動作は、合計 16 通りであった。

課題遂行中のサルの Pre-SMA, SMA から細胞活動を記録し、両手順序動作を記憶に基づいて行っているときの、1 番目の動作実行直前の細胞活動を解析した。

はじめに、直後 (1 番目) に行う動作、2 番目に行う動作それぞれが細胞活動に及ぼす影響を調べた結果、1 番目の動作開始前に、すでに 2 番目の動作に選択性を持つ細胞活動が Pre-SMA, SMA で多数記録された。このような細胞集団について更に解析を行うと、2 番目の動作のみに選択的な細胞の割合は Pre-SMA で有意に高かった。また、Pre-SMA では、2 番目の動作選択的な細胞活動は、実際に 2 番目の動作を実行する直前には減衰する傾向であった。

次に、直後の動作で用いる腕 (右腕か左腕) と、行う運動の種類、それぞれが細胞活動に及ぼす影響を比較検討した。ここで、運動の種類は、対称座標系 (回内・回外)、平行座標系 (右回し・左回し) の 2 通りで定義できる。Pre-SMA においては、使用する腕によらず、行う運動の種類を対称座標系で表現したと考えられる細胞活動が多数記録されたのに対し、SMA ではこのような細胞は少数であった。

以上の知見より、両手順序動作課題遂行中において、Pre-SMA では、①2 番目に行う動作に関連する情報が、1 番目の動作実行前に表現されていることが明らかになり、②運動の種類が、効果器に関わらず、主に対称座標系でカテゴリー化されていることが示唆された。

(9) 認知と運動を統合する神経基盤

星 英司 (玉川大学 脳科学研究所)

視覚認知情報を動作制御情報に変換する神経基盤を解明すること目標に一連の研究を行ってきた。特に、構造的側面と機能的側面に注目して解析を行ってきたが、大変興味深い知見が得られつつあるので、本研究会で紹介したい。

神経解剖学的研究は、下側頭皮質から運動前野に至る経路を解明することを目標に行われた。まず、運動前野に逆行性に運搬される蛍光物質を注入して、この部位へ

直接投射する細胞の分布を解析した。その結果、前頭葉の内側部と背側部に、標識された細胞が多数見出された。しかし、下側頭皮質や前頭前野の腹側部には標識された細胞は見出されなかった。この知見を踏まえた上で、狂犬病ウイルスをトレーサーとして実験を行った。このウイルスは軸索終末から取り込まれて逆行性に運搬されるが、シナプスを越えてシナプス前細胞に運搬される特徴がある。また、ウイルス注入後の生存期間を調節するこ

とによって、シナプスを越える回数を調節することができる。運動前野にウイルスを注入した後に、一段階の経シナプス性の伝搬を許したところ、前頭前野の腹側部に標識された細胞集団が現れた。しかし、この段階でも下側頭皮質には標識された細胞は殆ど見られなかった。そこで、生存時間を延ばし、二段階の経シナプス性の伝搬を許したところ、下側頭皮質に標識された細胞の集団が現れた。また、この部位は前頭前野の腹側部に投射することが示されている領野に相当していた。総合すると、下側頭皮質は、前頭前野の腹側部を経由して運動前野に経シナプス性の投射を送っていることが示唆された。

神経生理学的研究では、視覚認知情報に基づいて動作制御をする行動課題を遂行している被験体の前頭葉の領域から神経細胞活動を記録した。Apraxia という病態では、概念的な指示を言葉で与えられると、これに従って正確な動作を行うことが難しくなることが分かっている。そこで、認知と動作の橋渡しをする重要な要素として「動作概念」があるという作業仮説を設定して、この

要素も詳細に検討できる課題を設定した。従って、視覚認知動作概念動作の準備実行という一連の情報変換過程を細胞活動レベルで検討することが可能であった。運動前野から記録された細胞活動を解析したところ、視覚認知情報は殆ど反映されていない一方で、動作概念や動作の準備・実行の過程が強く反映されていることが明らかとなった。加えて、動作概念や動作自体を反映する細胞活動は数100msという短潜時で始まること、細胞活動全体で動作概念から動作自体への情報変換過程が反映されていることが明らかとなった。以上の結果は、運動前野が視覚認知情報に基づいて生成された動作概念情報を受け取り、これを動作制御情報に変換していることを示唆した。

二つの手法で得られた結果を総合すると、下側頭皮質から前頭前野を経由して運動前野に至る経路があり、このネットワークが視覚認知情報に基づく動作の発現過程において重要な役割を果たしていることが示唆される。

11. シナプスの形成と成熟の分子機構：細胞外環境と形態変化

2007年12月6日－12月7日

代表・世話人：竹居光太郎（横浜市立大学大学院・医学研究科・分子薬理神経生物学教室）

所内対応者：重本隆一（自然科学研究機構・生理学研究所・脳形態解析研究部門）

- (1) 樹状突起スパインの形態と可塑性を担うアクチン線維構築
本蔵直樹（東京大学大学院・医学系研究科・疾患生命工学センター）
- (2) 細胞接着を介したシナプス誘導過程の生体内可視化
高坂洋史（東京大学大学院・理学系研究科・物理学専攻）
- (3) イオンチャネル型神経伝達物質受容体のシナプス上分布
深澤有吾（自然科学研究機構・生理学研究所・脳形態解析研究部門）
- (4) 小脳シナプス可塑性におけるシグナル伝達の計算機シミュレーション
土居智和（大阪バイオサイエンス研究所・システムズ生物学部門）
- (5) スパイクタイミング依存シナプス可塑性のタイミング検知メカニズム
浦久保秀俊（東京大学大学院・理学系研究科・生物化学専攻）
- (6) シグナル伝達の拡散と局所性を利用したシナプス可塑性
作村諭一（奈良先端科学技術大学院大学・情報科学研究科）
- (7) イオンチャネル型グルタミン酸受容体と会合分子群のパルミトイル化による制御
林崇（ジョンスホプキンス大学・医学部・神経科学教室）
- (8) AP-4によるAMPA受容体の細胞内輸送制御
松田信爾（慶應義塾大学・医学部・生理学教室）
- (9) 社会的隔離による経験依存的AMPA受容体シナプス移行阻害
宮崎智之（横浜市立大学大学院・医学研究科・生理学教室）

【参加者名】

竹居光太郎（横浜市大院・医）、重本隆一（生理研・脳形態解析）、北西卓磨（東大院・薬）、山田麻紀（東大院・薬）、山肩葉子（生理研・神経シグナル）、浦久保秀俊（東大院・理）、林崇（ジョンスホプキンス大・神経科学）、宮田麻理子（生理研・神経シグナル）、白尾智明（群馬大院・医）、児島伸彦（群馬大院・医）、竹田麗子（群馬大院・医）、土居智和（大阪バイオサイエンス研・システムズ生物）、井上英二（株カン研・シナプス形成）、宮澤淳夫（理研・放射光センター）、福永 優子（理研・放射光センター）、本蔵直樹（東大院・疾患生命センター）、柚崎通介（慶大・医）、松田信爾（慶大・医）、中野高志（奈良先端大院・情報科学）、真鍋 俊也（東大・医科研）、関野祐子（東大・医科研）、渡部文子（東大・医科研）、井ノ口馨（三菱化学・生命研）、大久保-鈴木玲子（三菱化学・生命研）、鈴木由有也（富山大・工）、高橋琢哉（横浜市大院・医）、高瀬堅吉（横浜市大院・医）、実木亨（横浜市大院・医）、宮崎智之（横浜市大院・医）、重本和宏

（東京都老人研・老化ゲノム）、石川幸雄（株エーザイ・創薬研）、畠中謙（株エーザイ・創薬研）、池谷真澄（横浜市大院・医）、山下直也（横浜市大院・医）、丸尾知彦（東大院・医）、田中慎二（東大院・医）、申義庚（東大院・医）、佐藤 映美（東大院・医）、多田敬典（横浜市大院・医）、深澤有吾（生理研・脳形態解析）、釜澤尚美（生理研・脳形態解析）、作村諭一（奈良先端大院・情報科学）、尾藤晴彦（東大院・医）、玉巻伸章（熊本大院・医薬）、松下正之（三菱化学・生命研）、久保義弘（生理研・神経機能素子）、石井裕（生理研・神経機能素子）、武井延之（新潟大・脳研）、丸山拓郎（阪大院・生命機能）、能瀬聡直（東大院・新領域創成）、高坂洋史（東大院・理）、福井愛（東大院・理）、岡田大助（三菱化学・生命研）、大塚稔久（富山大院・医）、所崇（富山大院・医）、林謙介（上智大・理工）、西野有里（理研・放射光センター）、山口和彦（理研・脳センター）、上窪裕二（阪大院・医）、崎村建司（新潟大・脳研）、西川光一（群馬大院・医）、

山崎真弥 (新潟大・脳研), 谷村あさみ (阪大院・医),
西村陽 (京府医大・医), 川上良介 (生理研・脳形態解析),

他

【概要】

学習、記憶、情動などの脳の高次機能は、複雑緻密な神経回路網の活動によって成され、その基盤を成す基本ユニットが”シナプス“である。シナプスは、外界環境や経験によりその構造と機能を変化させる可塑性を有する。発生・発達期と成熟期におけるシナプス形成と可塑性の分子機序を明らかにすることは、現代の神経科学における最重要課題の一つである。更に、この課題における科学研究は、基礎研究としての貢献のみならず、神経変性疾患などの神経系の病態発症機構の理解にも大きく貢献する。

本研究会では、シナプス分子集積動態や AMPA 受容体のトラフィッキングといったシナプスにおける分子動態と形態・機能の関連性に焦点を絞ったテーマで討議した [樹状突起スパインの形態変化 (本蔵), 神経筋接合部での接着分子動態 (高坂), シナプスにおける受容体密度と機能の関係 (深澤), AMPA 受容体のパルミトイル化に

よる分子会合 (林), 樹状突起特異的な AMPA 受容体の輸送機構 (松田), 経験依存的な AMPA 受容体の膜移行機構 (宮崎)]。これらの報告を通し、分子の集積・会合・膜移行などを経て機能変化へと転換されるシナプス機能のダイナミズムに関する理解を深めることができ、非常に意義深いものであった。一方、新たな視点からシナプス研究を見つめる一環としてシステムズバイオロジーの話題を取り上げた [小脳 LTD における Ca^{2+} 濃度変化 (土居), スパイクタイミング検知機構 (浦久保), Ca^{2+} の局所的濃度変化と機能連関 (作村)]。これらの報告は、実験科学とのタイアップによって成されたシミュレーション結果に基づく考察で、新たな実験デザインを提唱したり、予期させたりするものであった。その他、16 演題から成るポスターセッションを行い、参加者の投票によって選出された上窪裕二氏 (阪大院・医) と山口和彦氏 (理研・脳センター) の口頭発表が行われた。

(1) 樹状突起スパインの形態と可塑性を担うアクチン線維構築

本蔵直樹 (東京大学大学院・医学系研究科・疾患生命工学センター)

大脳皮質において、興奮性シナプスの多くは樹状突起スパイン上に形成され、またその形態は非常に多様である。近年、スパイン頭部構造の大きさと機能的なグルタミン酸受容体の発現量が相関すること、長期増強 (LTP) に際してはスパイン頭部の体積増大が生じること、これら現象がアクチン線維に依存していることが示されている。スパインにはアクチン線維 (F-actin) が多く存在し、他の細胞骨格タンパク質はほぼ皆無であることから、

F-actin が主要な細胞骨格と考えられている。しかし、これまでの研究では単一スパイン内での F-actin の構築、即ちその配列や動態は未知であった。そこで我々は、スパインに存在するアクチン線維構築を調べ、異なる三種の性質を持つアクチン線維群を発見した。これらのアクチン線維群を調べた結果、F-actin 動態がスパインの形態、安定性、構造可塑性を担うと、推察される結果を得た。

(2) 細胞接着を介したシナプス誘導過程の生体内可視化

高坂洋史 (東京大学大学院・理学系研究科・物理学専攻)

シナプス形成過程における細胞接着の役割を明らかにするために、ショウジョウバエ胚の神経筋結合をモデ

ル系として、生体内でのシナプス可視化を行なった。シナプス前膜と後膜の両方に存在する細胞接着分子ファシ

クリン 2 (Fas2)に着目して、シナプス後細胞上の Fas2-GFP のシナプス形成過程における挙動を解析した。シナプス後膜部への Fas2 の集積には、軸索上の細胞接着分子 Fas2 との細胞外相互作用が必要であることが分かった。蛍光消光回復法を用いた解析により、神経支配に伴って後シナプス部の Fas2 の可動性が低下することが

明らかになった。また fas2 欠失胚では、足場タンパク質や神経伝達物質受容体の後シナプス部への集積が低下した。以上の結果は、生体内において細胞接着分子 Fas2 の経シナプスの相互作用による集積が、後シナプス部への分子局在を誘導することを示唆する。

(3) 神経伝達物質受容体のシナプス上分布

深澤有吾（自然科学研究機構・生理学研究所・脳形態解析研究部門）

神経伝達物質受容体及び関連分子の細胞膜上局在を 2 次元的且つ定量的に解析することが出来る、凍結割断レプリカ標識法を用いて行ってきた。これまでにグルタミン酸受容体として、NMDA 型、AMPA 型グルタミン酸受容体、グループ I 代謝型グルタミン酸受容体、GABA 受容体として GABA_A 受容体の局在を幾つかの脳領域で解

析を行い、それぞれの受容体がシナプス結合の種類に応じて特徴的な局在様式をとることが明らかになってきた。そこでこれらを概説し、受容体局在の調節機構について考察する。またシナプス内 AMPA 受容体局在の差異がシナプス伝達特性にどの様に影響するかについて解析したので報告する。

(4) 小脳シナプス可塑性におけるシグナル伝達の計算機シミュレーション

土居智和（大阪バイオサイエンス研究所・システムズ生物学部門）

小脳 LTD シグナル伝達経路を生化学方程式に基づいて計算機シミュレーションを試み、以下の 2 つの小脳 LTD の現象を再現・説明した。小脳プルキンエ細胞は平行線維と登上線維から入力を受けている。平行線維入力の後に登上線維という入力順序で、プルキンエ細胞スパインの Ca²⁺濃度が著しく上昇し、LTD が誘導される。シミュレーションにより、平行線維入力下流の代謝系経路に時間遅れがあり、細胞内 Ca²⁺ストア上の IP3 受容体が、

平行線維入力による IP3 産生と登上線維入力による Ca²⁺流入の同時性を検出しうることを示した。また、共同研究により、ケージド Ca²⁺光分解と小脳 LTD 誘導のシグモイド状の定量的関係を、シミュレーションで再現した。シグモイドの関係は PKC と MAPK の正のフィードバックループが影響していることを実験とシミュレーションの両方から明らかにした。

(5) スパイクタイミング依存シナプス可塑性のタイミング検知メカニズム

浦久保秀俊（東京大学大学院・理学系研究科・生物化学専攻）

スパイクタイミング依存シナプス可塑性 (STDP: Spike-timing-dependent synaptic plasticity) は脳の記憶や学習に重要な役割を果たしている。しかし、STDP のスパイクタイミング検知メカニズムには未だ謎の部分が多

い。そこで、我々は Froemke and Dan (Nature 416, pp 433, 2002) および Froemke et al. (Nature 434, pp 221, 2005) をもとに詳細なシミュレーションモデルを構築し、スパイクタイミング検知メカニズムを検討した。その結果、

NMDA 受容体の新規なアロステリック効果を仮定すると、複雑なタイミング発火による可塑性における実験結果を全て説明でき、また NMDA 受容体性 EPSP に見られる抑圧を説明することができることが分かった。これ

らの発見は NMDA 受容体の単純なアロステリック効果が、脳のスパイク活動を長期可塑性へコードするカギとなっている可能性を示唆する。

(6) シグナル伝達の拡散と局所性を利用したシナプス可塑性

作村諭一 (奈良先端科学技術大学院大学・情報科学研究科)

海馬シナプスの LTP/LTD が、情報の送り手側の状態、つまりシナプス前神経の活動に依存的であることは良く知られている。近年の研究では、情報の受け手側の都合、つまりシナプス後神経の NMDA 受容体のサブタイプに依存することも分かってきた。後者の機能について、NMDA 受容体の下流の分子シグナルを想定することができるが、果たして新しく発見された機能に対して必ずしも新しいシグナル経路が必要なのだろうか。本研究で

は、上記の可塑性が新たなシグナル経路を用いることなく説明できる可能性を計算機実験により調査した。主に導入した仮定は、シナプス後膜直下のタンパク質高密度領域では分子拡散が抑制されるため、シグナル伝達に局所性が発生するというものである。我々の結果は、既知のシグナル経路だけでも上記の可塑性(送り手依存, 受け手依存)が両立して説明できることを示す。

(7) イオンチャンネル型グルタミン酸受容体と会合分子群のパルミトイル化による制御

林崇 (ジョンズホプキンス大学・医学部・神経科学教室)

グルタミン酸は、哺乳類の中樞神経系における主要な興奮性の神経伝達物質である。速い興奮性シナプス伝達を担う AMPA 型グルタミン酸受容体の翻訳後修飾による制御は、学習・記憶の分子基盤として重要な役割を果たすと考えられる。我々は、従来知られていたリン酸化による可逆的な制御に加え、AMPA 受容体自体のパルミトイル化により、受容体の局在や膜輸送過程が調節され

ている事を新たに見出した。AMPA 受容体には多くの結合分子が存在し、その内 GRIP1b/2b, PSD-95, PSD-93 等はパルミトイル化修飾を受ける事が知られている。今回、AMPA 受容体を含むグルタミン酸受容体とその会合分子群のパルミトイル化による制御機構に関して、最新の知見を報告する。

(8) AP-4による AMPA 受容体の細胞内輸送制御

松田信爾 (慶應義塾大学・医学部・生理学教室)

神経細胞は、樹状突起と軸索という、機能的・構造的に大きく異なった領域をもった極性細胞である。AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA 受容体) は主に樹状突起にゆそうされ、軸索ではわずかしが存在しないことが知られているが、この極性輸送を制御する分子機構は明らか

かにされていない。我々は小胞輸送に関与するヘテロ 4 両体アダプタータンパク質である Adaptor Protein Complex-4 (AP-4) が Transmembrane AMPA receptor Regulatory Protein (TARP) を介して間接的に AMPA 受容体に結合することを明らかにした。また AP-4 のサブユ

ニットのひとつである AP-4 β のノックアウトマウスの神経細胞では TARP および AMPA 受容体が樹状突起のみならず軸索にも存在していた。これに対して代謝型のグルタミン酸受容体 mGluR1 α や NMDA 受容体は樹状突起にのみ局在していた。さらに AMPA 受容体には結合するが

AP-4 には結合しない変異 TARP を発現させた神経細胞では AMPA 受容体が軸索にも存在するようになった。これらの結果から AP-4 が AMPA 受容体の樹状突起特異的輸送を制御することが示唆された。

(9) 社会的隔離による経験依存的 AMPA 受容体シナプス移行阻害

宮崎智之 (横浜市立大学大学院・医学研究科・生理学教室)

経験依存的な脳の可塑的变化に関わる分子-細胞のメカニズムは未だ不明な点が多い。近年の研究により、AMPA 受容体のシナプスへの移行がシナプス可塑性における重要な分子機構であることが示唆されている。高橋らはラットのバレル皮質において、経験依存的に AMPA 受容体がシナプスへの移行することを示した (Takahashi et al. Science 2003)。そこで我々は、生後の早い段階における社会的隔離が、シナプス可塑性にどのよ

うな影響を及ぼすかを検討した。その結果、社会的隔離はバレル皮質における AMPA 受容体のシナプスへの移行を阻害し、ヒゲによる知覚機能を障害した。また、一連の影響は、ストレスにより副腎皮質から分泌されるグルココルチコイドの作用を阻害することにより改善した。このことは、社会的隔離がグルココルチコイド受容体を介して、脳の可塑的变化に影響を及ぼすことを示唆するものである。

12. 大脳皮質機能単位の神経機構

2007年11月28日-11月29日

代表・世話人：金子武嗣（京都大学大学院・医学研究科）

所内対応者：川口泰雄（大脳神経回路論研究部門）

(1) 外界に適応する感覚系視床

小村豊（産業技術総合研究所 脳神経情報研究部門）

(2) 視覚野細胞の機能推定法：個々の細胞は何を伝えているか？

大澤五住（大阪大学 大学院生命機能研究科 脳神経工学講座視覚神経科学研究室）

(3) 大脳嗅皮質における左右嗅覚入力の切り替え

柏谷英樹（東京大学大学院医学系研究科 機能生物学専攻 細胞分子生理学講座）

(4) 聴覚同時検出の神経回路機構

久場博司（京都大学大学院 生命科学キャリアパス形成ユニット）

(5) 線条体パッチ・マトリックスを巡るネットワークを再検討する

藤山文乃（京都大学大学院 医学研究科 高次脳形態学教室）

【参加者名】

宋文杰（熊本大学・医）、福田孝一（九州大学大学院・医）、大澤五住（大阪大学大学院・生命機能）、齋藤充（大阪大学大学院・歯）、金子武嗣、久場博司、藤山文乃、日置寛之、古田貴寛、中村公一、田中琢真、越水義登、亀田浩司、田中琢真、中村悠（京都大学大学院・医）、青柳富誌生、野村真樹、太田絵一郎、伊賀志朗（京都大学・情報）、松田和郎（滋賀医大・医）、柏谷英樹、吉田郁恵（東京大学大学院・医）、佐々木拓哉、高橋直矢（東京大学大学院・

薬）、小島久幸（東京医科歯科）、山下晶子（日本大学・医）、小村豊（産業技術総合研究所）、一戸紀孝、坪泰宏（理化学研究所）、定金理（基礎生物研究所）、宮田麻理子、伊藤南、井上剛、郷田直一、吉田正俊、平松千尋、足澤悦子、浅川晋宏、川口泰雄、窪田芳之、大塚岳、森島美絵子、重松直樹、関川明生、平井康治、牛丸弥香（生理学研究所）

【概要】

今回は、大脳皮質の話題提供を大澤五住先生（阪大生命機能）、柏谷英樹先生（東大医学系）にお願いし、それぞれ大脳皮質視覚野および嗅皮質の情報処理機構について解説していただいた。前者は初期視覚皮質での線型情報処理と高次皮質野での非線形生強い情報処理の対比をし、そのメカニズムを理論的に解こうという「大脳皮質機能単位の神経機構」に迫る内容であった。後者の嗅皮質の話題は、左右の前嗅皮質が片側の鼻閉により速やかに反対側で代償性の情報処理が始まるメカニズムについての講演であり、新規な現象と前嗅皮質のもつ高い可変性に驚かされた。大脳皮質に直接関わる神経部位として、小村豊先生（産総研）には大脳皮質への入力部位である視床の内側膝状体で、多感覚性の収束的な神経機構が存在して、相互作用を示していることを報告していただき、藤山文乃先生（京大医学）には皮質の主要な出

力部位のひとつである線条体がどのような情報処理をしているかを、とくに線条体のパッチ・マトリックス構造に関係して呈示していただいた。久場博司先生（京大医学）は、大脳皮質とは直接には関係していないが、最近進展著しい分野のトピックとしてトリの脳幹部における音像定位の仕組みを呈示した。

毎回、この研究会の顕著な特徴となっているのが、講演中での活発な議論であり、1時間の講演時間に対して概ね1時間半を超す講演と議論になっていた。とくに今年は若年層の研究者による質問・議論が盛んであり、この研究会では話しを遮って質問して良いのだという姿勢が浸透してきているようであった。こうした「がちんこ」議論は、通常の学会等では行うことができないので、それを可能にする当生理研研究会は貴重な存在である。

(1) 外界に適応する感覚系視床

小村豊（産業技術総合研究所 脳神経情報研究部門）

私たちが難なく感じている外界のリアリティーは、どこで、どのようにして生まれるのでしょうか？ 目や耳などの感覚器は、各感覚器に特化した物理情報を、外界から抽出し、その情報を、視床経路で、大脳に送り込んでいます。このような並列分散処理は、脳の初期知覚系の大きな特徴とされていますが、私たちの知覚像は、切り裂かれていません。これまで、異なる感覚情報を束ねるのは、連合野をはじめとする大脳皮質の役割と考えられてきました。しかし、個々のニューロン活動のふるま

いを観察すると、すでに視床領域において、異種感覚間の相互作用が認められることが、分かってきました。さらに、視床ニューロンは、同じ感覚入力に対して、常に決まりきった応答をするわけではなく、生物が外界の中で置かれている状況に応じて、応答を変化させていることが、明らかになってきました。外界と大脳間をつなぐ視床に出現した、この計算機構が、生物にどのような意義をもたらすのか、議論していきます。

(2) 視覚野細胞の機能推定法：個々の細胞は何を伝えているか？

大澤五住（大阪大学 大学院生命機能研究科 脳神経工学講座視覚神経科学研究室）

脳の機能についてのカジュアルな議論において、私たちはよく「この細胞は何をやっているのだろうか？」という問いを發する。この問いに対する答えを見つけるために、細胞がやっといそうな事の仮説をたて、それをテストするための実験をする。個々のテストは仮説と密接に結びついているため、あるテストからのデータで別の仮説を検証する事は一般には不可能である。例えば、一次視覚野の複雑型細胞の多くは、方位選択性、空間周波数選択性、運動方向とスピードに対する選択性、両眼視差選択性等、種々の機能を持つ。方位選択性のテストに使った実験データから、両眼視差選択性を推定することはできない。このような限界を超える方法はあるだろうか？ 特に、高次視覚領域の細胞については、細胞が何をやっているか、どのような計算を行っているかについ

て簡単に仮説を立てる事は難しいし、多くの個々の仮説についての多数の計測を行う事も、細胞からの記録時間の制限により厳しい上限が存在する。

そこで、私たちは「細胞がやっといそうな事」に関する仮定をできるだけ含まない非常に汎用性の高い視覚刺激による、1回の実験データからできるだけ多くの仮説に対する答えを得るための手法を開発検討している。視覚刺激としては、両眼ダイナミック無相関ノイズを用い、様々な選択性に関する細胞の特性を推定する方法を提案する。細胞の機能に関する仮定はデータの解析過程に挿入されるため、1回の計測データから実験時には思いつかなかった細胞の機能に関する仮説も検証することが可能になる。このような解析を、簡単な実例を示しながら考察する。

(3) 大脳嗅皮質における左右嗅覚入力の切り替え

柏谷英樹（東京大学大学院医学系研究科 機能生物学専攻 細胞分子生理学講座）

左右嗅粘膜は生理的条件下であっても交互に腫脹を繰り返し、腫脹側では鼻腔流量が低下することが知られている。鼻腔流量が低下すると嗅上皮への匂い分子の到

達量が減少し、外界の匂い情報のモニタ能力が低下する。嗅上皮で検出された匂い情報は同側の嗅球、さらに同側の大脳嗅皮質へと伝えられ、同側性に情報処理される。

では、嗅粘膜腫脹時のように片側の匂い入力に遮断されている時、遮断側の脳嗅皮質では匂い情報処理は行われないのだろうか？

本研究では、脳嗅皮質の中でも左右間線維連絡が発達している前嗅核 (Anterior Olfactory Nucleus: AON) に注目し、AON ニューロンの左右鼻腔への匂い刺激に対するスパイク発火応答を調べた。左右鼻腔の分離刺激を行ったところ、およそ 62% の AON ニューロンは左右両側の刺激に応答することが明らかになった。また、同側刺激に対する応答は対側刺激に対する応答より強い傾向が見

られた。

次に、対側刺激に対する AON ニューロンの発火応答の、同側鼻腔閉鎖前後での変化を経時的に調べた。同側鼻腔閉鎖前、AON ニューロンは対側刺激には弱い応答しか示さなかったが、同側鼻腔閉鎖から数分の遅延の後、対側刺激に対する応答は著しく増強した。

これらの結果から、脳嗅皮質では同側性嗅覚系からの入力に遮断されると、対側嗅覚系の感覚入力を短時間で増強し、入力系を切り替えることで外界の匂い情報をモニタしていることが示唆された。

(4) 聴覚同時検出の神経回路機構

久場博司 (京都大学大学院 生命科学キャリアパス形成ユニット)

動物は両耳に到達する音の時間差 (両耳間時間差: ITD) を手がかりとして、正確に音の方向を知ることができる。ITD は脳幹の神経細胞が左右からのシナプス入力の同時検出器として働くことにより検出され、トリでは層状核 (NL) 神経細胞がこの役割を担う。NL には音の周波数に対応した機能局在があり、ITD は特徴周波数 (CF) 領域毎の同時検出回路により検出される。

最近のヒヨコを用いた我々の研究から、NL では CF 領域に応じて神経細胞の形態と機能が異なり、分子・細胞レベルで極めて精巧な制御が行われていることが明らかとなってきた。特に、中間 CF 領域では Kv1.2 チャンネル

の発現が高いことにより、最も正確な同時検出が行われる。また、高 CF 領域では HCN2 チャンネルの発現が優位であることにより、同時検出の精度はノルアドレナリンにより繊細に調節される。さらに、CF 領域に応じた軸索における Na⁺ チャンネル局在は各 CF 領域において正確な ITD の検出を可能にする。このように、聴覚同時検出の神経回路では処理する音の周波数毎にチャンネル分子の発現と細胞内局在が異なり、この違いが音の周波数に応じた細胞の同時検出、さらには動物の音源定位能力の違いに関わると考えられる。

(5) 線条体パッチ・マトリックスを巡るネットワークを再検討する

藤山文乃 (京都大学大学院 医学研究科 高次脳形態学教室)

線条体にはパッチ・マトリックスという解剖学的なコンパートメントがあり、近年、強化学習や報酬系における機能的な役割分担の面でも注目されている。しかしながら、脳基底核の中でこのパッチ・マトリックスを巡るネットワークはどのように違うのか、ということに関しては解明されていない点が多い。まず入力の点から考えると、線条体は脳皮質と視床から興奮性のグルタミン酸入力を受けているが、皮質線条体入力に比べると、視床線条体入力とパッチ・マトリックス領域との関係は

ほとんど論じられてきていない。一方、出力に関しては、直接路・間接路という概念とパッチ・マトリックスという解剖学的な構造が同じ線条体内でどのように共存しているのかは未だコンセンサスがいない状態である。例えば、パッチのニューロンは本当に黒質緻密部に投射されるのだろうか、パッチにも直接路・間接路ニューロンともに存在しているのだろうか。また、直接路・間接路の投射形式にはどの程度バリエーションがあるのだろうか。脳基底核ネットワークをパッチ・マトリックスという視

点で再構成するために、シナプス小胞性グルタミン酸トランスporter, 遺伝子組み換えウイルストランスfer, エンケファリントランスジェニックマウス等を用いて解

析しているのをこれを報告し, 大脳基底核ネットワークの検証を議論する。

13. 神経科学の道具としてのfMRI研究会

2006年11月21日-11月22日

代表・世話人：本田 学 (国立精神・神経センター)

所内対応者：定藤規弘 (生理学研究所 心理生理学)

脳機能画像解析入門中級コース

(1) 低周波ノイズの扱い

谷中久和・市川奈穂・牧陽子 (生理学研究所 心理生理学)

(2) Event-related design の最適化

村瀬未花・松本敦・間野陽子 (生理学研究所 心理生理学)

(3) 共通項と特異項の抽出

米田英嗣・森戸勇介・佐々木章宏・佐野香織 (生理学研究所 心理生理学)

(4) 主観・個人差への挑戦

出馬圭世・林正道 (生理学研究所 心理生理学)

(5) Effective connectivity 概説

河内山隆紀* (㈱国際電気通信基礎技術研究所脳情報研究所)

藤井猛 (生理学研究所 心理生理学)

研究発表

(1) Visual image reconstruction from human cortical activity by combination of multi-resolution local image decoders

宮脇 陽一 ((独) 情報通信研究機構, ㈱国際電気通信基礎技術研究所脳情報研究所)

(2) Sensing hand movement using visual and kinesthetic information

羽倉 信宏 (京都大学大学院人間・環境学研究科)

(3) An fMRI study using a group comparison: a case study on second language processing

Hyeonjeong JEONG (東北大学加齢医学研究所脳機能開発研究分野)

(4) Hemodynamic responses during learning of lexical-semantic and syntactic information in a miniature language

Jutta L Mueller (Max Planck Institute for Human Cognitive and Brain Sciences, Leipzig, Germany/National Institutes for Longevity Science)

(5) Processing of infant-directed speech in parents: Experience, gender and individual dependency

松田 佳尚 (理化学研究所 BSI 言語発達研究チーム)

(6) Neural substrate of stress coping style as revealed by regression analysis of self-evaluated spontaneity during acting

関口 敦 (東北大学加齢医学研究所脳機能開発研究分野)

(7) 自己顔評価における右側前頭前野の役割

守田 知代 ((独) 科学技術振興機構)

(8) Probing functional specificity through neuronal interaction in fMRI response

成 烈完 (濱野生命科学研究所財団 小川脳機能研究所)

(9) Analyzing Functional MRI Time-Course Using a Wavelet-Based Approach (Activelets)

Ildar KHALIDOV (RIKEN Brain Science Institutes, Tokyo, Japan/EPFL, Lausanne, Switzerland)

(10) Akaike Causality for fMRI Studies

WONG Kin Foon Kevin (統計数理研究所, (独) 科学技術振興機構)

(11) Influence of visual saliency on cortical activities: a functional MRI study in awake macaque Monkeys

郷田直一 (生理学研究所 感覚認知情報部門)

(12) Dynamic switching of thalamocortical network associated with transition of human sleep state

小池 耕彦 ((独) 情報通信研究機構 未来 ICT 研究センター CREST 脳機能イメージングチーム)

【参加者名】

本田 学 (国立精神・神経センター神経研究所), 増田早哉子 (国立身体障害者リハビリテーションセンター研究所), 橋本 照男 (慶応義塾大学), 小野田 慶一 (広島大学大学院医歯薬学総合研究科), 岡田 成生 (自治医科大学大学院医学研究科), 柴田 みどり (北海道大学大学院文学研究科), 守口 善也, 権藤 元治 (国立精神・神経センター精神保健研究所), Jutta Mueller (Max Planck Institute for Human Cognitive and Brain Science, 国立長寿医療センター研究所), 中田 大貴 (名古屋大学医学部保健学科), 坂本 貴和子 (生理学研究所 感覚運動調節部門), 程 康 (理化学研究所 脳科学総合研究センター), 鯨井 加代子 (生理学研究所 感覚運動調節部門), 中村 優子 (九州大学歯学大学院), 後藤 多津子 (九州大学病院 口腔画像診断科), 浅水屋 剛 (理化学研究所 脳科学総合研究センター), 加美 由紀子 (九州大学大学院歯学研究院), Mauro Costagli (理化学研究所 脳科学総合研究センター), 田中 秀明 (追手門学院大学), 上田 一貴 (東京大学先端科学技術研究センター), 緒方 洋輔, 渡邊 言也 (筑波大学大学院人間総合科学研究科), 川田 良作 (京都大学医学部医学研究科), 森 健之 (国立精神・神経センター武蔵病院), 成 烈完 (濱野生命科学研究所), 小野 健太郎 (国立長寿医療センター), Hyeonjeong Jeong (東北大学加齢医学研究所), 金 完哉 (星城大学), 古澤 義人 (東北大学病院), 望

月 秀紀 (生理学研究所 感覚運動調節部門), 宮田 淳 (京都大学大学院医学研究科), 二本杉 剛 (大阪大学経済学研究科), 寒 重之 (九州工業大学大学院), Ildar Khalidov (理化学研究所脳科学総合研究センター, EPFL), 眞野 博彰 (明治鍼灸大学), 金澤 伸江 (東北大学医学系研究科), 松田 佳尚 (理化学研究所), 宮脇 陽一 (情報通信研究機構, 国際電気通信基礎技術研究所), 守田 知代 (科学技術振興機構), 小林 球記 (自動車事故対策機構), 尾崎 統 (統計数理研究所), Wong Kin Foon Kevin (科学技術振興機構), 柴田 敬祐 (京都府立医科大学), 小池 耕彦 (情報通信研究機構未来 ICT 研究センター), 関口 敦 (東北大学加齢医学研究所), 羽倉 信宏 (京都大学大学院人間・環境学研究科), 郷田 直一 (生理学研究所 感覚認知情報部門), 佐是 輝安 (京都大学医学部), 中村 昭範 (国立長寿医療センター), 宮内 哲, 劉 国相 (情報通信研究機構未来 ICT 研究センター), 大石 晴美 (岐阜聖徳学園大学), 平松 千尋, 原田 卓弥 (生理学研究所 感覚認知情報部門), 平井 真洋 (生理学研究所 感覚運動調節部門), 定藤規弘, 杉浦元亮, 田邊宏樹, 豊田浩士, 齋藤大輔, 村瀬 未花, 米田英嗣, 松本 敦, 市川奈穂, 森戸勇介, 牧 陽子, 間野陽子, 出馬圭世, 谷中久和, 林 正道, 佐々木章宏, 藤井 猛 (生理学研究所 心理生理学)

【概要】

1990年に発見された blood oxygen level dependent (BOLD) 効果を主な原理とする機能的磁気共鳴画像法 (以下 fMRI) は近年著しく普及し, ヒトを含む霊長類の脳機能を非侵襲的に探る上で卓越した可能性をもつことが明らかとなってきた。その反面, いまだ手法自体の歴史が浅いため, 適切な撮像方法や統計的解析法といった技術面のみならず, 記録される信号変化のもつ生理学的意味 (即ち局所脳血流あるいは電気的活動との関係など) を理解する上でも検討すべき課題が山積している。本研究では, このように萌芽的側面を有する fMRI 手法を,

技術的ならびに生理学的な諸課題について活発な議論をおこなうとともに, 情報交換の場を提供することを目的として開催した。

今年度は, 会の前半の 20 日 (火) 午後~21 日 (水) 午前にかけて, 脳機能画像解析入門中級コースと題して, 日常の研究において課題設計や解析について困っていることなどを紹介し, それについて皆で討論するハンズオンワークショップを開催した。これは, 毎年夏に生理科学実験技術トレーニングコースの一環として心理生理学研究部門が開催している「ヒト脳機能マッピングにおけ

るデータ解析入門」コースの発展形と位置づけられるものであり、トレーニングコースで学んだ技術を実際の実験に応用した場合に出てくる様々な問題について皆で議論し考える場となった。

後半の21日(水)午後~22日(木)午前にかけては、例年通り、MRIの撮像方法、統計的解析法等、技術的側

面についての検討、BOLD効果など、fMRIの基盤となる生理学的現象に関連する検討、fMRIによって得られたシステム脳科学的な知見についての研究発表と討論を行った。fMRI研究を盛んに実施している研究施設や装置開発など関連領域の研究者並びに技術者が合計72名参加し、活発で有意義な討論を行った。

(1) Visual image reconstruction from human cortical activity by combination of multi-resolution local image decoders

Yoichi Miyawaki, Hajime Uchida, Okito Yamashita, Masa-aki Sato, Yusuke Morito, Hiroki Tanabe, Norihiro Sadato, Yukiyasu Kamitani NiCT,ATR CNS,NAIST,NIPS

Pattern analysis of fMRI signals can accurately predict the presented visual features (e.g., orientation). As previous approach focused on a single dimension of visual features, it cannot reveal a visual image from the cortical activity evoked by an arbitrary visual stimulus. Here we show that arbitrary visual images that a subject is seeing can be reconstructed from fMRI signals of the early visual cortex by combining local image decoders that predict local image contrast of multiple spatial scales. We performed fMRI scans (3 T, 3 mm × 3 mm × 3 mm voxel size) while subjects viewed a sequence of random pattern images consisting of small flickering checkerboard patches. A set of local image decoders were trained to predict the mean contrast of local image segments of multiple resolutions. The trained decoders were then combined so as to minimize the reconstruction error using the

training data. In separate sessions, we measured fMRI data evoked by geometric shape images, which were not used to train the decoders, to test if the combined decoder generalizes to the novel images. The combined decoder showed accurate reconstruction performance, revealing sharp geometric shapes. The decoders of multiple resolutions were complementary over eccentricity and outperformed a single resolution decoder. Our algorithm automatically found retinotopic voxels relevant for the reconstruction without conventional mapping experiments. These results suggest that the validity of combinatorial representation of visual images in the early visual cortex. Our approach extends previous decoding technique to deal with high dimensional nature of human perceptual space based on the representation model.

(2) Sensing hand movement using visual and kinesthetic information

Nobuhiro Hagura (Kyoto University, JSPS)

Neuroimaging techniques, in particular functional magnetic resonance imaging (fMRI), allow us to infer the neuronal mechanisms underlying human cognitive/perceptual function. In the basic conventional analysis, brain activity (hemodynamic response) that occurs in a certain time epoch is associated with the cognitive/perceptual function assumed to take place in that time epoch. Further analyses can be

performed to validate the results obtained in this basic analysis. Testing the correlation between the behavioral measure (ex. perceptual ratings, reaction times) and the strength of the brain activity can confirm the association between the detected brain region and that particular function (correlation analysis). Functional connectivity analysis may elucidate the inter-regional communication between the

detected region and the other brain regions, which may be important in achieving that function. In my talk, I will introduce our recent studies where the above methods are used to investigate the brain network involved in the multisensory processing of visual and kinesthetic information of hand. Firstly, I will introduce our study which demonstrated the role of posterior parietal cortex in aligning

the hand position signaled from visual and kinesthetic information. Second, I will introduce our study that showed the participation of the left cerebellum in aligning the velocity of directionally concordant visual and kinesthetic information of hand movement, and the occurrence of cerebro-cerebellar interaction during that process.

(3) An fMRI study using a group comparison: a case study on second language processing

Hyeonjeong JEONG (Japan Society for the Promotion of Science,
Department of Functional Brain Imaging, IDAC, Tohoku University)

In the neuroimaging literature, the age of second language (L2) acquisition, the level of L2 proficiency, and the amount of exposure are major determinants of whether and how cortical representation differs between L1 and L2. Very limited studies (e.g., Jeong et al., 2007) have attempted to examine how linguistic similarities and differences between L1 and L2 affect brain activation during L2 processing, although second language acquisition literature has documented their important roles in L2 acquisition. In this study, we conducted an fMRI study on L1 and L2 sentence comprehension tasks for two different L1 (i.e., Korean and Chinese) groups who learned two L2s (i.e., English and Japanese). We present data from 18 Korean and 12 Chinese subjects who performed sentence comprehension tasks in each L1 (Korean or Chinese) and two L2s (English and

Japanese). These two groups showed similar L2 learning backgrounds, age of L2 acquisition, the amount of L2 exposure, and L2 proficiency levels. Nonetheless, differential brain activation patterns were observed between the Korean and Chinese groups. During the English relative to L1 sentence comprehension tasks, the Korean group showed significantly greater activation in the bilateral posterior superior temporal gyrus, left inferior frontal gyrus, right inferior frontal gyrus, and right cerebellum than the Chinese group. In contrast, during the Japanese relative to L1 sentence comprehension tasks, the Chinese group showed significantly greater activation in the anterior portion of superior temporal gyrus than the Korean group. The results demonstrated that the location of the L2-L1 processing-induced cortical activation varies between different L1-L2 pairs.

(4) Hemodynamic responses during learning of lexical-semantic and syntactic information in a miniature language

Jutta L. Mueller (Max Planck Institute for Human Cognitive and Brain Sciences,
Leipzig, Germany, National Institute for Longevity Sciences)

The present study used the blood-oxygen dependent (BOLD) fMRI technique to investigate brain correlates of lexical semantic and syntactic processing and learning in a second language. In order to capture learning related changes in the BOLD signal we used a miniature version of Japanese

which participants learnt partly before and partly during fMRI scanning. During scanning familiar sentences, sentences containing new words and sentences containing new word order were presented in conjunction with pictorial representations of their meaning. With regard to processing

sentences with new syntactic or semantic information compared to familiar sentences we found strikingly overlapping patterns of brain activation. No region was exclusively activated for the processing of new syntactic structures whereas the bilateral caudate nuclei and the left fusiform gyrus were active only in the lexical-semantic condition. Activation that was parametrically modulated by the amount of learning as reflected in individual learning

curves was found only in the lexical-semantic condition. Specifically, left inferior frontal gyrus, left middle temporal gyrus and left anterior fusiform/parahippocampal areas were related to the behavioural learning measure. The results point to shared mechanisms for the processing of new and difficult sentences but also to different learning related dynamics in syntactic and lexical-semantic learning.

(5) Processing of infant-directed speech in parents: Experience, gender and individual dependency

Yoshi-Taka Matsuda (Lab for Language Development, Brain Science Institute, RIKEN)

Adults are known to use a special style of speech when they talk to infants. The properties of infant-directed speech (IDS) include prosodic and lexical modifications. While these linguistic components are independent and considered to be lateralized in opposite hemispheres (i.e., prosodic processing in the right hemisphere and lexical processing in the left), both are functionally connected in terms of IDS and may share neural processing during the perception and production in experience-, genderand/ or individual-dependent manners. This hypothesis was tested with Japanese parents (n=35, 20 mothers), who have had their first babies within one year, and non-parents (n=30, 15 males) using fMRI (Varian 4T MRI system) with an event-related design. IDS effects were determined by measuring differential activity when the subjects discriminated auditorily presented IDS stimuli from

adult-directed speech (ADS) stimuli, selectively attending to either the prosody or lexicon, and followed by the mental rehearsal of the percept. The following four results were revealed in the random-effects analysis of multiple comparisons with GLM. (1) Mothers showed significant activation to both prosodic and lexical IDS in the classical language areas. (2) Fathers and non-parents did not show these activation. (3) Mothers had a correlation between brain activities to IDS and extraversion scores of psychological index, which reflected individual difference of social personality trait in IDS processing. (4) These activations and correlation disappeared when their children developed to school ages. These results suggest that mothers process IDS in a use-dependent manner.

(6) Neural substrate of stress coping style as revealed by regression analysis of self-evaluated spontaneity during acting

関口敦 (東北大学加齢医学研究所脳機能開発研究分野)

The way to cope with a stressful situation differs across individuals and occasions. In this fMRI study, we examined the top-down process of an adaptive stress coping styles. We designed the stress coping styles into a two factorial design, incorporating a direction of demand (Self vs. Other) and a

direction of view (Prospective vs. Retrospective). We were particularly interested in the Self Prospective style as an adaptive coping style. Thirty-two healthy subjects performed an acting task. Each subject was presented with a picture of a stressful situation in which an actor comments (presented in a

balloon) to the subject on the situation. With a delay of two seconds, a possible verbal response to the comment in one of the four stress coping patterns (i.e., Self Prospective, Self Retrospective, Other Prospective and Other Retrospective) was presented, and the subject was required to act the protagonist of the situation by responding as presented. After MRI measurement, each subject self-evaluated how naturally he/she could act (Spontaneity scores) for each response. Given that the stress coping styles was the spontaneous

response to the situation, we assumed that the top-down process related to each coping styles was correlated with the Spontaneity scores during act. A significant negative correlation between the Spontaneity scores and neural responses for the Self Prospective conditions was observed in the right anterior temporal lobe. The results indicated the advantage of the low response in this region to the stressful situation for adaptive social behavior.

(7) 自己顔評価における右側前頭前野の役割

守田知代 (科学技術振興機構 JST/RISTEX)

自分の顔など自己像を与えられると、それに対して自己評価的な認知活動が生じ、特に自己の中にある基準とのズレが大きい場合には、羞恥心などのネガティブな情動が生じると言われている。本研究では、自己評価プロセスに関わる神経基盤を明らかにするために以下のような fMRI 実験をおこなった。被験者には自己顔および未知人物の顔を呈示し、それらの写真写りを評価しているときの脳活動を計測した。その結果、他者顔の評価時に

比べて自己顔の評価時には、右側前頭前野領域において有意な活動増加が見られた。その中でも右側中心前溝では、自己認知と深く関連する自己意識の個人特性を反映した活動が見られた。また、それよりも前方に位置する右側下前頭回の活動は、自己評価の結果生じる羞恥心の強度と相関することが示された。これらの結果より、自己顔の評価に関わる右側前頭前野領域において異なる機能的役割をもつ領域の存在が示された。

(8) Probing functional specificity through neuronal interaction in fMRI response

成 烈完 (濱野生命科学研究所 小川脳機能研究所)

It is very difficult by disentangling an functional MRI (fMRI) response to separate neuronal circuits contributing to the fMRI response in an area when a stimulus has more than two kinds of specific information and those information are represented into different neuronal circuits each other. Areas in the visual ventral pathway show common activation to stimuli belonging to different object categories while some of

them have their preferred categories. To investigate functional specificity in those areas we in this study used a paired stimulus paradigm which can induce a refractory suppression in fMRI. The suppression phenomenon is that the response to the second stimulus is suppressed if two inputs to an area are processed in the same way when the stimuli arrive at the site in short succession.

(9) Analyzing Functional MRI Time-Course Using a Wavelet-Based Approach (Activelets)

Ildar Khalidov, Dimitri Van De Ville, Jalal Fadili, Michael Unser and Kang Cheng
(RIKEN Brain Science Institute, Japan EPFL, Switzerland)

Over recent years, functional magnetic resonance imaging (fMRI) has become a key modality in imaging human brain function. The blood-oxygenation-level-dependent (BOLD) signal, which originates from an overcompensation in oxygenated hemoglobine following neuronal activity by the neurovascular system, can be measured and localized using fast acquisition of T2* MRI volumes. The analysis of these large spatio-temporal datasets is difficult due to noise, measurement artifacts, and the variability of the BOLD response. The classical approach puts forward a linear model to explain a voxel's time course. The modeled BOLD response is the convolution of the haemodynamic response function (HRF) with the stimulus function, which can be a train of boxcar functions (block-based paradigm) or Dirac delta-functions (event-related paradigm). A widely used

model for the HRF is the sum of two gamma-functions. Finally, voxels are declared as activated based on the results of statistical hypothesis testing. In this work, we concentrate on the event-related setting. Our activelet approach relies on two key ideas. First, a specially-designed wavelet basis allows concentration of the activity-related signal energy on a small number of decomposition coefficients. Second, a fast sparse-solution search algorithm is used to determine the position and the value of these coefficients. Our approach does not use any a priori knowledge on the stimulus onset times; as a consequence, it is robust to the variability of the BOLD response. Compared to the classical algorithm, the activelet method has potential in a wider class of neuroscience applications where the exact stimulus times are not known and should be estimated directly from the data.

(10) Akaike causality for fMRI studies

KFK Wong, Tohru Ozaki (科学技術振興機構, JST/RISTEX, 統計数理研究所)

Intrinsic connection between brain regions has been an important issue in fMRI study. Yet the majority neglects the direction of connectivity while discussing the influence that one brain region exerts on another. Directional connectivity can be obtained only by taking the information along the time into consideration, is applying statistical time series model. With aids of multivariate autoregressive model, directional connectivity can be obtained using causality technique, for instance, the Akaike causality. Nonetheless the issue of instantaneous causality comes up in connectivity study of fMRI. The primary reason is the low sampling rate of fMRI images. Such sampling rate is perfect for observing HRF but insufficient to detect a faster response at a voxel over the

others. Interpreting causality becomes uneasy when number of regions of interest increases. In this contribution we present a new approach of explaining instantaneous causality in multivariate time series by the class of state space model. Every single time series can be divided into two noise-driven processes, a common process shared among multivariate time series and a specific process refining the common process. Using Akaike causality theory, causality among brain regions are quantified over the spectral domain. We will illustrate the method with applications to two sets of fMRI data, and explore the potential of state space modeling for fMRI data analysis.

(11) Influence of visual saliency on cortical activities: a functional MRI study in awake macaque monkeys

Naokazu Goda (生理学研究所 感覚認知情報部門)

Our visual system can rapidly and effortlessly detect a salient object in a cluttered visual scene. Recent electrophysiological studies in monkeys suggest that such an efficient detection of the salient object involves processing in multiple areas in frontal and parietal cortices, as well as competitive interaction in retinotopic areas in occipital cortex. To clarify the whole picture of this distributed network, we measured the influence of the visual saliency on the activities in various cortical regions by using functional MRI in the awake macaque monkeys. We used an array stimulus containing eight disks; in some arrays one of the disks in the left or right hemifield was unique in color (left-singleton / right-singleton), in others all were identical (no-singleton).

We presented these different singleton stimuli to the monkeys during a fixation task in a block design. We found that the presence of the pop-out, salient singleton in the array enhanced BOLD responses in V2/V3, V4, MT and LIP. The enhancement was observed in the hemisphere contralateral to the location of the singleton. Interestingly, we also found a strong response enhancement with the contralateral bias on the posterior bank of the superior temporal sulcus (STS), which was located anterior to MT and medial to TEO. This STS region has not been explored by electrophysiological recordings. Our findings shed new light on the neural system involved in the detection of the salient object.

(12) Dynamic switching of thalamocortical network in association with transition between REM and NREM sleep

Takahik Koike, Shigeyuki Kan, Masaya Misaki, & Satoru Miyauchi
(CREST brain function imaging team, KARC, NICT)

In recent years, increased attention has been directed at investigating spontaneous brain activities; examination of spontaneous BOLD activity has made clear that several brain regions form a functionally-connected ‘resting-state network’ during wakefulness without goal-directed tasks. Another attention has been paid to brain activities during sleep. Although there seems to be also no explicit goal-directed tasks during human REM/NREM sleep state, several recent studies suggest that spontaneous brain activities during sleep are associated with important brain functions such as memory consolidation. Therefore, considering functionally-connected brain network associated with human REM/NREM sleep may be helpful to investigate sleep-stage-related brain functions. To investigate characteristics of spontaneous networks linked to human sleep states, we used fMRI with simultaneous polysomnographic recording, and examined functional

connectivity between thalamus and other cortical areas, using a technique with Spearman’s rank-correlation coefficient between the BOLD signals. We found that a set of regions, including DLPFC, anterior cingulate and hippocampus, showed significantly increased connectivity to thalamus during NREM sleep period (sleep stage 3/4). In contrast, during REM sleep which is usually linked to vivid dreaming, we found a thalamocortical network including visual cortices, hippocampus and primary motor area. In addition, only during REM sleep, we found a significant functional connectivity between the thalamus and the posterior cingulate cortex, precuneus, and inferior temporal gyrus; these regions are known as a part of ‘default network’. Our findings show that thalamocortical network switches in association with transition of sleep states between NREM and REM, and suggest that identifying functionally-connected brain network

using correlation coefficient between BOLD signals is a sleep.
useful tool for exploring brain functions of NREM and REM

14. Motor Control 研究会

2007年6月28日－6月29日

代表・世話人：高草木薫（旭川医科大学・生理学）

所内対応者：伊佐 正（生理学研究所・認知行動発達機構）

- (1) ヒトの倒立振子制御：仮想重力の変化が制御に及ぼす効果
澤畑博人（山形大・院・理工）
- (2) 小脳の平行線維－プルキンエ細胞シナプス LTP と AMPA 型受容体のリサイクリング
戸高 宏（新潟大・院・生体機能）
- (3) ラットカー：ラット運動皮質の神経発火パターンに基づくオンライン車体制御
深山 理（東京大・院・情報理工）
- (4) 制御系と機構系の連関から創発するモジュラーロボットのアメーバ様ロコモーション
清水正宏（東北大・工）
- (5) 受動歩行時における皮膚反射の位相依存性
中島 剛（国立身障者リハ）
- (6) 熟練スポーツ動作に見られる巧みな多関節協調メカニズム ～相互作用トルクの利用～
平島雅也（東京大学・院・教育）
- (7) ヒトの受動歩行での皮質脊髄路興奮性に対する荷重の影響
上林清孝（国立身障者リハ）
- (8) 随意運動における脳の情報生成機構
富田 望（東北大・電通研）
- (9) 淡蒼球内節ニューロン活動の異常から大脳基底核疾患の病態を考える
橘 吉寿（生理研・生体システム）
- (10) マウス脊髄歩行運動神経回路網の研究
西丸広史（産総研・脳神経情報）
- (11) 遺伝子変異マウスを用いた小脳性歩行失調の解析と歩行の適応制御における小脳の役割
柳原 大（東京大・院・総合文化）
- (12) 霊長類の大脳皮質における歩行制御機序
中階克己（近畿大・医・第一生理）
- (13) 脳幹・脊髄と筋緊張の制御
高草木薫（旭川医大・生理学）
- (14) 末梢神経信号における求心性感覚神経情報と遠心性運動神経情報の分離手法
伊藤孝佑（東京大・院・情報理工）
- (15) 動き易さの指標を用いた自律的な随意運動制御
吉原佑器（東北大・電通研）
- (16) 手首運動を利用した定量的運動機能検査システムの構築
李 鍾昊（都神経研・認知行動）
- (17) 下肢麻痺者の歩行補助ロボットにおけるセンサ・制御系開発
香川高弘（名大・院・機械理工）
- (18) 脳波筋電図コヒーレンスと筋力調節能
牛場潤一（慶應大・理工）

- (19) 視線移動を指標とするマウス行動実験課題の開発, あるいは脳内多点電気刺激による
ブレイン・プログラミングについて
坂谷智也 (生理研・発達生理)
- (20) 歩行及び筋緊張調節機構に対するオレキシン入力役割
高橋和巳 (福島県立医大・医)
- (21) 3次元精密筋骨格モデルに基づくニホンザル2足・4足歩行の運動解析
荻原直道 (京大・院・理)
- (22) 随意運動を支える前頭葉内ネットワーク
星 英司 (玉川大・脳研)
- (23) 経頭蓋磁気刺激と磁気共鳴機能画像同時計測による誘発脳領域間連関画像法の基礎的検討
花川 隆 (精神・神経センター研)
- (24) 多機能柔軟神経電極の開発とBMIへの応用
鈴木隆文 (京大・院・情報理工)
- (25) 神経科学とリハビリテーション医学—今後の展望—
大須理英子 (NICT/ATR)
- (26) 軌道計画を必要としない運動制御モデル
小池康晴 (東京工大・精密工)
- (27) 大脳皮質運動領野への低強度高頻度経頭蓋磁気刺激による手の運動技能低下克服の試み
内藤栄一 (NICT/ATR)
- (28) 眼球反射の適応の運動記憶の固定化に対する小脳皮質不活性化の影響
岡本武人 (理研BSI・運動学習)
- (29) 運動記憶の獲得と固定化に関与する小脳皮質由来の遺伝子群の同定
片桐友二 (理研BSI・運動学習)
- (30) 頭頂葉の視覚-触覚バイモーダルニューロンによる自己と他者身体部位の表現
石田裕昭 (近畿大・医・第一生理)
- (31) 空間位置と報酬に基づく補足眼野のニューロン活動
内田雄介 (順大・院・神経生理)
- (32) 補足眼野・前頭眼野の神経活動に基づく眼球運動の開始時刻・振幅・方向の推定
大前彰吾 (順大・院・神経生理)
- (33) 視覚情報を優先させた手の空間位置算出には上頭頂小葉後部領域が関与する
羽倉信宏 (京大・院・人間環境)
- (34) VOR 運動学習の左右非対称性, 周波数選択性, 能動・受動運動学習
吉川明昌 (中部大・院・工)
- (35) 運動視処理における二つの皮質経路—運動信号と知覚信号の分離—
林 隆介 (京大・院・認知行動)
- (36) 視野の動きに短潜時で誘発される視覚誘導性腕応答の視覚運動座標変換
西條直樹 (NTT基礎研)
- (37) リーチング運動中の視覚ターゲットの移動により引き起こされる修正運動
渋谷 賢 (杏林大・医・統合生理)
- (38) 標的刺激選択時の前頭連合野の神経細胞活動
井上雅仁 (京大・霊長研)

- (39) サルにおける短潜時で起こる視覚誘導性腕応答 (MFR: Manual Following Response) の時空間特性
竹村 文 (産総研・脳神経情報)
- (40) 小さな誤差での視覚運動適応は長く続いた
山本憲司 (放医研・分子神経)
- (41) 水平性・垂直性サッケードの出力系中枢神経回路の解析
伊澤佳子 (東京医歯大・神経生理)
- (42) 大脳-基底核ループによる眼球運動の随意性制御
田中真樹 (北海道大・医)
- (43) 追跡眼球運動の開始部の特性を決める外的な要因と内的な要因
三浦健一郎 (京大・院・認知行動)
- (44) 報酬獲得行動における Dopamine と Serotonin ニューロンの神経活動の比較
中村加枝 (関西医大・第二生理)
- (45) 眼球運動の能動的抑制に関わる脳内機構
長谷川良平 (産総研・脳神経情報)
- (46) 上丘頭側部と尾側部の機能の違いについて
杉内友理子 (東京医歯大・神経生理)
- (47) 前庭動眼反射運動学習中の小脳 Purkinje 細胞複雑スパイク
平田 豊 (中部大・工)
- (48) サッケードに伴う時間順序判断の逆転
北澤 茂 (順大・院・神経生理)
- (49) 頭頂連合野における身体の認識機構
村田 哲 (近畿大・医・第一生理)
- (50) リズム制御における神経機構
鴻池菜保 (京大・霊長研)
- (51) 左右指運動中における体性感覚情報の役割と腕姿勢に依存した運動の協調性
櫻田 武 (東工大・院・総合理工)
- (52) 一次運動野 (M1) への経頭蓋磁気刺激 (TMS) による運動開始に対する妨害効果は
タスクに依存して変化する
中塚晶博 (京大・医・高次脳研)
- (53) 把持運動可能性判断の脳内神経機序
廣瀬智士 (京大・院・人間環境)
- (54) 把握運動の制御における脊髄神経機構の役割
武井智彦 (京大・院・人間環境)
- (55) 生体ノイズの影響下における上肢到達運動の消費エネルギーに基づく最適性
谷合由章 (山口大・院・理工)
- (56) C3-C4 脊髄固有ニューロンは皮質脊髄路切断後の手指の巧緻性の回復に関与する
坪井史治 (総研大・院・生命)
- (57) サル皮質脊髄路：一次運動野における手指制御領域から脊髄への軸索投射の定量的解析
齋藤紀美香 (生理研・認知行動)
- (58) 両手鏡像運動の開始は片手分のコストですむ？
荒牧 勇 (NICT/ATR)

- (59) 両手運動遂行中の脳活動に視覚フィードバックのパターンが及ぼす影響
戸松彩花 (都神経研・認知行動)
- (60) 低頻度反復経頭蓋的磁気刺激 (rTMS) 後の脳内変化：拡散強調画像法による検討
阿部十也 (京都大・医・高次脳研)
- (61) 到達運動中のターゲットおよび視野背景の運動が引き起こす短潜時運動応答の特性
門田浩二 (NTT 基礎研)
- (62) 一次運動野は腕運動中の力場環境に対する予測的反射ゲイン調節に関与している
木村聡貴 (NTT 基礎研)
- (63) 小脳プルキンエ細胞複雑スパイクは筋肉座標系で運動をコードする
角田吉昭 (都神経研・認知行動)
- (64) 第一次運動野損傷後の運動機能回復：行動学および組織化学的研究
肥後範行 (産総研・脳神経情報)
- (65) 力出力とスティッフネス制御に関わる脳部位
春野雅彦 (ATR・計算神経生物)
- (66) 随意運動時における末梢感覚入力役割
関 和彦 (生理研・認知行動)
- (67) 内力と運動の軌道を予測する力覚情報に基づいた運動規範
太田 憲 (国立スポーツ科学センター)
- (68) 腕の運動学習・制御モデルの提案
神原裕行 (東工大・精密工学研)
- (69) 社会的行動選択に伴う頭頂葉神経細胞の特性
藤井直敬 (理研 BSI・象徴概念)
- (70) 運動抑制の署名 Stop Signal 課題遂行の成否は M1 活動から予測できる
美馬達哉 (京都大・医・高次脳研)
- (71) 両腕運動と片腕運動：同じ腕の運動学習に関わる脳内過程の違い
野崎大地 (東京大・院・教育)
- (72) 脊髄運動系における GAP-43 免疫陽性構造
大石高生 (京都大・霊長研)
- (73) 一次運動野における到達運動の情報表現
宮下英三 (東工大・院・理工)
- (74) 精密運動中の皮質脊髄路の興奮性および皮質内抑制について
遠藤隆志 (順大スポーツ医科研)
- (75) 個性適応型筋電義手の開発とその適応機能評価のための脳機能解析
加藤 龍 (東京大学・院・工)
- (76) 到達・把持運動における運動情報表現に関する情報論的アプローチ
阪口 豊 (電通大・院・情報システム)
- (77) 複数の報酬関数を持つ環境のための MOSAIC モデル
杉本徳和 (ATR・脳情報研)

【参加者名】

高草木薫 (旭川医大・生理学), 伊澤佳子, 杉内友里子 (東京医歯大・神経生理), 荒牧 勇, 大須理英子, 内藤栄一 (NICT/ATR), 春野雅彦 (ATR・計算神経生物), 杉本徳和 (ATR 脳情報研), 木村聡貴, 五味裕章, 西條直樹,

門田浩二 (NTT 基礎研), 福士珠美 (科学技術振興機構・社会技術研究開発センター), 笹田周作 (東芸大・院), 中村加枝, 雨夜勇作 (関西医大・第二生理), 小川 正, 三浦健一郎, 稲場直子 (京都大・院・認知行動), 中塚晶博, 阿部十也, 美馬達哉 (京都大・医・高次脳), 林隆介 (京都大・医・高次脳研), 武井智彦, 廣瀬智士, 羽倉信宏, 草野純子 (京都大・院・人間環境), 荻原直道 (京都大・院・理), 大木 紫, 渋谷 賢 (杏林大・医・統合生理), 石田裕昭, 中隣克己, 村田 哲 (近畿大・医・第一生理), 牛場潤一 (慶応大・理工), 上林清孝, 門田 宏, 中島 剛, 中澤公孝, 関口浩文 (国立身障者リハ), 太田憲 (国立スポーツ科学センター), 花川 隆 (精神・神経センター研), 松山清治 (札幌医大・生理学), 竹村文, 長谷川良平, 肥後範行 (産総研・脳神経情報), 大前彰吾, 内田雄介, 北澤 茂 (順大・医・神経生理), 遠藤 隆 (順大スポーツ医科研), 戸松彩花, 李 鍾昊, 角田吉昭, 笈慎治 (都神経研・認知行動), 中山義久, 星 英司, 山形朋子 (玉川大・脳研), 平田 豊, 吉川明昌 (中部大・院・工), 阪口 豊 (電通大院・情報システム), 宮下英三, 櫻田 武 (東工大・院・総合理工), 神原裕行, 小池康晴

(東工大・精密工学研), 伊藤孝佑, 深山 理, 鈴木隆文 (東京大・院・情報理工), 山中健太郎, 平島雅也, 野崎大地 (東京大・院・教育), 加藤龍 (東京大・院・工), 柳原 大 (東京大・院・生命環境), 清水正宏 (東北大・工), 富田 望, 吉原佑器 (東北大・電通研), 宇野洋二, 田中友浩, 香川高弘 (名大・院・機械理工), 青木佑紀 (奈良先端・大・院・情報科学), 戸高宏 (新潟大・院・生体機能), 高橋 真 (広島大・院・国際協力), 高橋和巳 (福島県立医大・医), 小山純正 (福島大), 山本憲司 (放医研・分子神経), 田中真樹, 松嶋藻乃, 吉田篤司, 國松 淳, 田代真理 (北海道大・医), 澤畑博人 (山形大・院・理工), 森 大志 (山口大・農学), 谷合由章 (山口大・院・理工), 長坂泰勇, 藤井直敬 (理研 BSI・象徴概念), 岡本武人, 片桐友二 (理研 BSI・運動学習), 瀬瀬大輔, 宮地重弘, 鴻池菜保, 禰占雅史, 井上雅仁, 大石高生 (京都大・霊長研), 東島眞一, 佐藤千恵, 木村有希子, 南部 篤, 鯨井加代子, 小松英彦, 林 正道, 牧 陽子, 村瀬未花, 郷田直一, 大鶴直史, 中川 直, 坪井史治, 橘 吉寿, 齋藤紀美香, 関 和彦, 梅田達也, 坂谷智也, 高原大輔, 伊佐 正 (生理研)

【概要】

我が国の運動制御に関する生理学的研究は歴史が古く, また世界をリードするような優れた研究成果が数多くあげられてきた。今後, これらの研究成果をいっそう発展させるためには, 主に若手, 中堅層に属する研究者による斬新な発想をもとにした研究連携が必須である。しかし我が国においてそのような研究者が集うことができる定期的研究集会はこれまで存在しなかった。そこで, 本「Motor control 研究会」では国内の様々なフィールドで運動制御研究を行っている主に中堅, 若手研究者が集い, インフォーマルな雰囲気の中で議論を行う事によって, お互いの研究成果について相互理解する事を目的とした。

6月28-29日に開催された当該研究会には合計130人の参加者があった。今年度の世話人は生理学研究所の関和彦(助教)であった。参加者の平均学位習得後年は5±10年であり, また工学・体育・リハビリテーションなど学際分野からの参加者が大半をしめた。従って, 若手・中堅中心の学際分野を含めた参加者が多数集まるという目的は達成されたと考えられる。また本研究会ではボト

ムアップ的な運営を行うという方針から, 希望者には全員口演発表をしてもらおうという新たな試みを行った。その結果, 合計73の口演と40のポスター発表があり, 活気のある議論が行われた。さらに, 研究会以降も参加者同士のコミュニケーションや議論を活発化する意図で, 統合脳5領域が口演している「神経科学者 SNS」内の「生理研 MotorControl 研究会コミュニティ」を立ち上げた。その結果, 参加者のほとんど(92人)がコミュニティメンバーとして登録があり, 今後活発な交流が始まる事が期待される。さらにベストプレゼンテーション賞などの新たな試みも好評であった。

以上のように, 今年度の本研究会の目的は達成され, ほとんどの参加者から次年度以降の参加の意思表示があった。本研究会によって, これからの我が国の, 学際分野としての運動制御研究の基盤となる研究者が一同に会することができた意義は大きい。今後, この交流を基盤に当該研究分野が飛躍的に発展することが期待される。

(1) ヒトの倒立振り子制御：仮想重力の変化が制御に及ぼす効果

澤畑博人, 新島和隆, 山口峻司 (山形大学大学院・理工学研究科・生体センシング機能工学専攻)

ヒトのバランス制御の一例として倒立振り子の制御を取り挙げる。倒立振り子のような視覚を用いた手の運動では、視覚入力から手の運動出力までの長い時間遅れ(約200ms)が問題になる。時間遅れに対して棒の倒れる速度が速いとき単純な feedback 制御では間に合わない。ヒトは棒が速く倒れるとき、どのように棒を立たせるのか?これを明らかにするために、コンピュータ仮想空間上に倒立振り子の力学系を構築した。被験者は、画面上に表示された棒(振り子)が倒れないようにマウスを用いて振り子下端を操作した。仮想重力を変化させて棒の倒れる速度を変えた。十分に訓練すると、 $2G$ ($G = 9.8\text{m/s}^2$)の重力場で1mの棒を制御できるようになった。重力にかかわらず、倒立振り子の制御において振り子下端の動きは、静止している時間相("stop" phase)と急速に移動する時間相("go" phase)からなっていた。"go"による下端の移動量

(変位 X)は、その運動の開始時点での棒の角度(θ)と角速度($d\theta/dt$)の1次式($X = k_1\theta + k_2d\theta/dt$)で表すことができ、 G が大きくなると角度の係数(k_1)が増加し角速度の係数(k_2)は減少した。"go"の持続時間が短いことから(最短で約50ms)、"go"はopen-loop制御で動かされている。その運動計画は、運動開始よりもずっと早い時点(少なくとも遅れ時間以前)の視覚情報に基づいていると考えられるが、その時点では前の"go"がしばしば完了していない(特に G が大きいとき)。このような場合、先行する"go"の結果に基づいて"go"を計画できない。おそらく先行する"go"の効果を予想してopen-loop制御していると考えられる。以上より、倒立振り子制御では、open-loop制御による動作の連続が等価的にfeedbackを構成すると結論づけられた。

(2) 小脳の平行線維-プルキンエ細胞シナプス LTP と AMPA 型受容体のリサイクリング

戸高宏^{1,2}, 立川哲也², 澁木克栄¹, 永雄総一²

(¹新潟大院・生体機能調節・システム脳生理, ²理研・脳センター・運動学習制御)

小脳の平行線維-プルキンエ細胞シナプスでは、SNAREタンパク質依存性のエクソサイトーシスとクラスリン-ダイナミン依存性のエンドサイトーシスによるリサイクリングによって、AMPA型受容体の発現が制御され、それがシナプス伝達可塑性の源であることが示唆されている。本研究では、ラットの小脳スライス標本を用いて、プルキンエ細胞から、平行線維を電気刺激することによって誘発されるEPSCを記録し、一酸化窒素(NO)依存性長期増強(LTP)(Lev-ram et al., 2002)におけるAMPA型受容体のリサイクリングの役割を検討した。

エンドサイトーシスを阻害するペプチド(PePD15)をプルキンエ細胞内投与すると、EPSCは徐々に増強した。また別のスライスで、細胞外にNO供与剤(NOR3)を投

与すると、同様にEPSCが増強した。EPSCの立ち上がり・減衰の過程とpaired pulse facilitation ratioは、PePD15とNOR3で誘発されたLTPにおいて、投与の前後に差がないことから、EPSCの増強は後シナプスに由来すると考えられる。次に、プルキンエ細胞内にPePD15を入れて、EPSCの増強が最大に達した後、NOR3を細胞外投与しても、さらなるEPSCの増強は生じなかった。

これらの結果から、NO誘発性LTPは、AMPA型受容体のエンドサイトーシスの阻害によるEPSCの増強と同じメカニズムを共有している。すなわち、小脳の平行線維-プルキンエ細胞シナプスLTPには、AMPA型受容体のリサイクリングが関与していることが示唆される。

(3) ラットカー：ラット運動皮質の神経発火パターンに基づくオンライン車体制御

深山 理, 谷口徳恭, 鈴木隆文, 満洲邦彦 (東京大学 大学院情報理工学系研究科 システム情報学専攻)

本研究では、ラットを搭載し、運動中枢からの神経信号によって制御される車体「ラットカー」の開発を行っている。ラットの脳内には神経電極が刺入されており、覚醒下での神経信号計測が可能である。我々は、この信号と実際の身体動作との相関関係をモデル化することにより、ラットが意図した通りの車体動作の実現を目指している。また、ラットの四肢は車体下部に突き出して地面に軽く触れた状態となっており、視覚情報と併せ、車体動作はラットの感覚系にフィードバックされる。

これまでに我々は、微小ワイヤを用いた電極アレイを製作し、埋め込み手術から数日間にわたる計測技術確立した。ここで計測された神経信号は、ノイズ環境下で複数のニューロンからの発火が入り混じったものであったため、テンプレート発火波形との相関値計算、混合正

規分布を用いた発火弁別を経て、ニューロン毎の発火頻度を算出した。また一方、ベルトコンベアと光学式マーカトラッキングを用い、実際のラット歩行速度および方向変化が、神経信号と同時に計測可能な実験系を構築した。これらの実験系を用い、複数ニューロンの発火頻度パターンと実際の歩行との対応関係を表す線形モデルを仮定し、誤差最小化規範に基づくパラメータ同定、およびラット搭載車のオンライン制御を行った。

現在、これまでに行った歩行推定の解析を通じて、我々のシステムで推定できた運動指令の解釈と、その時間的変化の観察を試みている。本発表では、これまでに実現された車体制御の様子を示し、実験系の発展可能性について考察したい。

(4) 制御系と機構系の連関から創発するモジュラーロボットのアメーバ様ロコモーション

清水正宏, 石黒章夫 (東北大学 大学院工学研究科 電気・通信工学専攻 石黒研究室)

ロボティクス分野では、その形態可変機能に起因する高い環境適応性、拡張性、耐故障性といった優れた特性の発現を期待されているシステムとして、複数の機械ユニット（モジュール）から構成されるモジュラーロボットが注目されている。しかしながら、この分野における国内外の先行研究では、これら優れた特性を実現するモジュラーロボットがどのように設計されるべきかに関しては、依然として知見が得られていない。本研究では、優れた特性を実現するためには制御系、機構系、環境の相互作用ダイナミクスが調和することが重要であるとの観点に立脚し、アメーバ様ロコモーションを示す2次元モジュラーロボット Slimebot の開発を進めてきた。Slimebot を構成するモジュールは、非線形振動子のリズム生成に基づく周期的なアームの伸縮と接地摩擦制御に

より局所的に移動する。物理的に結合したモジュール群においては、互いの非線形振動子の間で引き込み現象が起り、モジュール個々の挙動が群として協調することによりアメーバ様ロコモーションが発現する。ロコモーションを通してモジュール間では着脱が起こるが、この着脱は明示的には制御されず、各モジュールの表面に機能性素材（無極性ペルクロテープ）を実装することで障害物等の外界との物理的干渉に依存するように行われる。以上のようにして、制御系（非線形振動子間の相互引き込み）、機構系（状況依存的なモジュール間着脱）、環境（外界との物理的干渉）の相互作用ダイナミクスが調和することでモジュラーロボットのアメーバ様ロコモーションを実現した。

(5) 受動歩行時における皮膚反射の位相依存性

中島 剛¹, 上林清孝¹, 高橋 真², 小宮山伴与志³, 中澤公孝¹

(¹国立身体障害者リハビリテーションセンター研究所, ²広島大学, ³千葉大学)

体重を部分的に免荷した状況下で麻痺肢である下肢の動作を補助し, 正常な歩容を再現する免荷式歩行トレーニングが歩行機能再獲得に向けたリハビリテーションの主流となりつつある。しかしながらこのトレーニングの主運動である受動歩行運動の脊髄神経機構, 特に律動運動のパターン発生に関わる脊髄神経回路の関与等については不明である。そこで本研究は, ヒトを対象とし, 周期運動との組み合わせにより律動パターン発生に関わる脊髄神経回路の活動性を反映するとされている皮膚反射法を用いて検討した。

被験者は健常成人を対象とした。課題は動力型歩行補助装置(Lokomat)を用い, 受動歩行運動(トレッドミル速度: 2 km/h)を行なった。特に, 今回は自重負荷に関する感覚情報の関与に焦点を絞るため, トレッドミル上でのステッピング(TS)と完全免荷による空中ステッピング(AS)の効果を検討した。皮膚反射は歩行周期を10位相に分割し, 足部神経束(脛骨神経および浅腓骨神

経)に電気刺激(感覚閾値の2倍, 5連発刺激)し, 全波整流した前脛骨筋の筋電図を加算平均することにより誘発した。

その結果, 両神経束刺激時においてTS課題では顕著な歩行位相依存的な皮膚反射の変動が確認された。また, 浅腓骨神経刺激時においては, 歩行位相によって抑制性の反射反応から促通性の反射反応に切り替わる皮膚反射の逆転現象が確認された。

TS時において観察された皮膚反射の歩行位相依存性と反射逆転現象は, ヒト通常歩行においても同様の現象が確認され, 除脳ネコ fictive 歩行においても運動ニューロン細胞内記録から観察されている。これらのことから受動歩行運動に関連した求心性活動, 特に負荷に関連した求心性活動が, 通常歩行時と類似した脊髄神経回路を賦活させ, 受動歩行時においてもヒト律動パターン発生に関わる脊髄神経回路の駆動を一部反映する可能性が考えられた。

(6) 熟練スポーツ動作に見られる巧みな多関節協調メカニズム ～相互作用トルクの利用～

平島雅也(東京大学大学院教育学研究科 日本学術振興会特別研究員(PD))

ヒトの身体運動では, 多数の関節が同時に回転する。このような多関節動作では, 関節回転を引き起こす力学的要因として, ①筋トルク, ②重力トルクだけではなく, ③相互作用トルクも存在する。従来, 相互作用トルクは脳による運動制御を難しくするものと考えられてきたが, 本発表では, 相互作用トルクを積極的に活用する仕組みがあることを投球動作, テニスサーブ, バドミントンスマッシュの分析を通して示す。各スポーツ種目の熟練者および未熟練者の動作をハイスピードビデオカメラで撮影し, 3次元運動データを得た。3次元相互作用トルク分析を行うことによって, 肩内旋, 肘伸展, 手屈曲に貢献する筋トルクと相互作用トルクを計算した。その結

果, 3つすべての関節回転において, 熟練者は相互作用トルクを利用していることがわかった。特に, 肘と手首においては, 相互作用トルクの貢献が顕著であった。一方, 肩では, 筋トルクの貢献の方が大きかった。これらの結果は, 近位部(肩, 体幹)の筋トルクは, 近位部の関節回転を生み出すだけではなく, 遠位部(肘, 手首)の関節回転にも相互作用トルクという形で貢献していることを示している。一方, 未熟練者は, 相互作用トルクを利用できない関節があることがわかった。以上より, 熟練者は, 相互作用トルクが有効に働くように多数の関節を協調させる能力に秀でていることが明らかとなった。

(7) ヒトの受動歩行での皮質脊髄路興奮性に対する荷重の影響

上林清孝¹, 中島 剛¹, 高橋 真², 赤居正美¹, 中澤公孝¹

¹ 国立身体障害者リハビリテーションセンター・研究所・運動機能系障害研究部,
² 広島大学大学院・保健学研究科)

脊髄不全損傷者では、免荷式歩行トレーニングによって歩行機能の再獲得が可能とされ、ニューロリハビリテーションとして昨今注目されている。この歩行訓練は、理学療法士が患者の足をアシストして動かすことで行われているが、近年ロボットによる免荷式動力型歩行補助装置 (Lokomat[®]) が開発され、質的・量的にも安定したトレーニングが可能になった。この補助装置では、コンピュータ制御による駆動力で歩行動作をアシストするため、患者が随意的に動作を行わない場合にもステップング動作が生じる。しかしながら、受動歩行の神経制御メカニズムは明らかでなく、トレーニング効果が生じるのか知られていない。そこで、本研究の目的は、ヒト健常者の Lokomat による受動歩行時に、下肢筋群に対する皮質脊髄路興奮性が変化するか経頭蓋磁気刺激 (TMS)

を用いて調べることであった。脊髄損傷後、歩行様の筋活動が発現するためには、下肢への荷重による求心性入力が必要とされていることから、トレッドミル上でのステップングと免荷による空中でのステップングの荷重が異なった 2 条件で比較を行った。両条件で、大腿直筋、大腿二頭筋、前脛骨筋の筋活動は生じなかったが、運動誘発電位 (MEP) はステップサイクルに依存した変化を示した。特に、前脛骨筋での MEP は空中でのステップングに比べてトレッドミル上でのステップング時に有意な促進がみられた。また、経頭蓋電気刺激によっても同様の MEP 変調が生じた。したがって、受動歩行でも、荷重情報を含めた歩行様の求心性入力によって皮質脊髄路の興奮性増加が生じ、その変調は皮質下での調節によるものと示唆された。

(8) 随意運動における脳の情報生成機構

富田 望 (東北大学・電気通信研究所・矢野研究室)

随意運動は実世界で生物が生存していくために必要不可欠な制御様式である。随意運動はあらかじめ設定した目的を達成する行動であるから、生物は運動目的を満たしつつ環境変化へ対応するために多様な運動パターンを実現しなければならない。そのためには身体系・神経系の冗長性が必要不可欠である。しかしながら、冗長なシステムの制御問題には不良設定性が存在するため、運動パターンを一意に決定するための拘束条件が必要となる。実環境は予測不可能に変化するため、拘束条件もまた環境適応的かつ即応的である必要がある。すなわち、柔軟且つ即応的な随意運動の実現には、冗長制御系に対する拘束条件をリアルタイムに生成することが必要となる。このような考えのもとで、我々は 2 足歩行や腕リーチングを題材として、随意運動に必要な情報の生成機構の解明を目指している。

2 足歩行モデルでは、身体のダイナミックな特性を決定する「筋緊張レベル」を適切に制御することで、運動発現時に身体性を最大限に利用することが可能となった。「筋緊張レベル」は機械受容器からの力情報を元に大脳基底核で設定される。力情報は環境との相互作用によってしか得られないから、「筋緊張レベル」は身体に対してリアルタイムに生成された拘束条件といえる。

腕リーチングモデルでは、自己受容器や視覚系から得られるキネマティクス情報である「手先目標速度」という幾何学拘束を、各関節の運動効率を用いて自律分散的に配分することで環境変化にロバストな運動が実現できる。また、各筋肉のエネルギー効率という動力学的拘束を用いることで、冗長な筋肉系の最適収縮パターンを自律分散的に決定することができる。

(9) 淡蒼球内節ニューロン活動の異常から大脳基底核疾患の病態を考える

橋 吉寿 (自然科学研究機構・生理学研究所・生体システム研究部門)

外界の状況に適した行動を選択し、運動を正確なタイミングで実行することは、我々人間にとって必要不可欠な機能である。これらの行動企画・運動制御には、大脳皮質と共に小脳・大脳基底核・視床といった脳領域が関与している。なかでも、大脳基底核は、その機能異常によりパリスム、パーキンソン病、ジストニアといった運動障害が惹起されることから、運動発現に深く関与していると考えられる。

大脳皮質に端を発する運動情報は、大脳基底核に入力し情報処理された後、視床を介して、再度大脳皮質に戻る事が知られている。これらの回路のなかで、淡蒼球内節は、大脳基底核の出力部に位置し、視床下核からグルタミン酸作動性の興奮性入力を、また、線条体・淡蒼球外節から GABA 作動性の抑制性入力を受けることで、そのニューロン活動は巧妙に制御されている。

これまで、大脳基底核疾患の運動障害に対する病態生

理として、その本質的な要因を、淡蒼球内節ニューロンの発射頻度の増減に求める説 (DeLong, *Trends Neurosci.* 1990) と発射パターンの変化に求める説 (Bergman et al., *Trends Neurosci.* 1998) が提唱されてきた。今回、パリスムやパーキンソン病モデルサルでの淡蒼球内節ニューロン活動を記録したところ、発射頻度の増減に加えて、bursting や oscillation といった淡蒼球内節ニューロンの異常な活動パターンが観察され、これらは視床下核や、線条体あるいは淡蒼球外節から淡蒼球内節への入力の異常に由来するとの結果を得たので報告する。今回示す淡蒼球内節ニューロンの異常な活動パターンによって運動障害の病態生理が説明できるとすれば、大脳基底核疾患に対する脳深部刺激療法 (DBS) の作用メカニズムも、高頻度刺激によって発射パターンを変化させるということでも説明可能であるかもしれない。

(10) マウス脊髄歩行運動神経回路網の研究

西丸広史 (産業技術総合研究所・脳神経情報研究部門・脳遺伝子研究グループ)

歩行運動の際には足のそれぞれの筋が各関節をリズムかつスムーズに曲げ伸ばしすることが重要であるが、それはそれぞれの筋群を支配する脊髄の運動ニューロンがそれぞれ決まったタイミングでリズム的に発火することによって実現されている。このときの運動ニューロンの基本的な発火パターンを形成しているのは脊髄に局在する歩行運動神経回路網である。この回路は外部からのリズム的な入力なしにリズム的な出力パターンを形成することが可能で、このような性質をもつ回路は一般に Central Pattern Generator (CPG; 中枢パターン発生器) と呼ばれている。特に我々ヒトをはじめとする哺乳類では他に呼吸や咀嚼の CPG などが知られているが歩行 CPG も含めて、ほとんどのものでは作動機構は不明である。その一因としてこれまでこれらの神経回路の結合を保った状態で、あらかじめ同定された神経細胞の活動を体系的に測定することが困難であったことが挙げら

れる。私たちは現在、主に遺伝子改変マウスの脊髄摘出標本を用いて歩行運動神経回路網の神経機構を解明することを目指して研究を続けている。最近、私たちは抑制性神経伝達物質 GABA の合成酵素であるグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) のアイソフォーム GAD67 を発現する細胞に蛍光タンパク質 GFP を発現させた GAD67-EGFP ノックインマウスの新生児脊髄摘出標本で GFP 陽性細胞を微分干渉・蛍光顕微鏡を用いて可視下に同定し、ホールセル・パッチクランプ記録を行うことに成功した。これにより、脊髄神経回路網をほぼ正常に保ったままで極めて効率的に抑制性ニューロンのシナプス活動を記録できることを見いだした。今回は、特にこの標本を用いて運動ニューロンと反動的に結合していることが知られている Renshaw 細胞から記録を行い、歩行運動リズム活動の際の発火パターンやシナプス入力を調べた結果を報告する。

(11) 種々の遺伝子変異マウスを用いた小脳性歩行失調の解析と歩行の適応制御における小脳の役割

柳原 大 (東京大学・大学院総合文化研究科・生命環境科学系)

小脳変性疾患における歩行失調を種々の遺伝子変異マウスを用いて調べている。例として、脊髄小脳変性症 3 型遺伝子変異マウスにおいては、ヒトにおける同疾患と同様に重篤な歩行障害が観察され、マウスにおいては後肢の intralimb coordination の異常として顕著に観察される。小脳はまた、そのシナプス可塑性を利用して、歩

行の適応制御に貢献している。ここでは、 $\delta 2$ 型グルタミン酸受容体、代謝型グルタミン酸受容体 1 型の歩行制御における寄与について簡単に紹介する。時間があれば、登上線維系入力のパルキンエ細胞の神経活動ならびに歩行制御における役割についても紹介する。

(12) 霊長類の大脳皮質における歩行制御機序

中岡克己 (近畿大学医学部 生理学第一講座)

歩行運動において、四肢のリズム運動および体幹の姿勢を制御する基本的な神経機構は脳幹および脊髄内に分散的に配置される。サルの大脳皮質に存在する複数の運動関連領域は、脳幹・脊髄に対して直接投射する。皮質網様体路細胞と皮質脊髄路細胞の皮質内分布様式が領野間において異なることを考慮すると、各皮質領域が歩行にかかわる基本的な脳幹-脊髄神経機構を分担的に制御することが推察される。本研究の目的はサル大脳皮質運動領野における歩行運動の分担制御機序の解明である。そのために流れベルトの上を無拘束の状態で行くサル

の一次運動野および補足運動野から記録された神経細胞は、歩行周期に一致した相動的な活動様式を示した。またこれらの細胞の多くは、歩行速度の増加に対して発射頻度を増加させた。一方補足運動野の体幹・下肢領域から記録された神経細胞の多くは、持続的或いは持続的かつ相動的な活動様式を示した。以上の結果から、歩行運動においてサルの一次運動野は脊髄リズム生成神経回路網の出力を直接的/間接的に制御する、補足運動野は運動に伴う体幹の姿勢を制御する可能性が示唆された。

(13) 脳幹・脊髄と筋緊張の制御

高草木薫 (旭川医科大学・生理学・神経機能分野)

適切に運動を実行するためには、各々の骨格筋の緊張力(筋緊張)が適切に維持されていることが必要である。筋緊張の異常は様々な神経疾患で観察される。例えば、基底核疾患の一つであるパーキンソン病では伸筋と屈筋とに持続的な筋緊張の亢進状態(筋固縮)が誘発される。一方、小脳の障害では伸筋と屈筋の筋緊張は低下する場合が多い。また錐体路の障害では、上肢は屈筋、下肢は伸筋の筋緊張が亢進する(痙縮)。そして、これらの疾患の病態を理解するためには、「筋緊張はどのような神経

機構により制御されるのか？」という基本的な問題を解決する必要がある。筋緊張を制御する基本的な神経機構は脳幹と脊髄に存在する。

20 年以上に渡る「筋緊張を制御する脳幹と脊髄の神経機構」についての研究により、主に、次の 2 点が明らかとなった。1. 脳幹と脊髄には四肢の筋緊張を低下させる網様体脊髄路系が存在する。2. この網様体脊髄路系は、Rexed VII 層に存在する脊髄介在細胞を介して、①伸筋或は屈筋を支配する脊髄 α 運動細胞の興奮性をシナプス

後抑制機序により調節する。②Ia 反射, Ib 反射, 屈曲反射, 反回抑制などの脊髄反射を媒介する介在細胞群の活動をシナプス後抑制機序により調節する。③一次求心性神経線維の興奮性をシナプス前抑制機序により調節する。即ち, この網様体脊髄路系は, 脊髄反射弓の入力部(一次求心性線維), 統合部(介在細胞), そして出力部(運動細胞)の興奮性を並列的に制御することにより, 筋

緊張レベルを調節すると考えられる。

運動に適切な筋緊張レベルは, 大脳皮質, 大脳基底核, そして, 小脳の出力が脳幹や脊髄の神経回路網の活動を介して提供される。従って, 「筋緊張」とは「運動の実行に必要な脊髄反射弓の Background excitability」と言い換えることができる。

(14) 末梢神経信号における求心性感覚神経情報と遠心性運動神経情報の分離手法

伊藤孝佑, 鈴木隆文, 満渕邦彦

(東京大学 大学院 情報理工学系研究科 システム情報学専攻)

上肢切断患者の上肢運動機能を代行する義手はその入力情報として, 従来筋電信号が用いられてきたが, 損傷の程度により対象部位の筋自体が失われる事もある。こうした場合の解決策として, 末梢の運動神経の情報そのものを利用した義手が考えられる。しかし末梢神経は感覚神経情報を含む求心性信号と運動神経情報を担っている遠心性信号が混在している為, 運動情報を抽出するには遠心性信号のみを選択的に取得する事が望まれる。

そこで我々は, 遠心性信号と求心性信号が混在する末

梢神経信号を伝播方向別に分離する事を試みている。末梢神経の走行方向に複数の電極を配置し, 神経信号を取得する場合, 各電極における信号の間には伝播遅延が発生する。この遅延が伝播方向により異なる事を利用して, 各電極で計測される信号から伝播遅延を推定し, 伝播方向別に信号を弁別するアルゴリズムを考案した。

本発表では, 本手法の詳細及び実際にラットの坐骨神経から取得したデータに対し本手法を適用し, 得られた結果について報告する。

(15) 動き易さの指標を用いた自律的な随意運動制御

吉原佑器, 富田望, 牧野悌也, 矢野雅文 (東北大学・電気通信研究所・矢野研究室)

生物が運動を行う際, その運動学と動力学は, 外部環境や生体システム自身の内部的な性質の変化に伴って常に変動するが, 生体システムは運動パターンを環境適応的に柔軟に変えながら, 様々な目的を達成することができる。これまで生体の運動制御は, システムの運動学と動力学の学習, 運動軌道の計画, 運動実行という逐次的なプロセスをとると考えられてきた。しかし, 学習が本質的に困難な動的な変化が起こった場合, どのように生体システムがリアルタイムに適応し, 運動目的を達成しているのかについては良く分かっていない。近年, 生物の運動実行は逐次的計算プロセスの結果として現れるのではなく, 運動実行そのものが認知や制御に重要な役割を果たしているという仮説が提案され, 歩行制御のモデ

ルによって実証されてきた。しかし随意性の高い運動に対する実証的検証はまだ行われていない。我々は, 腕到達運動を対象とし, この仮説の計算論的実装を行った。ここでは, 腕の各関節を自律分散化した要素とみなし, 各関節は瞬時の動き易さを評価しながら, これをよりよくするように相互作用を行う。本モデルを水平面で3関節を持つ冗長腕の腕到達運動制御に適用した結果, 運動途中の突発的な関節の故障に運動パターンを自律的に変化させて対応できることが分かった。また, 人間の腕到達運動の特徴を良く再現するトルク変化最小モデル(Uno, et al. 1989)との比較を行ったところ, 提案モデルのトルク変化の総和は理論的最小値と比較できる程度に小さく抑えられた。これらの結果は, 生体システムが随意

運動を行う際、環境への適応性を得る上で、運動実行を主体とする制御が有効に機能することを示唆していた。

(16) 手首運動を利用した定量的運動機能検査システムの構築

李 鍾昊, 笥 慎治 (東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・認知行動研究部門)

本研究の目的は、臨床の現場で簡便に使える定量的な運動機能検査システムを構築し、種々の神経疾患における運動機能を定量的に把握できる方法を確立することにある。特に、我々は各種神経疾患の異常運動とそれをもたらす筋活動の異常を同定し、異常運動の **agonist selection** から病的運動の脳内メカニズムを解明することを試みた。実験タスクとして、被験者は8方向運動、追跡運動などさまざまな手首運動を行い、その際2自由度の手首関節の動きと手首運動に関わる4個の主動筋 (Extensor Carpi Radialis (ECR), Extensor Carpi Ulnaris (ECU), Flexor Carpi Ulnaris (FCU), Flexor Carpi Radialis (FCR)) の活動を同時記録した。まず、手首の運動方程式から運動の際の手首のトルクを計算し、次いでその手首トルクを4個の筋活動の線形和で最適近似した。その結

果、手首のトルクと4個の筋活動の線形和の間には極めて高い相関(相関係数0.9)があることが明らかになった。この結果は、我々が記録した4個の筋活動の中に、手首の位置・速度・加速を説明する十分な情報が含まれていることを示しており、神経疾患における個々の異常運動を個々の筋活動の異常に還元できることを意味する。このことから、この方法により正常運動における **agonist selection** と異常運動におけるそれとを定量的に比較し、その違いから異常運動生成の中枢機序を推定できると考えられる。われわれは現在、このシステムおよび方法を用いて東京都立神経病院の入院患者を対象に、脊髄小脳変性症、パーキンソン病等の疾患における異常運動を解析中である。

(17) 下肢麻痺者の歩行補助ロボットにおけるセンサ・制御系開発

香川高弘, 宇野洋二 (名古屋大学大学院・工学研究科・機械理工学専攻)

対麻痺者のADLを改善することを目的として、歩行再建に関する研究が盛んに行われている。ユーザー自身の随意制御と歩行再建システムのコントローラの協調を実現するためには、ユーザーの意図に従って歩幅を制御することが重要である。ユーザーの意図する歩幅は先行する腕運動における移動距離と等しいことを仮定して、我々は腕の移動距離を加速度センサにより推定するヒューマンインタフェースを構築した。ヒトの腕運動をよく再現する滑らかさの規範に基づいて、腕運動の移動距離は始点と終点の境界条件と多項式近似によって加速度データから推定される。歩行補助ロボットの制御では、推定された移動距離と歩幅が等しくなるように左右の股関節、膝関節、足関節の角度が制御される。

本研究では、加速度センサによる移動距離の推定精度と歩行補助ロボットの制御システムの動作検証実験につ

いて報告する。移動距離の推定精度の検証実験では、腕運動中の手先の位置と加速度が計測された。腕運動の加速度データに対して、単純な2回積分による推定と5次、7次、9次の多項式近似による推定を比較した。推定精度は計測された移動距離と推定された移動距離の間の回帰分析によって評価された。実験の結果、単純積分と5次多項式近似による推定と比較して、7次および9次の多項式近似による方法が高い線形性を示し、実際の移動距離とよく一致した。加えて、7次多項式による移動距離推定を用いたヒューマンインタフェースを歩行補助ロボットの制御系に実装し、健康者による動作試験を行った。その結果、腕の移動距離を調整することによって、歩幅を制御することが可能であることが確認できた。これらの結果は、提案するヒューマンインタフェースが対麻痺者の歩行再建に有用であることを示唆する。

(18) 脳波筋電図コヒーレンスと筋力調節能

牛場潤一, 正門由久 (慶應義塾大学理工学部生命情報学科)

ヒトの運動制御機構を知るためには、神経筋系に対して一過性の刺激を与えてその応答を計測する、いわばインパルス応答を基にした機能定量が一般的であった。しかしこの10年の間に、ヒトが自然な状態で運動を遂行しているときの皮質脊髄路活動を定量する脳波筋電図コヒーレンス解析が確立されつつあり、これまでの電気生理学に新たな視点を与える方法論として注目が集まっている。脳波筋電図コヒーレンスとは、随意運動中の筋放電が運動皮質近傍から導出した脳波と相関関係にあることを周波数領域で定量する手法であり、両信号の位相関係を求めたり、システム同定をおこなった上で入出力関係の合理性を検証したりする事で、因果関係をも推定することが可能である。このように脳波筋電図コヒーレンスは、運動皮質の筋駆動様式を非侵襲的に推し量るツールとして興味深い手法であるが、コヒーレンスの程度には大きな個人差が認められることから、その機能的意義に

関する議論が必要とされていた。そこで我々は、若年層健常成人15名を対象として、等尺性収縮における発揮筋張力の安定性との関係について検討をおこなった。実験では被験筋を右前脛骨筋として表面筋電図を計測し、60sのあいだ最大随意収縮力の30%で背屈し続けるよう指示した。このとき運動皮質足部領域に近い頭頂部から脳波を計測した。解析の結果、脳波筋電図コヒーレンスの値が高い被験者ほど、脳波および表面筋電図が15-30 Hz帯域で同期的に強く律動し、その律動にあわせて発揮背屈力も大きく変動していた。コヒーレンス値と発揮筋張力の変動係数の間には有意な相関が認められたことから、運動皮質が筋を駆動する際に錐体路ニューロン群が強い同期活動を呈する被験者ほど、筋力調節の安定性が低いことが示された。このことから脳波筋電図コヒーレンスは、筋収縮中の発揮筋張力安定性を規定する神経活動を定量できる方法であると思われる。

(19) 視線移動を指標とするマウス行動実験課題の開発、あるいは脳内多点電気刺激によるブレイン・プログラミングについて

坂谷智也 (自然科学研究機構・生理学研究所・認知行動発達機構研究部門)

マウスをもちいた *in vivo* での神経生理学的研究基盤の開発は、遺伝子工学技術によりハードとしての神経回路の特性を改変することでソフトとしての正常脳の動作原理を解明する、あるいは行動異常マウス・精神疾患モデルマウスから具体的な神経メカニズムを明らかにする上で極めて重要である。一般に、神経活動と行動・運動制御との関連を明らかにするためには、神経活動の時間解像度(ミリ秒)に近いオーダーで行動を計測・評価することが望まれる。

私はこれまでに、マウスの随意運動を定量的・高精度に評価することを目的に、高速度カメラによる視線移動(サッケード)測定システムを開発し、マウスにおけるサッケードの特性について調べてきた。

今後さらにサッケードの制御やそれに付随する脳機

能と、神経発火活動とを関連づける上で、計測・評価に加えてトレーニングによる動物行動の人為的制御が課題となる。

サッケードは中脳上丘が出力・制御中枢と考えられており、実際マウスにおいても中脳上丘を電気刺激することで人工的なサッケードの誘発に成功した。中脳上丘は特徴的な層構造をもっており、網膜からの入力に直接投射している視覚入力層と、サッケード出力層が上下に対応する形で存在し、感覚入力・運動出力をあわせもつ。視線移動を指標とするマウス行動実験課題の開発を目的に、脳内報酬系の活性化や、中脳上丘の特徴的な構造を利用した感覚入力・運動出力の誘発などを組み合わせた脳内多点電気刺激による行動プログラミング(ブレイン・プログラミング)の可能性について紹介する。

(20) 歩行及び筋緊張調節機構に対するオレキシン入力役割

高橋和巴¹, 高草木薫², 児玉 亨³, 香山雪彦¹, 小山純正⁴

(¹福島県立医科大学・医学部・神経生理学講座, ²旭川医科大学・医学部,

³東京都神経総合科学研究所・心理学部門, ⁴福島大学・共生システム理工学類)

脚橋被蓋核 (PPN) のアセチルコリン (ACh) ニューロンは逆説睡眠 (レム睡眠) 中の筋緊張の消失 (muscle atonia) を起こす。この ACh ニューロンは、黒質網様部 (SNr) の GABA ニューロンによって抑制性の制御を受けている。視床下部外側部に局在するオレキシン (Orexin) ニューロンは、SNr と PPN のいずれに対しても投射しているが、Orexin ニューロンの活動が筋緊張にどのような影響を及ぼすのかは不明である。また、Orexin ニューロンは歩行運動を制御する中脳歩行領域 (MLR) にも投射が知られている。さらに、睡眠障害の一つであるナルコレプシーでは、Orexin 系の障害によって情動性脱力発作 (カタブレキシー) が起こることから、Orexin ニューロンが muscle atonia と歩行運動の制御に関与していると考えられる。本研究では、除脳したネコの SNr, PPN, MLR に Orexin

を微量注入し、歩行運動及び、後肢の筋緊張に対する影響を調べた。Orexin A (60~500 μ M, 0.25 μ l) を MLR に注入すると、トレッドミル上での歩行を誘発する MLR への電気刺激の閾値強度が下がるか、電気刺激をしなくても歩行を発現した。これに対し、Orexin A (60~1000 μ M, 0.25 μ l) を PPN あるいは SNr に注入すると、muscle atonia を誘発する PPN への電気刺激の閾値強度は上昇した。この効果は、GABA_A 拮抗薬である bicuculline (1mM, 0.25 μ l) を PPN に注入することで打ち消された。これらの結果は、SNr と PPN への Orexin 入力が、PPN の ACh ニューロンに対する GABA の効果を増強し muscle atonia を抑制する一方で、MLR への Orexin 入力は興奮性に作用し、歩行運動を維持していることを示している。

(21) 3次元精密筋骨格モデルに基づくニホンザル2足・4足歩行の運動解析

荻原直道 (京都大学・大学院理学研究科・動物学教室・自然人類学研究室)

動物は、冗長で複雑な筋骨格構造を巧みに協調させ、多様な環境に適応的な歩行運動を生成することができる。こうした動物の優れた歩行生成知能の解明に向け、ニホンザルの2足・4足運動を対象とした歩行の構成論的研究を開始した。ニホンザルの筋骨格系は、CT 撮影および屍体解剖により取得した解剖学的情報を元にモデ

ル化した。構築したモデルを用いて、実歩行計測データの生体力学的分析と、神経制御系の数理モデルを統合した順動力学的な歩行生成シミュレーションを行うことにより、身体筋骨格系、神経系、環境の秩序だった力学的相互作用の中から発現すると予想される適応的歩行運動の生成メカニズムの理解を目指す。

(22) 随意運動を支える前頭葉内ネットワーク

星 英司, 丹治 順 (玉川大学・脳科学研究所)

随意運動を実現させる過程で、前頭葉が中心的な役割を果たしているが、これはネットワークを形成している複数の領野から構成されていることが明らかとなってきた。本研究では、前頭葉内の各領野の機能的特長を明ら

かにするために、行動課題を遂行している被験体 (サル) から神経細胞活動を記録した。この課題では、使用する手の指示と標的の位置に関する指示が、この順、または、逆の順に与えられた。従って、動作に関連した情報を収

集し統合する動作企画の過程と、企画された動作を準備・実行する過程を区別して検討することができた。

結果として、前頭葉には多彩な細胞活動が見出されたが、これらは4つのグループに分類できることが明らかとなった。第一グループの活動は、使用する手、または、到達する標的位置に関する情報を選択的に収集し、これらを統合していた。即ち、到達運動の企画過程を反映していた。第二グループの活動は、視覚刺激の位置や到達する標的位置を選択的に反映しており、視覚空間情報を反映していた。第三グループの活動は、動作遂行に伴ってみられ、手を伸ばすという実際の動作を反映していた。第四グループの活動は、指示や動作の内容ではなく、動作の遂行に向かって課題の進行を反映していた。

これらの細胞活動の分布を前頭葉内で纏めたところ、

各グループの活動はある特定の領野に選択的に見出されることが明らかとなった。第一グループの活動は、前頭前野と運動前野の背側部に、第二グループの活動は、前頭前野と運動前野の腹側部に見出された。また、前補足運動野には第一と第二グループ両方の活動が見出された。第三グループの活動は、前頭葉の後部領域（一次運動野、補足運動野、運動前野）に、また、第四グループの活動は帯状皮質運動野の吻側部に見出された。これらの結果を前頭葉内の解剖学的ネットワークと比較してみたところ、皮質-皮質間結合で結ばれている領野同士に類似した細胞活動が見出されることが明らかとなった。以上の結果は、前頭葉には構造的基盤によって支えられた複数の機能的ネットワークがあることを示している。

(23) 経頭蓋磁気刺激と磁気共鳴機能画像同時計測による誘発脳領域間連関画像法の基礎的検討

花川 隆 (国立精神・神経センター・神経研究所・疾病研究第七部)

磁気共鳴機能画像 (fMRI) と経頭蓋磁気刺激 (TMS) の同時施行が可能となり、刺激部位と解剖学的に連絡のある脳部位を画像化する方法 (誘発脳領域間連関画像) として注目されている。しかし、磁気刺激の刺激強度が、直接刺激される脳部位や遠隔部位の活動にどのように影響するのかを詳細に検討した報告はない。今回、15人の右利き健康被験者において、運動野出力を反映する運動誘発電位 (MEP) の同時計測を行いながら、磁気刺激が直接・遠隔部位脳活動に与える刺激強度依存性の影響を検討した。3テスラ MRI スキャナ上で、MRI 用 8 の字 TMS コイルを、専用器具にて被験者の頭皮に軽く触れる程度に固定し、拇指球筋からの MEP を測定するため筋電図の同時記録を行った。fMRI は脳波の同時測定を目的に開発されたエコープランナー撮像法を用いて行い、一回の

fMRI セッション中に、一定強度の TMS 刺激を 2-3TR 毎 (約 0.15 Hz) に、計 20 回与えた。TMS 刺激強度は機械出力の 30-110% の間でセッション毎に変化させた。信号変化は機械出力あるいは MEP 振幅の関数として検討した。最大 TMS 刺激により、一次運動野に相当する中心前回を含め、高次運動皮質、聴覚野、基底核などに活動上昇が認められた。刺激に伴うクリック音の検知に関与する一次聴覚野では刺激強度に対応して線形の信号変化を認めたが、一次運動野や他の運動関連領域においては非線形な信号変化を呈した。誘発脳領域間連関研究における活動の解釈のため、信号の経時的変化を含めた、さらに詳細な基礎的検討が必要を行っているところである。

(24) 多機能柔軟神経電極の開発と BMI への応用

鈴木隆文*, 竹内昌治**, 満洲邦彦* (*東京大学大学院情報理工学系研究科, **東京大学生産技術研究所)

生体の神経系と人工機器との間で直接の情報入出力を行う Brain-Machine Interface システムの開発が国内外

で活発に行われ、義手などの機器の神経情報による制御、あるいは人工感覚生成への期待が高まっている。こうし

たシステムの実現には、神経系に対する多チャンネルかつ長期間安定した信号入出力が可能な神経プローブの開発が不可欠である。我々は主に柔軟な高分子材料であるパリレンCを基板として、様々なアプローチからこうした課題に取り組んで来たので紹介する。

一つは従来シリコンで開発されてきた神経プローブ針の、パリレンによる柔軟化の取り組みである。柔軟なプローブはその刺入方法が課題となるが、我々はポリエチレングリコール(PEG)でコートすることで刺入時には固く、刺入後には再び柔軟にする方法を提案した。さらに神経プローブの多機能化への取り組みの一つとして、微細な流路構造の神経プローブへの統合を行った。これによって薬液注入やサンプリングと神経信号の計測が統合化され、BMIシステムとの接続後の可塑性の観

察、あるいはその制御のためにも重要なツールとなることを期待している。また上述のPEGを流路内に注入することでコート法よりも良好な再現性を得た。こうした流路構造の別の応用として、末梢神経の再生能力を利用した神経再生型電極への応用についても紹介する。末梢神経系を接続対象とすると中枢神経系の場合に比べて、万が一の事故の影響が限局的になり得る上、計測した神経信号の解釈もより容易であることが期待できる。本プローブは複数の電極を内部に備えた多数微細流路を束にした構造である。各流路には薬液を注入することが可能であり、軸索再生の促進・誘導を図ることを検討している。こうした多機能型の神経プローブはBMIだけでなく脳科学のツールとしての意義も大きいと考えられるため、こうした観点からの議論も期待したい。

(25) 神経科学とリハビリテーション医学—今後の展望—

大須理英子 (独立行政法人情報通信研究機構/株式会社国際電気通信基礎技術研究所脳情報研究所)

大高洋平 (東京湾岸リハビリテーション病院)

神経科学研究の進展と脳機能イメージング研究の蓄積により、人間の脳機能の様々な側面が明らかになりつつある。一方、リハビリテーションの現場でも、このような基礎研究の成果を活かした、神経リハビリテーションへの期待が大きい。しかし、実際には、基礎研究現場と臨床現場にあるギャップは大きく、真の意味で神経科学の成果がリハビリテーションに生かされているとはいえない。リハビリテーションの現場では、脳画像よりも実際に現れた機能障害症状に基づいて訓練を処方することに重きが置かれており、その背景には、損傷部位から予測される機能障害と実際に現れる機能障害は一致しないという暗黙の了解がある。本発表では、リハビリテ

ーションを計算論的観点から理解するため、その現場を長期的に訪問し、特に脳卒中による運動機能障害について、臨床と研究の現状と今後の展望を検討した結果を報告する。機能回復においては、「痙縮」のコントロールが重要であること、にもかかわらず、痙縮の発生機序や損傷部位とのかかわり、さらには健常時のインピーダンス制御とのかかわりは明らかになっていないこと、さらに、発生確率が高く、重篤な片麻痺および痙縮を起こすのは内包や被殻周辺の損傷であることが多いこと、しかし、内包や被殻周辺の損傷については、十分にコントロールされたサルによる損傷回復実験が実施されていないこと、といった点を議論する。

(26) 軌道計画を必要としない運動制御モデル

小池康晴 (東京工業大学)

Bizziの終端位置制御仮説を否定する実験以来、仮想軌道制御仮説のように、運動軌道をあらかじめ計画してから実行する様々な計算論的モデルが提案されている。し

かし、どのモデルも運動時間をあらかじめ決めなければ最適な運動軌道を計算できないモデルであり、どれだけの情報を用いて軌道を計画しているのかという簡単なこ

とさえも分かっていない。また、実際の脳が本当に最適な軌道を毎回計画しているかは定かではない。

我々は、運動学習により内部モデルを獲得し、獲得した内部モデルを用いて、軌道計画をしなくても2点間到達運動が実現できるモデルを提案している。本発表では、

運動の滑らかさがどうして実現されるのか、また、軌道を計画しないでどのように運動を実現するのか、さらには、力の制御も同じモデルを用いて実現できることを示し、運動計画とは何かを計算機シミュレーションの結果と実際の人の軌道データを比較しながら議論する。

(27) 大脳皮質運動領野への低強度高頻度経頭蓋磁気刺激による手の運動技能低下克服の試み

内藤栄一^{1,2}, 大内田裕², 越野八重美³, 大高洋平⁴, 大須理英子^{1,2,5}

(¹独立行政法人 情報通信研究機構 未来 ICT 研究センター バイオ ICT グループ 計算神経サブグループ, ²ATR 脳情報研究所, ³大阪大学大学院医学系研究科 総合ヘルスプロモーション科学講座, ⁴東京湾岸リハビリテーション病院, ⁵慶應義塾大学医学部リハビリテーション医学教室)

ヒトの運動機能は低下する。例えば、加齢など長期間で起こる機能低下もあれば、我々が日常経験する短時間で集中的に運動を行った場合の一時的な機能低下もある。近年、大脳皮質感覚-運動領への電気および磁気刺激がヒトの感覚-運動機能を向上させることが明らかになりつつあるが、これに基づき、運動領野への低強度高頻度経頭蓋磁気刺激が手運動技能の一時的な低下を克服できるかを検証した。

7名の健常被験者が掌で二つの球を回す。6秒の休憩をはさんで10秒間できるだけ多く回すことが要求され、1条件で70試行が繰り返された。便宜的に10施行毎を1セッションとし、2および5セッションのみで運動閾80%、20Hzの磁気刺激が運動開始直前の2秒間に与えられた。先行研究より運動前野の活動がこの運動の技能向上と関係することがわかっている。そこで、手と反対側運動前野(hot spotの約2cm前方)への磁気刺激の効果を検討した(運動前野条件)。統制条件では反対側感覚領野(hot spotの約3cm後方)が刺激された。

刺激はいずれの被験者にも有害な効果を及ぼさなく、不随意運動の誘発や運動障害も観察されなかった。実験に先行した十分な練習により実験開始時には回転数が安定していた。統制条件では、セッション数が増えるにつれ、参加者は次第に手の疲れを覚え、平均回転数が減少した。これに対して、運動前野条件では、2および5セッションで、統制条件でみられた回転数低下の有意な改善が認められた。この効果は特にセッション5で顕著になり($p < 0.0005$)、左右の手で観察された。この効果は1名の参加者では明瞭でなかったが、4名は運動前野刺激に関連して手が軽くなる、手指が円滑に動くなどの主観を経験した。

磁気刺激に伴う運動改善を裏付ける脳内神経機序に関しては不明な点が多いが、本研究は大脳皮質運動領野への非侵襲的磁気刺激が、内因性の生理学的変化による時間依存性運動機能低下の克服に効果的である可能性を示した。

(28) 眼球反射の適応の運動記憶の固定化に対する小脳皮質不活性化の影響

岡本武人^{1,2}, 白尾智明¹, 永雄総一² (¹群馬大・院・高次細胞機能 ²理研・脳センター・運動学習制御)

運動学習の記憶の形成と保持に、小脳は必須である。私達は、水平性視機性眼球反応(HOKR)の適応のパラダイムを用いて、運動記憶の固定化の神経機構を調べた。マウスに1時間、チェック模様のスクリーンの正弦波状

の高速回転による視覚訓練を行うと、適応が生じHOKRの利得が増加する(短期適応)。さらに、1日1時間の視覚訓練を4日間続けるとHOKRの利得に長期適応が生じる。長期適応が生じたマウスの両側小脳片葉の出力を薬

理的に遮断すると、4日目の訓練により生じた短期適応は消失したが、4日間の訓練で形成された長期適応は影響を受けなかった (Shutoh et al., 2006)。この結果は、運動学習の記憶痕跡が、訓練の時間経過に依存して、小脳皮質から前庭核へ転移し固定化されることを示唆する。本研究では、訓練期間のどの時期で記憶痕跡の固定化が生じるかを、ムシモールによる小脳皮質の不活性化の実験により調べた。以下の4実験群のB6マウスを用いた。①群には4日間毎日1時間の訓練を行い、訓練直

後にイソフルランによるガス麻酔を20分間行った。②群には毎日の訓練直後にガス麻酔下、両側片葉にムシモール(0.25%, 0.2 μ l)を投与した。③群には毎日の訓練直後にガス麻酔下、両側片葉に同量のリンゲル液を投与した。④群には訓練をせずに、毎日ガス麻酔下、両側片葉にムシモールを投与した。①と③群には長期適応が生じたが、②と④群には長期適応は生じなかった。これらの結果は、訓練直後の数時間の間に、小脳皮質の神経活動に依存して運動記憶の固定化が生じることを示唆する。

(29) 運動記憶の獲得と固定化に関与する小脳皮質由来の遺伝子群の同定

片桐友二^{1,2}, 柳原 大², 永雄総一¹

(¹ 理研 BSI・運動学習制御, ² 東大院・総合文化・生命環境・運動適応)

運動記憶の獲得と固定化に、小脳は重要な役割を演じる。マウスの水平視機性眼球反応(HOKR)の短期と長期適応を用いた先行研究により、運動記憶の獲得の場が小脳皮質(片葉)であるのに対して、長期記憶への固定化の場は皮質の出力先の前庭核であることと、記憶の獲得と固定化には、ともにプルキンエ細胞のシナプス伝達可塑性の長期抑圧(LTD)が必須であることが報告されている(Shutoh et al. 2006)。これらの所見は、小脳皮質に生じたシナプス伝達の変化が、経シナプスの何らかの影響を前庭核に与える可能性を示唆する。LTDを含むシナプス伝達の可塑的变化に遺伝子発現の変化が伴うことが知られている。本研究では、HOKRに短期または長期の適応が生じたマウスの片葉プルキンエ細胞で、適応の運動

記憶の形成に相関して発現が修飾される遺伝子群を検索した。まず、マウスの小脳皮質全域から、レーザーマイクロダイセクションを用いてプルキンエ細胞層と顆粒細胞層を切り出し、両細胞層からRNAを抽出した。RNAをマイクロアレイ(GeneChip, Affymetrix)解析し、プルキンエ細胞に特徴的な遺伝子を2000-4000個同定した。次に、HOKRの短期適応と長期適応が生じた実験群と対照群のマウスから抽出した片葉と傍片葉のブロックからそれぞれRNAを抽出し、GeneChipによって遺伝子発現のパターンを比較した。これらの実験結果から、HOKRの適応における運動記憶の獲得および固定化に相関して、片葉のプルキンエ細胞ではそれぞれ90-160個程度の遺伝子の発現が修飾されると推定した。

(30) 頭頂葉の視覚-触覚バイモーダルニューロンによる自己と他者身体部位の表現

石田裕昭, 村田 哲 (近畿大学医学部 第一生理学講座)

他個体の行為やその意図を認識する能力は、霊長類の生存にとって重要である。この認知の脳内表現には、自己身体の表象と他者の身体像を脳内でマッチングするという仮説が提案されている。サルの脳では下頭頂小葉(7b)や頭頂間溝底部(VIP)で、視覚と体性感覚情報の両方に反応するバイモーダルニューロンが記録でき、こうしたニューロンが自己身体とその周辺空間の認識に関与

していることが知られている。そこでわれわれは、これらの領域の視覚-触覚バイモーダルニューロンの中から他者の身体周辺空間の表象に関わるニューロンを探索した。まず触覚と視覚刺激に反応するニューロンを探索し、受容野の広がり調べた。次にサルの前に実験者が対面し、サルの身体部位上にある受容野の位置と同じ実験者の身体部位を、実験者自身が触るか、第三者に触られて

いるところをサルに観察させ、その時の単一ニューロンの活動を記録した。その結果、サルの身体付近に受容野を持つVIP野や7b野のニューロンのいくつかは、サルの身体上の受容野の位置に対応する実験者の身体部位への視覚刺激に反応した。たとえば、サルの受容野が右頬にある場合、実験者が右頬を触るか、第三者が実験者の右頬付近に視覚刺激を提示したときに反応し、左頬では反応が弱まった。このようにサルと実験者の受容野はミ

ライメージに空間的配置するニューロンが多かった。さらに興味深いことにこれらのニューロンの視覚反応は、サルとヒトの身体周辺(~50cm)で強まり、両者間の空間上に刺激を提示したときは弱まった。本研究の結果は予備的だが、頭頂葉の視覚-触覚バイモーダルニューロンが自己と他者の身体部位とその周辺の空間情報を同時に処理している可能性を明らかにした。

(31) 空間位置と報酬に基づく補足眼野のニューロン活動

内田雄介, 陸曉峰, 大前彰吾, 高橋俊光, 北澤茂 (順天堂大学大学院医学研究科神経生理学)

補足眼野は重要な大脳皮質眼球運動関連領野のひとつであり、その活動は視覚目標の位置や眼球運動の方向などの運動方向依存性をもつことが知られている。一方、最近の研究では、報酬依存性の活動を示すことも報告されている (Amador et al., 2000; Roesch and Olson, 2005)。本研究では、補足眼野の報酬依存性の活動が運動の空間的パラメータの修飾を受けるかどうかを調べた。2頭のニホンサルを用いて、サッケード眼球運動課題を行わせた。45度ずつ8方向からランダムに選択、呈示された視覚刺激に対して中心点からサッケードを行わせ、正しく課題を遂行した場合には、報酬を与えた。報酬の量は16試行

ごとに切り替えた (基本量または倍量)。この課題遂行中の補足眼野の活動を単一微小電極によって記録し、ニューロン活動の性質を調べた。その結果、補足眼野の約4割のニューロンが報酬期間の活動を示した。また、その内の約7割が方向依存性を持つ活動を示した。これら運動方向選択的に報酬期間応答を示すニューロンのおよそ6割は報酬量と相関する応答を示した。これらの運動方向選択的に報酬量に応じた報酬期間応答を示すニューロン群は、それぞれの運動の価値を表現している可能性がある。

(32) 補足眼野・前頭眼野の神経活動に基づく眼球運動の開始時刻・振幅・方向の推定

大前彰吾, 陸曉峰, 内田雄介, 高橋俊光, 北澤茂 (順天堂大学大学院医学研究科神経生理学)

補足眼野と前頭眼野の脳表に露出した領域は、マルチ電極を埋め込んで眼球運動の意思を取り出す標的として理想的である。本研究では、それらの神経活動から眼球運動の開始時刻・振幅・方向を推定した。2頭のサルに、モニタの中央の固視点から8方向と2振幅の位置にある16箇所の標的へ固視点が消えた直後にサッケードするように訓練した。単一電極を用い、1頭の右補足眼野から115個、もう1頭の左補足眼野から120個、左前頭眼野から54個得た。これを用い擬似同時記録データを作成した。更に2つのマルチ電極を両側の補足眼野に埋め込こんで27個の神経細胞の同時記録データを得た。記録し

た試行の50-65%を学習試行として300msの発火頻度のテンプレートを作成し、残りの試行をテスト試行とした。テスト試行の300msの発火頻度をテンプレートにマッチングさせて眼球運動の開始時刻・方向・振幅を推定した。最初に、擬似同時記録データから一定の推定精度に必要な細胞数を見積もった。右補足眼野115個を用いた推定では、運動開始時刻の正解率 (誤差100ms以内) は97%、運動標的の正解率 (16標的のうち1つ) は48%となった。115個からランダムに30個を選ぶと時刻正解率は59%、標的正解率は23%となった。2頭目の左補足眼野の結果も同様だった。左前頭眼野の54個では、時刻正解率は

98%, 標的正解率は48%となった。多くの神経活動に基づくほど推定は正確になり、前頭眼野の方が補足眼野より少数(約50%)の細胞で同程度の精度を得た。次に、27細胞の同時記録データでは、時刻正解率は45%, 標的正解率は38%だった。擬似同時記録データに比べ、時刻

正解率はやや悪かったが標的正解率は改善した。これらの結果は比較的少数の前頭眼野・補足眼野の神経活動の同時記録を用いることで眼球運動を正しく予測できる可能性を示唆している。

(33) 視覚情報を優先させた手の空間位置算出には上頭頂小葉後部領域が関与する

羽倉信宏^{1,2}, 武井智彦¹, 廣瀬智士^{1,2}, 荒牧勇^{4,5}, 松村道一¹, 定藤規広⁵, 内藤栄一^{1,3,4}

(¹京都大学大学院人間・環境学研究科 ²日本学術振興会 ³ATR ⁴NICT ⁵生理学研究所)

我々は自己身体位置を視覚情報と運動感覚情報を統合することによって把握している。多くの場合、視覚の方が運動感覚よりも正確に空間位置を伝えるので、この異種感覚統合の際、脳は視覚からの空間情報を優先させて身体位置を算出する。これを「身体位置知覚における視覚の優位性」という。本研究では、脳のどの領域で視覚を優先させた身体位置算出がなされているのかを調査した。

行動学実験では、22名の被験者が右手、もしくは左手の屈曲する運動錯覚(手首伸筋の腱への振動刺激)を経験しながら、錯覚を経験しているが実際には静止している自分の手のライブ画像(同側条件)、もしくは錯覚を経験していない反対側の静止している手のライブ画像(反対側条件)を観察した。同側条件では視覚と運動感覚は同じ手の情報を伝えているが、反対側条件では両感覚はそれぞれ無関係な手の位置情報を伝えている。統制条件として、被験者は閉眼状態で運動錯覚を経験した。fMRI(機能的磁気共鳴画像法)実験では、8名の被験者の脳活動を同側条件、および反対側条件で測定した。

行動学実験では、被験者の手の屈曲経験は同側条件で統制条件よりも有意に減弱したのに対し、反対側条件では有意な減弱は観察されなかった。これは視覚情報と運動感覚情報が同じ手の情報を伝えているとき(同側条件)にのみ、視覚を優先させた手の空間位置算出が行われることを示している。fMRI実験では、同側条件のとき特異的に、上頭頂小葉後部領域が活動することが明らかになった。さらにこの領域の活動は、各被験者の手の屈曲経験の減弱度(視覚を優先させる強さ)と強く相関することが分かった。

以上の結果から、視覚情報を優先させた手の空間位置算出には上頭頂小葉後部領域が関与することが示された。この領域の機能によって、多感覚からの身体情報がある状況でも、統合された“身体像”が知覚できると考えられる。

Ref. Hagura N, Takei T, Hirose S, Aramaki Y, Matsumura M, Sadato N, Naito E (2007). Activity in the posterior parietal cortex mediates visual dominance over kinesthesia. *J Neurosci* (in press).

(34) VOR 運動学習の左右非対称性, 周波数選択性, 能動・受動運動学習

吉川明昌, 平田 豊 (中部大学 工学研究科 情報工学専攻 平田研究室)

生体の筋肉系の特性は、加齢や病気などにより生涯にわたり変化する。筋肉の特性変化に対し適応的に運動指令を修正しパフォーマンスを維持する運動学習機能は、生体の精緻な運動制御を実現する上で必須となる。前庭動眼反射(Vestibulo-ocular Reflex :VOR)は、頭部運動時に

眼球を補償的に動かすことで視覚の安定化を図る反射性眼球運動であり、他の運動学習と同様、小脳を介して実現される。VOR運動学習は頭部運動刺激と、被験者の周囲に提示した視覚刺激を同相或いは逆相の組み合わせで与えることで数時間のうちに成立し、暗闇で測定される

VOR gain (眼球速度/頭部速度) は、同相刺激後は減少し、逆相刺激後は増大する。近年、この VOR gain 増大・減少における学習・記憶メカニズムの違いが示唆されている。我々は、左右頭部運動方向を区別して VOR gain の調整が必要となるような VOR 運動学習課題を用い、この違いについて検討した。その結果、gain 増大は頭部運動方向を区別して調整できるが、gain 減少はそれができないことが分かった。この結果は VOR gain 増大と減少が異なるメカニズムで実現されていることを裏付けている。一方、VOR 運動学習においても、短期学習から長

期学習に移行するにつれ、記憶部位が遷移することが示されている。しかしながら、これまでの両学習の誘発方法は、前者では人工的に与えられる受動的な頭部運動、後者では被験動物自らの動きによる能動的な頭部運動を用いるものであり、含まれる周波数成分も異なるなど、本質的に刺激の性質が異なっている。そこで、受動・能動学習の学習特性、記憶保持特性を定量的に評価する為の実験セットアップをデザインし構築し、両者の比較を進めている。

(35) 運動視処理における二つの皮質経路—運動信号と知覚信号の分離—

林 隆介, 三浦健一郎, 田端宏充, 河野憲二 (京都大学大学院 医学研究科 認知行動脳科学)

運動視には少なくとも二種類の処理システムが並列的に働いていると言われている。一つは一次運動視と呼ばれる輝度変調を検出するメカニズムであり、もう一つは二次運動視と呼ばれ、コントラスト変調など一次運動検出器では検出できない刺激特徴を検出するメカニズムである。一次運動視はさらに単眼性と両眼性のシステムに分けられ、両眼性一次運動視のシステムは両眼分離運動視 (dichoptic motion) 刺激を使うことで選択的に調べることができる。そこで、本研究では視覚刺激に対し反射的に誘発される追従性眼球運動応答 (Ocular Following Responses, OFR) が、1) 単眼性一次運動視、2) 両眼性一次運動視、3) 二次運動視によってそれぞれどのように誘発されるか検証した。その結果、両眼性一次運動視は単眼性一次運動視と比べ、応答利得の低下や潜時の遅れはあるものの OFR を誘発することが確認された。

両眼性一次運動視刺激には一切の単眼性運動視手がかりが含まれず、皮質下経路の働く余地がないことから、OFR が皮質由来の運動応答であることが示唆された。一方、二次運動視は、その運動方向が知覚されていたにも関わらず、OFR を全く誘発しなかった。このことから、皮質における運動視処理は、反射的な眼球運動応答に関わる経路と意識的な運動視知覚に関わる経路に分けることができ、前者は一次運動視だけが寄与することが示唆された。本研究ではさらに、単眼に提示された刺激の運動方向と両眼情報の統合後に知覚される運動方向が逆転する全く新しい錯視を開発し、単眼性一次運動視と両眼性一次運動視がどのように統合され眼球運動応答に影響するか調べた。実験結果から、二つの一次運動視の統合は非線形な winner-take-all 型ではなく、単純な加算型であることが示唆された。

(36) 視野の動きに短潜時で誘発される視覚誘導性腕応答の視覚運動座標変換

西條直樹, 五味裕章 (NTT コミュニケーション科学基礎研究所)

腕の到達運動中に突然の視野の動きを与えると、短潜時で視覚誘導性腕応答 (Manual Following Response: MFR) が生じる。MFR は、ほぼ視野の動きの方向へ誘発されるが、視覚運動と手先応答の方向がどの程度外界で一致しているのかについては明らかでない。本研究では、

MFR における視野の動きから運動指令への座標変換メカニズムについて報告する。

平面上の上肢到達運動中、平面上の8方向いずれかの方向へ視覚運動が与えられると MFR が誘発され、視覚運動方向の変化に従って MFR が生じる方向も変化した。

この視覚刺激に対し、到達運動の向きを変化させ MFR が生じる時刻での腕の姿勢を変化させると、肩と肘の主働筋において最大の筋活動応答が現れる視覚刺激方向 (preferred direction: PD) が変化しており、その結果、MFR の方向に現れる腕の姿勢変化の影響は小さくなっていった。これは、MFR を生成する上で、腕の姿勢が考慮されていたことを示唆する。一方で、MFR が生じる時刻での腕の姿勢を一定に保ったまま、到達運動の方向を変化させて MFR を誘発すると、肘関節主働筋の PD のみが変化

し、その結果、MFR の方向も変化した。PD の変化は背景筋活動量とは無相関であったことから、この PD 変化は到達運動方向の変化に伴う複数の筋活動パターンの組み合わせの変化の影響を受けて生じたものと予想される。

以上の結果から、MFR を生成する過程において、最終的な MFR の運動指令は随意運動の影響を受けて変化するものの、外界での視野の動きを、腕の姿勢を計算し、外界での手先運動へ変換するメカニズムの存在が示唆される。

(37) リーチング運動中の視覚ターゲットの移動により引き起こされる修正運動

渋谷賢¹、五十嵐一峰²、佐野秀仁²、高橋雅人²、里見和彦²、大木紫¹
(¹杏林大学医学部・統合生理学教室、²杏林大学医学部・整形外科教室)

リーチング運動中の視覚ターゲットの移動は、短潜時の修正運動を引き起こすことが知られている。我々は病態における運動の変化を調べるため、まず正常被験者の修正運動の詳細を検討した。右利き正常被験者の眼前 40cm の位置に、3 つの LED を水平方向に 10cm 間隔で固定し、被験者の示指の 3 次元位置と EOG を記録した。被験者は中央の点灯する LED (ターゲット) に向かって出来るだけ素早く腕を伸ばし、示指で正確にターゲットに触れるよう要求された。また運動開始後に中央の LED が消え同時に左右いずれかの LED が点灯した場合 (確率 50%) は、出来るだけ素早く新しいターゲットに触れるよう指示された。従来の報告通り、視覚ターゲットの移動はリーチング運動の素早い修正を誘発した (onset latency ≥ 120 ms)。しかし修正運動には非対称性が見られ、水平内転方向への修正 (右腕の場合、左側への修正) の方が逆方向よりも運動修正の潜時が短く、かつ到達位

置も正確であった。腕の修正とほぼ同時に新しいターゲットへの急速眼球運動が生じたが、この運動も水平内転方向の修正の方が潜時が短く (≥ 120 ms)、また腕の運動修正潜時との相関が高かった。この傾向は、利き手の方が顕著であった。修正運動の非対称性と視覚的注意の関連性を検討するため、ターゲットの移動直後に液晶シャッターを用いて視覚入力を完全に遮断し、短時間呈示された新しいターゲットの検出力とその時の修正運動を解析した。その結果、被験者はやはり水平内転方向に移動したターゲットをより正確に検出した。この結果は、正常被験者はリーチング運動開始前後からターゲット周辺の非対称な空間に注意を向け、これが修正運動にも影響していることを示唆する。腕の修正運動と眼球運動の潜時の相関は、前者が急速眼球運動と共通の機構で駆動される可能性を示すと考えられた。

(38) 標的刺激選択時の前頭連合野の神経細胞活動

井上雅仁、三上章允 (京都大学・霊長類研究所・行動発現分野)

複数の視覚刺激から標的となる視覚刺激を選択するときの前頭連合野のニューロン機構を明らかにするため、serial probe reproduction (SPR) task の反応期の前頭連合野外側部のニューロン活動を解析した。この SPR task

では、サルは 2 個の連続して提示された図形刺激を記憶し、その後提示された色刺激に基づいて 2 個の記憶した図形刺激から 1 個の標的となる図形刺激を想起し、反応期に提示された 3 個の図形刺激 (array) から標的となる

図形刺激を選択し、その標的刺激に対して眼球運動を行わなければならない。前頭連合野外側部から記録した611個のニューロンのうち、74個のニューロンが視覚応答を示した。39個のニューロンが array 選択性を示し、このうち27個のニューロンが標的刺激に依存したニューロン活動を示した。これらのニューロンの多くは前頭連合野腹外側部 (VLPFC) から記録された。一方、56個のニューロンが presaccadic 活動を示した。このうち、9個のニューロンは標的刺激に依存した (target-selective) 活動を、17個のニューロンは標的刺激と眼球運動の方向

の両方に依存した (target- & direction-selective) 活動を、23個のニューロンは眼球運動の方向に依存した (direction-selective) 活動を示した。VLPFC からはすべてのタイプのニューロン活動が記録されたが、前頭連合野背外側部 (DLPFC) からは direction-selective 活動が記録された。これらの結果は、VLPFC は標的刺激を選択する過程に関与し、VLPFC と DLPFC は標的刺激の空間的位置を決定し、眼球運動を実行する過程に関与していることを示唆している。

(39) サルにおける短潜時で起こる視覚誘導性腕応答 (MFR: Manual Following Response) の時空間特性

竹村 文, 安部川直稔, 河野憲二, 五味裕章

((独) 産業技術総合研究所・脳神経情報研究部門・システム脳科学)

腕の到達運動中に、突然、視野が動くと、非常に短潜時で腕の修正運動 (視覚誘導性腕応答) が生じる (Saijo et al. 2005, Gomi et al. 2006)。この修正運動は、身体が動いたときに生じる視野のブレをつかって、到達運動を素早く修正し、日常生活において機能的に働いていると考えられる。本研究では、ヒトと同様な視覚誘導性腕応答がサルにおいても生じることを明らかにした。頭部を固定したサルの目の前33cm前に置いたCRTに視覚刺激を呈示し、CRT上の視標に上肢の到達運動を行わせた。視覚刺激は、 $62^\circ \times 50^\circ$ の Grating pattern (空間周波数 0.05c/deg と 0.2c/deg) を用いた。サルがスイッチを押すと、CRTの中心に赤い視標が呈示され、遅延 (800-1,300ms) の後、到達運動の開始を指示する緑に変わった。サルが600ms以内にスイッチを離し、800ms以内にCRT上に呈示された緑の視標に向かって到達運動を行ったとき、報酬とし

てジュースを与えた。トレーニング中、その試行におけるサルの到達位置と実際の視標との誤差距離が近いほどジュースの量を多くした。到達運動の実験では、MFR課題、ターゲットジャンプ (TJ) 課題、コントロール課題を行った。MFR課題では、サルがスイッチを離して約30ms後に Grating Pattern を左右どちらかに一定速度で500ms間動かした。TJ課題では、サルがスイッチを離して約30ms後に左右どちらかに視標を7度ジャンプさせた。コントロール課題では、サルの到達運動中、視覚刺激は静止していた。その結果、サルにおいても、明らかな視覚誘導性腕運動が誘発され、その潜時は約60msだった。一方、TJ課題における修正運動の潜時は約100msだった。さらに、視覚誘導性腕運動の時空間周波数特性は、ヒトの特性と似ていた。

(40) 小さな誤差での視覚運動適応は長く続いた

山本憲司, ドナホフマン, ピーターストリック

(独立行政法人・放射線医学総合研究所・分子神経イメージング研究グループ,
ピッツバーグ大学医学部神経生物学部)

短期間しか練習していない運動はすぐに忘れる。繰り返し練習した運動は忘れにくい。我々のもつこれら常識

は真実ではないかもしれない。3人のヒトと2頭のマカクサルは手首運動用 manipulandum のバーを右手で握り

動かした。手首の運動方向とカーサーの運動方向は同じだった。被験者はモニター上の中心に提示されるターゲットから周辺8方向のうちランダムに1方向に提示されるターゲットにカーサーを入れるため手首の center-out 到達運動を行った。ヒト被験者は1.5時間、サルは9年あるいは3年間このタスクを訓練した。訓練後のある日、ターゲットはある一方向へのみ現れた。この間、30試行に10度ずつ手首運動の方向とカーサーの提示方向の間に差を作った。30, 60, 90, 120試行で視覚と運動の差は10, 20, 30, 40度になった。各30試行の間に被験者は運動を補正しカーサーをターゲットに入れるように適応し

たため、最後まで視覚と運動の差は10度程度より大きくなることはなかった。このため、視覚と運動の間に差があることに気づいたヒト被験者はいなかった。サルの適応は7-14日後に92% (9年間訓練したサル) あるいは52% (3年間訓練したサル) 残っていた。ヒトは1年後に59-91%の適応が残っていた。これら結果は、視覚と運動の誤差を徐々に与えた場合、9年間行った訓練 (~100万試行) での視覚と運動の関係はたった120試行の練習で変えられ、変えられた関係は永遠に残る可能性があることを示唆する。

(41) 水平性・垂直性サッケードの出力系中枢神経回路の解析

伊澤佳子, 杉内友理子, 篠田義一 (東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・システム神経生理学)

動物は興味のある対象物が目の前に現われると、そちらに注意を向けて急速な眼球運動 (サッケード) を起こす。サッケードの発現には上丘が重要な働きをしていることが知られているが、上丘から水平性および垂直性眼球運動ニューロンに至る神経回路の詳細は明らかにされていなかった。我々はまず水平眼球運動系において、上丘から外眼筋運動ニューロンに至る神経回路を、ネコ *in vivo* 標本での細胞内記録と WGA-HRP の transneuronal labeling を用いて解析した。その結果、上丘から外直筋運動ニューロンへ至る経路は、従来想像されていた3シナプス性ではなく、対側上丘から傍正中橋網様体 (PPRF) を経由する2シナプス性の興奮性経路、同側上丘から傍

正中橋延髄網様体 (PPMRF) を経由する2シナプス性の抑制性経路であること、またこれらの系の興奮性・抑制性介在細胞の脳幹内分布を明らかにした。また最近、水平眼球運動系で行った解析を垂直眼球運動系に発展させ、垂直眼球運動ニューロン (上斜筋運動ニューロン) にも水平眼球運動系と同様に上丘から2シナプス性の興奮性および抑制性入力があり、それぞれ中脳のフォレル野およびカハール間質核を介していることを明らかにした。これまで水平眼球運動系における抑制性バースト細胞に相当するものが垂直眼球運動系では明らかにされていなかったが、本研究により垂直眼球運動系にも抑制性バースト細胞が存在することが明らかになった。

(42) 大脳-基底核ループによる眼球運動の随意性制御

田中真樹, 吉田篤司, 國松 淳 (北海道大学医学研究科・認知行動学分野)

基底核は大脳からの入力を受けるとともに、その出力の大部分を視床大脳経路に送ることによって、大脳、とくに前頭葉皮質での情報処理を調節している。これに加え、基底核には大脳から送られた信号を上丘につたえるフィードフォワード経路の存在も知られており、眼球運動系では主として後者の機能が調べられてきた。最近の研究により、眼球運動の随意性調節に視床大脳経路が関

与することが示唆されており、それらの研究の一部を簡単に紹介する。

①代表的な基底核疾患であるパーキンソン病では自発的に運動を開始することが困難になることが知られており、こうした機能には基底核-視床大脳経路が関与すると考えられる。視覚刺激提示後、一定のタイミングで眼球運動を行なうようにサルを訓練し、視床を不活化し

たところ、反対側にむかうサッカードの開始が遅れ、視床の信号が眼球運動の発現に重要であることが示された。

②日常生活の中では一定の刺激に対する反応を状況に応じて変化させる必要があるが、その神経機構を調べるための眼球運動課題として Antisaccade 課題がよく知られている。固視点の色によって視標に対する運動方向 (Antisaccade と Prosaccade) を切り替えるようにサルを訓

練した。要求された課題の種類によって活動を変化させるニューロンが淡蒼球と視床から多数記録され、前者の不活化によって課題の成功率が低下した。上丘では Antisaccade の際に神経活動が減弱することが知られているが、これらの部位では神経活動の増大がみられ、基底核の眼球運動信号の一部は視床を介して大脳皮質に送られていると考えられる。

(43) 追跡眼球運動の開始部の特性を決める外的な要因と内的な要因

三浦健一郎^{1,2}, 田端宏充¹, 河野憲二¹

(¹京都大学・医学研究科・認知行動脳科学, ²京都大学・ナノメディシン融合教育ユニット)

追跡眼球運動の開始部は追跡視標の視覚刺激としての特性 (外的な要因) や追跡を始める前の先行条件 (内的な要因) の影響を受ける。本研究では、視標の視覚刺激としての特性と視標追跡の先行条件がヒトの追跡眼球運動の開始部に与える影響について、より詳細に調べることを目的としていくつかの実験を行った。実験課題には、全ての実験に共通して、追跡眼球運動研究で良く用いられる実験課題 (静止視標を注視した後、一定速度で動く視標を追跡するという課題) に一工夫加えたものを用いた。視標 (ここではランダムドットパッチ) が一定速度で動き出す直前に、視標を短時間、左右に動かした (三角波, 10Hz, 一周期, $\pm 20\text{deg/s}$)。視標をこのように一過性に動かすと、それに応じて一過性のステレオタイプな眼球運動反応が起こる。この反応の波形を解析する

ことで、追跡眼球運動システムの特性 (遅延やゲイン) を明確に反映した特徴を抽出できる。この実験課題を用いて、視標サイズと視標コントラストといった視覚刺激特性の影響、追跡視標をその動き出しに先行して呈示するか否かといった先行条件の影響について調べた。その結果、①視標サイズが大きくなるにつれて眼球運動反応が早く大きくなる、②視標コントラストが高くなるにつれて反応が早く大きくなる、③追跡視標をその動き出しに先行して呈示した時には、動き出す直前に呈示される時よりも反応が大きくなることがわかった。この結果は、追跡眼球運動を起こす時の視覚一運動変換の遅れ (システムの遅延) は視覚刺激の特性によって決まり、視覚一運動変換の効率 (システムのゲイン) は外的な要因と内的な要因の両方によって決まることが示唆する。

(44) 報酬獲得行動における Dopamine と Serotonin ニューロンの神経活動の比較

中村加枝 (関西医科大学 第二生理学教室)

報酬の期待量や得られる確からしさは、我々の行動決定の重要な要素である。近年の神経生理・行動薬理学実験によって、期待報酬量により行動の選択や運動の速さが増減する神経メカニズムが基底核線条体とドパミンの作用を中心として明らかにされ、さらに reinforcement learning (RL) による計算論の適用も成功した。しかし、この基底核線条体とドパミンを主体とした既存の RL 理

論には限界がある (Doya 2002; Daw et al., 2002)。たとえば、単純な RL 理論では、行動を起こしてその直後に報酬を得る、という単発的な状況に適用できるが、現実の世界では、報酬が行動の後ある期間待ってから得られる場合が少なくない。この待ち時間は報酬を得るためのコストといえる。このコストと報酬の情報が脳内のどのような神経メカニズムで表現され、行動に影響を及ぼして

いるのかほとんど分かっていない。

近年の動物実験とヒトを被験者とした非侵襲的画像診断により、セロトニンが従来の RL 理論では説明しきれない長期的な報酬予測に関係している可能性が指摘された。セロトニン欠乏状態にある被験者や動物が、コストと報酬の両方を考慮して行動を選択する課題において、適切な行動の選択が障害されることが報告された (Rogers et al. 1999; Mobini et al., 2000 Wogar et al. 1993)。また、被験者が長期的な報酬を予測する場合にセロトニン放出細胞がある縫線核の周囲の活動が高まった (Tanaka et al., 2004)。しかし、同じ課題、同じ個体で、ドパミンとセロトニンニューロンの発火パターンを比較する必要がある。

我々は、与えられる報酬量を操作した眼球運動課題である 1DR (one-direction rewarded) saccade task を試行中のサルの前頭葉皮質下部ドパミンニューロンと脳幹の縫線核から単一細胞外記録を行い、両者の発火パターンには大き

な違いがみられることを確認した。

- (1) タスク関連性：ドパミンニューロンは例外なくターゲットのオンセットに反応するが報酬そのものには反応しない。一方、縫線核ニューロンは報酬の後に発火することが多かった。
- (2) 報酬関連性：ドパミンニューロンは例外なく多くの報酬が期待できるターゲットのオンセットに反応するが、縫線核ニューロンは多くの報酬に選択的なもの、少ない報酬に選択的なもの、さらにどちらにも選択性のないもの 3 分の 1 ずつ見られた。
- (3) 発火パターン：ドパミンニューロンは例外なく短期間の発火パターンで発火するが、縫線核ニューロンは規則的でときには 2 秒以上も続く tonic な発火パターンが典型的であった。

以上より、縫線核ニューロンも報酬の情報処理にかかわっているが、ドパミンとは異なるメカニズムによることが予測された。

(45) 眼球運動の能動的抑制に関わる脳内機構

長谷川良平 (産業技術総合研究所・脳神経情報研究部門)

動眼系をモデルにした研究によって「どの方向に眼を動かすか」というような、何らかの行動を起こすための意思決定に関わる脳内機構の研究が進んできた (例: Hasegawa et al. *J Neurophysiol* 1998, 2000)。その一方、「ある方向へは眼を動かさない」というような、特定の行動を抑えるための意思決定もしばしば必要となるが、その脳内機構に関しては不明な点が多い。そこで本研究では特定の行動の抑制を誘導する空間的非見本合わせ課題を考案し、従来の特定の行動の実行を誘導する空間的見本合わせ課題とペアでサルに訓練した (Hasegawa et al.

Neuron 2004)。課題遂行中のサルの前頭眼野およびその周辺領域からニューロン活動を記録した結果、見本合わせ課題で特定方向の眼球運動の準備に関わる時に活動するニューロン (“Look neuron”) のみならず、非見本合わせ課題で特定方向への眼球運動を抑制しなければならぬ時に活動するニューロン (“Don't look neuron”) を発見した。これらの結果から、前頭眼野およびその周辺領域が、特定の不適切な行動を抑えることに関わっていることが示唆された。

(46) 上丘頭側部と尾側部の機能の違いについて

杉内友理子, 伊澤佳子, 高橋真有, 篠田義一

(東京医科歯科大学・歯学総合研究科・システム神経生理学)

上丘は、従来、サッケードの発現に関与することが知られているが、近年、上丘頭側部には、固視に際して活

動し、サッケードの間に活動を休止するニューロンが存在することが知られるようになり、上丘頭側部に固視機

能が存在し、尾側部のサッケード領域と異なる機能をもつことが提唱されるようになった。しかし最近、この考え方に否定的で、「頭側部に固視領域は存在しない」とする報告がなされ、この考えが主流となりつつある。サッケードのトリガー-神経機構のメカニズム解明にあたり、この問題の解決が重要と考えられる。もし、上丘の頭側部と尾側部に、異なる機能を持ったシステムが存在

するのであれば、それぞれの部位から脳幹の saccade generator への結合のしかたは異なると考えられる。そこで本研究では、上丘頭側部と尾側部から、脳幹の saccade generator へのシナプス入力 of 性質を解析し、さらに上丘頭側部の固視領域にある細胞の、交連性入力および出力の性質について解析し、上丘頭側部の機能の特殊性を裏付けた。

(47) 前庭動眼反射運動学習中の小脳 Purkinje 細胞複雑スパイク

平田 豊 (中部大学 工学部 情報工学科)

Pablo M. Blazquez, Stephen M. Highstein

(Washington University School of Medicine, Vestibular Research Lab.)

リスザルの短期的 (~3 時間) 水平方向前庭動眼反射 (VOR) 運動学習中、小脳片葉 Purkinje 細胞から連続的に単純ならびに複雑スパイクを計測した。従来、複雑スパイクを発生させる感覚刺激として考えられている網膜像のスリップに対する応答から、これらの複雑スパイクは3つのタイプに分類できた。そのうち最も多かったものは、電位記録側と対側方向に生じる網膜像スリップに対して発火確率を増すものであった。これらの複雑スパイクは、同側に生じる網膜像スリップに対しては逆に発火確率を減少させた。こうした網膜像スリップの方向変化に対し、複雑スパイクは非常に敏感に発火確率を変化させた。VOR のスピード増加ならびにスピード減少学習

中、網膜像スリップの量は学習進行に伴い徐々に減少したが、これらの複雑スパイクは、いずれの学習時にも、その発火確率を殆ど変えなかった。以上の結果から、小脳片葉 Purkinje 細胞複雑スパイクは、VOR パフォーマンスの誤差の向きを高感度でコードし、その量に関しては殆ど情報を持っていないことが示唆された。また、これらの複雑スパイクは、暗所での頭部運動負荷時にも発火確率を変化させることが確認され、網膜像スリップ以外の情報もコードしているようであった。情報理論の適用により、これらの複雑スパイクは、眼球運動に関する情報をコードしていることが示唆された。

(48) サッケードに伴う時間順序判断の逆転

高橋俊光, 茂泉俊次郎, 奥住文美, 斎藤史根, 北澤 茂 (順天堂大学大学院・医学研究科・神経生理学)

Morrone ら (2005) は、サッケード開始直前に 50ms の時間差で提示された2つの視覚刺激の時間順序判断が逆転することを報告した。我々は、サッケードが皮膚刺激の時間順序判断にも影響を与えるのかどうかを調べた。右利き被験者 (5名) に対し、固視点が消えると同時に提示される目標に向かって 24 度の振幅の右向きサッケードを行うとともに、サッケード前後の様々なタイミングで左右の手に加えた皮膚刺激の順序を判断するように求めた。手は水平方向のサッケードに対して中立の位置

になるように、正中矢状面内で左手を右手の上 20cm の高さに置いて刺激した。サッケード開始から 100ms 以上経過した後に皮膚刺激を加えた場合には、上 (左手) が先という判断の確率は刺激時間差に対してシグモイド曲線で近似され、刺激時間差 50ms に対する正解率は約 75% だった。しかし、サッケード開始直前の 100ms 以内に刺激が加えられた場合には、判断の曲線は N-字状となり、刺激時間差 50ms に対して判断が逆転する傾向を示した (正解率 45%)。これらの結果はサッケード直前の時間順

序判断の逆転効果は皮膚刺激の時間順序判断にも及ぶことを示す。サッケードに関する情報と視覚、触覚の信号

が収束する領域が時間順序判断に関与していることが示唆された。

(49) 頭頂連合野における身体の認識機構

村田 哲 石田裕昭 (近畿大学・医学部・第一生理)

身体意識は、自己の認識、他者の認識のベースになっていると考えられている。頭頂連合野の障害では、身体失認、身体部位失認、運動の主体の認識の障害など身体に関わる症状が知られており、また神経生理学的にいくつかの視覚や体性感覚などの多種感覚領域が知られている。頭頂葉のこれらの多種感覚領域が身体感覚に関わる領域であると思われる。我々は現在、頭頂葉を中心に、身体や身体表現に関わるニューロン活動を記録している。とくに、我々は感覚運動制御に関連する領域が体性感覚と視覚、運動の遠心性コピーを統合し、自己の運動の主体の認識に関わると考えている。我々の実験では、頭頂葉の PFG 野のニューロンが手の運動に関わる活動を示すが、これらのニューロンの一部には自己の運動の

動画を観察しているときに反応するものが見つかり自己の運動の主体の認識に関わると推測される。またこれらのニューロンの一部は、腹側運動前野や下頭頂小葉の PFG 野で記録されているミラーニューロンの性質を示した。一方、脳内には自己とともに他者の身体像も表現されていると考えられる。こうした他者身体像は、自己の身体像の上にマップされていると推測する。最近、我々は多種感覚領域の一つである VIP 野や PFG 野において自己の身体と他者の身体の両方に関連するニューロン活動を記録した。自己と他者の区別、及び自己と他者の身体像の比較に関連した脳内システムについて頭頂葉を中心に考察する。

(50) リズム制御における神経機構

鴻池菜保, 宮地重弘 (京都大学霊長類研究所 行動神経研究部門 行動発現分野)

運動リズムの制御の脳内機構を明らかにする目的で、一定のリズムで点滅するボタンを押す課題をサルに訓練した。これは、ヒトの心理実験で用いられるリズム同期タッピング課題をサル用に改変したものである。ボタン点滅のパターンは①ランダム、②等間隔リズム (750, 1000, 1500ms)、③3分の2拍子 (750/1500ms=1:2 間隔)、④変則3分の2拍子 (750/1000ms=1:1.33 間隔) の4条件である。また、それぞれについてボタン点灯とともにブザー音が鳴る「音あり条件」と、点灯のみの「音なし条件」がある。刺激呈示からボタン押しまでの反応時間に注目して行動学的解析を行った。750ms/1000ms の「等間隔リズム条件」での反応時間は「ランダム条件」と比

較して非常に短く、一方、1500ms では反応時間は短縮しなかった。「音あり条件」では、「音なし条件」と比較して反応時間が短縮していた。また、「規則的な3分の2拍子」は「変則3分の2拍子」と比較して、より忠実にリズムを再現できた。これらの結果より、①サルは、少なくともインターバル1秒以下の等間隔リズムを学習できる、②聴覚刺激がリズム運動を容易にする、③長さの異なるインターバルを含むリズムでは、含まれるインターバルの長さが整数比である「規則的リズム」の場合、「変則的リズム」に比べ、再現が容易であることが示唆された。

(51) 左右指運動中における体性感覚情報の役割と腕姿勢に依存した運動の協調性

櫻田 武^{1,2}, 五味裕章², 伊藤宏司¹

(¹東京工業大学・大学院総合理工学研究科・知能システム科学専攻・伊藤宏司研究室

²N T T コミュニケーション科学基礎研究所・人間情報研究部・感覚運動研究グループ)

日常生活における運動では、左右の指を協調的に動作させる場合が多い。このような左右両側の体部位を用いた運動は、それぞれの制御器である脳半球間における情報処理系を考える上で重要な課題である。本研究ではこのような協調運動制御メカニズム解明を目指し、左右の人差し指による同相と逆相のリズム運動により検証を行った。実験課題において、被験者の正面に置かれたモニター上には、上下に配置された二点のターゲットと被験者の左指位置を示すカーソルが提示される。このターゲット間を結んだ直線軌道を運動目標とし、一定のリズム(0.5Hz)で両指運動を行った。運動中、モニター上の左指カーソルの振幅を変化させる課題と、左人差し指への力場課題により、モニター上の運動誤差に対する適応課題を設定した。結果から、振幅変化課題において同相運動では対側への強い影響を及ぼし、逆相運動では対側への

影響を比較的抑えられていることが確認された。また、力場課題では対側への影響が見られなかったことから、これら左右間の相互関係を生み出す運動情報として運動部位の体性感覚情報が強く働いていることが示唆された。次に、腕姿勢による左右協調性への影響を検証するために、異なる指先間距離において同様のモニター上の振幅変化に対する適応課題を行った。結果から、より指先間距離が近いほど対側への影響が強くなるような、協調関係に関する空間特性が確認された。これは腕姿勢などの内因的な座標系で表現された情報が協調運動制御系に影響を与えていることを示すとともに、左右の運動部位間の距離変化という点から、外部座標系で表現された情報が協調運動制御系を修飾している可能性を示唆している。

(52) 一次運動野(M1)への経頭蓋磁気刺激(TMS)による運動開始に対する妨害効果はタスクに依存して変化する

中塚晶博, 美馬達哉, 福山秀直

(京都大学医学研究科附属 高次脳機能総合研究センター)

【目的】3種類の異なる運動タスクを用いた選択反応時間課題において、運動開始前にM1に与えられたTMSのvirtual lesion効果の違いを検討する。

【被験者】6人の正常な右利き成人

【方法】被験者は右手の第2~5指を用いて、スクリーンの中央にランダムに5~7秒おきに呈示される3種類のCueに従い、それぞれのCueに対応したタスクを可能な限り迅速に行う。タスクの内容は、第2指(示指)でキーを一回押す(simple)、第2指でキーを4回押す(repetitive)、第2指→第4指→第3指→第5指の順でキーを押す(sequential)、の3種類である。

Cueの呈示後100ms, 200ms, 300ms, 400ms, あるいは

500msのタイミングで、左M1領域にTMSを1回与え、反応時間と誤答率を計測する。

【結果】TMS刺激を行わない場合の平均反応時間は、simple課題で480ms, repetitive課題で550ms, sequential課題で530msだった。反応時間の延長は、300-400msで認められ、simple課題では10%, repetitive課題では3%, sequential課題では9%だった。

【考察】repetitive課題においては、他の2つの課題に比べ、TMSによる反応時間の延長効果が小さかった。この結果から、repetitiveな指の動きは、simpleあるいはsequentialな動きに比べ、M1領域へのTMSの介入に対し抵抗性を有する可能性が示唆された。

(53) 把持運動可能性判断の脳内神経機序

廣瀬智士^{1,2}, 羽倉信宏^{1,2}, 松村道一¹, 内藤栄一^{3,4}(¹京都大学大学院人間・環境学研究科 ²日本学術振興会 ³ATR ⁴NICT)

我々がある視覚対象に対して運動を行おうとしたとき、運動に先立ってその運動が可能か否かを判断することができる。これは、運動の対象の情報（e.g. 位置, 大きさ）と、自己の運動可能範囲（e.g. 片手ではどの程度の大きさのものをつかめるか）を比較することで実現されていることが知られている。本研究では、視覚対象と自己の手運動の運動可能範囲が脳内でどのように比較されているのかを、心理物理学的手法および脳機能画像法（fMRI）を用いて調査した。17名の右利き被験者が実験に参加した。心理物理実験では、被験者は自己の右手のライブ映像と同時に手の前に呈示される様々な大きさの箱の映像を見て、呈示された箱が右手で握めるか否かを判断する課題を行った（運動判断課題）。また統制課題として、被験者は同じく自己の手と箱を見るが、握った手と箱の視覚的な大きさを比較する課題を行った（視覚判断課題）。運動判断課題では運動可能範囲と対象の大きさの比較が必要となるが、視覚判断課題ではその必要は

ない。被験者の両課題での判断のばらつきを比較すると、運動判断課題の方が視覚判断課題よりも有意にばらつきが大きくなることが分かった。これは運動判断課題において、単なる大きさの比較ではなく、自己の関節可動域から計算された運動可能範囲と対象の大きさを比較していたことを示唆する。fMRIを用いて両課題で被験者の脳活動を測定すると、背側運動前野前部領域が運動判断課題で特異的に活動することが分かった。さらに、この領域の活動は各被験者の運動判断課題時の応答時間と有意な正の相関を示した。これらの結果から自己の運動可能範囲と対象の大きさの比較には背側運動前野前部領域が関与することが分かった。この比較計算によって、我々は実際の運動に先立って様々な運動プログラムの持つ運動可能範囲と視覚対象の関係性を理解し、その状況に適した運動プログラムを選択することができると考えられる。

(54) 把握運動の制御における脊髄神経機構の役割

武井智彦, 関和彦

(京都大学大学院人間・環境学研究科/自然科学研究機構・生理学研究所・認知行動発達機構研究部門)

我々人間は手先を器用に使って、物を握ったり操作したりすることが出来る。このような把握運動を制御するためには、視覚や体性感覚の情報に基づいて適切な運動指令を作り出し、それにより39種類にも及ぶ手の筋活動の時空間パターンを生成することが必要である。従来、サル単一ニューロン活動記録や脳機能イメージングなどの研究によって把握運動に関わる大脳皮質や小脳の機能的役割が詳細に調べられてきた。しかしこれらの神経機構によって作られた運動指令は、脊髄へと送られた後でどのような感覚および運動情報の処理が行われて最終的な筋出力が実現されているのかは全くの不明であった。脊髄に存在する介在ニューロンには、大脳皮質、脳幹などの運動中枢からの下降性運動指令と末梢からの求

心性感覚入力収束しており、これらの情報が統合されて脊髄運動ニューロンへの出力が行われていることが知られている。つまり脊髄介在ニューロンは、中枢神経機構における最終的な運動指令決定の座であると考えられる。そこで我々は、脊髄介在ニューロンが把握運動中にどのような活動を示しているのか、それらがどのような下降性・求心性の入力を受けて運動ニューロンへの出力を行っているのかを明らかにすることで、把握運動における脊髄での感覚運動処理の機構を明らかにすることを研究の目的としている。現在まで、把握運動中のサルの頸髄から単一神経活動を行った結果、1) 把握運動の様々な局面で活動の変化を示す神経細胞が存在すること、2) 一部の神経細胞は運動ニューロンへの投射を持

ち筋活動の制御に関わっていることが明らかとなった。これらの結果は、脊髄神経機構が把握運動制御における感覚運動処理に関与していることを示唆するものである。今後、電気刺激の手法を導入することで脊髄神経細

胞の入出力パターンを同定し、把握運動の制御における脊髄神経機構の役割を明らかにすることを計画している。

(55) 生体ノイズの影響下における上肢到達運動の消費エネルギーに基づく最適性

谷合由章, 西井淳 (山口大学大学院 理工学研究科 自然科学基盤系専攻)

ヒトの上肢到達運動の軌道を決定する最適化規範に関する計算論的研究の多くは、1秒程度までの比較的短い運動時間の運動軌道に注目して行われてきた。このような運動における手先の速度波形はベル型の形状をとる、すなわち運動の開始後なめらかに増加し、運動時間の約半分まで最大となり、その後なめらかに減少していくことが知られている。一方、運動時間が1秒を越える到達運動の場合は、手先の速度形状がやや台形になることが多く、その最適化規範の検討は行われてこなかった。

そこで本研究では、さまざまな運動時間における上肢到達運動に関して、生体ノイズの影響下で総消費エネルギーの期待値を最小とする運動軌道を求め、その結果を計測実験によるヒトの到達軌道と比較した。その結果、運動時間が長くなるにつれて、いずれの速度波形もベル型から台形型になることがわかった。すなわち本研究結果は、ゆっくりとした到達運動も速い運動と共に消費エネルギー最小化基準によって説明可能であることを本研究結果は示唆している。

(56) C3-C4脊髄固有ニューロンは皮質脊髄路切断後の手指の巧緻性の回復に関与する

坪井史治¹, 西村幸男^{1,3}, 斎藤紀美香¹, 高橋雅人², 伊佐正^{1,3}

(¹自然科学研究機構・生理学研究所・認知行動発達機構研究部門,

²杏林大学・整形外科教室, ³科学技術振興機構・CREST)

霊長類の皮質脊髄路 (CST) は脊髄運動ニューロンに直接結合があり、それが手指の巧緻性を支えていると考えられている。またネコ・霊長類において、第3-4頸髄 (C3-C4) に細胞体を持つ脊髄固有ニューロン (C3-C4 PN) が存在し、CST からこの C3-C4 PN を介して脊髄運動ニューロンへ投射する間接経路がある。

本研究では、マカクサルにおいて C3-C4 PN が霊長類でのみ観られる精密把持のような手指の巧緻運動に関与しているか検討するために、①C3-C4 PN を介する間接経路を残し、更に CST から脊髄運動ニューロンへの直接結合を遮断するために、手指の脊髄運動ニューロンがある髄節の吻側の C4 と C5 境界で CST が通る脊髄背側側索

部を切断したサル (C5 lesion, N=2) と、②C3-C4 PN を介する間接経路を遮断するために、その吻側の C1 と C2 の境界で CST を切断したサル (C2 lesion, N=2) で精密把持の回復過程を比較した。

C5 lesion は切断後2ヶ月以内で精密把持の成功率は切断前の水準にまで回復した。一方、C2 lesion では切断後4ヶ月経っても切断前の40%の水準までしか回復しなかった。更にC5 lesion では個々の指の独立した運動が回復したのに対し、C2 lesion では回復が観られなかった。

これらの結果は、CST切断後の手指の巧緻性の回復に、C3-C4 PN を介する CST から脊髄運動ニューロンへの間接経路が関与していることを示唆している。

(57) サル皮質脊髄路：一次運動野における手指制御領域から脊髄への軸索投射の定量的解析

齋藤紀美香¹, 西村幸男^{1,3}, 大石高生^{1,2}, 伊佐正^{1,3}¹生理学研究所・認知行動発達機構研究部門, ²京都大・霊長類研究所・器官調節分,
³科学技術振興機構・CREST)

これまでの一次運動野 (M1) における手指制御領域から脊髄への軸索投射の研究の多くは、白質での軸索走行の分布や灰白質内への投射分布を定性的に解析しているに過ぎなかった。本研究では 2 頭のアカゲザルで、M1 の手指制御領域に感度の高い順行性神経トレーサーである biotinylated dextran amine (BDA) を注入し、それによってラベルされた軸索の C1-Th2 レベルにおける脊髄内分布の定量的解析を行った。

BDA でラベルされた皮質脊髄路 (CST) の軸索は、C2-T2 において 93±6% が注入部位と対側の脊髄の背側側索に分布し、それに対して同側では 4.2±4.0% 分布していた。また同側の腹側前索では 2.8±2.6% 分布していたが、対側では確認されなかった。後索では両側ともにラベルされた軸索を確認できなかった。

CST は全ての脊髄分節において、主に対側の脊髄灰白質の VII 層に終止していた。また頸髄膨大部 C6-T1 においては IX 層に終止する軸索が確認された。同側の灰白質においては、軸索の分布は髄節により異なり、C1-C4 では VII 層に多く、C5-Th1 では VIII 層に多くみられた。更に頸髄膨大部 (C6-C8) では対側の背側側索を通り脊髄中心管を越えて、BDA 注入側に対して同側の VII-IX 層に終止するものが多く確認された。同側の脊髄に投射する軸索は、対側背側側索、同側背側側索、同側腹側前索を通るものが確認された。

このような片側の M1 から脊髄への両側性の投射は、CST 損傷後の機能回復過程に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

(58) 両手鏡像運動の開始は片手分のコストですむ？

荒牧 勇^{1,2} 定藤規弘¹¹情報通信研究機構 バイオ ICT グループ 計算神経サブグループ
²自然科学研究機構 生理学研究所)

「両手鏡像運動は片手運動のように 1 ユニットとしてプログラムされている」という仮説を支持する行動実験は多い。一方で、脳活動からこの仮説の補強に成功した研究はない。

両手運動を対象とした脳イメージング研究は「到達運動」や「周期運動」などを対象として数多く報告されているが、その殆どは「両手非鏡像運動は鏡像運動よりも困難であるため、ある脳部位の活動が大きい」という結論にとどまっている。その理由として、運動プログラムの問題を扱うならば、運動パラメータの初期入力過程が反映されるであろう「開始時」の脳活動に注目するのが効果的であるにもかかわらず、(1) 到達運動研究では運動の「開始」と「持続」に関わる脳活動が区別しにくいこと、(2) 周期運動研究では運動の「持続」に関わる脳

活動に注目し、「開始」に関わる脳活動は無視していたこと、さらに (3) 冒頭の仮説を検証する上でもっとも重要な片手運動との比較が行われていないこと、等が考えられる。

本研究では、fMRI を用いて周期運動の「開始」と「持続」に関わる脳活動を分離し、両手鏡像運動、両手非鏡像運動、片手運動の比較を行った。注目する脳部位は、パーキンソン病患者に歩行の開始障害が観察されることから大脳基底核とした。

すべての条件で運動開始時には被殻吻側に、持続時には被殻尾側に賦活が確認された。また、運動開始時の被殻吻側の賦活は、両手鏡像運動において両手非鏡像運動よりも顕著に小さかった。さらに、両手鏡像運動での同部位の賦活量は、両手運動であるにもかかわらず、片手

運動時の賦活量と同程度に過ぎなかった。この結果は、両手鏡像運動では左右の同名筋に対して同じ運動パラメータが利用できるため、運動開始時のパラメータ初期入

力にかかる負荷が両手非鏡像運動よりも著しく減少することを示唆しており、両手鏡像運動が1ユニットとしてプログラムされているという仮説を強く支持する。

(59) 両手運動遂行中の脳活動に視覚フィードバックのパターンが及ぼす影響

戸松彩花, 笈 慎治

((財) 東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・認知行動研究部門)

両手をリズムカルに動かす場合、動作は左右対称になり、非対称動作は行いにくい。しかし、左右非対称動作を行いながら、あたかも左右対称動作を遂行しているかのように感じられる視覚情報が得られると、動作の正確性が増す。このような視覚情報とともに左右非対称動作を遂行するときの脳活動を、fMRI を用いて検証した。

被験者はfMRI装置内で両手の位相ずれが90度になるように、両手によるタッピングを行った。このとき左右それぞれのタッピングに応じて、コンピュータ画面の中で左右2つの光点が動いた。要求された動作が正確に行われると2つの光点の位相ずれが90度になる条件(以下FB90条件とする)と、位相ずれが0度(=左右対称)になる条件(FB0条件)を設けた。

この実験より導かれた結果および考察は以下の通り

である。(1)FB90条件では一次感覚運動野、補足運動野、視覚野、小脳下部の活動が認められた。(2)FB0条件では一次感覚運動野、背側運動前野、頭頂連合野、島皮質の活動が認められた。(3)FB0条件ではFB90条件よりも島皮質の活動が有意に減少した。補足運動野は記憶誘導性の運動遂行に関わると報告されており、一方、運動前野は視覚誘導性の運動で活動が報告されている。つまり、FB0条件では、視覚フィードバックを用いて運動したにもかかわらず、通常の視覚誘導性運動として処理されなかったことになる。また、島皮質は多数のモダリティを統合する座といわれていることから、FB0条件では、視覚情報と固有感覚情報をともに参照(=感覚情報統合)しながら現行の運動を修正する一連のフィードバックループの情報処理負荷が軽減していたことが示唆された。

(60) 低頻度反復経頭蓋的磁気刺激 (rTMS) 後の脳内変化：拡散強調画像法による検討

阿部十也¹, 美馬達哉¹, 福山秀直¹ (¹京都大学医学研究科付属高次脳機能総合研究センター)

【目的】rTMSは脳可塑性を誘導し、運動異常症、うつ病などの治療として応用されているが、その作用機序は明らかでない。我々は水分子拡散運動を測定するMRI拡散強調画像(DWI)を用いて低頻度rTMSによる脳内変化を検討した。

【方法】健常人7人に対して左一次運動野に安静時運動閾値下の強度で10分間、1HzのrTMSを行った。刺激前、直後、10、20分後にDWI画像と運動誘発電位(MEP)を

記録した。DWI信号変化(ADC値)はSPM2で評価した。

【結果】刺激直後にMEP振幅の減少が認められ、MRIでは、両側一次感覚運動野、前頭前野、運動前野でADC値増強が認められた。

【結語】DWIの信号変化はrTMSによる神経ネットワークの可塑性変化を表している可能性がある。

(61) 到達運動中のターゲットおよび視野背景の運動が引き起こす短潜時運動応答の特性

門田浩二¹, 五味裕章^{1,2}(¹JST-ERATO 下條潜在脳機能プロジェクト, ²NTT コミュニケーション科学基礎研究所)

我々が活動する環境には多様な変動が含まれているにもかかわらず、我々は特に強く意識することなく日常的に安定した運動を行っている。このことは身体運動を制御している感覚-運動システムに、種々の変動を補償する自動的かつ高速の処理機構が備わっていることを示唆している。例えば、到達運動中に突然ターゲットがジャンプしたり視野背景が移動すると、ごく短潜時(>170ms)で腕の運動軌道が修正されることが知られている。この運動応答は意図的な制御を必要としない反射的なものであるが、両者の応答の違いは十分に明らかにされていない。そこで本研究では、到達運動中のターゲットジャンプおよび視野背景運動が引き起こす運動応答(TJR, MFR)の特性を幅広い年齢層で比較検討し、応答

特性の差異からそれぞれの応答の生成メカニズムを検討した。その結果、TJR と MFR のどちらの応答においても応答規模と年齢との間には関係性が認められないこと、さらに高齢者(～79歳)においても応答潜時の大幅な遅延は生じないことが明らかとなった。つまり、これまでに数多くの運動で報告されているような、加齢による低速化はMFRやTJRのような短潜時の運動応答に必ずしも当てはまらないことが示された。さらに、すべての年齢層においてMFRの応答潜時がTJRよりも短いことが明らかとなった。これはMFRの運動指令の生成がTJRと比較して情報処理の負荷がより少ない単純な系が担っている可能性を示すものと考えられる。

(62) 一次運動野は腕運動中の力場環境に対する予測的反射ゲイン調節に関与している

木村聡貴¹, 五味裕章^{1,2}(¹NTT コミュニケーション科学基礎研究所・人間情報研究部, ²JST・ERATO 下條潜在脳プロジェクト)

運動中の反射ゲインは遂行する課題や環境に応じて機能的かつ予測的に調節されることが知られている。しかしながら、そのような調節がどういった神経メカニズムで実現されているのかについては不明な点が多い。そこで本研究では、この問題に迫る端緒として、伸張反射調節に対する大脳一次運動野(M1)の関わりについて検討した。被験者はマニピュランダムを用いて既知の力場(左右いずれかの方向への一定力、運動後半に設けた)に対する腕運動を行った。腕が力場に至る前に機械摂動を与えたところ、誘発された肩筋群の反射応答の大きさは力場方向に応じて変化した。すなわち、力場環境に対する予測的な反射ゲイン調節が観察された。しかしながら、反射処理が行われる時間帯(摂動から反射が生じるまでの時間帯)のM1活動が乱されるように経頭蓋磁気刺激

(TMS)を摂動に先行して加える(厳密には、TMSによって筋に生じる筋活動停止区間(サイレントピリオド, M1抑制性介在ニューロン活動が起源と考えられている)がこの時間帯にオーバーラップするようにTMSを加える)と、反射応答自体は残るにも関わらず、反射ゲインの変化(反射ゲイン調節)は減弱した。この反射調節の低下は、TMSによって生じる末梢性の影響(筋収縮、あるいはそれに伴う筋紡錘感度の変化)では説明できないことを追加実験により検証した。したがって、反射調節の低下は、主にTMSによるM1介在ニューロン網活動の変化に起因すると考えられた。以上の知見より、M1介在ニューロン網は、反射生成というよりむしろ、環境に応じた予測的な反射ゲイン調節に関与していると示唆された。

(63) 小脳プルキンエ細胞複雑スパイクは筋肉座標系で運動をコードする

角田吉昭, 笥 慎治 (財) 東京都神経科学総合研究所・認知行動研究部門)

小脳皮質プルキンエ細胞は手首運動中に複雑スパイクを発射する。その発火頻度は約 1Hz 程度と非常に低い。例えば手首を屈曲する運動の間に発火するとは限らない。低頻度の発火にも関わらず、複雑スパイクが手首運動開始時のタイミングに発火確率が上昇することが報告されてきた。我々は、運動開始時の複雑スパイクが空間、関節、筋肉座標系のどの座標系で運動をコードしているか調べた。サルに 8 方向への手首運動を 3 つの前腕姿勢で行わせ、その際の小脳プルキンエ細胞の活動を記録した。Mano 等の報告と同様に運動開始時に複雑スパイクの発火頻度の上昇が確認された。複雑スパイクの活動を

運動開始時刻と運動開始指示時刻との 2 つのタイミングでそれぞれ揃え、活動を比較した。その結果、発火は運動開始を指示する視覚刺激の変化よりも、運動開始時刻に相関が強いことが示された。さらに、複雑スパイクの発火頻度の方向選択性を調べ、最適方向を計算した。前腕姿勢を回内位から回外位に変化させたとき、最適方向が回転する細胞が存在した。最適方向の回転角度は 180 度より小さく、筋肉座標系に分類された。これらの結果は、複雑スパイクが運動開始時に筋肉座標系で運動をコードしていることが示唆された。

(64) 第一次運動野損傷後の運動機能回復：行動学および組織化学的検証

肥後範行, 村田 弓, 大石高生, 山下晶子, 松田圭司, 林 基治
(産業技術総合研究所・脳神経情報研究部門・システム脳科学研究グループ)

マカクザルの第一次運動野手領域をイボテン酸により不可逆的に破壊した後、積極的な運動訓練を行わせるグループと行わせないグループに分け、運動機能の回復過程を比較した。訓練群では、小さい球状の物体を円筒状の窪みから取り出す把握運動課題を 1 日 1 時間、週 5 日行わせた。これらの個体では損傷直後は重篤な運動麻痺があるものの、その後把握課題の成功率が一時的な下降を伴いながら徐々に上昇し、1-2 ヶ月の訓練期間を経て損傷前と同程度にまで回復した。課題遂行時の手指の動きを解析したところ、課題成績の変動にともなって、把握方法の変化が見られることが明らかになった。すなわち、回復の途上では指の独立した動きが不十分なため手掌全体を用いた把握を行っていたが、指の動きの自由度の回復にともなって拇指と示指を対立した精密把握への切り替えが見られるようになった。損傷後に把握運動訓練を行わせなかった個体群においても、課題成績の回

復が見られたが、損傷後数ヶ月経った後も成績は損傷前よりも有意に低かった。非訓練群では損傷後数ヶ月の時点においても手掌全体を用いた把握が多く見られ、精密把握はほとんど見られなかった。以上のことから、第一次運動野損傷後の精密把握の回復には積極的な把握運動訓練が必要であると考えられる。さらに、第一次運動野損傷後の機能回復の背景となる神経回路の再組織化を明らかにするため、神経回路の変化にかかわる遺伝子発現に着目した。第一段階として、軸索終末に存在する神経成長関連タンパクである GAP-43 の、運動関連領域における mRNA 発現を調べた。組織化学的解析の結果、運動前野腹側部の錐体細胞において、GAP-43 mRNA の発現亢進が見られることが明らかになった。この結果は、第一次運動野損傷後に、運動前野腹側部からの投射終末において構造変化が生じた可能性を示すものである。

(65) 力出力とスティッフネス制御に関わる脳部位

春野雅彦 (ATR 脳情報研究所 計算神経生物学研究室 室長代理)

スポーツや道具使用などの日常行動において、手足の力出力とスティッフネスを巧みに制御することが求められる場面が多い。我々が筋の冗長性により力出力とスティッフネス制御を独立にしかも容易に行えることは脳においても両者は部分的には別々に表現されていることを示唆する。我々は手首の isometric 課題を用いてこの仮説を検証する fMRI 実験を行った。

FORCE 条件では被験者は左右ランダムに提示されるターゲットに合わせて3秒間左右に力を出力することを求める(手首は動かさない)。1回のFORCE条件は10回の試行を含み、その間被験者の主動筋と拮抗筋からEMGを同時計測する。続くCOCONTRACT条件ではFORCE条件における主動筋と拮抗筋の平均EMGの和をターゲットとして、主動筋と拮抗筋の同時活性を行ってもらう(手首は動かさない)。FORCE条件と同様に1回のCOCONTRACT条件は10回の試行を含む。全体の課

題はREST, FORCE, COCONTRACTを8回繰り返すものである。課題のデザインからFORCE条件とそれに続くCOCONTRACT条件では平均の意味での筋活動は同じであり、両条件では視覚刺激も同じである。また、被験者は撮像の前に外部で十分な課題練習を行ったので、撮像中に学習効果や条件間のパフォーマンス差は見られなかった。

この課題を遂行中の14名の被験者に対してMRIの撮像を行った。解析はFORCE条件中の力、COCONTRACT条件中のEMGの和とBOLD信号が有意に相関する脳部位をSPMにより探索した($P < 0.001$, uncorrected)。その結果、FORCE条件では背側運動前谷の後部、COCONTRACT条件では腹側運動前野の活動が見られた。それに対してMIは両条件で共通の活動を示した。これらの結果は我々の仮説を支持するものである。

(66) 随意運動時における末梢感覚入力役割

関 和彦, 武井智彦 (自然科学研究機構・生理学研究所・認知行動発達機構研究部門)

動物は、自分をとりまく外部環境に関する必要な情報を得るために運動を行う。随意運動によって目的としている外部環境に到達し、その情報を感覚受容器を用いて抽出し、中枢神経系によって認知されるのである。その際、感覚情報の抽出は動的な運動の最中になされており、さらに末梢感覚受容器からの情報と運動指令に関わる情報は中枢神経系の様々なレベルで合流している事が知られている。古典的な生理学的研究ではこの感覚系と運動系の相互作用のうち、感覚→運動という情報の流れに焦点が当てられていた。例えば感覚入力が直接運動を引き起こす、脊髄反射や姿勢反射などはそのよい例である。しかし最近になって、運動→感覚という情報の流れ、つまり運動指令が感覚入力を制御している事を示唆する神経生理学的知見が多く報告されるようになった。この場合、感覚入力とははや受動的なものでなく、行っている運動によって強調されたり抑圧されたりといった制御の

対象となる。つまり「動く」という行為自体がすでに感覚抽出の初期段階になっているという考えである。しかし、このような運動指令によって求心感覚入力が動的に修飾される仕組みについてはよくわかっていない。そこで我々は、一次求心神経へのシナプス前抑制によって、随意運動中の状況依存的な感覚入力の動的制御がおこなわれていると考えて、サルを対象とした電気生理学的実験を行っている。これまでに、末梢神経へのシナプス前抑制が随意運動の動的局面で増大すること、筋神経と皮膚神経を比較した場合その増大パターンに相違があること、そのシナプス前抑制は下降性及び求心性両方の入力において引き起こされている可能性のあることを示してきた。今後はこのシナプス前抑制を引き起こす上位中枢の同定、また抑圧される感覚神経が伝達している情報の詳細な解析から、運動時における感覚入力抑圧現象の機能的意義に迫りたい。

(67) 内力と運動の軌道を予測する力覚情報に基づいた運動規範

太田 憲¹, Rafael Laboissière²

(¹国立スポーツ科学センター・スポーツ情報研究部, ²Espace et Action U864, INSERM, France)

我々の日常生活では、手先と外部環境（物体や道具）との物理的な相互作用を避けて生きていくことが出来ないとと言っても過言ではない。このようなタスクでは、手と物体の間には力の相互作用が生じ、ヒトは手先からの力覚情報に基づいて巧みに物体を操作しており、この体性感覚の情報が重要な役割を果たしていることが予想される。しかし、近年、外部環境と相互作用するヒトの腕運動の研究が盛んであるものの、外部環境は単なる外乱として扱われることが多く、ヒトが手先の力覚情報に基づいて如何に巧みに道具を操作し、運動を遂行しているかという観点からの生体の研究は多くはない。ところで、ハンドル回しのような幾何学的拘束のあるタスクや、両手で道具を操作するタスクでは、手先に内力が生じ、上手にタスクを遂行するために内力の制御も重要となる。この内力は物体の操作力とは独立に決定される力で、任意に決定することが出来る。したがって、運動の目標軌

道のみならず、適切な内力の目標軌道を設定することは、運動の効率のみならず、物体の破壊を防ぐという観点からも重要である。

そこで本研究では、手先に内力の発生するクランク回転タスクを用いて、内力を含めて運動を良く再現する「力覚変化最小規範」を用いて、手先の力覚情報がどのように利用されているかを、ヒトの心理物理実験と最適化によるシミュレーションとの比較によって検討した。この力覚変化最小規範は制御入力（関節トルク、または筋力）と手先力の両方を滑らかにする複合型規範であり、多くのヒトの実験結果を良く再現することから、ヒトが手先の力覚情報を用いて運動を遂行していることを裏付けている。また、この規範は、両手で行うタスク等、環境との相互作用のある多くのタスクの運動を予測できるだけでなく、手先力が作用しない自由空間でのリーチング運動も予測する。

(68) 腕の運動学習・制御モデルの提案

神原裕行, 小池康晴 (東京工業大学 精密工学研究所 知能工学部門)

我々が普段行っている運動は、脳が実際に体を動かしながら複雑な制御対象である身体の巧みな制御方法を学ぶことによってはじめて実現される。脳の運動制御機構を説明する計算論的なモデルがこれまでにいくつか提案されてきたが、それらは習熟された運動の制御方法を説明するものであり、脳がどのようにしてそれを学ぶかを説明してはいない。本研究の目的は、制御だけでなく学習機構を説明できる脳の運動学習・制御モデルを提案することにある。具体的には、強化学習とフィードバック誤差学習を組み合わせることで、実際に腕を

制御しながら試行錯誤的にフィードバック及びフィードフォワード制御器を獲得する運動学習・制御モデルを構築した。このモデルを重力の作用する矢状面における腕の姿勢保持運動の学習シミュレーションに適用した。その結果、制御対象である腕のダイナミクスに関する知識が無い状態から、様々な目標位置に正確に姿勢を保持できるようになることが確認できた。また、姿勢保持運動学習によって獲得された制御器を用いることによって、目標軌道を計画することなく人間の様々な二点間到達運動の軌道が再現できることが確かめられた。

(69) 社会的行動選択に伴う頭頂葉神経細胞の特性

藤井直敬（理化学研究所・脳科学総合研究センター・象徴概念発達研究チーム）

社会的文脈が私達の行動選択に様々な修飾を与えることは日々経験することである。つまり、私達は“空気を読む”ことで社会的文脈を読み取り、社会的適応行動を行っていると言える。社会的文脈が私達の行動選択に与える影響は大きく、条件によっては指一本動かすことも出来ないこともある。しかしながら社会的脳機能に関する神経生理学的研究は殆どなく、それがどのように実現されているのかは不明であった。そこで、今回「多次元生体情報記録手技」という新しい記録手法を開発し、2頭の日本サルが社会空間を共有しているときの頭頂葉神経細胞活動を2頭から同時に記録した。サルが行う課題は「社会的餌とり課題」と呼ばれる単純な課題である。2頭のサルは、3種類の相対位置に配置された。両者の間に餌をめぐる競合関係が無いときは、どちらのサルも相手のことを無視していた。しかしながら同じ空間を共有するようになると、共有空間に置かれた餌に関して競合

が生じる。そのような場合、2頭の間には明確な上下関係が観察され、競合空間内では殆どの場合で上位のサルが餌を獲得した。このような社会的行動選択を見せるサル達の頭頂葉神経細胞の特性は以下の通りであった。まず、両者が社会的に繋がりを持たない場合、左頭頂葉の運動関連細胞は、その殆どが自分の右手の運動にのみ反応を示した。ところが、両者の間に双方向的な社会関係が確立した場合、頭頂葉の神経細胞は自身の右手に関しての反応性を優位に低下させ、他者の運動へも反応を示すようになった。この反応特性の変化は上位、下位の両方のサルにみることができ、個体間に社会的繋がりが確立されることにより、頭頂葉における環境認知の様式が大きく切り替わることが明らかになった。これは、頭頂葉の神経細胞が社会文脈依存的な行動選択に関与していることを示しており、社会的脳機能を実現するための一部を担っていると考えられた。

(70) 運動抑制の署名 Stop Signal 課題遂行の成否は M1 活動から予測できる

美馬達哉, Reda Badry (京都大・医・高次脳研)

運動コントロールの中でも運動抑制は重要なメカニズムだがその詳細は知られていない。運動抑制がたんに運動準備の停止なのか M1 を能動的に抑制するプロセスであるかを解明し、運動抑制が実行される以前にその成否を予測することが可能かを知らるために、M1 に対して経頭蓋的磁気刺激法 (TMS) を Stop Signal 課題中に施行した。

Stop Signal 課題では、被験者は視覚的に提示された GO 刺激に対して左か右かのボタンをできるだけ早く押すように指示されている。そのうち 20% では GO 刺激から一定の時間差で Stop 刺激が提示され、その場合に被験者はボタン押しを抑制しなければならない。時間差はコンピュータによって調整され正答率はおよそ 50% を保ってい

る。TMS を M1 に対して与え、手内筋に誘発された筋電図振幅を計測して M1 興奮性の指標として用いた。平均反応時間は GO 刺激後 500ms であったが、TMS が 400ms で与えられた場合に、成功した Stop 課題では M1 の抑制が認められた。一方で、失敗した Stop 課題では GO 刺激後 300ms に開始する M1 興奮性の上昇が認められた。

こうした結果は、TMS による M1 活動性の評価によって、実際に運動抑制が行われる 100-200ms 前に被験者が運動抑制課題に成功するか失敗するかを予測することが可能であることを示している。

(71) 両腕運動と片腕運動：同じ腕の運動学習に関わる脳内過程の違い

野崎大地 (東京大学大学院教育学研究科身体教育学コース)

外見上、両腕運動はそれぞれの腕の運動が組み合わされたものである。実際、例えば左腕の運動を片腕だけで行おうと、右腕の運動を付け加えて両腕運動として行おうと、左腕の運動自体に特別な違いがあるわけではない。我々は、「運動学習」を切り口として、片腕運動としての左腕運動と、両腕運動時の左腕運動が行動レベルで異なっていることを以下の通り明らかにした。

新奇な力場の存在下でリーチング運動を行うと、手先の軌道は大きく曲げられてしまう。しかし、試行を繰り返すと、円滑で直線的な軌道を再獲得する。このとき、腕が力場に適応した度合い(運動学習効果)は、力場を切った試行(キャッチ試行)で生じる、力場と反対方向への手先の動き(後効果)の大きさによって評価することができる。まず、被験者は、左腕だけで行うリーチング動作によって力場を学習した。十分な学習後、左腕だけで行うキャッチ試行、両腕を一緒に動かすキャッチ試行の二つを行ってもらったところ、両腕運動時に左手が示す後効果の大きさは、片腕運動時の6~7割に留まった。つまり、片腕運動によって獲得した左腕の運動学習効果は、両腕運動時の左腕には6~7割しか活用されない。

しかしながら、両腕運動では注意がもう一方の腕の運動に分散されるので、発揮される運動学習効果が低下し

たとも考えられる。そこで今回は、最初から両腕を一緒に動かしながら、左腕への力場を学習してもらった(右腕に力場は課さない)。この場合にも、両腕運動によって左腕が獲得した学習効果は、片腕だけで行う左腕運動時には6~7割しか転移しなかった。

こうした同じ腕が獲得する運動学習効果の片腕運動-両腕運動間の部分的転移は、図1に示すように、同じ左腕が学習効果を獲得するといっても、それに関与する脳内過程が片腕運動時と両腕運動時で一部異なっていると考えることによって自然な説明が可能である。この単純な図式が妥当である証拠として、さらに我々は、ここから導かれる二つの予測、①片腕運動で左腕への力場を学習した後、力場を切り両腕運動を繰り返すと左手が示す後効果が徐々に減少し左腕は学習効果を失ってしまうかのようにみえるが、片腕運動に切り替えると直ちに隠れていた後効果が出現すること、つまり、片腕運動時の左腕のみ学習効果を保持しているという奇妙な状況が実現できること、②従来、同時に適応することが極めて困難だとされてきた全く反対の方向を向いた二つの力場に、片腕運動時の左腕と両腕運動時の左腕のそれぞれに別々の力場を割り当てることによって、同時にかつ容易に適応できること、を実証した。

(72) 脊髄運動系における GAP-43免疫陽性構造

大石高生, 肥後範行, 山下晶子, 村田 弓, 西村幸男, 松田圭司, 林 基治, 伊佐 正
(京都大学霊長類研究所, 産業技術総合研究所, 日本大学, 筑波大学, 生理学研究所)

皮質脊髄路を頸髄 C4/C5 レベルで損傷したサルは、延髄レベルで損傷したサルとは異なり、指の麻痺後に訓練を経て精密把握機能が回復する(Sasaki et al., 2004)。この回復の神経回路機構を知る一環として、代表的な成長関連タンパクである GAP-43 の損傷個体の脊髄での局在を免疫組織化学法で調べた。損傷から3ヶ月経った個体の側索では、損傷部位の吻側尾側の両方で損傷と同側に反対側よりも強いシグナルを持つ陽性構造が見られた。

また、前角では第 IX 層の運動ニューロン周辺などに線維状の GAP-43 陽性構造が見られた。脊髄で軸索の再構成が起こっていることが示唆される。これらの免疫陽性構造がどのような細胞に由来するものかを明らかにするため、損傷個体及び正常対象個体で GAP-43 とさまざまなマーカー分子との二重染色を行った。現在までに GAP-43 陽性構造がグリア細胞由来ではなくニューロン由来であることは確認できたので、vGluT1, vGluT2,

vGAT, vAChT, 5-HT との二重染色を用いて、どのような伝達物質を持つニューロンであるかの解析を進めてい

る。

(73) 一次運動野における到達運動の情報表現

宮下英三¹, 阪口 豊², 小松三佐子¹

¹東京工業大学・大学院総合理工学研究科・知能システム科学専攻

²電気通信大学・情報システム学研究科・情報メディアシステム学専攻

脳による情報の符号化は科学的に興味深い問題であると同時に、応用的に利用価値のある脳情報の復号化とは表裏一体となっている。到達運動における情報の符号化と復号化は Georgopoulos らによって提案された“preferred direction”と“population vector”といった概念に象徴されている。この概念が導入されて以来、それまでは力の大きさを符号化していると考えられていた一次運動野が手先の運動方向をも符号化していると考えられるようになった。しかしながら、これら二つの変数は互いに相関するため、どちらを符号化しているのかを明らかにするためには同一の神経細胞活動に対する変数による説明の良さを比較する必要がある。我々は一次運動野

の視覚誘導性到達運動の情報表現に着目し、同一の時系列神経細胞活動に対する運動学的な変数(加速度, 速度, 位置)と運動力学的な変数(慣性力, コリオリ力+遠心力, 関節周りの粘性)による説明の良さを線形重回帰により比較した。その結果, 肩関節あるいは肘関節の受動的な動きに応答する 189 個のユニットの内 180 個の解析対象ユニットの 85%が, 運動学変数よりも運動力学変数の線形和によってより良く説明できることが分かった。さらに説明変数の係数を解析すると, 関節トルクあるいは手先力そのものを符号化しているのではないことが明らかになった。

(74) 精密運動中の皮質脊髄路の興奮性および皮質内抑制について

遠藤隆志 (順天堂大学スポーツ健康医科学研究所)

これまで経頭蓋磁気刺激法(TMS)を用いて, 精密把握運動および強力把握運動時の皮質運動野の興奮性および皮質内抑制を比較し, 課題依存的变化を報告したものは多い。しかしながら, 両把握課題間で物体把握の方法が大きく異なるために共同筋活動および発揮筋力において大きな差が認められ, 課題遂行時の精密さの違いで皮質運動野の興奮性および皮質内抑制が変化するかどうかは明らかにされていない。そこで本研究では, 精密さを必要とする精密把握課題において皮質脊髄路の興奮性および皮質内抑制はどのような修飾を受けるかについて明らかにすることを目的とした。被験者は物体を普通に第一指と第二指で握る課題(NP)およびNP課題と同じ把握方法で物体を落とさない必要最小限の把握力で物体を握る課題(MS)を行い, これらの課題遂行中にTMSを被験者

の皮質運動野に与え, 第一背側骨間筋の表面筋電図より誘発される運動誘発電位(MEP)の振幅値, MEP後に現れる筋電図消失期間(SP)および背景筋電図量を解析した。また, 課題遂行中の把握力も記録した。重量負荷は50, 100, 200, 400 および 600g の5種類であった。全ての重量負荷において, NP課題の把握力はMS課題の約2倍あり, また背景筋電図量もNP課題に比して有意にMS課題で少なかった(ともに $P < 0.01$)。しかしながら, 全ての重量負荷においてMEPおよびSPは両課題間で有意な差が認められなかった($P > 0.05$)。背景筋電図量で標準化したMEPおよびSPは全ての重量負荷においてMS課題でNP課題に比して有意に大きかった(ともに $P < 0.01$)。これらの結果は, 皮質脊髄路の興奮性および皮質内抑制は運動課題の精密度に関係して変化すること, お

よびこれらが精密な運動制御時において重要な役割を果たしている可能性を示唆する。

(75) 個性適応型筋電義手の開発とその適応機能評価のための脳機能解析

加藤 龍, 横井浩史

(東京大学大学院・工学系研究科・精密機械工学専攻・知能システム分野・認知発達機械研究室)

当研究室では、前腕切断者のための個性適応型筋電義手の開発を行ってきた。この筋電義手は、①ヒトの手指構造を模した干渉駆動関節により多自由度・軽量・高出力を実現するロボットハンド、②ヒトの義手への適応能力を考慮することで長期安定的に動作意図推定が可能な方法論、③手指の触圧を使用者に伝達する表面電気刺激による触覚フィードバック、という3つの特徴を持つ。

本研究では、これら筋電義手が使用者へどのような影響を与えるかを検証するため、機能的磁気共鳴画像(fMRI)による脳機能解析を行った。健常者と切断者との脳賦活状態の差異からその機能と賦活部位の関係を明らかにし、自然な操作感を有する義手開発を目指す。

しかし fMRI の計測環境は高磁場下にあるため、①義手を計測室に入れることができない、②誘導電流が微弱な筋電位信号に対してノイズとなる、という問題がある。そこで、義手を操作室に設置し、筋電位信号を計測するセンサ・ケーブルの静電遮蔽化、及び義手のビデオ映像

をプロジェクタでスクリーン投影した像を使用者に提示することで義手の遠隔操作を可能とした。

このような計測環境の下、(I)義手操作の習熟、(II)触覚フィードバックの有無についての検証を行った。義手使用(握る・開く)開始時には、右前腕切断者の脳には特徴的な賦活がみられなかったが、3時間の訓練後には左側 M1 に賦活が特定され、1か月の訓練後にはその賦活強度がより高いものとなった。この適応速度は、従来の義手研究の報告より早く、長期安定的な動作推定法によるものと考えられる。また触覚を左上腕にフィードバックした場合、左側 M1・S1(右前腕部)の賦活状態が認められた(感覚としての電気刺激が左上腕に付与しているのにも関わらず、右手に相当する部位が反応した)。この錯覚現象は、筋電義手を随意的に制御して物体把持することにより“能動的”に感覚刺激を感じたことにより起こったのではないかと考えられる。

(76) 到達・把持運動における運動情報表現に関する情報論的アプローチ

阪口 豊¹, 清水崇司¹, 石田文彦¹, 村田 哲², 池田思朗³

(¹電気通信大学・大学院情報システム学研究科, ²近畿大学・医学部, ³統計数理研究所・数理・推論研究系)

運動制御に関わる情報神経系においてどのように表現されているかという問題は、運動メカニズムを理解する上で重要な問題である。本発表では、運動情報表現について情報理論や計算モデルの観点から行なっている筆者らの研究を二つ紹介する。

一つは、3次元物体の手操作運動中に AIP 野で観察された神経活動の情報量解析の研究である。AIP 野には、把持対象の3次元形状特性に対して特異的に反応する細胞が見られるが、本研究では、対象の3次元形状による分類と神経活動との間の相互情報量を一定の時間ごとに

計算することにより、神経活動に含まれる対象形状に関する情報が課題遂行中の時間区間に応じてどのように変化するかを分析した。その結果、対象をどのような群に分類して情報量を計算するかに依存して情報量がピークを迎える時間区間が異なることが明らかになった。ある細胞では、粗い分類に対する情報量のピークが固視区間に生じたのに対し、より細かな分類に対する情報量のピークは手操作運動区間に現れた。このことは、AIP 野における情報表現が階層的な構造を有することを示唆する。

もう一つは、スパース表現に基づく運動指令生成モデルの研究である。このモデルでは、筋に対する運動指令を、あらかじめ定められた基本的指令パタンの線形荷重和で表現する。その上で、ある時刻に目標で正しく静止するという制約条件の下で、各基本的パターンにかかる荷重の総和を最小化する最適化問題を解くことによって運動指令を求める。この方法により得られる運動指令は、

結果として、ごく少数の基本的パターンだけの組み合わせとして表される（つまり、大多数の荷重はゼロになる：スパース表現）。数値実験の結果、スパース表現規範の下で生成された運動指令が人間の到達運動軌道の特徴を再現することがわかった。この結果は、「コンパクトな表現を求める」という規範が運動系においても機能している可能性を示している。

(77) 複数の報酬関数を持つ環境のための MOSAIC モデル

杉本徳和, 春野雅彦, 銅谷賢治, 川人光男 (ATR 脳情報研究所)

我々の日常活動の多くは報酬信号によって動機付けられている。報酬信号は課題の達成状況に応じて与えられ、自律的な活動を行うためには様々な種類の報酬をバランスよく獲得しなければならない。強化学習理論は報酬にもとづいた行動の解析や計算モデルの構築に有用な学習理論であり、多くの実験的、理論的研究成果が報告されている魅力的な研究分野である。しかし、強化学習分野における最も大きな問題は複数の報酬関数と環境のダイナミクスの両方が変動する状況への対処方法であり、この問題を解決する理論やモデルは未だ提案されていない。我々が以前に提案した MOSAIC 理論は環境のダイナミクスを予測し、その変動に応じて複数の制御器を切り替える手法である。今回我々は MOSAIC 理論における制御器を強化学習の枠組みへ拡張し、ダイナミクスの

変動と報酬信号の変動の両者に応じて制御器を切り替える手法 “MOSAIC for Multiple-Reward environment (MOSAIC-MR)” を提案する。MOSAIC-MR は複雑な環境を2つの基準（ダイナミクスと報酬）によって小環境へ分割し、分割された各小環境を複数の強化学習器が制御する。通常、複数の基準を用いて環境を分割すると組み合わせ爆発が起きてしまうため、タスク達成にとって重要な小環境にのみ強化学習器を動的に割り当てる機能を備えている。我々は MOSAIC-MR の性能を検証するため、風の強さ（ダイナミクス）と複数のゴール（報酬）が複雑に切り替わる環境下で、振子の制御課題をシミュレーションした。さらに、提案手法の実用性を検証するため二足歩行ロボットの制御課題を行い、スムーズな歩行運動が実現できる事を

15. 認知神経科学の先端 「注意と意志決定の脳内メカニズム」

2007年10月11日-10月12日

代表・世話人：小川 正 (京都大学大学院医学研究科認知行動脳科学)

世話人：吉田正俊 (生理学研究所 認知行動発達研究部門)

所内対応者：伊佐 正 (生理学研究所 認知行動発達研究部門)

(1) 脳損傷患者における注意と意思決定

鈴木 匡子 (山形大学大学院医学系研究科 高次脳機能障害学)

(2) 注意のトップダウン制御原理 - 次元加重, 課題構え, 探索モード

熊田 孝恒 (産業技術総合研究所 人間福祉医工学研究部門)

(3) 行動価値予測の誤差とリスク - 行動適応における前頭前野内側部の役割

松元 まどか (理化学研究所 脳科学総合研究センター)

(4) 注意が意思決定に変わるとき - 変換場としての頭頂連合野機能

小川 正 (京都大学大学院医学研究科 認知行動脳科学)

(5) 情動に基づく意思決定のための大脳基底核関連回路

中原 裕之 (理化学研究所 脳科学総合研究センター)

(6) 社会的状況における意思決定のメカニズム

春野 雅彦 (国際電気通信基礎技術研究所 脳情報研究所)

(7) ヒトにおける金銭的価値の脳内表現 - 機能的MRIによる神経経済学的研究

筒井 健一郎 (東北大学大学院生命科学研究科 脳情報処理分野)

(8) 意思決定の適当さ

渡邊 克巳 (東京大学 先端科学技術研究センター)

【参加者名】

網田 英敏 (北海道大学行動知能学講座), 市川 奈穂 (生理学研究所), 中田 大貴 (名古屋大学医学部保健学科), 綾部 友亮 (生理学研究所感覚運動調節研究部門), 小早川 睦貴 (昭和大学医学部神経内科), 岡田 貴裕 (大阪大学生命機能研究科 認知脳科学研究室), 武田 景敏 (昭和大学神経内科), 福永 浩介 (早稲田大学スポーツ科学研究科スポーツ神経科学研究室), 水口 暢章 (早稲田大学大学院 スポーツ科学研究科スポーツ神経科学研究室), 宮崎 由樹 (中京大学大学院心理学研究科), 土井 隆弘 (大阪大学大学院 生命機能研究科脳神経工学講座 認知脳科学研究室), 仁木 和久 (産業技術総合研究所 脳神経情報研究部門), 楠井 慶昭 (バイエル薬品株式会社専門治療薬事業部マーケティング中枢神経系), 近添 淳一 (東京大学統合生理学教室), 則武 厚 (玉川大学脳科学研究所), 綱田 丈二 (北海道大学医学研究科), 佐々木 亮 (順天堂大学生理学第一), 出馬 圭世 (生理学研究所・心理生理学研究部門), 庄野 修 (株式会社ホンダ・リサーチインスティテュート・ジャパン), 横井 功

(生理学研究所 感覚認知情報部門), 三浦健一郎 (京都大学・ナノメディシン融合教育ユニット), 郷田 直一 (生理学研究所), 森 健之 (国立精神神経センター武蔵病院放射線診療部) 佐々木 哲也 (基礎生物学研究所・脳生物学研究部門), 青木 佑紀 (奈良先端科学技術大学院大学), 小川 昭利 (理化学研究所脳科学総合研究センター象徴概念発達研究チーム), 山田 洋 (京都府立医科大学), 渡邊 正孝 (東京都神経科学総合研究所), 河村 章史 (岐北厚生病院), 山代 幸哉 (生理学研究所感覚運動調節研究部門), 池田 琢朗 (生理学研究所 認知行動発達研究部門), 加藤 利佳子 (生理学研究所 認知行動発達研究部門), 山田 大輔 (国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第4部), 吉田 岳彦 (沖縄科学技術大学院大学銅谷ユニット), 鹿内 学 (奈良先端科学技術大学院大学), 内山 仁志 (鳥取大学大学院生命科学研究科), 藤原 寿理 (東北大学大学院生命科学研究科脳情報処理分野), 原澤 寛浩 (脳科学総合研究センター理論統合脳科学研究チーム), 渡辺 秀典 (玉川大学脳科学研究所), 矢野 有

美 (奈良先端科学技術大学院大学), 関 和彦 (生理学研究所 認知行動発達研究部門), 桑島 真里子 (北海道大学 医学研究科認知行動学分野), 大鶴 直史 (総合研究大学院大学 生命科学研究科), 荒木 修 (東京理科大学 理学部応用物理学科), 柴田 智広 (奈良先端科学技術大学院大学 情報科学研究科), 田嶋 達裕 (東京大学大学院 新領域創成科学研究科), 平井 真洋 (生理学研究所 感覚運動調節研究部門), 下村 智斉 (中京大学大学院心理学研究科), 足立 信夫 (松下電器産業㈱先端技術研究所), 速水 則行 (榊豊田中央研究所), 近藤 正樹 (昭和大学 神経内科), 石津 智大 (慶應義塾大学 社会学研究科心理学専攻), 吉田 慎一 (厚生連昭和病院), 千歳 雄大 (京都大学医学部), 伊藤 南 (生理学研究所), 宇賀 貴紀 (順天堂大学), 野沢 真一 (東京工業大学), 浅川 晋宏 (生理学研究所), 坂野 拓 (生理学研究所 感覚認知情報部門), 定金 理 (基礎生物学研究所), 林 正

道 (生理学研究所 心理生理), 鴻池 菜保 (京都大学 霊長類研究所), 渡辺 昌子 (生理学研究所 感覚運動調節), 橘 吉寿 (生理学研究所 生体システム), 西尾 亜希子 (生理学研究所 感覚認知情報), 斉藤 紀美香 (生理学研究所 認知行動発達研究部門), 藤井 猛 (生理学研究所 心理生理), 高原 大輔 (生理学研究所 生体システム), 二宮 太平 (大阪大学), 岩室 宏一 (生理学研究所 生体システム), 松茂良 岳広 (生理学研究所 感覚認知情報), 鯨井 加代子 (生理学研究所 感覚運動調節), 西春 拓也 (生理学研究所 生体恒常機能), 野間 陽子 (生理学研究所 心理生理), 岡 さち子 (生理学研究所 感覚運動調節), 山森 哲雄 (基礎生物学研究所), 橋本章子 (生理学研究所 感覚運動調節), 浦川 智和 (生理学研究所 感覚運動調節), 牧 陽子 (生理学研究所 心理生理)

【概要】

人間の心の仕組みを脳を起点にして明らかにすることを目指す認知神経科学は、神経生理学、心理物理学、脳機能イメージング、計算論的神経科学といったさまざまな discipline からなる学際的領域であり、また実験対象も人間からサル、ラット、マウスと多様なものが扱われている。このような学際的領域を発展させるためには1) 専門分野を超えた共同研究 (情報交換) の促進と 2) 研究者の層の厚みを増やすことが不可欠である。そこで本研究会では、認知神経科学における2つの重要なトピック「注意と意志決定」に絞ったうえで、1) 共通するテーマに関連するさまざまな研究領域から、2) アクティブに研究成果を出している実際上の研究実施者を中心にして人選を行った (口演発表 8 件)。内訳は、神経心理 (1 名)、サル電気生理 (2 名)、脳機能イメージング (2 名)、計算論的神経科学 (1 名)、心理物理学 (2 名) であり、広範な領域から最新の話題を提供してもらった。

発表では議論の時間を多く取ることによって、特定のテーマについて様々な角度から議論を深める形式を採用した。また本研究会の特色として、講演者以外にも指定討論者として研究活動のアクティビティが高い研究者を招き、より活発で深化した議論を目指した。さらに、各講演に対して座長を 2 人配置することにより、議論のリードがよりスムーズになるように配慮した。また、初日の口演発表終了後にポスター発表の場を設定し、若手研究者中心に現在進行中の研究を発表してもらい、参加者相互の交流促進を促した (ポスター発表 17 件)。

本研究会への参加人数は生理学研究所内から 32 名、所外から 69 名と参加者総数が 100 名を越えた。熱気溢れる会場で、広範な分野から活発で質の高い議論がすべての講演において交わされ、研究会参加者から高い評価を得ることができた。

(1) 脳損傷患者における注意と意思決定

鈴木 匡子 (山形大学大学院医学系研究科 高次脳機能障害学)

視覚性注意の方向や広がり、処理する視覚対象を規定する一方、視覚対象を扱う課題の性質が視覚性注意

の範囲を限定する可能性がある。このような視覚性注意と視覚対象の処理の相互作用を知るために、脳損傷患

者における実験的観察を行った。(1) 両側頭頂葉梗塞における視覚性注意障害：規則的な図形の間にある線分を指示することはできたが、規則的に並んだ文字の間にある線分には気付かず、指示することができなかった。これは同一空間内でも、より有意味な対象に優先的に視覚性注意が向くことを示唆している。(2) アルツハイマー病（視覚型）における視覚性注意の配分：同一の視覚性対象であっても、口頭で質問に答える場合に比べて模写等をする場合は視覚性注意の範囲が著しく狭まった。ま

た同じ描画でも、手本の模写より記憶からの想起のほうが全体を捉えられた。このことから、より正確な視覚性処理を必要とするときは、視覚性注意の範囲は狭くなると考えられた。(3) 半側空間無視：模写の質的特徴の観察および新たに考案した抹消課題により、自己の体軸を中心とした片側空間に対する無視、置かれている空間に関わらずひとつの視覚対象の片側に対する無視があることが示された。

(2) 注意のトップダウン制御原理 — 次元加重, 課題構え, 探索モード

熊田 孝恒 (産業技術総合研究所 人間福祉医工学研究部門 認知行動システム研究グループ)

特定の刺激特徴に対する処理を重みづけが行われる「特徴探索モード」では、その構えに合致した妨害刺激が提示された場合に干渉効果 (随伴性注意捕捉) が生じる。そのため、標的対象への重み付けと妨害対象からの干渉の回避を最適に行う機構が存在すると考えられる。

左右の前頭葉損傷患者を被験者とし、探索モードの選択と実行にかかわる脳部位を探ったところ、右の前頭弁蓋部を損傷した患者において「特徴探索モード」を採用したときに、妨害刺激による随伴性注意捕捉の頻度が増大した。前頭弁蓋部の機能を推定するため、健常被験者を用いて、以下の4つの要因を検討した。(1) 刺激のク

オリティ低下, (2) 直前に利用した特徴加重のキャリーオーバー, (3) 空間的注意の焦点化の失敗, (4) 次元加重の不完全な設定。その結果、入力刺激のクオリティが低下した場合に、標的と非標的の競合が増大し、随伴性注意捕捉の生起率が向上した。また、事前の次元加重からの負のキャリーオーバーの効果が生じている可能性も明らかとなった。これらの結果から、右前頭弁蓋部が、設定されたモードに応じて、入力刺激間の競合の解消や、過去の次元加重履歴と現在の刺激との競合の解消にかかわる役割を担っていることが示唆された。

(3) 行動価値予測の誤差とリスク — 行動適応における前頭前野内側部の役割

松元 まどか (理化学研究所 脳科学総合研究センター認知機能表現研究チーム)

動物は、環境が変化すると、行動を変化させることによって環境に適応する。この行動適応において前頭連合野が果たす役割を明らかにするため、行動学習課題を行っているサルの前頭連合野内側部と外側部から、単一神経細胞活動を記録した。行動学習ブロックにおいて、行動結果を示すフィードバック刺激に対して活動を高める神経細胞が内側部に見られた。これらの細胞には、正負のそれぞれのフィードバック刺激に選好を示す細胞があった。活動の大きさは、選択、実行した行動の価値予測における誤差に一致していた。また、行動を実行した後、

フィードバック刺激を呈示する前の期間に、活動を漸増させる別の神経細胞が、内側部および外側部に見られた。トップダウン注意の制御に関与しているとされる外側部よりも、内側部の方が早く活動を開始していたことから、内側部はトップダウン注意制御のデマンドを表現していると考えられた。さらに、内側部の活動の大きさは、フィードバック刺激に対して期待される予測誤差の二乗平均平方根の値と一致していた。以上の結果は、行動適応において前頭連合野内側部が実行した行動の評価・調整、および行動結果へのトップダウン注意の制御に関与して

いることを示唆する。

(4) 注意が意思決定に変わるとき — 変換場としての頭頂連合野機能

小川 正 (京都大学大学院医学研究科 認知行動脳科学)

我々の周囲には多数の物体が存在し、複雑な視覚的世界を形成しているが、目標とする物体を視覚探索によって探し出すことができる。このような機能を説明するため、saliency map 仮説が提案されている。仮説では、視覚情報にもとづく外的要因と、意図・知識などにもとづく内的要因に依存して各刺激の重要性を表現する二次元視野地図が形成されるが、刺激特徴や文脈、及び目標を探索するための意図・知識などの個別の要因に対して特異性をもたずに視覚刺激の重要性を表現する。

本研究では、このような「普遍的な視覚刺激の重要性」が表現されている可能性をサルの後頭頂連合野 (LIP,

7a) からニューロン活動を記録することによって調べた。その結果、(1) 特定の外的要因 (特徴, 文脈) と内的要因 (注意状態) が組み合わさった場合にのみ目標刺激に対して活動強度を増大させるニューロン群と、(2) 条件にかかわらず目標刺激に対して活動強度を増大させるニューロン群が見出され、両者は同一部位に存在していた。前者は、後者の普遍的な視覚刺激の重要性 (saliency map) 導くために部分的な解答を提供していることから、saliency map 表現への変換過程の場として後頭頂連合野が寄与していることが示唆された。

(5) 情動に基づく意思決定のための大脳基底核関連回路

中原 裕之 (理化学研究所 脳科学総合研究センター 理論統合脳科学研究チーム)

現在にいたるまでの脳研究の知見から、大脳基底核回路は、大脳皮質などの他領野とともに意思決定、特に報酬関連や情動を含む意思決定と運動制御に大きな役割を果たすと考えられる。講演では、これらの知見に関連した私どもの研究を中心に話す。第一に、これを良い機会とし、今までの私どもの大脳基底核関連回路の研究を俯瞰したい。例えば、大脳皮質・大脳基底核の並列回路の

機能や、報酬予測誤差としてのドーパミン神経細胞活動の特性などに関する研究である。第二に、この俯瞰と共に、近年の脳研究の知見を鑑みつつ、基底核回路が関連する意思決定の脳内メカニズムについて、私どもの研究の視点から重要と思われる論点を整理したい。第三に、時間が許せば、その論点とともに、より一般的な視点からいくつかの仮説を議論する。

(6) 社会的状況における意思決定のメカニズム

春野 雅彦 (国際電気通信基礎技術研究所 脳情報研究所)

During behavioral adaptation through interacting with human and non-human agents, marked individual behavioral differences are seen in both real-life situations and games. However, the underlying computational process and neural mechanism are not well understood. Here, by neuroimaging

subjects trying to maximize monetary rewards by learning in a prisoner's dilemma game, we show that activity in the superior temporal sulcus (STS) is correlated with the subject's ability to consider the agent's strategy into reward prediction, and this STS activity can predict individual differences in

learning performances. These results indicate that by achieving reward prediction based on the agent's strategy, the STS plays a crucial role in extending human social

intelligence beyond simple conditioning by incorporating the agent's interactive characteristics into reward prediction.

(7) ヒトにおける金銭的価値の脳内表現—機能的MRIによる神経経済学的研究

筒井 健一郎 (東北大学大学院生命科学研究科 脳情報処理分野)

脳内において報酬や罰、あるいは刺激や行動の価値がどのように表現されているのかについて、いまだ不明な点が多い。そこで、本研究では、ヒトの脳において金銭的な価値がどのように表現されているのかについて、機能的MRI法を用いて調べることにし、とくに以下の二つの点について明らかにすることを目的とした。一つ目は、金銭的な報酬(利得)と罰(損失)が脳内の異なる領域で別個に表現されているのか、あるいは、同一の領域で統合された形で表現されているのかということである。二つ目は、金銭の絶対的価値と相対的価値がそれぞれ脳内のどのような領域で表現されているのかということである。

ある。実験の結果、絶対価値と相対価値、およびそれらの利得と損失について、それぞれ異なる脳領域が関係していることが明らかになった。絶対的価値に関連して賦活した領域は、先行研究によると快あるいは不快な情動体験に伴って賦活しやすい領域であることから、金銭の損得にともなう直接的な情動体験と関係していると考えられる。一方で、相対的価値に関連して賦活した領域は、反実仮想的(counterfactual)な思考やそれに伴う情動、あるいは、報酬情報を基にした意思決定など、金銭に関するより認知的な過程にかかわっている可能性がある。

(8) 意思決定の適当さ

渡邊 克巳 (東京大学先端科学技術研究センター (認知科学分野), (独)産業技術総合研究所, (独)科学技術振興機構)

「正しい」意思決定のイメージは、外界の情報を正確に取り込みながら、個人的な好みに基づいた判断過程を経て、最終的な行動に至るという一連の時間軸に沿ったものである。この意味での意思決定には、外界のルール、自分の能力、自分の好み、自分の思考過程などに関する正しい認識など、いくつかの前提が必要となると考えられている。しかし、現実の場面ではこのような前提条件が

成り立たないことが多く、実験室での心理物理実験や質問紙を使った実験でもそのようなことが確かめられている。外界のルール、自分の能力、自分の好み、自分の思考過程の結果などの「正しい」意思決定に必要とされている条件が、かなり曖昧であり、適当に決められている可能性を示す実験例を紹介し、意思決定のpostdictive(事後的)な側面について議論する。

16. シナプス伝達ダイナミクス解明の新戦略ーシナプス伝達の細胞分子調節機構ー

2007年11月21日ー11月22日

代表・世話人：加藤総夫（東京慈恵会医科大学総合医科研神経生理学）

所内対応者：鍋倉淳一（生体恒常機能発達機構研究部門）

- (1) 神経細胞内 Cl 濃度の分布調節による GABA 応答性制御
山田順子（静岡大学創造科学技術大学院）
- (2) カリウムクロライド共役担体 KCC2 の機能発現制御
渡部美穂（生理学研究所生体恒常機能発達機構研究部門）
- (3) GABA_B 受容体によるマウス上丘でのバースト発火の制御機構
金田勝幸（生理学研究所認知行動発達研究部門）
- (4) 視覚野における抑制性シナプス可塑性の NMDA 受容体による制御
堀部尚子（名古屋大学環境医学研究所視覚神経科学）
- (5) 細胞内カルシウムシグナルを指標とした小胞体機能調節と記憶学習との関連性
森口茂樹（東北大学大学院薬学研究科薬理学）
- (6) 交感神経ー褐色脂肪細胞間伝達による細胞内シグナリングの可塑性：高脂肪食と胆汁酸の効果
早戸亮太郎（名古屋学芸大学管理栄養学部解剖生理学研究室）
- (7) 慢性神経因性疼痛モデルにおける扁桃体中心核シナプス増強とその固定化
加藤総夫（東京慈恵会医科大学総合医科研神経生理学）
- (8) 小脳プルキンエ細胞における AMPA 受容体トラフィッキングの制御機構
山口和彦（理化学研究所脳センター記憶学習）
- (9) マウス Renshaw 細胞への脊髄運動中枢からのシナプス入力様式
西丸広史（産業技術総合研究所脳神経情報研究部門脳遺伝子研究グループ）
- (10) 養育行動の分子神経メカニズム
黒田公美（理化学研究所脳科学総合研究センター精神疾患動態研究チーム）
- (11) Ca²⁺チャネルと短期シナプス可塑性
持田澄子（東京医科大学細胞生理学講座）
- (12) 神経伝達物質放出におけるトモシンの全く新しい機能
匂坂敏朗（神戸大学大学院医学研究系研究科生理学・細胞生物学講座膜動態学）
- (13) グルタミン酸受容体δ2サブユニットはシナプス前終末の分化を誘導する
畔柳智明（京都大学大学院理学研究科生物科学専攻生物物理学教室）
- (14) 海馬苔状線維シナプス前終末における小胞ダイナミクス
八尾 寛（東北大学大学院生命科学科脳機能解析分野）
- (15) TRPA1 の活性化による興奮性シナプス伝達の増強
中塚映政（佐賀大学医学部生体構造機能学講座神経生理学分野）
- (16) 神経終末端の膜電位変化によるシナプス伝達修飾機構
堀 哲也（同志社大学生命医科学部神経生理学研究室）

【参加者名】

高橋由香里（東京慈恵医大・総合医科学研究センター）、大・医）、武田健太郎（東京慈恵医大・医）、和光未加（東京慈恵医大・医）、高橋智幸（同志社大・生命医）、齋藤平野丈夫（京都大・院・理）、長谷川奈海（東京慈恵医

直人 (同志社大・生命医), 中村行宏 (同志社大・生命医), 金子雅博 (東京大学・院・医), 持田澄子 (東京医科大学・細胞生理), 高鶴裕介 (生理研), 西巻拓也 (生理研), 山下慈朗 (東大・院・医), 中塚映政 (佐賀大・医), 稲田浩之 (生理研), 八尾寛 (東北大・院・生命科学), 畔柳智明 (京大・院・理), 和気弘明 (生理研), 田中洋光 (京大・院・理), 長崎信博 (京大・理), 鶴野瞬 (京大・院・理), 江口工学 (沖縄科学技術研究基盤整備機構・大学院大学先行研究事業), 神谷温之 (北大・院・医), 久場健司 (名古屋学芸大・管理栄養), 田村友穂 (東京慈恵医大・総合医科学研究センター), 山下貴之 (沖縄科学技術研究基盤整備機構・大学院大学先行研究事業), 藤井大祐 (京大・理), 堀 哲也 (同志社大・生命医科), 榊原賢司 (同志社大・工), 堀部尚子 (名大・環研), 小松由紀夫 (名大・環研), 早戸亮太郎 (名古屋

学芸大・管理栄養), 山口和彦 (理研・脳センター), 森口茂樹 (東北大・院・薬), 西丸広史 (産総研・脳神経情報), 金田勝幸 (生理研), 吉村由美子 (名大・環研), 山田順子 (静岡大・創造科学技術大学院), 福田敦夫 (浜松医大・医), 山本清文 (東京慈恵医大・神経生理学研究室), 渡部美穂 (生理研), 黒田公美 (理研・脳センター), 山口純弥 (生理研), 本橋詳子 (沖縄科学技術研究基盤整備機構・大学院大学先行研究事業), 加藤総夫 (東京慈恵医大・総合医科学研究センター), 井村泰子 (東京慈恵医大・総合医科学研究センター), 岩瀬彩乃 (慈恵医大・院医), 匂坂敏朗 (神戸大・院医), 山本泰憲 (神戸大・院医), 石橋 仁 (生理研), 鍋倉淳一 (生理研), 田村泰基 (京大・理), 田中進介 (京大・理), 山寄義人 (京大・理), 平尾頭三 (生理研), 江藤圭 (生理研)

【概要】

脳機能の基礎細胞過程であるシナプス伝達の構造および機能に関する研究は神経科学の中心課題の一つである。本研究会では、生理学, 生化学, 分子生物学, および, 形態学の立場から遺伝子工学, パッチクランプ, 光学的測定などの技術を駆使してシナプス研究を進める最前線の研究者が一堂に会し, 抑制性伝達, 可塑性と特異的機能, および, シナプス前機構のサブテーマごとに, それぞれ, 3, 7 および 6 演題の報告が行われた。1 日目, 抑制性伝達のセッションでは, Cl⁻イオン濃度の細胞内分布とその意義, それを制御する K-Cl 共役担体のリン酸化による機能発現制御機構, および, 局所回路活動における代謝型 GABA 受容体の役割について報告があった。可塑性と特異的機能のセッションでは, 視覚野の抑制性シナプス伝達の可塑性, 細胞内小器官の局在に関する分子群の意義, 褐色脂肪細胞の細胞内 Ca²⁺濃度制御機構の栄養による可塑的变化, 慢性痛における扁桃体中心核シ

ナプス伝達増強の固定化, 小脳シナプスにおける AMPA 受容体のトラフィック制御機構の差異, 脊髄レンショウ細胞へのシナプス入力の特徴, および, 養育行動を担う内側視索前野神経回路のシナプス構成に関する報告があった。2 日目, シナプス前機構のセッションでは, 短期シナプス可塑性におけるカルモジュリンによるカルシウムチャネルの制御の意義, シナプス小胞融合制御における放出関連分子トモシンの意義, グルタミン酸受容体δ2 サブユニットのシナプス形成における役割, 苔状線維-CA3 錐体細胞シナプスにおける即時放出可能小胞の利用効率, 脊髄後角におけるシナプス前 TRPA1 チャネルによるシナプス伝達の促進機構, および, シナプス前終末の膜電位が放出に及ぼす影響と機構などに関する報告があり詳細な実験手法から研究の生理学・病態生理学的意義に至るまでの活発かつ建設的な討論が展開された。

(1) 神経細胞内 Cl 濃度の分布調節による GABA 応答性制御

山田 順子 (静岡大学創造科学技術大学院)

脳における主要な抑制性伝達物質である GABA は, 細胞内 Cl⁻濃度 ([Cl⁻]_i) の変化により興奮性にも抑制性にも変化しうる。

今回我々は, ラット及びマウス海馬スライスの歯状回顆粒細胞を用い, 単一細胞内における局所的な GABA 応答を測定した。樹状突起における E_{GABA} は細胞体より過

分極方向にシフトしたが、神経軸索の起始部 (AIS ; axon initial segment) における E_{GABA} は細胞体より脱分極方向にシフトした。AIS-細胞体間の $[Cl^-]_i$ 勾配は NKCC1 抑制薬 bumetanide により消失したが、樹状突起-細胞体間の $[Cl^-]_i$ 勾配は影響を受けなかった。NKCC1 ノックアウト

トマウスでは、bumetanide の効果と同様に、AIS-細胞体間の $[Cl^-]_i$ 勾配のみが消失した。

これより、NKCC1 は AIS-細胞体間の $[Cl^-]_i$ 勾配に関わり、AIS は GABA により脱分極を生じていることが示唆される。

(2) カリウムクロライド共役担体 KCC2の機能発現制御

渡部美穂, 和氣弘明, 鍋倉淳一 (生理研・生体恒常機能発達機構)

発達に伴い KCC2 の蛋白発現や機能発現が増加することにより、GABA は未熟期の細胞興奮性作用から、成熟動物における抑制性作用へスイッチする。しかし、成熟神経細胞における KCC2 の機能発現の制御機構はほとんど明らかにされていない。KCC2 は長い C 末端領域を細胞内に持ち、チロシンキナーゼのリン酸化部位が一カ所存在することから、KCC2 の機能発現におけるリン酸化の役割について検討を行った。リン酸化阻害剤やリン酸化部位の変異により、KCC2 が機能しなくなり、KCC2 の細胞体や樹状突起での発現パターンがドット状から細

胞膜上における一様な分布に変化した。また、KCC2 の C 末端領域の欠失により、KCC2 が機能しなくなった。KCC2 の分布の変化についてさらに検討したところ、KCC2 はリピッドラフトに存在し、リン酸化によりラフトと interaction しやすくなることがわかった。また、KCC2 はリン酸化により C 末端を介して、オリゴマーを形成することがわかった。以上の結果より、チロシンキナーゼによるリン酸化および KCC2 の C 末端領域は KCC2 の機能発現において重要な役割を持つことが示唆された。

(3) GABA_B 受容体によるマウス上丘でのバースト発火の制御機構

金田勝幸, Penphimon Phongphananee (生理研・認知行動発達機構, 総研大)

柳川右千夫 (群馬大・医)

小幡邦彦 (理研・BSI)

伊佐 正 (生理研・認知行動発達機構)

中脳上丘ニューロンのバースト発火は興味の対象にすばやく視線を向けるサッケード運動の制御に重要である。本研究では、マウス脳スライス標本を用いて GABA_B 受容体のバースト発火に対する役割を検証した。GABA_A 受容体アンタゴニストの存在下、上丘浅層を単発刺激すると中間層ニューロンにおいてバースト発火が誘発された。GABA_B 受容体アンタゴニスト CGP52432 (CGP) の追加適用は、バースト発火の持続時間を顕著に増大させた。同様の効果は CGP を浅層に局所投与することでも観察

された。以上の結果は、浅層に発現する GABA_B 受容体がシナプスから遊離された GABA により活性化されることを示している。浅層ニューロンでは、ポストシナプス GABA_B 受容体を介した過分極と shunt 効果、プレシナプス受容体を介したグルタミン酸遊離の制御が認められた。以上の結果は、上丘浅層の GABA_B 受容体は上丘局所回路でのバースト発火の持続時間を制限する機能を持ち、サッケード運動を適切に終了させる上で重要な役割を果たす可能性を示している。

(4) 視覚野における抑制性シナプス可塑性の NMDA 受容体による制御

堀部尚子, 任 鳴, ベグム・タハミナ, 吉村由美子, 小松由紀夫
(名大・環研)

発達期視覚野の抑制性シナプスでは, 長期増強 (LTP) あるいは長期抑圧 (LTD) が起きる。本研究では, 興奮性シナプス活動が抑制性シナプスの可塑的变化に及ぼす影響とその機構を調べた。マウスの視覚野スライス標本を用いて, ホール・セル記録法により, 2/3 層錐体細胞から抑制性シナプス後電流 (IPSC) を記録し, 4 層の高頻度刺激により可塑的变化を誘発した。高頻度刺激が記録細胞に大きな脱分極と活動電位を引き起こす場合には,

LTD が生じ, 小さな脱分極のみを引き起こす場合には, 逆に LTP が起こった。さらに, LTD 発生にはシナプス後部の, LTP 発生にはシナプス前部の NMDA 受容体の活性化が必要であることがわかった。また, 微小 IPSC の解析と免疫組織化学により, 抑制性シナプス前終末に NMDA 受容体が存在する結果も得た。以上より, シナプス後細胞の NMDA 受容体の活性化状態が可塑性の方向を制御することが示唆された。

(5) 細胞内カルシウムシグナルを指標とした小胞体機能調節と記憶学習との関連性

西 美幸, 竹島 浩 (京都大院・薬)
森口 茂樹, 福永 浩司 (東北大院・薬)
八尾 寛 (東北大院・生命)

本研究ではジャンクトフィリンの III, IV 型遺伝子の同時欠損したマウスを利用して小胞体機能の記憶・学習における役割を電気生理学, 免疫組織化学, 行動薬理学的手法を用いて検討した。ジャンクトフィリン遺伝子欠損マウスにおいて記憶・学習の有意な低下が Y 迷路および受動回避学習試験による行動解析により認められ, 電気生理学的手法により海馬 CA1 領域における LTP の有意な減弱が認められた。また, 免疫プロット法の解析では, ジャンクトフィリン遺伝子欠損マウスの海馬 CA1 領域における CaM キナーゼ II の恒常的な活性上昇が認められた。スライスパッチクランプ法による海馬の錐体

細胞の解析においても, 活動電位発生時に認められる後過分極 (AHP) の消失が確認された。これらの結果によりジャンクトフィリン遺伝子欠損マウスでは AHP の形成が抑制されていることが明らかとなった。NMDA 受容体より流入するカルシウムが ryanodine 受容体の活性化を介して小胞体より放出されたカルシウムによる SK チャンネルの開口が海馬 CA1 領域錐体細胞における AHP の形成に重要であることが示された。本研究結果は, Moriguchi et al. PNAS, 103, 10811-10816 (2006) に掲載され, 新しい海馬における AHP の記憶・学習における機能を明らかにした。

(6) 交感神経—褐色脂肪細胞間伝達による細胞内シグナリングの可塑性: 高脂肪食と胆汁酸の効果

早戸亮太郎, 日暮陽子, 久場雅子, 久場健司 (名古屋学芸大・管理栄養学)

褐色脂肪細胞は密な交感神経支配を受けている熱産生器官であり, エネルギーバランスの調節において重要な役割を担っている。近年, 胆汁酸が褐色脂肪細胞に作用し, 肥満の防止に寄与する事が明らかになっている (Watanabe et al., Nature, 439:486, 2006)。この事は, 交感

神経を介する熱産生機構が胆汁酸により促進される可能性を示している。

そこで私たちはマウスを 3 群に分け, 普通食 (Chow), 高脂肪食 (HF), 胆汁酸添加高脂肪食 (HF+CA) により飼育し, 肥満発症とその阻止時において, 褐色脂肪細胞の

アドレナリン受容体活性化剤や脱共役剤 FCCP による Ca^{2+} 応答と、ミトコンドリア-滑面小胞体 (ER) 間のカップリングがどのように変わるかを調べた。その結果、 β 活性化剤、 α 活性化剤、FCCP による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は、HF マウス

で小さく、HF+CA マウスで大きい事がわかった。また、ミトコンドリアから ER への Ca^{2+} カップリングは、HF マウスで弱く、HF+CA マウスで強い事が示唆された。

(7) 慢性神経因性疼痛モデルにおける扁桃体中心核シナプス増強とその固定化

加藤総夫, 高橋由香里, 池田 亮, 岩瀬彩乃, 井村泰子 (東京慈恵会医科大・総合医科研)

慢性痛における侵害受容と情動を結ぶ神経回路の可塑的变化を解析するために、脊髄神経結紮神経因性疼痛モデルを作成し、異痛症応答を定量評価した後、脳スライスを作成して脚傍核-扁桃体中心核 (CeLC) ニューロン間の興奮性シナプス後電流を解析した。その結果、(1) 異痛症の強度に依存してシナプス伝達が増強される、(2) これは non-NMDA 受容体成分の増加による、(3) これは放出確率の変化を伴わない、(4) 両側性に生じる早期増

強 (術後 1.5 日目まで) に続き、片側性の遅期増強が生じ、7 日後以降まで持続する、そして (5) 急性痛を改善させてもシナプス増強は残存する、という事実を見出した。以上より、持続的な疼痛入力によって誘発された扁桃体中心核シナプス伝達の増強が早期増強から遅期増強へと固定化されることが、慢性痛における持続的情動障害の構造的基盤を構成しうると結論した。

(8) 小脳プルキンエ細胞における AMPA 受容体トラフィッキングの制御機構

山口和彦 (理研・脳センター・記憶学習)

AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA-R) のシナプス膜発現はエクソ/エンドサイトーシスのバランスにより調節され、バランスの活動依存性シフトがシナプス後膜における可塑性メカニズムと考えられる。しかし小脳プルキンエ細胞 AMPA-R の構成性と活動依存性トラフィッキングの関係は明らかではない。テタヌス毒素 (TeTx) を細胞内投与すると構成性エクソサイトーシスは阻害さ

れ、EPSC 振幅は約半分に減少し定常状態となるが、この定常状態からさらに LTD が生じた。Latrunculin (Lat) は TeTx 抵抗性の定常状態を減少させ、Jasplakinolide (Jas) はこれを増大させた。また Jas は LTD を阻害し、Lat は LTD を増強させたことから、LTD にはアクチン脱重合が関与していることが示された。

(9) マウス Renshaw 細胞への脊髄運動中枢からのシナプス入力様式

西丸広史 (産総研・脳神経情報)

脊髄の Renshaw 細胞は運動ニューロンの軸索側枝から興奮性シナプス入力を受け、運動ニューロンを反動的に抑制することが知られているが、その機能やシナプス入力様式の大部分は依然として不明である。私たちは、GABA 作働性ニューロンが GFP を発現する GAD67-GFP

ノックインマウス新生児の脊髄摘出標本において脊髄内の神経回路網をほぼ正常に保ったままで極めて効率的に抑制性ニューロンを同定できることを見いだした。これらのニューロンのうち、腰髄腹側に細胞体が局在するものからホールセル記録し、近傍の腰髄前根の電気刺激に

対して単シナプス性 EPSP が観察されるものを Renshaw 細胞として生理学的に同定できる。これまでに軸索側枝からのシナプス入力のアセチルコリン受容体の他にグルタミン酸受容体を介していることを明らかにしたが、今

回、このシナプスにおいて、グルタミン酸受容体の役割を検討した結果を報告した。また、Renshaw 細胞は、歩行運動中枢および脊髄反射経路から強い抑制性のシナプス入力を受けることを報告した。

(10) 養育行動の分子神経メカニズム

黒田公美 (理研・脳センター)

養育本能は哺乳類すべての種の生存に必須であるため進化的に保存されており、その基礎は性行動や摂食・飲水と同様、遺伝的に組み込まれた本能的欲求である。私共は、養育行動異常をきたす遺伝子改変マウスなどを手がかりに、養育行動の中枢である内側視索前野 (MPOA) において ERK-FosB シグナル伝達系が養育行動の開始に重要な役割を果たすことを明らかにした (Kuroda K. O. et al., 2007)。現在は、これまでほとんど研究されてこな

かった MPOA の解剖学的・神経化学的解析を行い、MPOA 内の微小神経回路を明らかにすることを試みている。具体的には、子からの知覚入力と自らの状況に関する情報を統合し、養育するか否かの意思決定を行う過程に、種々の MPOA 内ニューロンがどのように関与しているかを、MPOA に発現するニューロペプチドのノックアウトマウスや GFP による可視化トランスジェニックマウスなどを用いて解析している。

(11) Ca²⁺チャネルと短期シナプス可塑性

持田澄子 (東京医科大学・細胞生理学講座)

ラット培養上頸交感神経節細胞に脳由来 P/Q 型 Ca²⁺チャネル、カルモジュリン (CD) 結合 domain 欠損ミュータント P/Q 型、IQ domain ポイントミュータント P/Q 型、両 double ミュータント P/Q 型 Ca²⁺チャネルを発現させ、Ca²⁺チャネル活性化パターンの違いによる神経伝達物質放出の変化を電気生理学的手法を用いて解析した結果、1) CD 結合 domain 欠損ミュータント P/Q 型 Ca²⁺チャネル (ΔCBD) では PPD は起こらず、IQ domain ポイントミュー

タント P/Q 型 Ca²⁺チャネル (IM-AA) では PPF が起こらない、2) 頻回刺激時 (1 秒間) のシナプス伝達 depression は ΔCBD では起こりにくい、3) Augmentation は IM-AA Ca²⁺チャネルでは強く抑制されるが、Post-tetanic potentiation (PTP) は P/Q 型 Ca²⁺チャネルの活性に依存しないことが判明し、Ca²⁺結合蛋白質による Ca²⁺チャネルの可塑的变化に起因した Ca²⁺流入量の変化が短期シナプス可塑性に寄与することが示唆される。

(12) 神経伝達物質放出におけるトモシンの全く新しい機能

匂坂 敏朗, 山本 泰憲 (神戸大院・医)

高井 義美 (阪大院・医)

私共は、これまで、神経伝達物質の放出に SNARE 系の活性制御タンパク質であるトモシンが抑制的に働くことを明らかにしている。トモシンが t-SNARE とトモシン

複合体を形成し、小胞融合に必要な SNARE 複合体の形成を抑制することにより、神経伝達物質の放出を制御している。最近、私共は、トモシンが神経伝達物質の放出

に抑制的だけでなく、促進的に働くことを見出した。培養ラット上頸交感神経細胞でトモシンをノックダウンすると、アセチルコリンの分泌を抑制した。一方、小胞融合には、SNARE 複合体のオリゴマー形成が重要であることが示唆されている。そこで、トモシンの SNARE 複合体のオリゴマー形成における効果を生化学的に検討し

たところ、トモシンが SNARE 複合体のオリゴマー形成を促進した。また、その促進効果には、N 末端側の WD40 リピート配列を含む領域が関与していた。以上の結果から、トモシンは SNARE 複合体のオリゴマー形成を介して、神経伝達物質放出を促進的にも調節していると考えられた。

(13) グルタミン酸受容体 $\delta 2$ サブユニットはシナプス前終末の分化を誘導する

畔柳智明, 平野丈夫 (京大院・理)

グルタミン酸受容体 $\delta 2$ サブユニット($\delta 2$) は小脳平行線維-プルキンエ細胞間シナプス後膜に特異的に局在している。 $\delta 2$ 欠損マウスでは平行線維-プルキンエ細胞間シナプス数が減少していることから、 $\delta 2$ がこのシナプスの形成及び維持に関与していると考えられている。免疫染色法およびホールセルパッチクランプ法によって、 $\delta 2$ 欠損マウス由来の小脳培養細胞では顆粒細胞-プルキンエ細胞間シナプスが形態的にも機能的にも異常であるこ

とを見出した。 $\delta 2$ を遺伝子導入した HEK293T 細胞と小脳細胞との混合培養下では、HEK293T 細胞上に顆粒細胞がシナプス前終末を形成していることが、免疫染色法、FM 1-43 イメージング、そして HEK293T 細胞からのホールセル記録により明らかになった。このシナプス形成には $\delta 2$ の細胞外ドメインが必要だった。以上の結果は、 $\delta 2$ の細胞外ドメインがシナプス前終末の分化を誘導できることを示唆している。

(14) 海馬苔状線維シナプス前終末における小胞ダイナミクス

八尾 寛, 引間卓弥, 石塚 徹 (東北大・生命)
須山成朝 (自治医大・統合生理)
阪上洋行 (北里大・医)

マウス海馬苔状線維終末における、シナプス伝達安定性の基盤となるメカニズムについて、以下の3つの仮説を検証した。(1) 易放出性小胞プール (RRP) が大きい。(2) RRP へのシナプス小胞の補充速度が大きい。(3) シナプス小胞が速やかにリサイクルされる。電子顕微鏡画像から RRP の大きさを推定したところ、小胞総数の 10% に満たなかった。シナプトフルオリン法により、全体の約半数の小胞が開口放出可能な小胞プールに属していたが、開口放出されない休小胞プールが存在することが示

された。開口放出可能な小胞の移動時定数は、12-16 s であるのに対し、再利用時定数は、約 50 s であった。すなわち、連続刺激により、あらかじめドックされていた小胞が速やかに枯渇し、予備小胞プールから RRP への補充が伝達安定性を維持していること、伝達安定性を維持するに十分な速いリサイクル成分がないことが示唆された。補充速度が大きいことが安定性を維持している主要なメカニズムであると結論される。

(15) TRPA1の活性化による興奮性シナプス伝達の増強

中塚映政, 小杉雅史, 藤田亜美, 熊本栄一 (佐賀大・医)

TRPA1 の中枢神経系における役割は全く知られていない。今回, 成熟雄性ラットから作製した脊髄横断スライス標本の膠様質ニューロンにパッチクランプ法を適用し, TRPA1 活性化が脊髄後角における興奮性シナプス伝達にどのような作用を及ぼすか検討した。TRPA1 は膠様質の興奮性シナプス前終末に発現しており, その活性化に伴って, 電位依存性カルシウムチャネルの開口なしにシナプス前終末へカルシウムが流入し, グルタミン酸含

有シナプス小胞の放出が誘発された。その結果, シナプス下膜の AMPA 受容体のみならず, spill over したグルタミン酸によってシナプス外の NMDA 受容体が活性化され, 膠様質ニューロンにおける興奮性シナプス伝達は増強することが明らかとなった。これらのことから, 脊髄における TRPA1 は, 生理的な痛みの調節あるいは病態時の難治性疼痛に関与している可能性が示唆された。

(16) 神経終末端の膜電位変化によるシナプス伝達修飾機構

堀哲也, 高橋智幸 (同志社大・生命医科)

マウス calyx of Held シナプスでホールセル記録を行い, 前末端膜電位変化によるシナプス修飾機構を検討した。前末端脱分極に伴って EPSC が増強した。脱分極が進むと前末端活動電位振幅が減少し, EPSC が減弱した。電位固定下に前末端 Ca^{2+} 電流 (I_{pCa}) と EPSC を同時記録した。脱分極に伴い前末端内 Ca^{2+} 濃度が上昇し, I_{pCa} と EPSC の振幅が増大した。前末端細胞内 EGTA 導入実験により, I_{pCa} と EPSC の増強は細胞内 Ca^{2+} に依存すると推論された。しかし, 10mM EGTA 単独による EPSC 増強

抑制効果は極めて弱く, このことから, 残存 Ca^{2+} 依存性伝達物質放出促進の主要なメカニズムは Ca domain 内にあると推測された。次に, 前末端脱分極に伴う I_{pCa} 増強を人工的にキャンセルしたところ, EPSC の増強程度が約半分 (40-60%) に減少した。シナプス前末端の脱分極は前末端内の Ca^{2+} 濃度上昇をもたらし, I_{pCa} の増強および I_{pCa} 非依存性機構の両方を介して伝達物質の放出を増強させると結論される。

17. 中枢・末梢臓器間連携による摂食, エネルギー代謝調節

2008年2月28日-2月29日

代表・世話人：矢田俊彦（自治医科大学医学部生理学講座統合生理学部門）

所内対応者：箕越靖彦（生理学研究所発達生理学系生殖内分泌系発達機構研究部門）

- (1) 転写因子 FoxO1 による摂食調節ペプチドの発現調節機構
北村忠弘（群馬大学生体調節研究所代謝シグナル研究展開センター）
- (2) 消化管ホルモンと摂食調節
伊達 紫（宮崎大学フロンティア科学実験総合センター生命科学研究部門生理活性物質探索分野）
- (3) グレリン欠損マウスの表現型について
児島将康, 佐藤貴弘（久留米大学分子生命科学研究科遺伝情報研究部門）
- (4) 摂食行動調節におけるストレスと神経ヒスタミン
千葉政一, 吉松博信（大分大学医学部 生体分子構造機能制御講座・第一内科）
- (5) 骨格筋でのグルコース代謝に及ぼす視床下部オレキシンの調節作用
志内哲也, 箕越靖彦（生理学研究所発達生理学系生殖・内分泌系発達機構研究部門）
- (6) GLP-1 による肝-膵神経性連関
西澤誠, 中川淳, 中林肇
（金沢医科大学内分泌代謝内科・金沢大学自然科学研究科動態生理学（保健管理センター））
- (7) 神経系を介した肝グルコキナーゼの核/細胞質間移行の調節
豊田行康, 三輪一智（名城大学薬学部病態生化学）
- (8) 門脈シグナルによる肝グリコーゲン, グルコキナーゼ G6-P, グリコーゲンシンターゼおよび
グリコーゲンホスホリラーゼの変動
菊池方利（朝日生命成人病研究所）
- (9) 転写因子 Dmbx1 の破綻によるエネルギー代謝異常の解析
三木隆司, 志内哲也, 藤本和歌子, 箕越靖彦, 岩永敏彦, 清野進
（千葉大学大学院医学研究院神経科学部門高次脳機能学講座自律機能生理学）
- (10) PACAP ノックアウトマウスの代謝調節異常
中田正範, 山本早和子, 矢田俊彦（自治医科大学医学部生理学講座統合生理学部門）
- (11) グレリンによる食欲・消化管運動調節-抗うつ薬 SSRI を例に-
乾明夫, 藤塚直樹, 浅川明弘（鹿児島大学大学院行動医学（心身医療科））
- (12) Nesfatin-1 の摂食抑制機構
清水弘行, 森昌朋（群馬大学大学院医学系研究科病態制御内科学（第一内科））
- (13) 自律神経を介した臓器間代謝情報ネットワーク
片桐秀樹（東北大学大学院医学系研究科創生応用医学研究センター再生治療開発分野）
- (14) IL-6/STAT3 を介した臓器間ネットワークの意義
井上啓¹, 小川渉²
（¹金沢大学フロンティアサイエンス機構, ²神戸大学大学院医学系研究科糖尿病・代謝・内分泌内科学分野）
- (15) 2型糖尿病モデル GK ラットにおける中枢-脂肪-膵軸連関の変調
安藤明彦^{1,2}, 石橋俊², 矢田俊彦¹
（¹自治医科大学医学部生理学講座統合生理学部門, ²自治医科大学医学部内科学内分泌代謝学部門）

【参加者名】

北村忠弘 (群馬大学), 中村 肇, 西沢 誠, 井上 啓 (金沢大学), 児島将康 (久留米大学), 嶋津 孝 (愛媛大学), 菊池方利 (朝日生命成人病研究所), 豊田行康, 熊澤良祐, 森 茂彰, 鈴木礼奈, 松尾吉泰, 長尾真里子 (名城大学), 乾 明夫 (鹿児島大学), 三木隆司 (千葉大学), 片桐秀樹, 山田哲也 (東北大学), 伊達 紫 (宮崎大学), 小川 渉 (神戸大学), 吉松博信, 千葉政

一 (大分大学), 矢田俊彦, 中田正範, 安藤明彦 (自治医科大学), Kyoung Kon Kim (Gachon University Gil Medical Center), 岩崎有作 (静岡県立大学), 藤川哲兵 (京都大学), 内田邦敏 (統合バイオサイエンスセンター), 山中章弘, 箕越靖彦, 志内哲也, 岡本土毅, 鈴木 敦, 李 順姫, 戸田知得, 大和麻耶, 藤野祐介 (生理研)

【概要】

摂食調節における中枢・末梢連携に関して, 北村氏は転写因子 FoxO1 による摂食調節ペプチド Agrp と Pomc の発現制御機構について, 伊達氏は迷走神経系による末梢代謝の脳への伝達機構について, 千葉氏は前頭前野辺縁下皮質 (infralimbic cortex) がストレス応答と食行動反応の調節に深く関与していること, 清水氏は新たな食欲抑制蛋白ネスファチン-1 は末梢投与でも脳幹孤束核を介して摂食抑制作用を現すことを示した。

臓器間の代謝神経情報連絡に関して, 西澤氏は腸管ホルモン GLP-1 が門脈で感知され神経を介して膵島インスリン分泌を刺激する経路を, 菊池氏はグルコースが門脈で感知され神経を介して肝グリコーゲン合成の増加につながる経路を, 豊田氏は脳室内へのグルコース注入による肝グルコキナーゼの核から細胞質への移行を, 志内氏はオレキシン A の VMH への投与が骨格筋でのグリコーゲン合成を促進する系を, 井上氏は中枢インスリン作用により肝 IL-6/STAT3 経路が活性化され肝糖産生が抑制される系を示した。さらに, 片桐氏は, 肝での PPAR γ 2 過剰発現は迷走神経求心路および交感神経遠心路を介し

て脂肪組織での脂肪分解を増加させ基礎代謝を亢進し, 肥満や糖尿病を改善すること, 乾氏は, 選択的セロトニン再取り込み阻害剤 (SSRI) は摂食を抑制し, 同時に空腹期の運動を食後期様の運動に変換させ, これらの効果はグレリン分泌の抑制を介すること, 安藤氏は, 2 型糖尿病モデル GK ラットの過食が中枢-脂肪-膵軸連関の変調によることを示した。

新規調節因子について, 中田氏は PACAP-KO マウスが低体重・低血糖を示すことから, このペプチドがエネルギー貯蔵と放出に関与すること, 児島氏はグレリン-KO マウスに摂食・代謝の変化が見られず代償機構が示唆されること, 三木氏は転写因子 *Dmbx1* が胎生期の脳分化に関与し動物行動量と摂食量の調節に関わることを示した。

参加者は, 全身の臓器連関による摂食, 代謝, 脳機能の調節に関する最新の研究成果を発表し, 懇親会を含めて盛んなディスカッションを行った。「臓器連関による生体恒常性」という新しい学問領域の発展と研究交流を促進する意義ある研究会となった。

(1) 転写因子 FoxO1による摂食調節ペプチドの発現調節機構

北村忠弘 (群馬大学生体調節研究所代謝シグナル研究展開センター)

転写因子 FoxO1 はマウスの視床下部, 弓状核の Agrp ニューロンと Pomc ニューロンに発現しており, 空腹時に核に移行する。ラットの弓状核に恒常的活性型の FoxO1 を発現するアデノウイルスをマイクロインジェクションしたところ, Agrp の発現レベル増加に伴いレプチンによる摂食抑制効果が消失した。Agrp のプロモーター解析の結果, FoxO1 結合モチーフが同定され, その部位

を用いたルシフェラーゼアッセイの結果, FoxO1 が Stat3 と競合することで Agrp の転写調節をしていることが明らかとなった。さらにクロマチン免疫沈降法を用いた解析により, Agrp プロモーターにおける p300 (転写共役活性化因子) と HDAC1 (転写共役抑制因子) のリクルートを FoxO1 と Stat3 が協調して調節する分子メカニズムが明らかとなった。インスリンとレプチンが神経ペプ

チド *AgRP* の発現調節を介して摂食を負に調節する分子メカニズムを解明した。

(2) 消化管ホルモンと摂食調節

伊達 紫 (宮崎大学フロンティア科学実験総合センター生命科学部門生理活性物質探索分野)

摂食行動は、末梢の液性因子、自律神経調節因子および学習、記憶、情動などの因子が中枢で統合されることにより複雑かつ精巧に制御されている。私たちは、摂食亢進ペプチド；グレリンの研究を通じて、迷走神経求心路を情報伝達経路とする末梢と中枢の機能連関とその分子機構について研究してきた。グレリン、CCK、PYYの受容体は迷走神経求心細胞で産生され迷走神経末端に軸索輸送される。迷走神経遮断ラットでは、グレリンの摂食亢進作用およびCCKやPYYの摂食抑制作用は完全にキャンセルされ、グレリン投与により迷走神経求心線維の発火頻度は減少を示し、CCKやPYYでは増加することが明らかになった。さらにこれらのホルモンによる摂

食関連情報伝達は、延髄から中脳への神経線維を切断した中脳切断ラットにおいても完全にキャンセルされることや末梢からのグレリン情報が延髄孤束核でノルアドレナリンに変換され視床下部弓状核に到達することも明らかになった。脂肪細胞で産生される摂食抑制ホルモン；レプチンの作用は、神経遮断ラットにおいて有意に減弱した。また、興味深いことに長期飼育した中脳切断ラットは著明な肥満を呈し、レプチンの作用も完全にキャンセルされた。以上より、迷走神経系は末梢のエネルギー代謝状況を脳に伝える重要なメディエーターであり、神経系の機能不全が肥満やレプチン抵抗性の一因となっている可能性も考えられる。

(3) グレリン欠損マウスの表現型について

児島将康, 佐藤貴弘 (久留米大学分子生命科学研究部遺伝情報研究部門)

グレリンは、摂食亢進や脂肪蓄積などの作用を持つエネルギー代謝調節ホルモンである。我々は、糖尿病や肥満症の発症におけるグレリンの作用機構を明らかにするために、グレリンノックアウトマウス (KO) を作出した。野生型マウス (WT) と KO の比較において、体重と積算摂食量に差は認められず、摂食行動の日内リズムや、制限給餌による摂食量、餌探し課題による学習記憶能にも差は認められなかった。一方、グルコース寛容試験に

おいてWTとKOの間に血糖値の差は認められなかった。絶食を行ない、肝臓のアセチル CoA カルボキシラーゼ、脂肪酸合成酵素、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼの遺伝子発現量を検討したが差は認められなかった。このように、現在までに解析を進めた項目において、WTとKOに明確な差は認められなかった。KOでは代償機構が存在することも考えられることから、現在さらなる検討を進めている。

(4) 摂食行動調節におけるストレスと神経ヒスタミン

千葉政一, 吉松博信 (大分大学医学部 生体分子構造機能制御講座・第一内科)

前頭前野辺縁下皮質 (infralimbic cortex; IL) はストレス情報処理に関与するとともに、視床下部と連携して食行動を調節している。特に IL から視床下部神経ヒスタミ

ンへの神経入力があり、ILの化学的破壊により神経ヒスタミン機能が低下すると、食行動や体温調節系のリズム障害が誘発される。一方、絶食負荷は神経ヒスタミンを

増加させ絶食後摂食抑制反応を生じる。同反応には低エネルギー状態で増加するオレキシンによる神経ヒスタミン活性化作用が関与している。しかし絶食負荷にはエネルギー欠乏要因に加えストレス負荷としての側面があり、この脳内情報処理機構については不明である。そこで我々は、電撃ショックによる痛覚ストレス、コミュニケーションボックスによる情動ストレス、4時間拘束ストレス、72時間の飢餓ストレスを用い、ストレス誘発性食行動反応に対するIL破壊の影響を解析した。インスリ

ン誘発性低血糖による食行動反応に対するIL破壊の効果も調べた。その結果、痛覚ストレス、情動ストレス、拘束ストレスおよび飢餓ストレスによって生じる食行動抑制反応が、IL破壊群では有意に減弱していた。一方、急性低血糖によって生じる食行動誘発反応は、IL破壊群と対照群の間に有意差を認めなかった。以上より、ILはストレス情報処理およびストレスによる食行動反応の調節に深く関与していることが示唆された。

(5) 骨格筋でのグルコース代謝に及ぼす視床下部オレキシンの調節作用

志内哲也, 箕越靖彦 (生理学研究所発達生理学研究系生殖・内分泌系発達機構研究部門)

本研究では、オレキシン・ニューロンが生体内のグルコース代謝に関与している可能性とそのメカニズムについて検討した。

オレキシンAを視床下部腹内側核 (VMH) に投与すると、交感神経系の活性化を伴って、 $\beta 2$ アドレナリン受容体を刺激し、骨格筋におけるグルコースの取り込みが顕著に上昇した。脂肪組織ではこのような変化は見られず、また、血糖値、血漿インスリンおよびエピネフリン濃度、摂食量や運動量にも変化は無かった。血糖を維持しながらインスリンを静脈内に投与すると、オレキシンAのVMHへの投与は、骨格筋でのグリコーゲン合成を有意に促進した。

一方、オレキシン・ニューロンは動機付け行動に関与

している。そこで、マウスにサッカリン溶液を自発的に経口摂取させると、オレキシン・ニューロンにおけるc-Fos発現の有意な増加を伴って、骨格筋におけるグルコースの取り込みおよびグリコーゲン合成が増加した。また、このような、甘味溶液の自発的摂取による骨格筋のインスリン感受性増強作用は、オレキシン受容体拮抗薬のVMHへの両側性投与、あるいは $\beta 2$ アドレナリン受容体拮抗薬の全身投与により低下した。

本研究により、甘味刺激のような動機付け行動は、視床下部オレキシン・ニューロンを活性化し、VMH-交感神経- $\beta 2$ アドレナリン受容体経路を介して骨格筋でのグルコース代謝を促進することが考えられる。

(6) GLP-1による肝-膵神経性連関

西澤誠, 中川淳, 中林肇

(金沢医科大学内分泌代謝内科・金沢大学自然科学研究科動態生理学 (保健管理センター))

摂食時に消化管から分泌させるGLP-1は液性ホルモンとしてインスリン(I)分泌増強(incretin)作用を発揮するとされてきた。一方、我々はGLP-1による肝-膵迷走神経(迷神)性連関につき一連の結果を得た。1)生理学的量のGLP-1門脈内投与は肝迷神求心性活動を増加し、さらに神経反射的に膵迷神遠心性活動増加を惹起する。2) nodose ganglion(NG)の神経細胞体にGLP-1受容体遺伝子

が発現する。3)GLP-1はNG神経細胞の膜電位脱分極と発火を惹起する。従って、肝門脈域迷神のGLP-1感受を基点とする神経性I分泌増強機構の存在が示唆された。そこで、肝迷神選択的切断(迷切)/非切断ラットで、無麻酔無拘束下に門脈内あるいは頸静脈内にグルコース(G)注入(20分間)し、後半10分間にGLP-1あるいはvehicle並行注入を行い、GLP-1のincretin作用での迷神の役割

を検討した。門脈内投与時、1) 生理学的量 GLP-1 は G による I 分泌促進を増強するが、この増強効果は迷切群では 67%も減弱した。2) 薬理的量 GLP-1 は I 分泌をより促進し、迷切群では 50%の減弱をみた。3) 1), 2)と同じ血糖下での薬理的量 GLP-1 の頸静脈内投与は、G に

よる I 分泌を一層増強するが、迷切群ではわずか 16%の減弱をみた。従って、GLP-1 の門脈内出現は肝迷神機構を介しても incretin 効果を惹起し、この効果は生理学的状況でより重要な役割を果たすことが示された。

(7) 神経系を介した肝グルコキナーゼの核/細胞質間移行の調節

豊田行康, 三輪一智 (名城大学薬学部病態生化学)

【目的】脳室内へのグルコース (Glc) 注入による肝グルコキナーゼ (GK) の核から細胞質への移行 (GK 移行) を調べた。

【方法】ラット第3脳室内にアロキサン(アロキサン処置)あるいは人工脳脊髄液(未処置)を注入した。次に、第3脳室に Glc を注入し、注入5分後の肝細胞内の GK 移行を調べた。また、視床下部神経核の GK 活性を測定した。

【成績】未処置ラットに Glc を注入すると GK 移行が起こった。アロキサン処置ラットでは GK 移行が減弱した。視床下部弓状核の GK 活性は、アロキサン処置ラットで低下していた。従って、脳室内の Glc 濃度の上昇が弓状核で感知され、その情報が迷走神経を介して肝臓に伝わり、GK 移行が起こった可能性が示唆された。

【結論】第3脳室内への Glc 注入により GK 移行が起こる。

(8) 門脈シグナルによる肝グリコーゲン、グルコキナーゼ G6-P, グリコーゲンシンターゼおよびグリコーゲンホスホリラーゼの変動

菊池方利 (朝日生命成人病研究所)

イヌやラットの門脈にグルコースセンサーが存在し、門脈または消化管からのグルコース注入はグルコースの取り込みを増加し、動脈と門脈のグルコース濃度差を低下させるとされる(門脈シグナル)。このグルコースの取り込みは急速に生じるので、自律神経が関与していると思われる。ラットの迷走神経切断の有無において、グルコースを $78\mu\text{mol/kg/min}$ で門脈または末梢血管に持続注入し、各注入経路間の肝グリコーゲン、G6-P、ホルモンを測定した。持続注入を行うと肝グリコーゲン濃度は S 字状に増加し、120分後、門脈の方が末梢より上昇し、グルコキナーゼの肝細胞移行、G6-P 上昇と Glycogen phosphorylase a (GP) 活性の抑制が門脈注入で大となり、

120分間に平衡した。Glycogen synthase (GS) は瞬間的に増加したが、注入経路間に差異がなく、その後低下し門脈注入で120分後朝食前値と同じになり、末梢注入で低下した。即ち、門脈注入により GS とグリコーゲンは120分後増加した。迷走神経を切断すると、各注入経路において血漿インスリン、グルカゴン濃度、G6-P 濃度、GK、GS、GP 活性は5分間に差異がなく、GP は切断しない末梢注入に対し僅かに増加したが、他に差異を認めなかった。門脈シグナルにより肝グリコーゲン合成は増加した。神経切断により上記代謝物は末梢注入とほぼ同等になった。

(9) 転写因子 Dmbx1の破綻によるエネルギー代謝異常の解析

三木隆司, 志内哲也, 藤本和歌子, 箕越靖彦, 岩永敏彦, 清野進
(千葉大学大学院医学研究院神経科学部門高次脳機能学講座自律機能生理学)

Dmbx1 は胎生期の脳に発現するホメオドメイン型の転写因子である。我々は Dmbx1 の生理的役割を解明する目的で, *Dmbx1* 欠損 (*Dmbx1*^{-/-}) マウスを作製したところ, *Dmbx1*^{-/-}マウスは多動と摂食量の減少を伴う著しい痩せを示すことが明らかになった。そこで我々は, エネルギーおよび糖代謝制御における Dmbx1 の役割について検討した。*Dmbx1*^{-/-}マウスの視床下部における POMC, NPY, AgRP の発現を調べたところ, 痩せを反映した変化が認められ, 視床下部の弓状核でのこれらの遺伝子の発現制

御は正常に保たれていると考えられた。しかしながら, MT-II, NPY, AgRP を脳室内投与し摂食応答を調べたところ, AgRP による摂食促進効果のみが消失していた。さらに, 肥満糖尿病モデルである *A^{y/a}* マウスと *Dmbx1*^{-/-}マウスを交配したところ, *A^{y/a};Dmbx1*^{-/-}マウスでは *A^{y/a}* マウスで見られる過食, 肥満, インスリン抵抗性, 糖尿病が完全に消失していた。このことから *Dmbx1* は胎生期の脳分化に関与することにより AgRP の作用発現に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

(10) PACAP ノックアウトマウスの代謝調節異常

中田正範, 山本早和子, 矢田俊彦 (自治医科大学医学部生理学講座統合生理学部門)

我々は, 神経ペプチド PACAP (Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) がインスリン分泌, インスリン作用増強作用を有することをこれまでに報告してきた。一方, PACAP にはアドレナリン分泌促進, 交感神経系の活性化, 白色脂肪細胞での脂肪分解作用などの貯蓄エネルギー放出作用もある。

今回解析を行った PACAP ノックアウトマウスは低体重, 絶食条件下では過度の低血糖を示し, エネルギー貯

蔵と放出の障害を呈する。解析の結果から, その責任臓器として脂肪細胞と視床下部弓状核が示唆された。さらに *in vitro* の解析とあわせ, 新たな PACAP の白色脂肪細胞肥大作用および摂食促進作用が生体内で重要な役割をしていることが明らかになったのでこれを報告する。

種々の生理作用を有する PACAP は, 生体内でインスリンと交感神経系の円滑かつ適正なバランス調節に関与していると示唆される。

(11) グレリンによる食欲・消化管運動調節—抗うつ薬 SSRI を例に—

乾明夫, 藤塚直樹, 浅川明弘 (鹿児島大学大学院行動医学 (心身医療科))

脳・消化管ペプチドは食欲・体重調節に重要な役割を有しているが, 摂食行動と密接にかかわる消化管機能の調節にも深くかかわっている。グレリンは胃から見出された強力な食欲促進ペプチドであり, 視床下部に存在する神経ペプチド Y (NPY) を介して, 食欲や消化管運動に促進性の影響を及ぼす。

本シンポジウムでは, 抗うつ薬として用いられる選択的セロトニン再取り込み阻害剤 (SSRI) とアシルグレリンとの関係について, 我々の最近の成績を中心に述べた。

SSRI は, セロトニン作用増強に基づく食欲・体重抑制効果を示す一方で, 食欲不振や胃排泄低下など, 消化器系の副作用を発現する。これは多くの向精神薬が, セロトニン, ヒスタミンなど脳内アミン系を阻害することにより, 食欲・体重増加作用を発現するのと対照的である。

SSRI をラットに投与し, トランスデューサー法を用いて, 胃十二指腸運動を測定すると, SSRI は空腹期の運動を食後期様の運動に変換させる。この作用は, 空腹期運動を誘発するグレリンと正反対であるが, ウロコルチン

など食欲抑制系ペプチドの作用と類似し、食欲と消化管運動が見事に調和していることを示している。SSRIのこの作用は、グレリン分泌の抑制を介し、グレリン投与はこのSSRIの作用に拮抗する。この知見は、グレリンが

病態生理学的に重要である可能性を示すと同時に、SSRIを悪液質患者に使用する上で、注意が必要であることを示唆している。

(12) Nesfatin-1 の摂食抑制機構

清水弘行, 森昌朋 (群馬大学大学院医学系研究科病態制御内科学 (第一内科))

新たな食欲抑制蛋白, ネスファチン-1の末梢投与後の摂食抑制作用の可能性について検証するとともに, その作用発現機構の解明を試みた。ネスファチン-1の腹腔内投与 (10-1,250 pmol/g body weight) は, 用量反応性にマウスの暗期における摂食行動を抑制し, 皮下投与では腹腔内投与と比較してより長時間継続する摂食抑制が認められた。ネスファチン-1をalpha-helix構造を中心に3分割し, N-端側, C-端側ペプチドとその中間の30個のアミノ酸 (M30) ペプチドの3種類を合成し, それらの腹腔内投与効果について検討を行ってみると M30 ペプチ

ドのみが明らかな摂食抑制作用を示した。また M30 ペプチドの投与は遺伝的肥満動物や高脂肪食誘発性肥満マウスにおける摂食行動も抑制した。M30 ペプチドの腹腔内投与により, マウス脳幹部孤束核における *c-fos* の発現は増加し, CART mRNA や POMC mRNA の発現も増強した。以上の成績より, ネスファチン-1の活性部位が明らかになり, 腹腔内投与されたネスファチン-1の摂食抑制シグナルが末梢から中枢への伝達される際における脳幹部孤束核の重要性が明らかとなった (一部は自治医大矢田俊彦先生との共同研究による)。

(13) 自律神経を介した臓器間代謝情報ネットワーク

片桐秀樹 (東北大学大学院医学系研究科創生応用医学研究センター再生治療開発分野)

多臓器生物であるヒトにおける全身での代謝調節には, 多くの臓器が協調的に関与しているものと想定される。

脂肪肝の際に肝臓での発現亢進が認められる PPAR γ 2を肝に過剰発現させたところ, 肝では脂肪蓄積を促進する一方で, 脂肪組織では脂肪分解を増加させ, 基礎代謝を亢進し, 肥満や糖尿病を著明に改善させた。神経切断や阻害剤投与実験などから, これら肝臓以外の臓器への遠隔効果は, 迷走神経求心路および交感神経遠心路を介していることが明らかとなり, この自律神経系ネットワークは, 過栄養時に基礎代謝を亢進させ肥満を予防するフィードバック機構として機能していると考えられた。このことは, 自律神経求心路を介して, 脳が肝臓での代

謝に関する情報を受け, 末梢臓器に各臓器を統合した協調的代謝に向けての指令を出していることを示唆する。

さらに, 肥満マウスを用いて, 肥満病態に及ぼす影響を検討したところ, 肝 PPAR γ 発現にともなう自律神経系ネットワーク機構は, 肥満の際の血圧上昇にも関与している可能性が示唆された。このように, 肥満を予防する働きを考えると考えられる内在性の機構が, 慢性的な過栄養のもとでは, メタボリックシンドロームの病態形成にも関わるという機序が考えられる。これらの臓器間代謝情報ネットワークのさらなる検討は, 個体における恒常性の維持機構の解明に加え, メタボリックシンドロームの病態の理解にもつながるものと期待される。

(14) IL-6/STAT3を介した臓器間ネットワークの意義

井上啓¹, 小川渉² (¹金沢大学フロンティアサイエンス機構,
²神戸大学大学院医学系研究科糖尿病・代謝・内分泌内科学分野)

我々は、中枢神経インスリン作用により肝 IL-6/STAT3 経路が活性化され、肝糖産生が抑制されるという新規なインスリン作用発現機構を明らかとした。一方、IL-6 のインスリン抵抗性発症への関与を示唆する報告も散見される。本研究では肥満・インスリン抵抗性状態における IL-6/STAT3 経路の耐糖能制御における意義を検討した。IL-6 中和抗体の投与により IL-6 作用を抑制すると、正常マウスでは肝糖産生抑制が障害され、肥満・インスリン抵抗性モデルである db/db マウスでは、末梢糖利用亢進と耐糖能異常改善を呈した。末梢糖利用に中心的役割を果たす骨格筋における IL-6/STAT3 経路活性化を検討し

たところ、正常マウス骨格筋では STAT3 活性化を認めないが、db/db マウスでは、糖負荷後に、骨格筋 STAT3 が活性化された。骨格筋 STAT3 活性化の役割を検討するために、骨格筋特異的 STAT3 欠損 db/db マウスを作製した。骨格筋特異的 STAT3 欠損 db/db マウスは、対照 db/db マウスに比べ良好な耐糖能を示し、末梢糖利用の増強を呈した。肥満・インスリン抵抗性状態では骨格筋 IL-6/STAT3 シグナル経路は亢進し、インスリン抵抗性を誘導する。IL-6/STAT3 経路は肝ではインスリン感受性の亢進、骨格筋ではインスリン抵抗性の誘導という2つの異なった作用を担うと考えられる。

(15) 2型糖尿病モデル GK ラットにおける中枢-脂肪-膵軸連関の変調

安藤明彦^{1,2}, 石橋俊², 矢田俊彦¹

(¹自治医科大学医学部生理学講座統合生理学部門, ²自治医科大学医学部内科学内分泌代謝学部門)

1型糖尿病モデル STZ 投与ラットや重度肥満 2型糖尿病モデル db/db マウスで過食が報告されている。当研究室での観察で正常体重 2型糖尿病モデル GK ラットにおいて若年性 (6-14 週齢) 過食を確認しておりその成因の同定を試みた。11 週齢では内臓 (腸間膜・腎周囲) 脂肪蓄積及び高レプチン血症を認めた。また GK ラットでは、レプチン投与後の摂食抑制が有意に減弱し、視床下部レプチン受容体 mRNA 発現は不変であったがレプチン脳室内投与後の STAT3 リン酸化が弓状核特異的に有意に低下していた。さらに弓状核で NPY mRNA 発現の亢進を認めた。GK ラットの過食を Pair fed により是正すると、内臓脂肪 (腸間膜・腎周囲) 蓄積の大部分は消失し、高レプチン血症は部分的改善認めたが、高血糖・高イン

スリン血症は改善を認めなかった。また高血糖、過食はともに3週齢で既に出現していた。

以上より 11-14 週齢では Pair fed 実験の結果から内臓脂肪蓄積、高レプチン血症は過食の結果と考えられ、中枢でのレプチン抵抗性に伴う NPY ニューロン活性化が過食の原因として示唆された。3 週齢で高血糖、過食の何れが一次的であるかについては今後の研究が必要である。

なお 14 週齢 GK ラットでは精巣上体脂肪は有意な減少を認めていた。その原因として、同週齢での血清脂質値の検討結果 (遊離脂肪酸正常・中性脂肪低下・総コレステロール増加) より、ケトン体の生成のため脂肪分解が亢進したことが推察された。

18. グリア細胞による脳機能調節機構の解明 新しいグリア研究の手がかりを求めて

2007年4月26日－4月27日

代表・世話人：工藤 佳久（東京薬科大学生命科学部）

所内対応者：池中 一裕（分子生理研究系分子神経生理研究部門）

- (1) 新しい分子プローブの創製とそれを用いた興奮性神経伝達系の研究
島本啓子（サントリー生物有機化学研究所）
- (2) アストロサイトの集合ダイナミクス
池谷裕二（東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室）
- (3) ドーパミン神経における Ret/GDNF シグナル経路の生理学的意義について
平田洋子（岐阜大学工学部生命工学科）
- (4) 未成熟ニューロンによる胎生中期神経幹細胞のアストロサイト分化獲得機構
中島欽一（奈良先端技術大学院大学バイオサイエンス研究科）
- (5) ミエリン形成に関わる Caspr2 と皮質形成異常を伴う症候性てんかん
武田泰生（鹿児島大学大学院医歯学総合研究科）
- (6) 成体ラット脳 NG2 神経前駆細胞の新しい分離培養法と精神疾患研究
楯林義孝（東京都精神医学総合研究所）
- (7) 中枢神経損傷後の機能回復と神経回路の再生
山下俊英（千葉大学大学院医学研究院 神経生物学）
- (8) The roles and regulatory mechanisms of reactive astrocytes' migration after CNS injury
Francois Renault-Mihara（慶應義塾大学医学部）
- (9) Transcriptional regulatory networks governing neural stem cell maintenance and glial differentiation
田賀哲也（熊本大学発生医学研究センター）
- (10) Neuromyelitis optica の脊髄病巣におけるアクアポリン4の欠落
三須建郎（東北大学病院神経内科）
- (11) 多光子励起法による大脳皮質の in vivo イメージング
和気弘明（生理学研究所 生体恒常機能発達機構研究部門）

【参加者名】

山下俊英（千葉大学）、Francois Renault-Mihara（慶應義塾大学）、中島欽一（奈良先端技術大学院大学）、島本啓子（サントリー生物有機化学研究所）、平田洋子（岐阜大学）、池谷裕二（東京大学）、和気弘明（生理研）、楯林義孝（東京都精神医学研究所）、武田泰生（鹿児島大学）、三須建郎（東北大学病院）、田賀哲也（熊本大学）、高坂新一（国立精神神経センター）、工藤佳久（東京薬科大学）、和田圭司（国立精神神経センター）、馬場広子（東京薬科大学）、加藤総夫（慈恵会医科大学）、鹿川哲史（熊本大学）、南雅文（北海道大学）、宮川剛（京都大学）、平瀬肇（理化学研究所）、山本清二（浜松医科大学）、浅井清

文（名古屋市立大学）、森寿（富山大学）、山崎良彦（山形大学）、山田真久（理化学研究所）、平田晋三（名古屋大学）、石橋智子（東京薬科大学）、佐野坂司（奈良先端技術大学院大学）、高田則雄（理化学研究所）、井上和秀（九州大学）、生田房弘（新潟脳外科病院）、丸尾知彦（東京医科歯科大学）、田中慎二（東京医科歯科大学）、浜清（生理研）、大橋憲太郎（岐阜大学）、野村貢（東北大学）、田中達英（岐阜大学）、李順姫（生理研）、桧山武史（基生研）、青山峰芳（名古屋市立大学）、根本知己（生体情報解析室）、渡辺英治（基生研）、金田勝幸（生理研）、鍋島俊隆（名城大学）、梅田達也（生理研）、鍋倉淳一（生

理研), 高鶴裕介 (生理研)

【概要】

本研究会ではグリア研究の新しい切り口と技術を掘り起こすための討論を展開した。講演はいずれも独創性に富み、今後のグリア研究に重要な手がかりを与えるものであった。島本啓子先生 (サントリー生有研): グリア研究のための新しい薬理的ツールの強力で選択性の高いグルタミン酸トランスポーターの阻害薬について解説。池谷裕二先生 (東京大薬学): 海馬スライス標本におけるアストロサイトの活動の集団としての機能を解析する新しい方法を提案。平田洋子先生 (岐阜大工学): グリア由来の神経栄養因子 (GDNF) とその受容体のドーパミン神経におけるシグナル伝達系における意義を解説。中島欽一先生 (奈良先端大バイオサイエンス): ニューロンとアストロサイトの発生過程におけるメチル化や Notch シグナルによる調節システムについて解説。武田泰生先生 (鹿児島大歯学): 難治性症候性てんかんの原因遺伝子としての Caspr2 の発現特異性と細胞内分子相

互作用について解説。楯林義孝先生 (東京都精神医学研): NG2 神経前駆細胞の新しい分離培養法を開発とその有用性を解説。山下俊英先生 (千葉大医学研究科): 脊髄損傷モデルにおける神経回路再生に関わる要因の解析から治療法開発の可能性について解説。Francois Renault-Mihara 先生 (慶應大医学): 脊髄損傷後の神経回路の再生における障害因子としてのアストロサイト由来因子 (STAT3) の機能を解説。田賀哲也先生 (熊本大発牛医学): 神経幹細胞からのニューロンとグリア細胞の発生に関わる分子群の機能を解説。三須建郎先生 (東北大学病院神経内科): 視神経脊髄炎におけるアストロサイトに発現するアクアポリン 4 の病理学的意義を解説。和氣弘明 (生理学研究所): 二光子顕微鏡を利用して、非侵襲的に脳深部のニューロンやミクログリアの動態を解析する方法について最新の成果を報告。

(1) 新しい分子プローブの創製とそれを用いた興奮性神経伝達系の研究

島本啓子 (サントリー生物有機化学研究所)

グルタミン酸は哺乳動物の中樞神経系における代表的な興奮性神経伝達物質であり、記憶や学習といった高次の脳機能にも深く関与している。しかし高濃度のグルタミン酸が存在すると過剰な反応によって神経細胞の死が引き起こされるため、正常な状態ではシナプスにおけるグルタミン酸濃度は、主にグリア細胞に存在するグルタミン酸トランスポーターのはたらきによって厳密に制御されている。トランスポーターが脳の機能や神経疾患に与える影響を明らかにする研究には、その作用に選択的な阻害剤が必要である。しかし、これまでに知られていた阻害剤は競合基質として働き、グルタミン酸の取り込みは抑えるものの、代わりにその阻害剤自身が取り込まれてしまうために、それに伴うイオンの流れや細胞内外のグルタミン酸交換現象を止めることができなかった。このため、それらの阻害剤を用いた実験ではトランスポーターの機能を正確に観測することは原理的に困難であった。我々は基質分子の化学構造に輸送を遮断するよう

な置換基を導入することによって遮断薬 (ブロッカー) 型阻害剤に変換することに成功した。このように見出された遮断薬 threo- β -benzyloxyaspartate (TBOA) を用いることにより、トランスポーターの働きを抑えた状態で細胞外グルタミン酸濃度が正確に測定できるようになった。その結果、トランスポーターが機能することによって、神経細胞がグルタミン酸に起因する細胞死から免れているという機構が初めて明確に証明された。選択的な遮断薬 TBOA が得られたことによりグルタミン酸トランスポーターの研究は飛躍的に進歩し、特にグリアが神経伝達に果たす役割が明らかになりつつある。さらに化学修飾によって TBOA の活性を 1000 倍近く強力にすることも成功した。光感受性保護基の導入や放射性標識化など、TBOA を基にして有機化学の手法で創出した分子プローブは、トランスポーターの機能解析や新規薬物探索に一層大きく貢献することが期待されている。

(2) アストロサイトの集合ダイナミクス

池谷裕二（東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室）

脳高次機能の発現においてグリア細胞が決定的な影響を持っていることが次第に明らかになってきている。しかし従来のグリア細胞の研究は、グリア細胞単独、もしくは、ごく少数のグリア細胞とニューロンの関連を調べているものが多く、膨大な数のグリア細胞の統合的な活動が神経ネットワーク機能といかなる相互関係にあるのかは十分には解明されていない。ニューロン・グリアネットワークにおけるグリア細胞の役割とはどのようなものなのだろうか。

私たちはマウス海馬スライス標本の CA1 放線層においてアストロサイトネットワークの挙動を大規模に解析した。アストロサイトの免疫組織化学染色および Ca^{2+} イメージングを行った。免疫組織化学染色では、アストロサイトはほぼ規則的に、20-30 μm の間隔で空間配置されていることを明らかにした。 Ca^{2+} イメージングは Oregon Green 488 BAPTA 1 と sulforhodamine 101 を同時に用いる

ことで行った。ニポウ板共焦点レーザー顕微鏡と高開口率の低倍対物レンズを利用することでイメージングのクオリティを向上させ、蛍光退色を限りなく抑えたため長時間の観察が可能となった。この可視化法を用い、250個以上のアストロサイトの自発的な Ca^{2+} 振動を 60 分に渡って観察した。すべての細胞ペアに対して相互相関を計算することで、アストロサイトはより近くに存在しているものペアほど Ca^{2+} 振動が同期する傾向あることを明らかにした（解析中）。このような性質はニューロンとは明らかに異なるものである。相互相関から抽出された回路はグラフ理論で解析することが可能であるため、アストロサイトの機能的ネットワーク構造を数理的に追求することができる。こうした大規模なアプローチを続けることで、ネットワーク素子としてのグリア細胞の統合的な挙動の解明に一歩近づくことができると期待している。

(3) ドーパミン神経における Ret/GDNF シグナル経路の生理的意義について

平田洋子（岐阜大学工学部生命工学科）

グリア細胞由来神経栄養因子 (Glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF) は 1993 年にグリア細胞の培養液から中脳ドーパミン神経の神経栄養因子として単離された。その後、運動神経など幅広い神経に対して neurotrophic action を持っていることが示され、現在では neurturin, artemin, persephin の 4 種の神経栄養因子が GDNF ファミリーのリガンドとして見つかった。これらの神経栄養因子は $\text{GFR}\alpha 1 \sim \alpha 4$ のリガンド結合部位を持った受容体に結合し、共通の受容体 Ret チロシンキナーゼと複合体を形成しシグナルを伝達することが知られている。中脳ドーパミン神経の栄養因子として報告された GDNF ではあるが、GDNF または Ret のノックアウトマウスの知見から GDNF/Ret は脳のドーパミン神経の発達・維持には必須ではないことが示されていた。しかし、最近ドーパミン神経で Ret を欠失したコンディショナルノックアウトマウスが作製され、老年期になるとドーパ

ミン神経が減少することが明らかにされ GDNF/Ret シグナル経路の重要性が示唆された。私たちはドーパミン神経における GDNF/Ret シグナル経路の生理的意義を解明するために研究を進めている。パーキンソン病モデル MPTP マウスの線条体では、Ret はドーパミン神経のマーカーであるチロシン水酸化酵素に先んじて減少したが、 $\text{GFR}\alpha 1$, TrkB 受容体は変化しなかった。Ret はドーパミン神経が変性・脱落する前に down-regulation されたと推察できる。Ret のドーパミン神経毒による down-regulation の分子機構を明らかにするために、MPP⁺と同様 complex I の阻害剤でラットのパーキンソンモデルに使用されているロテノンを用いて培養細胞系で同様の現象がおこるかどうかを検討した。PC12 細胞をロテノンで処理すると細胞死に先んじて Ret の down-regulation が認められた。この分解にはカスパーゼ経路およびカルパインは関与していなかったが、プロテアソームにより Ret が分解される

ことが示唆された。一方, Ret mRNA も著しく減少したので Ret の down-regulation にはプロテアソームによる分解系の亢進とともに合成系の抑制も寄与していると考えられる。また, Ret は種々の細胞死誘導物質によっても down-regulation され, 他のタンパク質に比べて各種スト

レスに対し感受性が高いことが明らかとなった。Ret が減少し GDNF/Ret シグナル経路の働きが低下することはドーパミン神経の生存に少なからず影響を与えられられる。

(4) 未成熟ニューロンによる胎生中期神経幹細胞のアストロサイト分化能獲得機構

中島欽一 (奈良先端技術大学院大学バイオサイエンス研究科)

哺乳類中枢神経系に存在するニューロンとアストロサイトは共通の神経幹細胞から分化・産生される。しかし発生過程において, 神経幹細胞は胎生中期にはニューロンへのみ分化する一方, 胎生後期において新たにアストロサイトへの分化能を獲得し, 多分化能を有する成熟した神経幹細胞となる。我々はこれまでに, 胎生中期神経幹細胞ではメチル化を受けているアストロサイト特異的遺伝子群 (GFAP 等) の転写調節領域が, 発生の進行に伴い脱メチル化されることで神経幹細胞がアストロサイトへの分化能を獲得することを報告した。しかし, このような発生段階依存的な DNA メチル化変化を誘導する機構については不明であった。神経幹細胞は胎生中期にはニューロンを盛んに産生し, その後, アストロサイト分化能を獲得することから, 早期に産生された未熟なニューロンが神経幹細胞の多分化能獲得に関与している可能性が考えられた。そこで我々は, 未熟なニューロンと胎生中期神経幹細胞を共培養した結果, アストロサイト

誘導性サイトカイン (LIF) 刺激に応じた早期 GFAP 陽性アストロサイトの出現を観察した。さらに我々は, この現象は未熟なニューロンが胎生中期神経幹細胞の Notch シグナルを活性化することにより, 神経幹細胞の多分化能獲得を誘導した結果であることを明らかにした。また, Notch シグナルの活性化を模倣するため Notch の細胞内ドメインを強制発現させた胎生中期神経幹細胞は, 未成熟なニューロンと共培養した場合と同様に, LIF 刺激に応じて早期に GFAP 陽性アストロサイトへと分化すること, およびそれらの細胞群ではアストロサイト特異的遺伝子プロモーターにおける領域特異的な DNA 脱メチル化の促進も観察された。以上の結果は, 神経幹細胞から分化した隣接する未熟なニューロンにより, 神経幹細胞の Notch シグナルが活性化されることで DNA メチル化状態が変化し, 神経幹細胞はアストロサイトへの分化能を獲得することを示唆している。

(5) ミエリン形成に関わる Caspr2と皮質形成異常を伴う症候性てんかん

武田泰生 (鹿児島大学大学院医歯学総合研究科)

皮質形成異常を伴うある種の難治性症候性てんかんの原因遺伝子として, これまでに Ca チャネルや K チャネル等のいくつかのチャネル遺伝子が同定されている。このような中, アメリカ合衆国のアーミッシュ人集落において, 同型のてんかん発作を頻発する親族患者が見つかり, 解析の結果, ミエリン形成に関わる神経接着分子の一つコンタクチン関連蛋白質 (contactin-associated protein, Caspr) 2 の遺伝子異常に起因していることが明らかにさ

れた (Strauss et al., New England Journal of Medicine, 2006)。

一方, 我々は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する GPI アンカー型神経接着分子のコンタクチン分子群 (現在, 哺乳動物で 6 種同定), ならびにそれらとシス型に結合する Caspr 分子群 (現在, 5 種同定) に焦点をあて, 分子間相互作用およびこれら分子の機能に関する検討を進めてきた。これまでに contactin, NB-3 がオリゴデンドロサイトの分化を誘導すること, NB-2, -3 遺伝子欠

損により、各々、聴覚異常、運動機能協調性の異常が起こることなどを明らかにしてきた。

本研究では、特に、上記てんかんの原因遺伝子であり、ミエリンの jaxtaparanode 領域に K チャンネルと共に局在し、そのクラスター形成に重要な役割を果たすと考えられている Caspr2 の発現特異性と細胞内分子間相互作用

について発表する。前半では、Caspr2 と上記てんかんとの関係について紹介し、後半で、現在展開中の Caspr2 細胞内部分を bait とした酵母 two-hybrid スクリーニング系で抜擢した carboxypeptidase E との相互作用について、その概略を紹介する。

(6) 成体ラット脳 NG2神経前駆細胞の新しい分離培養法と精神疾患研究

楯林義孝（東京都精神医学研究所）

NG2 陽性細胞は成体脳内に豊富に存在し、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリアとは別の第4のグリアといわれている。オリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPCs) とも呼ばれるが、Kondo と Raff (2000) は P6 ラットの視神経より分離培養された OPCs が、特殊な条件下で、神経細胞に分化する能力を獲得する事を報告した。その後も同様の報告が相次ぎ、OPCs がある種の神経前駆細胞であることが指摘されている。また NG2 陽性細胞は、それ自体、成体脳において何らかの生理的機能を持っている事が推測されているが、その詳細についてはほとんどわかっていない。NG2 陽性細胞 (OPCs) は、難治性の気分障害や統合失調症の治療で用いられる電気けいれん療法において海馬や扁桃体で増殖することが最近報告され、精神疾患の病態機序に関与する可能性がある。成体脳における NG2 陽性細胞の研究には、成体脳か

らの簡便で効果的な *in vitro* の細胞培養系の確立が欠かせないが、われわれが知る限り、そのような方法は報告されていない。今回、われわれは成体ラット脳のさまざまな部位から細胞を分離・培養し、その大部分（約 90% 以上）が NG2 陽性になる培養条件があることを発見した。この方法では、ほぼあらゆる月齢の成体ラット脳のほとんどの部位から、セルソーターなどを使用せずに簡便、高純度かつ比較的大量に NG2 陽性細胞を無血清培地で分離・培養する事が可能である。また、これらの細胞の一部は培養条件によって GAD67 陽性の神経細胞様に分化したり、GFAP 陽性のアストロサイトに分化する。今回、それらの培養法を用いて、われわれの研究室で得られた最近の知見と、精神疾患研究への発展の可能性を議論したい。

(7) 中枢神経損傷後の機能回復と神経回路の再生

山下俊英（千葉大学大学院医学研究院神経生物学）

中枢神経回路は脳虚血、外傷、脊髄損傷などにより深刻な打撃を受ける。傷害のために多くの神経細胞は死滅し、神経細胞死を免れることができたとしても、軸索の損傷により神経ネットワークは破壊される。これらの病態により神経回路網の機能は失われ、運動機能や感覚機能の脱落症状があらわれ、生涯にわたって後遺症が残る。脊髄の完全損傷の場合、損傷部で感覚経路と運動経路の軸索が離断され、損傷レベル以下の感覚と運動機能は失われる。また不完全損傷の場合、部分的に神経機能は

保たれるが、それらは不完全で、慢性疼痛などの合併症を伴うこともある。中枢神経疾患による神経脱落症状を緩和する有効な治療法はなく、新たな治療法の開発が待ち望まれている。そのためには、なぜ中枢神経回路が再生しにくいのかという問題を解決しなければならない。

中枢神経回路の再形成という課題に取り組むにあたって、脊髄損傷動物モデルがよく使われる。脊髄の完全損傷の場合、軸索は全て離断される。したがって神経機能を取り戻すためには、損傷した軸索が損傷部を超えて、

長い距離にわたって伸展し、2次ニューロンにシナプスを形成しなければならない。しかしヒトなどのほ乳類では損傷された中枢神経の軸索は極めて再生しにくい。原因としては中枢神経細胞を取り巻く環境が再生に適していないこと、そして中枢神経自体の再生力が弱い事があげられる。これまで特に前者が注目され、中枢神経系には軸索の再生を抑制する蛋白質が複数存在することが明

らかになってきた。ここ数年で、それらの再生阻害因子がどのように神経細胞に働きかけ軸索再生が阻害されるのかという分子メカニズムが明らかになり、治療的な展望も開けてきた。いまだ研究は途上であるが、おそらく複数の分子ターゲットに対する治療法を時間的空間的に組み合わせることで、機能的な中枢神経機能の再生を導くことが将来的に可能になるのではないかと期待される。

(8) The roles and regulatory mechanisms of reactive astrocytes' migration after CNS injury

Francois Renault-Mihara (慶應義塾大学医学部)

Spinal cord injury (SCI) is a two-step process involving a primary mechanical injury followed by an inflammatory process and appearance of reactive astrocytes. Interdigitation of astrocytic processes lead to chronic formation of the glial scar which is believed to hinder axonal regeneration, thus preventing further satisfying functional recovery.

Here we will present evidences that the biological role of reactive astrocytes is positive in the sub-acute phase of SCI, i.e. in the first two weeks when a limited functional recovery naturally occurs. During this phase astrocytes migrates to compact the lesion and seclude inflammatory cells. Since we observed that Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) is activated only in reactive astrocytes surrounding lesion site, we wondered about the effect of specific deletion of STAT3 in these cells. Use of a

conditional KO mice targeting STAT3 (Nes-Stat3^{-/-}) allowed observing that Stat3 signaling in astrocytes is required for compaction of lesion center. In agreement with the hypothesis that this compaction of the lesion by astrocytes is beneficial, Nes-Stat3^{-/-} mice, which present few developmental defects, display a reduced recovery after SCI. Thereafter, we observed that Nes-STAT3^{-/-} astrocytes presents in vitro a reduced migration, a phenomenon that seems to drive compaction of lesion observed in vivo, because BrdU incorporation experiments have showed that STAT3 signaling does not modulate astrocyte proliferation. Finally we will present current results of ongoing research that aims at identifying downstream targets of STAT3 in the control of astrocyte migration.

(9) Transcriptional regulatory networks governing neural stem cell maintenance and glial differentiation

田賀哲也 (熊本大学発生医学研究センター)

Neurons, astrocytes, and oligodendrocytes differentiate from neural stem cells that reside in the neuroepithelium during development. We have previously demonstrated that leukemia inhibitory factor (LIF), a member of the interleukin-6 family of cytokines, and bone morphogenetic protein 2 (BMP2), a member of the BMP family of cytokines, synergistically act on neuroepithelial cells to induce differentiation of mature astrocytes which express glial

fibrillary acidic protein (GFAP). In the neuroepithelial cells stimulated by LIF and BMP2, their respective downstream transcription factors STAT3 and Smad1 form a complex in the nucleus with a transcriptional co-activator, p300. This complex is suggested to be important for astroglialogenesis and lead to transcriptional activation of the gene for GFAP.

Our recent study has demonstrated that LIF induces, via STAT3 activation, expression of its cooperative partner

cytokine BMP2 and consequent activation of Smad1 to efficiently promote astroglial differentiation of neuroepithelial cells. The results suggest the presence of a novel LIF-triggered positive para-regulatory loop that functions as a signal-booster to enhance astroglial differentiation.

Basic fibroblast growth factor (bFGF) promotes proliferation of neural precursors while it inhibits their differentiation. We have recently found that FGF signaling and Wnt signaling cooperate together, via inactivation of

glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) and subsequent induction of cyclin D1 expression, to induce proliferation of neural precursor cells and to inhibit their astroglial differentiation. Interestingly, the inactivation of GSK3beta is involved in the inhibition of neurogenesis from neural precursor cells by cooperating with a Notch pathway. In conclusion, our findings suggest that cross-interactions among transcriptional regulatory mechanisms are important for the cell-fate determination in the developing brain.

(10) Neuromyelitis optica の脊髄病巣におけるアクアポリン4の欠落

三須建郎 (東北大学病院神経内科)

【研究目的】 視神経脊髄炎 Neuromyelitis optica (NMO) は、視神経と脊髄が選択的に障害される炎症性疾患であるが、長い間多発性硬化症 (MS) との異同が問題となってきた。近年、NMO の患者血清には中枢神経系の微小血管や軟膜に特異的に反応する NMO-IgG が見出され標的抗原がアクアポリン 4 (AQP4) であることが報告された。AQP4 は水チャンネルの一つで生体の水輸送に重要な働きをしており、中枢神経系では主にアストロサイトの足突起に好発している。しかし、抗 AQP4 抗体がどのように疾患の発症に関わるかは不明であり、病理学的に解析する必要があると思われた。

【研究方法】 NMO 12 例 (平均 59.3 才, 経過 8.0 年, 女性 8 例, 男性 4 例), MS 6 例 (平均 36.7 才, 経過 10.3 年, 女性 3 例, 男性 3 例) の剖検脊髄を用い、正常対照との比較検討を行った。各症例の脊髄標本を用いて、病巣における免疫グロブリン (IgG, IgM) や活性化補体 (C9neo) の発現を免疫組織学的に検討した。また AQP4, ミエリン塩基性蛋白 (MBP), グリア繊維細胞酸性蛋白 (GFAP) の発現を免疫組織学的に検討した。

【研究結果】 健常者脊髄では、灰白質に AQP4 の発現が認められ、また白質の微小血管や軟膜に発現が認められた。NMO の病変は、壊死・脱髄を伴い、血管の増生と肥厚

性変化, マクロファージの浸潤を伴う特徴を有していた。NMO 全例において病巣における AQP4 の発現低下・欠落が認められた。特に活動期には脊髄中心部を含む広範な AQP4 発現の低下が認められた。一方、活動期病巣において髄鞘の構成蛋白 MBP が比較的保たれる傾向が認められた。特に、補体・免疫グロブリンの証明される活動期病巣の血管周囲では AQP4 欠損が明らかで、GFAP も低下していた。一方、MS では NMO で見られる広範な AQP4 欠損は証明されず、AQP4 は GFAP 陽性の反応性グリアに高発現していた。

【考察】 今回、NMO では病巣部位で AQP4 は発現が低下し、MS では発現が亢進していることから、NMO はアストロサイトに発現する AQP4 の低下に起因する MS とは異なる疾患であることが示唆された。また、AQP4 と GFAP の発現パターンは比較的一致しており、アストロサイトの何らかの障害が病態に関与していると推察される。これらの結果は、病変が脊髄中心部に多く血管周囲に多いなど、臨床・病理学的に矛盾のない結果であった。

【結論】 NMO 病巣の AQP4 および GFAP の発現低下は、NMO がアストロサイトに起因する MS とは異なる病態を有する疾患であることを示唆している。

(11) 多光子励起法による大脳皮質の *in vivo* イメージング

和氣弘明 (生理学研究所 生体恒常機能発達機構研究部門)

近年多光子励起過程を用い、細胞機能の可視化解析(2光子顕微鏡)が様々な組織の細胞生理学的研究に用いられるようになってきた。ここでは本顕微鏡法の特徴と大脳皮質の *in vivo* イメージングへの応用について、最近我々の構築した個体用 *in vivo* 2光子顕微鏡のデータを交え、議論する。この2光子顕微鏡の利用の著しい増大の理由は、組織的標本深部において高い空間分解を維持したまま断層イメージングが可能なることにある。これは、多光子励起過程では励起光が近赤外領域にあるため、生体標本に対し低吸収低散乱性であることに原因する。さらに、この低吸収性は生体試料に対する侵襲性が低いことをも意味し、長時間に渡って安定的なライブイメージングを可能たらしめている。この高い組織透過性と低い侵襲性を活用し、最近、我々は特定の細胞種に蛍光蛋白を発現する *transgenic mouse* を用い、生きた個体において *in vivo imaging* を行い、レーザー拡散角を脳内各深度で最適化することにより脳内深部解像度の向上を行い、大脳皮質第5層の錐体細胞に EYFP を発現したマウスにお

いて、表面から 0.9mm 以上もの大脳新皮質深部の可視化に成功した。さらに我々はこの技術を用い中枢神経系において生きた個体を用いて、個体の表現型と細胞の生理活性および微細構造の関係を検討した。

発達期と同様、脳障害後の回復過程において様々な過疎的な変化が起こることがこれまで知られている。特に神経筋接合部などにおいては、障害前後のイメージングで特徴的な変化が起こることが知られている。しかし、これまでは技術的な制限のため、中枢神経系の脳障害後の変化についてはほとんど知られていない。我々はクリプトンレーザーによる脳血管内血栓形成および YAG レーザーによる再灌流技術を利用して脳障害を作成し、同一個体において脳障害後の変化を経時的に観察するモデルを作成し、この技術を利用し、脳障害後における神経微細構造およびグリアの可塑的な変化を生きた個体を用いて検討した。さらに様々な障害モデルを作成するためのフェムト秒パルスレーザーの生体への応用についてわれわれの試みを紹介する。

19. 上皮膜機能活性化物質と上皮膜防御の最前線

2007年11月1日-11月2日

代表・世話人：中張隆司（大阪医科大学 生理学）

所内対応者：岡村康司（自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター，
生理学研究所，神経分化研究部門）

- (1) $[Cl^-]_i$ 減少による胃幽門線粘液細胞 Ca^{2+} 調節性開口放出の増強
中張隆司（大阪医科大学 生理学）
- (2) 骨芽細胞におけるクロライド依存的な細胞周期調節
宮崎裕明¹，牧昌弘^{1,2}，新里直美¹，丸中良典
（京都府立医科大学大学院¹生理機能制御学，²運動機能再生外科学）
- (3) 神経突起伸長におけるクロライドイオン輸送体の役割
中島謙一，宮崎裕明，新里直美，丸中良典（京都府立医科大学大学院医学研究科生理機能制御学）
- (4) 低浸透圧刺激による上皮型 Na^+ チャネル (ENaC) の機能制御
樽野陽幸，新里直美，丸中良典（京都府立医科大学大学院医学研究科生理機能制御学）
- (5) アルドステロンにより促進されるナトリウム再吸収のクロライドイオン依存的な制御
新里直美，丸中良典（京都府立医科大学大学院医学研究科生理機能制御学）
- (6) 電位依存性ホスファターゼ VSP は，ホヤ，ゼブラフィッシュの消化管上皮細胞に発現する
岡村康司^{1,2,3}，Mohammad I. Hossain^{1,2}，木村有希子^{1,2}，東島眞一^{1,2,3}，小笠原道生⁴
（¹自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター，
²生理学研究所，³総合研究大学院大学，⁴千葉大学理学系研究科）
- (7) 熱ショック転写因子による細胞の生と死の決定の機構
林田直樹，藤本充章，高木栄一，大島功，王倍倍，井上幸江，中井 彰
（山口大学大学院医学系研究科医化学分野）
- (8) 嚢胞性線維症原因遺伝子 CFTR の成熟化・分解を制御する分子機構
杉田 誠（広島大学大学院歯歯薬学総合研究科・創生医科学専攻・病態探究医科学講座（口腔生理学））
- (9) 新規有機アニオントランスポーター分子の同定：
内因性有機酸の輸送特性および生理機能における重要性
安西尚彦¹，金井好克²，遠藤 仁^{1,3}
（¹杏林大学医学部薬理学教室，²大阪大学医学部情報薬理学教室，³ジェイファーマ株式会社）
- (10) 毛包幹細胞領域は，表皮・毛包・末梢神経と血管網の再生を行う表皮バリア再生のための
最前線基地として働いている
天羽 康之¹，狩野 真帆¹，勝岡 憲生¹，河原 克雅²
（¹北里大学医学部皮膚科学教室²北里大学医学部生理学教室）
- (11) 浸透圧，静水圧とタイトジャンクションの機能調節
徳田深作，中島謙一，宮崎裕明，新里直美，丸中良典
（京都府立医科大学大学院医学研究科生理機能制御学）

(12) クローディング 15 ノックアウトマウスにおける小腸肥大化の解析

田村淳¹, 北野由香², 秦正樹³, 勝野達也¹, 森脇一将⁴, 佐々木博之⁵,
林久由⁶, 鈴木裕一⁶, 野田哲生⁷, 古瀬幹夫⁴, 月田承一郎², 月田早智子¹

(¹大阪大学大学院医学系研究科/生命機能研究科分子生体情報学,
²京都大学大学院医学研究科分子生体情報学, ³兵庫医科大学病理学,
⁴神戸大学大学院医学系研究科細胞分子医学, ⁵慈恵医科大学 DNA 医学研究所分子細胞生物学,
⁶静岡県立大学食品栄養科学部栄養学科生理学研究室, ⁷癌研究会癌研究所細胞生物学)

(13) 食事性フラボノイドの吸収経路に関する検討

室田佳恵子, 寺尾純二 (徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部食品機能学分野)

(14) 唾液腺 AQP5 の LPS による down-regulation とそのシグナル伝達経路

姚 陳娟, 細井和雄 (徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 口腔分子生理学分野)

(15) マウス膝導管細胞における slc26a6 Cl⁻-HCO₃⁻ exchanger

石黒 洋, 山本明子 (名古屋大学大学院医学系研究科 健康栄養医学)

(16) 2つの異なる胃酸分泌最終段階における胃プロトンポンプ複合体

酒井秀紀, 藤井拓人, 高橋佑司, 森井孫俊, 竹口紀晃

(富山大学大学院医学薬学研究部 薬物生理学)

【参加者名】

岡村康司 (自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター), 大河内善史 (自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター), M.I.Hossain (自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター), 高橋信之 (自然科学研究機構機能協働), 河原克雅 (北里大学医学部生理学), 天羽康之 (北里大学大学院医療系研究科皮膚科学), 狩野真帆 (北里大学大学院医療系研究科皮膚科学), 酒井秀紀 (富山大学大学院医学薬学研究部), 藤井拓人 (富山大学大学院医学薬学研究部), 丸中良典 (京都府立医科大学大学院生理機能制御学), 新里直美 (京都府立医科大学大学院生理機能制御学), 宮崎裕明 (京都府立医科大学大学院生理機能制御学), 中島謙一 (京都府立医科大学大学院生理機能制御学), 徳田深作 (京都府立医科大学大学院生理機能制御学), 山田敏樹 (京都府立医科大学大学院生理機能制御学), 樽野陽幸 (京都府立医科大学大学院生理機能制御学), 石黒 洋 (名古屋大学大学院医学系研究科), 遠藤 仁 (杏林大学 医学部), 安西尚彦 (杏林大学 医学部), 古家喜四夫 (科学技術振興機構・細胞力覚プロジェクト), 細井和雄 (徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部), 室田佳恵子 (徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部), 中井 彰 (山口大学医学部), 杉田 誠 (広島大学大学院医歯薬学総合研究科), 田村 淳 (大阪大学生命機能研究科), 鈴木裕一 (静岡県立大学), 林 久由 (静岡県立大学), 中張隆司 (大阪医科大学 医学部 生理学教室)

能制御学), 山田敏樹 (京都府立医科大学大学院生理機能制御学), 樽野陽幸 (京都府立医科大学大学院生理機能制御学), 石黒 洋 (名古屋大学大学院医学系研究科), 遠藤 仁 (杏林大学 医学部), 安西尚彦 (杏林大学 医学部), 古家喜四夫 (科学技術振興機構・細胞力覚プロジェクト), 細井和雄 (徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部), 室田佳恵子 (徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部), 中井 彰 (山口大学医学部), 杉田 誠 (広島大学大学院医歯薬学総合研究科), 田村 淳 (大阪大学生命機能研究科), 鈴木裕一 (静岡県立大学), 林 久由 (静岡県立大学), 中張隆司 (大阪医科大学 医学部 生理学教室)

【概要】

平成 19 年 11 月 1-2 日に研究会「上皮膜機能活性化物質と上皮膜防御の最前線」を開催した。最初のセッションで, 細胞内 Cl⁻イオンが種々の細胞機能を修飾していることが紹介され, Cl⁻が細胞容積調節と密接に関連した新たな細胞内情報伝達物質として紹介された。また, 電位変化を感じて活性を変化させるイノシトールリン脂質の脱リン酸か酵素の上皮膜における発現の可能性について紹介された。第 2 のセッションでは熱ショック蛋白転写因子による生と死の決定機構についての発表があった。

第 3 のセッションでは CFTR の成熟化と分解の調節, 有機溶質トランスポーターとイオン輸送体がカップリングと新たな輸送蛋白について報告された。第 4 のセッションは表皮バリア機能に着目し毛包幹細胞が, 表皮・毛包・末梢神経と血管網の再生により表皮バリア機能を維持していること, また, 細胞レベルではタイトジャンクションが静水圧により変化していること, KO マウスにおける消化管の変化が紹介された。最後のセッションでは, 上皮膜輸送の調節として, 小腸のフラボノイド吸収にお

ける構造特異性, 唾液腺における水チャンネルの調節, 膵臓導管の HCO_3^- 分泌機構, 胃酸分泌の調節が発表があった。生体防御の最前線に位置する上皮膜の機能の活性

化の重要性が議論され, 上皮膜の機能とそれを制御する内因性, 外因性生理活性物質の重要性が新ためて示された。

(1) $[\text{Cl}]_i$ 減少による胃幽門線粘液細胞 Ca^{2+} 調節性開口放出の増強

中張隆司 (大阪医科大学 生理学)

細胞容積の減少は胃幽門線粘液細胞の Ca^{2+} 調節性開口放出を増強する。細胞容積減少を増強する bumetanide あるいは Cl^- free solution は Ca^{2+} 調節性開口放出をさらに増強した。また, Cl^- free solution による Ca^{2+} 調節性開口放出の増強は, $[\text{Cl}]_o$ の増加に従い濃度依存性に抑制された。一方, NPPB は細胞容積減少を抑制し, Ca^{2+} 調節性開口放出をわずかに減少させた, さらに, bumetanide あるいは Cl^- free solution による Ca^{2+} 調節性開口放出の増強を完全に抑制した。MQAE を用いた $[\text{Cl}]_i$ の測定は, ACh

刺激は $[\text{Cl}]_i$ を減少させ, bumetanide あるいは Cl^- free solution は ACh 刺激による $[\text{Cl}]_i$ 減少を増強すると同時に, それ自身が $[\text{Cl}]_i$ 減少を引き起こした。さらに, bumetanide あるいは Cl^- free solution は単独で $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を増加させた。また, Ca^{2+} 調節性開口放出の最終段階の ATP-dependent priming 反応が $[\text{Cl}]_i$ 減少により修飾され, Ca^{2+} 調節性開口放出が増強されることが明らかとなった。これらの結果から, $[\text{Cl}]_i$ の減少が Ca^{2+} 調節性開口放出を活性化することが示された。

(2) 骨芽細胞におけるクロライド依存的な細胞周期調節

宮崎裕明¹, 牧昌弘^{1,2}, 新里直美¹, 丸中良典¹

(京都府立医科大学大学院, ¹生理機能制御学, ²運動機能再生外科学)

近年, Cl^- チャネルや輸送体の発現・活性調節を介した細胞内 Cl^- 濃度変化が, 細胞増殖のシグナルとして重要であることが示唆されるが, その詳細なメカニズムは現在も不明のままである。そこで本研究では, Cl^- が MC3T3-E1 骨芽細胞の細胞増殖に対する影響を検討した。MC3T3-E1 細胞の増殖は, 培養液中の Cl^- 濃度 ($[\text{Cl}]_o$) の減少に伴って有意に抑制された。また, $[\text{Cl}]_o$ の減少は, 細胞周期の G_0/G_1 期と G_2/M 期における細胞数を増加させることが明らかとなった。 G_0/G_1 期の進行を亢進させる

Rb と, G_2/M 期の進行を亢進させる $\text{cdc}2$ の活性と発現レベルの変化を調べたところ, $[\text{Cl}]_o$ を減少させると Rb のリン酸化, $\text{cdc}2$ の発現レベルが共に減少し, 細胞周期の進行を抑制することが明らかになった。また, $[\text{Cl}]_o$ の減少によって引き起こされる細胞増殖抑制と Rb と $\text{cdc}2$ の活性・発現レベルの低下は, 2 mM のグルタミンの存在下では影響を受けなかった。従って, Cl^- とグルタミンは, 相同なメカニズムによって細胞増殖をコントロールしている可能性が示唆された。

(3) 神経突起伸長におけるクロライドイオン輸送体の役割

中島謙一, 宮崎裕明, 新里直美, 丸中良典 (京都府立医科大学大学院 生理機能制御学)

神経細胞における神経突起伸長には, 微小管をはじめ

とする細胞骨格系の再構築が深く関わっていることが知

られている。一方、細胞内 Cl⁻濃度変化は、細胞増殖や細胞骨格系再構築を含む様々な細胞機能制御に関与していることが、近年の研究より明らかになってきた。本研究では、Cl⁻輸送体として Na⁺/K⁺/2Cl⁻共輸送体 (NKCC1) に着目し、神経突起伸長に対する NKCC1 の役割、および神経突起伸長の Cl⁻要求性を調べた。

ラット副腎由来 PC12D 細胞は、神経成長因子 NGF 処理により神経突起を伸長する。PC12D 細胞を NGF 処理する際に、NKCC1 阻害剤 bumetanide を同時に作用させ、伸長した神経突起の長さを測定した。また、Cl⁻濃度が低

い培養液中で NGF 処理を行い、同様に突起の長さを測定した。さらに、RNAi 法を用いて NKCC1 をノックダウンした際の突起の長さを測定した。Bumetanide 処理、低 Cl⁻濃度の培養液、および RNAi 法による NKCC1 のノックダウンにより、神経突起の伸長が有意に抑制された。NGF 処理により、NKCC1 の発現量増加が見られた。また、間接蛍光抗体法および GFP 標識法による観察より、NKCC1 は神経突起先端に多く存在していた。これらの結果から、NKCC1 を介した細胞内への Cl⁻の取り込みにより神経突起の伸長が促進するという結論を得た。

(4) 低浸透圧刺激による上皮型 Na⁺チャネル (ENaC) の機能制御

樽野陽幸, 新里直美, 丸中良典 (京都府立医科大学大学院医学研究科細胞生理学)

アフリカツメガエル由来の腎尿細管モデル細胞である A6 細胞において、血管側の低浸透圧刺激が ENaC を介した経上皮 Na⁺再吸収を亢進させる現象が、我々の研究室を含めた多くの研究室から報告されている。さらに、我々の先行報告により、この Na⁺再吸収の亢進には 2 つのメカニズムが関与していることが明らかにされている。一つはチロシンキナーゼ依存的な管腔側への ENaC トラフィッキングであり、これは刺激後 10 分以内に引き起こされる急性の反応である。もう一方は遺伝子発現 (α ENaC サブユニットと SGK1) に依存した反応で、刺激後 1 時

間以降に始まる亜急性の反応である。しかし、これらの反応に関わる細胞内シグナルの詳細については不明であった。今回、我々は、電気生理学的手法と生化学的手法を用いて、低浸透圧刺激による ENaC の機能制御に関わるこの 2 つの細胞内シグナル経路の同定を試みた。その結果、急性の ENaC トラフィッキングにおいては EGFR-JNK-PI3K カスケードが関与することを明らかにし、亜急性の遺伝子発現を介した反応には細胞内 Ca²⁺シグナルが関与することを明らかにしたので、その詳細について報告する。

(5) アルドステロンにより促進されるナトリウム再吸収のクロライドイオン依存的な制御

新里直美, 丸中良典 (京都府立医科大学大学院医学研究科細胞生理学)

アルドステロンが Na⁺再吸収を亢進するメカニズムとして、genomic な作用と non-genomic な作用が知られている: 1) genomic な作用は、核内レセプター依存的な遺伝子発現を介して、ナトリウム再吸収に寄与する上皮型 Na⁺チャネル (ENaC) や Na⁺/K⁺ポンプなどを新たに産生するもの; 2) non-genomic な作用は、多様なシグナル分子が ENaC の局在や活性制御に関与することが示唆されている。我々は、これまでに細胞内クロライド濃度 ([Cl⁻]_i) がシグナル分子としての役割を担っており、Na⁺再吸収制御にも深く関わっていることを報告してきた。

アルドステロンを腎尿細管由来上皮細胞である A6 細胞に作用させる際、クロライドチャネル阻害剤や Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter を活性化するフラボノイドを添加すると、[Cl⁻]_i 上昇を介して、Na⁺再吸収阻害を引き起こすことを見出した。さらに、我々は、[Cl⁻]_i の低下がアルドステロンによる Na⁺再吸収の亢進をさらに増強することを見出した。これらの研究成果を基盤として、[Cl⁻]_i がアルドステロンによる Na⁺再吸収亢進機構の制御因子として機能している可能性について報告する。

(6) 電位依存性ホスファターゼ VSP は、ホヤ、ゼブラフィッシュの消化管上皮細胞に発現する

岡村康司^{1,2,3}, Mohammad I. Hossain¹, 木村有希子^{1,2}, 東島眞一^{1,2,3}, 小笠原道生⁴¹自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター, ²生理学研究所,³総合研究大学院大学, ⁴千葉大学理学系研究科)

Ci-VSP (Ciona intestinalis Voltage-Sensing Phosphatase) は、電位依存性チャネルの電位センサーと PTEN 様ホスファターゼの構造を併せ持つ膜蛋白であり細胞膜の脱分極によりイノシトールリン脂質の PI (4,5) P₂ を脱リン酸化する。

VSP の生理機能を理解する目的でカタユウレイボヤにおいて *in situ hybridization* 法により発現を調べたところ、これまでに発現が確認されていた *testis* 以外に、血液系細胞と消化管上皮細胞に発現が見られることがわかった。さらに分子遺伝学的なアプローチが可能なゼブラフィッシュからオルソログ分子のクローニングを行った。ゼブラフィッシュの VSP (Dr-VSP) は Ci-VSP と高い相同性を示し発現系細胞での電気生理学的計測で顕著なゲート電

流を示すことから Ci-VSP と同じように膜電位感知機能をもつことがわかった。更に細胞内ドメインのホスファターゼは、*in vitro* で PI(4,5)P₂ および PI (3,4,5) P₃ を基質として脱リン酸化能をもっていた。アフリカツメガエル卵母細胞を用いた実験から、この酵素活性は脱分極により活性化することが示された。Dr-VSP の発現を *in situ hybridization* により調べたところ、受精後 3 日胚から消化管上皮細胞での発現が確認された。現在ゼブラフィッシュ VSP に対する抗体を作成してその発現を蛋白レベルで解析中である。

これらの知見は上皮細胞の形成や機能に、膜電位に応じたイノシトールリン脂質代謝が関与している可能性を示唆している。

(7) 熱ショック転写因子による細胞の生と死の決定の機構

林田直樹, 藤本充章, 高木栄一, 大島功, 王倍倍, 井上幸江, 中井 彰

(山口大学大学院医学系研究科医化学分野)

すべての生物にとって、温度変化に適応する能力はその生存のために必須のものである。細胞が高温にさらされることで最も有害な影響は蛋白質の変性である。この蛋白質の変性を抑制するために、分子シャペロンとして働く一群の熱ショック蛋白質 (Hsp) が誘導される。この応答が熱ショック応答であり、進化の過程で保存された、普遍的な生体防御機構である。この応答を制御するのが熱ショック転写因子 HSF1 である。HSF1 は、Hsp の構成的ならびに誘導性の発現を制御することで、温熱ストレスをはじめとする様々なストレスに対する耐性の獲得に働いている。また、Hsp 以外のターゲット遺伝子の発現

を介して細胞生存に働くことも強く示唆されている。一方、HSF1 が細胞死を導く働きがあることが示唆されてきた。その分子機構を明らかにするために、DNA マイクロアレイを用いた HSF1 のターゲット遺伝子の検索を行った。その中で、細胞死促進因子 TDAG51 (T-cell death associated gene 51) を同定した。蛋白質変性にとまなう細胞運命の決定は、ともに HSF1 によって制御される Hsp と TDAG51 の発現のバランスによることが示唆された。以上の結果をもとに、ストレスを受けた細胞の生存と死の制御の意義について議論する。

(8) 嚢胞性線維症原因遺伝子 CFTR の成熟化・分解を制御する分子機構

杉田 誠 (広島大学大学院医歯薬学総合研究科・創生医科学専攻・病態探究医科学講座 (口腔生理学))

CFTR の遺伝的機能不全症 (嚢胞性線維症) は、全身性外分泌腺機能障害・呼吸器感染を誘発する致死率の高い疾患である。嚢胞性線維症を引き起こす CFTR 変異の 70% は、508 番目のアミノ酸欠損 ($\Delta F508$) であり、その変異型 CFTR を有する患者においては、細胞内の ER で CFTR が異常分解され、結果として粘膜上皮細胞の腺腔側細胞膜に CFTR Cl⁻チャネルが存在しないために疾患が誘発される。本研究においては、ER で翻訳された CFTR の成熟型コンフォメーションへの移行および分解を制御する分子基盤を解明することを目的とした。上皮系培養細胞での成熟型 CFTR の生成は、butyrate の添加により顕著に促進された。しかし R ドメインを欠損する CFTR に

おいては butyrate の効果は微弱であった。Butyrate は ERK/MAPK の活性化レベルに依存して、CFTR の R ドメインを介して成熟型 CFTR の生成を促進し、その促進には butyrate により発現制御・機能制御される未知分子が関与することが示唆された。Yeast two-hybrid system により R ドメインに接着する分子を検出し、その結合分子に関して分子複合体の構築様式および細胞内局在制御様式を解析した。さらに R ドメインに対する結合分子およびその変異体を過剰発現させた際、および siRNA を用いて結合分子の発現を低下させた際に生じる成熟型 CFTR の生成量の変化を比較解析した。

(9) 新規有機アニオントランスポーター分子の同定： 内因性有機酸の輸送特性および生理機能における重要性

安西尚彦¹，金井好克²，遠藤 仁^{1,3}

(¹ 杏林大学医学部薬理学教室，² 大阪大学医学部情報薬理学教室，³ ジェイファーマ株式会社)

SLC22 に分類される有機アニオントランスポーター OATs は主として腎尿細管に存在し、薬物や毒素など生体異物の解毒・排泄に関与するだけでなく、抗酸化作用を持つ尿酸などの内因性物質の再吸収等を介して生体の防御に重要な役割を果たしている。最近我々は新規有機アニオントランスポーター OAT7, Oat8, OATN1 の分子同定を行った。OAT7 は肝臓 sinusoidal membrane に局在し、エストロン硫酸や DHEA 硫酸などの硫酸抱合体を輸送する。OAT7 による硫酸抱合体取込みは、細胞内の短鎖脂肪酸により増強され、特に炭素数 4 の酪酸と交換輸送が行われることを明らかにした。OAT7 は腸管から門脈を介し肝臓へと到達した短鎖脂肪酸の肝臓でのクリアランスへの関与が推測される。Oat8 は腎臓の集合管に発現を

示し、TCA サイクル中間代謝体である α ケトグルタル酸との交換輸送を行う。Oat8 は α 間在細胞の管腔側膜と β 間在細胞の基底側膜に存在し、体内での酸塩基平衡の変動と連動した何らかの腎臓の生理機能に関与することが推測される。OATN1 は PAH などの典型的な有機アニオンではなく、ニコチン酸、サリチル酸、プロスタグランジンなどを運ぶことから OAT の novel type として名付けられた。この OATN1 のノックアウトマウスを作成し、野生型との間でのマウス尿中の化合物のメタボローム解析を行うことにより、ケトン体の β -hydroxybutyrate の排泄量が異なることを見出し、さらに同物質が OATN1 の輸送基質となることを明らかにし、ケトン体の腎臓での再吸収を担うと考えられる。

(10) 毛包幹細胞領域は、表皮・毛包・末梢神経と血管網の再生を行う 表皮バリア再生のための最前線基地として働いている

天羽 康之¹, 狩野 真帆¹, 勝岡 憲生¹, 河原 克雅²

(¹北里大学医学部皮膚科学教室 ²北里大学医学部生理学教室)

ネスチンは神経系幹細胞に発現する class VI の中間径フィラメント (神経前駆細胞のマーカー) である。我々は、ネスチン遺伝子の second intron に GFP を組み込んだトランスジェニック (ND-GFP-Tg) マウスを用い、毛包幹細胞とそれに連結する真皮の血管網がネスチンを発現しており、さらに、ネスチンを発現する毛包幹細胞が多分化能を有していることを報告した (PNAS **101**, 2004, PNAS **102**, 2005 ほか)。

近年、創傷治癒における毛包幹細胞の役割が注目されている。我々は ND-GFP-Tg マウスを用いて、移植皮膚生着や創傷治癒におけるネスチンを発現する真皮血管網の

役割を検討した。ND-GFP-Tg マウスの休止期毛包を有する背部皮膚をヌードマウスに移植すると、移植皮膚の毛包が成長期に移行するのに伴ってネスチンを発現する真皮血管網は増殖を始め、18 日後までには移植片下床のヌードマウスの血管網と再結合して血管網を再構築した。また、ND-GFP-Tg マウスに 2 mm biopsy punch で皮膚欠損を作ると、bulge area の毛包幹細胞に連結するネスチンを発現する真皮血管網は、創傷部位へ向かって増殖を始め、15 日後までには血管網を再構築した。

【結論】毛包幹細胞に連結するネスチンを発現する真皮血管網は、創傷治癒や移植皮膚の生着のために重要である。

(11) 浸透圧、静水圧とタイトジャンクションの機能調節

徳田深作, 中島謙一, 宮崎裕明, 新里直美, 丸中良典

(京都府立医科大学大学院 医学研究科 生理機能制御学)

細胞間隙はイオンなどの物質を選択的に透過させることが知られており、その透過性は主にタイトジャンクションによって調節されている (barrier function)。腎遠位尿細管におけるイオン輸送は、体内のイオン環境・血圧維持にとって重要な役割を果たしており、特に細胞経由イオン輸送は浸透圧による調節を受けることが知られている。しかし、浸透圧変化の細胞間隙イオン輸送に対する影響については不明である。そこで、我々は、浸透圧の細胞間隙コンダクタンスに対する影響についての検討を行った。その結果、血管側・管腔側間に浸透圧勾配を与

えることにより、イオン選択的な細胞間隙コンダクタンスが増大することを見出した。さらに、血管側の静水圧増加が細胞間隙コンダクタンスの上昇およびタイトジャンクション構成タンパク質である claudin-1 の局在変化をもたらすことも明らかとなった。これらの結果より、タイトジャンクションが有する barrier function は、血管側・管腔側間の浸透圧および静水圧の勾配により、claudin-1 局在変化を伴うダイナミックな制御を受けることが判明した。

(12) クローディン15ノックアウトマウスにおける小腸肥大化の解析

田村淳¹, 北野由香², 秦正樹³, 勝野達也¹, 森脇一将⁴, 佐々木博之⁵,
林久由⁶, 鈴木裕一⁶, 野田哲生⁷, 古瀬幹夫⁴, 月田承一郎², 月田早智子¹

¹大阪大学大学院医学系研究科/生命機能研究科分子生体情報学

²京都大学大学院医学研究科分子生体情報学

³兵庫医科大学病理学 ⁴神戸大学大学院医学系研究科細胞分子医学

⁵慈恵医科大学 DNA 医学研究所分子細胞生物学

⁶静岡県立大学食品栄養科学部栄養学科生理学研究室 ⁷癌研究会癌研究所細胞生物学)

上皮細胞は多細胞生物において体内のコンパートメントを形成し、体内のホメオスタシスを維持するという重要な役割を担っている。そのためには、上皮細胞間に形成されるタイトジャンクション (TJ) によるバリアー機能が必須である。TJ を構成する主要なタンパク質であるクローディンは少なくとも 24 種からなるファミリーを形成し、これらの発現の組み合わせでバリアー機能の特性が規定されると考えられているが、分子レベルでの詳細は明らかではない。

今回我々は、クローディン 15 のノックアウトマウスを作製し、表現型の解析を行った。クローディン 15 は、多種類の臓器に発現するクローディンの 1 つである。この

マウスは外観上正常な成長を示したが、離乳後に腸管とくに小腸の肥大化が認められた。この肥大化は、陰窩と絨毛の伸長を伴っていた。ポリープが形成されたり癌化することではなく、正常な小腸細胞の増殖が促進しているように思われた。フリーズフラクチャー法によると、ノックアウトマウスでは TJ スtrand が量的に顕著に減少しており、またその性状もより曲線状で、ところどころ途切れた部分が認められた。この所見からは、バリアー機能の障害が予測されたが、ビオチン (約 400Da) やデキストラン (4kD, 20kD) 透過試験では、変化は認められなかった。一方、電気生理学的な試験では、conductance の低下が認められた。

(13) 食事性フラボノイドの吸収経路に関する検討

室田佳恵子, 寺尾純二 (徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部食品機能学分野)

食事性フラボノイドは摂食後、小腸および肝臓で抱合代謝を受け、血中には第二相抱合代謝物として存在している。これまでに、フラボノイドは摂取後糖鎖が加水分解され生じたアグリコンが腸管細胞へ取り込まれて最初の代謝過程を経て門脈へと輸送され、肝臓でさらに代謝されて胆汁中へ排出されるか、あるいは血中へと移行する経路が知られている。一般的にフラボノイドは水相と脂質相の界面に局在しやすく両親媒性物質として知られている。すなわち、フラボノイドは実質的に水難溶性物質であり、そのような分子が小腸管腔溶液から循環系へ至る経路としては、腸管からのリンパ輸送がある。我々はこれまでに、胸管リンパカニューレーションラットを用

いて、代表的なフラボノイドであるケルセチンおよびゲニステインを胃あるいは十二指腸へ投与すると一部がリンパへと輸送されることを明らかにした。末梢血濃度に比較してリンパ液中の濃度は 1/4 程度であった。フラボノイドのリンパ輸送経路の存在は、高脂肪食とともにケルセチンを摂取すると吸収が促進されることや、ラットにおけるケルセチンの生体内局在を調べると肺に比較的多量のケルセチンの蓄積が見出されるなどの他の研究グループの報告によっても支持されるものである。本研究会ではこれまでに得られた成果を報告するとともに、フラボノイドの腸管上皮細胞内輸送経路について考察したい。

(14) 唾液腺 AQP5 の LPS による down-regulation とそのシグナル伝達経路

姚 陳娟, 細井和雄 (徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 口腔分子生理学分野)

口腔は生体の防御系における最初の関門であり, その中で唾液・唾液腺は重要な働きを担っている。唾液腺の外分泌活動に関しては, 外分泌腺型水チャネル蛋白質, アクアポリン 5 の働きが重要である。本研究では内毒素, LPS による唾液腺 AQP5 発現制御を雄性 C3H/HeN マウス及びその TLR4 変異型, C3H/HeJ マウスを実験動物として調べた。まず, RT-PCR および Western blotting によって解析し, LPS 腹腔投与後 6-24 時間後, C3H/HeN マウス耳下腺において AQP5 と AQP1 の mRNA 及び蛋白質は減少すること (down-regulation) を見出した。LPS による AQP5 mRNA の down-regulation は培養耳下腺において, NF- κ B 経路の阻害剤である PDTC, MG132, および MAPK 下流の ERK1/2 ならびに JNK の阻害剤である AG126 および SP600125 (それぞれ c-fos および c-Jun のリン酸化阻害) により完全に解除された。上記 down-regulation は

p38MAPK 阻害剤である SB203580 によつては部分的にのみ解除された。他方, AQP1 mRNA の LPS による down-regulation は AG126 と SP600125 によつてのみ, しかも部分的にのみ解除された。Gel shift 解析結果から, NF- κ B は AQP5 プロモーターの 2 種の NF- κ B 応答配列へ結合し, そのレベルは LPS 刺激により上昇した。AQP5 の転写活性はこれにより抑制されたと考えられた。更に, Western blot 解析および免疫組織化学により, NF- κ B の subunit, p65 および p-c-Jun ならびに c-fos は LPS 刺激により増幅され, 核へ移行することが確認された。

結論として, LPS による AQP5 mRNA の down-regulation には NF- κ B 及び MAPK 経路が関与し, NF- κ B および AP-1 がクロスカップリングする可能性が考えられた。一方, AQP1 mRNA の down-regulation には MAPK 系が部分的に関与していると推定された

(15) マウス膵導管細胞における slc26a6 Cl⁻-HCO₃⁻ exchanger

石黒 洋, 山本明子 (名古屋大学大学院医学系研究科 健康栄養医学)

膵臓の導管系は, 高濃度の HCO₃⁻ を含む等張液を分泌する。管腔膜を介する HCO₃⁻ 分泌は, CFTR の HCO₃⁻ コンダクタンスと, SLC26 family 輸送体による Cl⁻-HCO₃⁻ 交換が担っているとされている。slc26a6 ノックアウトマウスの膵から小葉間膵管を単離し, 管腔内に BCECF-dextran を注入して, 溶液分泌速度 (管腔容積の変化率) とともに管腔内の pH (HCO₃⁻ 濃度) を測定した。表層, 管腔内とも HCO₃⁻-free, 150 mM Cl⁻ の条件で測定を開始した。forskolin 刺激下に, 表層灌流液を 25 mM

HCO₃⁻-5% CO₂-125 mM Cl⁻ 溶液に切り替えると, 管腔内 pH は一時的に低下 (CO₂ の流入による) した後上昇した。その時, ワイルドタイプでは一過性の溶液分泌の増加が見られたが, slc26a6 (-/-) では逆に一過性の吸収が半数以上の膵管に見られた。HCO₃⁻ 濃度と Cl⁻ 濃度の和が常に 150 mM であると仮定し, 管腔膜を介する HCO₃⁻ および Cl⁻ 輸送を算出したところ, slc26a6 は 1 Cl⁻ ⇌ 2 HCO₃⁻ 交換を担っていると推定された。

(16) 2つの異なる胃酸分泌最終段階における胃プロトンポンプ複合体

酒井秀紀, 藤井拓人, 高橋佑司, 森井孫俊, 竹口紀晃
(富山大学大学院医学薬学研究部 薬物生理学)

胃酸分泌細胞において酸分泌休止状態では, 胃プロトンポンプに富む細管小胞は細胞内に存在しているが, 刺

激に伴い細管小胞は分泌膜につながりプロトンポンプが活性化され管腔へ胃酸が分泌される。我々は、分泌膜の基礎胃酸分泌（休止時）と、細管小胞膜の胃酸分泌（刺激時）におけるトランスポーターの役割について検討した。

ブタ胃より細管小胞膜由来のベシクル (TV) と分泌膜由来のベシクル (SA) を調製した。TV および SA における胃プロトンポンプの機能について比較すると、特異的阻害剤 (SCH 28080) 感受性はTVのプロトンポンプが有

意に高く、コンフォメーションの K^+ 感受性 (E1→E2K) もTVのプロトンポンプが高かった。TVにはCLC-5が選択的に、SAにはKCC4が選択的に発現しており、いずれも胃プロトンポンプと分子会合していることがわかった。胃ベシクルおよび細胞株において、これらのタンパク質とプロトンポンプが機能的に関連していた。したがってTVとSAにはそれぞれ異なった胃プロトンポンプ複合体が存在しており、胃プロトンポンプは2つの異なる機構により調節されていることが示唆された。

20. 電子顕微鏡機能イメージング法の展開

2007年12月25日-12月26日

代表・世話人：白田 信光（藤田保健衛生大学医学部解剖学Ⅱ）

所内対応者：永山 國昭（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

- (1) 顕微鏡の未来
寺川 進（浜松医科大学 光量子医学研究センター）
- (2) SPM を用いた半導体からバイオまでの電気特性イメージング
藤田 高弥（(株)東レリサーチセンター 表面科学研究部 表面解析研究室）
- (3) SiC の結晶成長と格子欠陥の TEM 評価
一色 俊之（京都工芸繊維大学大学院 工芸科学研究科 基盤科学部門）
- (4) AP-FIM, TEM の融合による高強度鉄鋼材料のナノ組織解析
佐野 直幸（住友金属工業(株) 総合技術研究所 厚板・条鋼研究開発部）
- (5) TEM 像, 角度分解反射 SEM 像を用いた粒界ナノ析出物の解析
谷山 明（住友金属工業(株) 総合技術研究所 物性・分析研究開発部）
- (6) EPMA を用いたヒト細胞の微小部・微量金属元素分析
副島 啓義（(株)島津総合科学研究所）, 渡辺 孝一（新潟大学）, 森 博太郎（大阪大学）
- (7) 生体試料分析を目的とした顕微質量分析装置の開発
出水 秀明, 原田 高宏, 竹下 建悟, 古橋 治, 小河 潔, 吉田 佳一
（(株)島津製作所）, 瀬藤 光利（生理学研究所）
- (8) 顕微質量分析による生体組織分析：応用
瀬藤 光利（岡崎統合バイオサイエンスセンター）
- (9) 生物電子顕微鏡の新しい展開
永山 國昭（岡崎統合バイオサイエンスセンター）
- (10) 経口投与 Aluminum の組織内蓄積の元素分析電子顕微鏡的解析
亀谷 清和（信州大学 ヒト環境科学研究支援センター 機器分析部門）
- (11) デジタルホログラフィック顕微鏡
松永 正史（愛知産業(株)）, 松田 知足（(株)オムニセンスジャパン）
- (12) デジタルホログラフィによるサブナノ変形計測技術
藤垣 元治（和歌山大学 システム工学部 光メカトロニクス学科）
- (13) コンフォーカル顕微鏡における理想的励起光技術と超解像技術
伊集院 敏（ライカマイクロシステムズ(株) リサーチクリニカル事業部）
- (14) 蛍光相関分光法
末永 佳代子（カールツァイスマイクロイメージング(株) プロダクトサポート部門）
- (15) アポディゼーション位相差法
大瀧 達朗（(株)ニコン コアテクノロジーセンター研究開発本部）
- (16) 軟 X 線顕微鏡による生細胞の観察手法
有澤 孝（(株)アライドレーザー JAEA 関西光科学研究所）
- (17) 環境制御・透過電子顕微鏡の進展と応用
竹田 精治（大阪大学大学院 理学研究科 物理学）
- (18) 隔膜型雰囲気試料室の開発
石川 晃（日本大学 文理学部 物理学科）

(19) Molecular Mechanism of Muscle Contraction Studied Using the Gas Environmental Chamber

(ガス雰囲気試料室による筋収縮の分子的機構の研究) 隔膜型雰囲気試料室の開発

杉 晴夫 (帝京大学 医学部 生理学教室)

【参加者名】

寺川 進 (浜松医大・光量子医学研究センター), 藤田 高弥 ((株) 東レリサーチセンター), 一色 俊之 (京都工芸繊維大・院工芸科学研究科), 佐野 直幸, 谷山 明, 亀井一人 (住友金属工業 (株) 総合技術研究所), 副島 啓義 ((株) 島津総合科学研究所), 渡辺 孝一 (新潟大), 森 博太郎 (阪大), 出水 秀明, 原田 高宏, 竹下 建悟, 古橋 治, 小河 潔, 吉田 佳一 ((株) 島津製作所), 亀谷 清和 (信州大), 松永 正史, 木寺正晃 (愛知産業 (株)), 松田 知足 ((株) オムニセンスジャパン), 藤垣 元治 (和歌山大・工), 伊集院 敏, 松田互司 (ライカマイクロシステムズ (株)), 末永 佳代子, 佐藤康彦 (カールツァイスマイクロイメージング (株)), 大瀧 達朗 ((株) ニコン), 有澤 孝 ((株) アライドレーザー), 竹田 精治

(阪大・院理), 石川 晃 (日大・文), 杉 晴夫 (帝京大・医), 臼田信光, 厚沢季美江, 松井佑樹, 伊藤辰将 (藤田保健衛生大・医), 金子康子 (埼玉大・教), 磯田正二 (京大・科学研究所), 青山一弘 (日本エフイー・アイ), 倉田博基 (京大), 田中信夫 (名大), 山田啓文 (京大), 詫間真苗美 (エスケー化研 (株)), 加藤幹男 (阪大), 新井善博, 松本勉 (テラベース (株)), 岩田博之 (愛知工業大・工), 上野理恵 (キヤノン (株)), 寺田健二 ((株) 住化分析センター), 佐藤馨 (JFE スチール), 野村英一 (開発受諾 21), 津野勝重 (EOST), 森久祐司 (島津製作所), 服部亮 (豊田通商 (株)), 福島球琳男 (日本電子 (株)), 永山 國昭, 瀬藤 光利, 早坂孝宏, 井上菜穂子 (統合バイオ)

【概要】

本研究会は平成 12 年よりスタートした電子顕微鏡の研究会 (“定量的高分解能電子顕微鏡法”, “電子位相差顕微鏡の医学・生物学的応用”, “位相差断層電子顕微鏡の医学・生物学的応用”) を継承しており, 本年で 8 年目になる。今回は特に, これまでの多くの共同研究の成果を踏まえ, 今後の進展の方向性について展望するための集中的な発表・討論を期した。

今年度は平成 19 年 12 月 25 日から 26 日に岡崎コンファレンスセンター小会議室で開催した。専門性を追求するために, 平成 19 年度日本顕微鏡学会関西支部特別企画講演会「生物科学・材料科学におけるイメージングの統合化」, 自然科学研究機構イメージングサイエンスと共催し, 延べ約 100 人が参加した。浜松医科大学光量子医学研究センター 寺川進先生「顕微鏡の未来」の基調講演の後に 1.材料系の光顕・電顕統合イメージング, 2.生

物系の光顕・電顕統合イメージング, 3.生物系の光顕・電顕イメージング, 4.生きた細胞の顕微鏡観察の主題について, それぞれ約 5 演題ずつ, 総計 19 演題の講演があった。材料系・生物系の双方から新規の機能イメージング法の提案があった。さらに今後の新しい潮流となる生細胞観察に対し, 特に電顕が備えるべき性能について議論が行われ, 技術革新について個々の具体的に必要な新規技術が提案された。

本研究会と呼応する形で岡崎で開発されてきた位相差電子顕微鏡法は, 無染色の生物試料観察に特に威力を発揮し, 従来法では観察が困難であった様々な生物試料の微細構造を明瞭に提示してきたが, 生物科学・材料科学におけるイメージングの統合化とともに生細胞観察においても基軸となる研究手法であることが理解された。

(1) 顕微鏡の未来

寺川 進 (浜松医科大学 光量子医学研究センター)

顕微鏡の革新

顕微鏡は, 19 世紀にドイツで著しい発展を遂げたが,

その駆動役となったのは E. Abbe と K. Zeiss である。特に Abbe は、レンズに関する基本的な回折理論を確立し、性能のよい光学系を作ることにも貢献した。さらに、彼は、機械工学的な理論も研究し、測定の精度を上げることにしても貢献した。すなわち「測定器は測定されるものの近くに置くことで精度が上がる」という考えを提唱した (Abbe の原理)。Abbe の活躍した時代に比べて、著しい発展を遂げた現代の顕微鏡であるが、実は、彼の理想としたことを全く追求することなく、発明初期の形を踏襲したまま現在に至っている。将来の顕微鏡は、この点を追求することが求められるであろう。Abbe の原理を追求することによって、現在の顕微鏡の形は大きく変わり、多様なニーズに適応できる新しい形の物に進化するはずである。

光に印を付けること

光の束が大きいものだと、それが励起したり昇華したりする作用を小さな領域に限ることができれば、情報は小さな点からだけ送られてくるはずである。したがって、光という波長の長いもの、あるいは、著しく散乱するものと、波長が短く焦点の絞れる別の波を重ねて作用を引き起こす方法が考えられる。たとえば、脳内に散

乱光を送り込めるが、これを使ってはイメージングできない。そこで、集中した音波で脳内を振動させ、その振動によって変調された光だけを集めれば、深部の点からの情報が得られる。あとは、走査すればよい。

分解能の追求

光学顕微鏡は電子顕微鏡に比べて分解能が劣ることが長い間の課題であった。光の波の波長が電子の波の波長に比べて大きいことが、回折限界という言葉を生み、これを超えることはできないとされてきた。しかし、現在、様々な試みがなされ、実質的に分解能は上がってきたといえる。この流れは、確実に大きな潮流になるであろう。光を使った顕微鏡の将来展望は大変面白いものになってきている。

電子顕微鏡と光学顕微鏡

光子と電子は素粒子として考えるとかなり近い存在である。光は電子から生まれ、電子に吸い込まれるので、光は電子という実体の影の様なものでもある。この二つを自在に扱って対象を調べることが、我々の世界の認識の幅を拓けることになる。まずは、独立した電子と光の波を同時に使うことが考えられる。この試みの先に新しい顕微鏡の世界が開けているであろう。

(2) SPM を用いた半導体からバイオまでの電気特性イメージング

藤田 高弥 ((株) 東レリサーチセンター 表面科学研究部 表面解析研究室)

走査型プローブ顕微鏡 (Scanning probe microscopy : SPM) は、先端が鋭利な探針=プローブを用いる顕微鏡の総称であり、固体表面において 10 億分の 1 メートル (ナノメートル) の世界を観察できるイメージング技術である。分析・評価の技術開発の歩みを振り返ると、1990 年代より、SPM は半導体産業の成長とともに発展していった。近年、シリコン (Si) や窒化ガリウム (GaN) などの基板をはじめ、大規模集積回路 (LSI) を構成する電界効果トランジスタ (例えば MOSFET) など、SPM は半導体の様々な試料においてナノメータスケールの表面粗さや電気特性の評価に用いられるようになった。我々は、半導体の電気伝導を担う電子や正孔 (キャリア) に関し、これまで難しいと言われてきた微小領域のキャリア濃度の定量化に取り組んできた¹⁾。最近、SPM を用いて MOSFET のキャリア濃度をイメージングできるようになった。一

方、バイオの分野では、タンパク質や細胞に電極を付けることは極めて難しく、SPM による生体試料の電気特性イメージングはほとんど行なわれてこなかった。そこで、生きた細胞に入力電圧を加えられる環境をつくり、藍藻の光合成前後における電位変化を捉えることができた。本講演では、多岐にわたる SPM 群の中から走査型キャパシタンス顕微鏡 (SCM)、走査型拡がり抵抗顕微鏡 (SSRM)、表面電位顕微鏡 (SpOM) を取り上げ、それらの手法の特徴を解説し、半導体からバイオまでの電気特性イメージングの事例を紹介する。

参考文献

- 1). 藤田高弥, 谷井義治, 村司雄一, 武中彩, 松村浩司: 「SPM における技術開発の取り組みと受託分析への新展開」, The TRC News No.100, 49-53 (Jul.2007).

(3) SiC の結晶成長と格子欠陥の TEM 評価

一色 俊之 (京都工芸繊維大学大学院 工芸科学研究科 基盤科学部門)

シリコンカーバイド (SiC) は、ワイドバンドギャップ、高電子移動度などの優れた電気的特性に加え高熱伝導性と化学的安定性を有することから、パワーデバイス応用を中心に研究開発が進められている。SiC デバイスの開発では基板の高品質化と大面積化が大きな課題である。現在の結晶育成技術では基板中の欠陥低減が不十分で本来の電気特性を発揮できておらず、サイズも4~6インチと小口径の基板しか得られていない。低欠陥密度、大口径の SiC 基板を低コストで製造するためには、欠陥の生成に密接に関連する結晶成長メカニズムの解明が不可欠である。この目的において、電子顕微鏡による欠陥のイメージングが重要な役割を果たすと期待される。この講演では透過型電子顕微鏡法を中心に行った SiC 結晶中の欠陥構造評価と成長メカニズムの考察について述べる。

1. 6H バルク結晶中のグラファイト偏析

昇華法を用いたバルク結晶成長中に SiC 相に不純物として Si や C 微粒子が形成されることがある。6H-SiC 結

晶に整合的に生成した平板状グラファイトについて、結晶格子像観察と EDX 分析により気相組成の揺らぎによる成長機構を考察した。

2. 非 *c* 面成長 4H 基板中の転位対配列

SiC 結晶の成長には *c* 面基板を用いることが多いが、*a* 面や *m* 面基板を用いてマイクロパイプ欠陥やポリタイプ混在を低減する成長方法も検討されている。昇華法で *m* 面基板上に成長した結晶中の微細転位対の配列を回折コントラスト法で観察し、その発生機構について考察した。

3. Si 基板上のヘテロエピタキシャル成長

Si 基板上への 3C-SiC ヘテロエピタキシャル成長について SiC/Si 界面近傍の詳細な観察を行い、基板面方位と結晶成長、欠陥導入の関係について議論した。Si (110) 基板上では格子不整合が低減する SiC (111) 結晶の成長が起こり、積層欠陥の発生が抑制されることを明らかにした。

(4) AP-FIM, TEM の融合による高強度鉄鋼材料のナノ組織解析

佐野 直幸 (住友金属工業 (株) 総合技術研究所 厚板・条鋼研究開発部)

1. 緒言

鉄鋼材料の高強度化は、鉄が使われるほぼ全ての分野で求められ続けるものと言えるが、近年では、CO₂ 排出削減への取り組みが日増しに強まる中で、特に自動車の燃費改善のために高強度の鉄鋼材料が広く求められている。鉄鋼材料の高強度化の基本は、炭素濃度に応じた最適な「相」構成を加工熱処理によって実現するものと言え、所望の相を得られやすくするために合金元素が添加される。一方で、合金元素は固溶状態からクラスターを経て、析出物となって高強度化にとって欠くことのできない役割を演じている。鉄鋼材料における主な析出強化粒子はナノメートルサイズの炭・窒化物である。これらは透過電子顕微鏡 (TEM) の恰好の解析対象であるが、個々の原子の空間分布を特定できる三次元アトムプローブ電界イオン顕微鏡 (3D AP-FIM) を併用すると、個々の

析出物の化学組成や局所的な数密度の情報を正確に得ることができる上、強度の上昇に伴って合金元素がどのようにその存在形態を変えていくのかをトレースすることができるので、析出強化の微視的機構を研究するのにもうってつけの組み合わせである。

2. 実験例

自動車用の特殊鋼では、特別な熱処理を施さなくても熱間鍛造後の空冷だけで十分な高強度が得られ、かつ機械加工性にも優れるような非調質鋼が望まれている。こうした要望に応えるためコネクティングロッド (コンロッド) 用途に Fe-0.28 C-0.55 Si-0.75 Mn-0.05 P-0.1 S-0.17 Ti-0.17 V (mass%) が開発された¹⁾。Fig.1 はこの鋼のフェライト相中の微細組織を TEM と 3D AP-FIM で解析した結果である。TEM 像では、V 系非調質鋼のフェライト強化を担う列状の VC の整合析出 (相界面析出) が明

瞭に捉えられた。3D AP-FIM で C, V, および Ti の分布状況を調べてみると Ti が VC 中に溶け込んでいることが明らかになった。Ti を添加すると V のみの添加に比べ

て一層、強度が増大するが、その理由のひとつが VC 炭化物が (V,Ti)C に変化し周囲の整合歪みを高めていることが推察された。

(5) TEM 像, 角度分解反射電子像を用いた粒界ナノ析出物の解析

谷山 明 (住友金属工業(株) 総合技術研究所 物性・分析研究開発部)

鉄鋼材料中に存在するナノ析出物・介在物は、粒成長の起点や転位や粒界のピンニングポイントとして作用するため、材料の機械的性質をコントロールする上で、その形態や析出領域、大きさ、組成などを把握することは重要である。これまでナノスケールサイズの構造解析には一般的に透過電子顕微鏡 (TEM) が用いられてきた。しかしながら、材料中の析出物量に不均一が生じている場合には比較的広い範囲を高倍率で観察する必要があり、3mm 径のディスクの極一部を薄片化した試料を用いて観察を行う TEM 観察では、材料の全体像を反映した結果を得られない可能性がある。したがって、材料全体の特徴を反映した結果を得るためには多数の TEM 試料を作製し観察することが必要となり、多くの時間と労力を要する場合が多い。一方走査型電子顕微鏡 (SEM) はこれまで比較的 low 倍率の観察に用いられ、ナノ析出物のような微小な観察には不適であると考えられてきたが、最近

では電界放射型の電子銃を搭載した FE-SEM が広く用いられるようになり、10 万倍以上の高倍率の観察も可能となってきた。特に、最近、極低加速電圧で観察できるものや反射電子の出射角度を自由に变化させて観察可能な装置も市販され、高倍率での極表面の形態や組成構造の観察が可能になってきている。また、SEM ではバルク材を試料として用いることができることや試料調整が比較的容易なこと、広い視野を観察できることなど利便性が高いため、粒界ナノ析出物観察に利用できれば、非常に有効な手法として活用可能であると考えられる。本講演では、SEM の利便性に着目したナノサイズ粒子の解析事例として、角度分解反射電子像を用いた鉄鋼材料中の粒界ナノ析出物観察結果を紹介し、それらの結果を TEM 観察結果と比較することで SEM 観察の有効性を議論する。

(6) EPMA を用いたヒト細胞の微小部・微量金属元素分析

副島啓義¹⁾, 渡辺孝一²⁾, 森博太郎³⁾ (1) (株) 島津総合科学研究所, (2) 新潟大学, (3) 大阪大学)

人体のある部位の細胞には代謝由来の微量金属元素が異常濃度で存在していること、また部位によっては環境由来の微粒子が存在していることが知られている。しかし、体内組織の何処にどのように蓄積し、どのような影響が生じるかについては不明な点が多い。昨今話題のアスベストやナノ粒子も、一部では以前から問題視されていたが、細胞レベルでの具体的な影響プロセスの詳細は良く分かっていない。これらの理由の一つは、細胞組織と対応した微量金属元素分析法が確立していないからである。生体組織微小部元素分析を振り返ると、マイクロ電子ビームを照射し特性 X 線を検出して微小部の元素

分析をする EPMA が実用化された 1960 年代に、金属や無機材料への応用にすぐ続いて生体への応用がはじまった。しかし硬組織 (歯や骨) や植物への応用を除いて軟組織 (タンパク質主体) への応用は続かなかった。EPMA に続いて TEM-EDS や SEM-EDS が出現し、軟組織への応用も行われたがこれも長続きしなかった。SIMS や PIXE による分析も行われているがごく一部に限られている。問題点としては、手法・装置によっても異なるが、細胞組織の観察分解能不足、ビーム照射による組織ダメージ、元素分析感度不足、元素分析空間分解能不足、臨界点乾燥や染色による元素分析の信頼性低下、などが挙

げられる。我々はEPMA技術をベースにして、人体組織と微量金属の関わり、特に細胞レベルでの関わりを明らかにするための分析技術・分析装置開発の研究を続けている。染色切片の光学顕微鏡像と対応した反射電子線像・窒素の特性X線像によるタンパク質像・微量金属元素の特性X線像を撮影している。現在、サブミクロン分解能、100ppmレベルの分析が一部で可能になってきている。

(7) 生体試料分析を目的とした顕微質量分析装置の開発

出水 秀明¹⁾, 原田 高宏¹⁾, 竹下 建悟¹⁾, 古橋 治¹⁾, 小河 潔¹⁾, 吉田 佳一¹⁾, 瀬藤 光利²⁾
(¹⁾(株)島津製作所 基盤技術研究所, ²⁾生理学研究所)

細胞や生体組織の形態観察時に、生体分子を確度の高い質量分析により同定し、きわめて高い空間分解能で分布測定を行うことが出来る、「顕微質量分析装置」の開発を行っている。

この装置では顕微鏡による形態学観察と、質量分析による生化学情報を結びつけることができ、形態変化から見つかった異常部位が物質として何で構成されているかなどを明確に知ることが可能となる。これにより基礎医学・生物学の研究だけでなく、疾患の原因解明や創薬の研究などに大きく貢献できると考えている。

この装置では壊れ易い生体分子を壊さずにイオン化して質量分析するためマトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI: Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization)法を用いる。この際にレーザーを微小集光することで空間的に限られた領域中から生体分子をイオン化し、さらに高解

参考文献 (一部)

- [1] 渡辺孝一, 小林正義: EPMAを用いた病理組織片の微量金属元素分析, 学振141委員会第102研究会資料 No.1210(2000.11.7)
- [2] H. Soejima et al: Improvement in X-ray Microanalysis of Trace Metalliferous Elements in Human Tissue and Cell, IMC16, 5Op5, 2006

像度の光学顕微鏡と高精度ステージを組み合わせることで顕微鏡レベルのイメージング分析を可能とした。また質量分析部にはイオントラップ-飛行時間型の構成を用いている。イオントラップでは、分子量だけでは特定できない分子イオンに対し、選別・分解して生成した断片の分子量から元の分子を同定する、MS/MS法を多段階でおこなうMSⁿ分析が可能である。これに飛行時間法による高精度の分子量測定と組み合わせることで確度の高い生体分子の同定が出来る。さらにイオントラップとして矩形波駆動イオントラップ型(Digital Ion Trap: DIT)を用いてデジタル回路技術による駆動波形生成により自在なイオン制御を可能にした。

本講演ではこれらの技術内容の詳細と、生体試料を用いた評価結果について報告する。

(8) 顕微質量分析による生体組織分析: 応用

瀬藤光利 (岡崎統合バイオサイエンスセンター)

ヒトを含む哺乳類中枢神経の興奮性シナプス伝達の8割はグルタミン酸作動性である。筆者はグルタミン酸受容体の動態12およびグルタミン酸小胞の輸送3と放出の機構4について新しい顕微鏡法56を開発しつつ研究してきた。今回、高分解能の顕微質量分析装置と手法、すなわち質量顕微鏡法を開発し、グルタミン酸シグナル伝達の可視化に成功したので報告する。

1. Setou, M., et al., Science 2000
2. Setou, M. et al. Nature 2002
3. Ikegami, K. et al. Proc Natl Acad Sci U S A 2007
4. Yao, I. et al. Cell 2007
5. Fukuda, Y. et al. Neurosci Lett 2006
6. Setou, M. et al. Med Mol Morphol 2006

(9) 生物電子顕微鏡の新しい展開

永山國昭 (岡崎統合バイオサイエンスセンター)

細胞生物学における各種光学顕微鏡の隆盛に引きかえ、生物電子顕微鏡はかつての輝きを失っている。解剖学、形態学自体が時代の先端に対応できないことと軌を一にしており、学問的勢いが無い。こうした学問的退潮は、構造生物学に依拠した米国、ドイツを中心とする新しい生物電顕の流れ(蛋白質の単粒子解析や細胞の低温トモグラフィ)で、様変わりしようとしている。しかし、日本の中では未だ新旧交代がうまく行っていない。本講演では、現在 CREST の枠組みで開発中の位相差電顕の可能性を提示し、これからの生物電顕の方向を考えたい。

1. 光顕電顕相関法—特に電子・光子ハイブリッド顕微鏡数年前から光顕試料を電顕で見る試みが世界的に始ま

った。その多くが Q-dot のような蛍光ラベル兼電顕ラベル素材を使うものである。しかし、光顕と電顕という両大陸を直接つなぐ方法も位相差法を用いれば考えられる。電子・光子ハイブリッド顕微鏡のアイデアと背景にある新しい発見を紹介したい。

2. 位相差 Live TEM

電子顕微鏡の最大の弱点はその *in vitro* 性(死んだまたは凍った試料のみの観測)にある。一方、細胞生物学における光顕の輝きは、その *in vivo* 性、すなわち live imaging にあった。liveこそが、従来の高分解能電顕の手の届かない所であった。この問題を解決する試みを紹介し、光顕に比べより高分解能で生物の機能に迫る電子顕微鏡法への道を提案したい。

(10) 経口投与アルミニウムの組織内蓄積の元素分析電子顕微鏡的解析

亀谷 清和¹⁾, 永田 哲士²⁾

(¹⁾ 信州大学ヒト環境科学研究支援センター・機器分析部門, (²⁾ 信州大学医学部解剖, 信州医療福祉専門学校)

分析電子顕微鏡は生物組織細胞の微細構造観察と同時に構成元素の定性・定量が行え、組織・細胞内に存在する元素の解析に有効な方法である。

我々は、通常の電顕試料(超薄切片)の10倍の1 μ m切片を用い、それを透過する高加速電圧電子顕微鏡HVTEM (high voltage transmission electron microscope)とエネルギー分散型 X 線微小部分分析装置 EDX (energy-dispersive x-ray microanalysis)により、生体内の微量金属元素を測定した。さらに、過剰蓄積した微量金属が生体に及ぼす影響と疾患の関係を解明するため、アルミニウム (Al) について検討を行った。

実験動物 (ddY マウス) に Al を経口投与し、吸収・代謝に関与する組織細胞内の Al 蓄積を HVTEM-EDX により解析した。

その結果、過剰経口投与された Al は小腸の吸収上皮細胞と肝臓の肝細胞の水解小体、肝臓内マクロファージ、腎臓の近位尿管管吸収上皮細胞の水解小体に取り込まれ

ていることを明らかにした。

脳組織についても HVTEM-EDX により Al 蓄積を検索した。しかし明確な Al 蓄積を同定することは出来なかった。脳組織の Al 蓄積量が HVTEM-EDX の検出限界より低い可能性が考えられるので、さらに元素分析の感度が高い電子エネルギー損失分光法 EELS (electron energy-loss spectroscopy) や長時間の元素分析が可能な走査透過電子顕微鏡とエネルギー分散型 X 線分析装置 STEM-EDX (HAADF-STEM high-angle annular dark-field scanning transmission electron microscopy) を用いて詳細に検討した。しかし現在のところ脳組織については明確な Al 蓄積は得られていない。

現時点における結果と今後の検討課題について報告したい。

デジタルホログラフィック顕微鏡による立体画像のリアルタイム表示と表面計測

(11) デジタルホログラフィック顕微鏡

松田 知足 ((株) オムニセンスジャパン)

ホログラフィは、光の波面のもつ位相情報を干渉によって強度に変換して媒体に記録する技術である。物理学者 Denis Gabor (1971年にノーベル物理学賞) によって1948年に理論的に導かれ、コヒーレントなレーザー光の発明により、立体像を記録できる新しい光学技術となった。物体からの光と参照光を重ね合わせてできる干渉縞に、参照光を照らすと物体の3次元的な虚像(ホログラム)が表示される。ホログラムとは Gabor が作った造語でギリシャ語のホロス(完全な)とグラム(メッセージ)の合成語である。

【顕微鏡の仕組み】ホログラムを利用して、リアルタイムで物体の3D画像を高分解能で表示する。測定対象物からの光と参照光に θ (角度)の角度を持たせてホログラムを描く(Off-Axis)ことにより1枚のホログラムから3D画像を描くことができる光学系を使用している特徴がある。画像はPCに保存され、位相と振幅信号に分けられ

る。2種の信号を再構築し、振幅強度から通常の光学顕微鏡と同じ画像を得て、位相情報には波長と同じスケールの分解能で計測用の情報が含まれる。観察対象:反射型と透過型顕微鏡の2種類の顕微鏡が作成されており、前者では不透明な試料について、0.6nmの垂直分解能で表面状態を観察し、後者では透明な試料について、厚さと屈折率による位相のずれを観察する。

【適用例】材料系・生物系のいずれにおいても、他の顕微鏡では行えなかった特徴ある観察が実現している。材料系における適用:視野が広く、10,000fpsで画像が取得できるので、例えばベルトコンベアの上の物体の表面の粗さ、ガラスの中の気泡を連続して計測することができる。生物系における適用:標本に非接触で無染色観察が可能であり照射されるレーザー光は微弱($1\mu\text{W}/\text{cm}^2$)であるため、生細胞の立体的・経時的観察に適する。

(12) デジタルホログラフィによるサブナノ変形計測技術

藤垣元治 (和歌山大学 システム工学部 光メカトロニクス学科)

1. はじめに

構造物の変形を精度よく計測する技術は、微細構造物から巨大構造物まで広い範囲で必要とされている。物体の微小な変位の分布を計測する手法として、レーザー干渉を利用する手法がある。その中でもとくに位相シフトデジタルホログラフィは、計測対象物表面が粗面であれば、とくに何の表面処理を施さずとも変位分布が計測できる。しかし、レーザーを用いることで、計測結果にスペックルパターンによるノイズが現れ、それが原因となり従来は数十ナノメートルの計測分可能しか得られなかった。そこで、窓関数を用いることによってスペックルノイズを大幅に軽減させる手法を考案し、それを用いることによってサブナノメートルの分解能で物体の変位分布を計測する技術を開発した^{[1][3]}。

2. 位相シフトデジタルホログラフィによる変形計測

位相シフトデジタルホログラフィは、CCDなどの撮像

素子面において物体から反射してきた物体光と参照光とがつくる干渉縞をホログラムとして記録し、得られた画像から光の伝播公式を用いて対象物の位置における強度分布を再生する手法である^[4]。再生された像として、対象物表面における光の強度と位相の分布が得られる。対象物が微小に変位した場合は、変形による光路長の差が位相の差として得られたため、位相の差から変位量を知ることができる^{[5][6]}。対象物への入射光に角度を持たせることで面内変位も計測することができる^[7]。

3. 窓関数を用いたスペックルノイズ除去手法

デジタルホログラムに窓関数をかけて再生すると再生像におけるスペックルの発生位置が移動する。スペックルの輝度が高いところはノイズが少ないという特徴がある。そこで、デジタルホログラムに窓関数をかけて再生して複数個の再生画像を得て、得られた複数の再生画像の同一画素のデータに対して、輝度が高いところに重

みをもたせて組み合わせることでノイズを減らす手法を開発した^{[1][3]}。この手法を片持ち梁の変位計測に適用した例を示す。分割数とは窓関数の個数のことであり、分割数を増やして行くにしたがって、ノイズが低減されている。この例の場合、当初 16.4nm あった理論値との差の標準偏差が分割数 16 の場合は 1.95nm になり、分割数を 1024 まで増やせば 1nm 以下になっているのがわかる。例は面外変形であるが、同様に面内変形のノイズ除去にも有効である。

4. ひずみ分布計測への応用

本手法はひずみ分布計測に応用することができる。構造物の機械特性評価のためには形状や変形だけでなくひずみを計測する必要がある。ひずみの分布を計測することで、物体内部の欠陥を検査することもできるようになる。ひずみの計測方法は、ひずみゲージを貼付ける手法が主流であるが、1点計測のため分布情報は得られない。また、マイクロ構造物のようにひずみゲージを貼付けることができない対象物も多い。一方、本手法のように高分解能に変位分布が得られていると、微分をしても有意なひずみ分布を得ることが可能である。本手法により対象物体の変形前後において面内変位分布を求め、そのデータに対して面内方向に微分を行うことでひずみ分布計測を行うことができる^{[8][9]}。

5. おわりに

位相シフトデジタルホログラフィを用いてサブナノメートルの分解能で変形計測を行う技術について概要を述べた。小型化することで光学実験台上でなくても利用できる振動に強い可搬型で実用的な計測装置とすることができる。本手法は、粗面であれば表面処理なしに微小変位分布やひずみ分布計測が高精度に計測できるため適用範囲が広く、今後ますます発展していくと予想している。現在、小型化や高速化、顕微鏡内で使うための手法、新しいキャリブレーション手法などの技術開発を進めているところである。

参考文献

- [1] Morimoto, Y., Matui, T., Fujigaki, M., Kawagishi, N.,
Subnanometer Displacement Measurement by

Averaging of Phase-difference in Windowed Digital Holographic Interferometry, *Optical Engineering, SPIE*, (in printing).

- [2] Morimoto, Y., Matui, T., Fujigaki, M. and Yamamoto, Y., Nano- and Pico-Meter Displacement Measurement by Phase Analysis of Fringe Patterns Obtained by Optical Method, (Keynote Lecture), *Proceedings of ISEM*, (2006).
- [3] Morimoto, Y., Matui, T., Fujigaki, M., Kawagishi, K., Accurate Displacement Measurement by Windowed Holograms in Digital Holographic Interferometry, 2005 SEM Annual Conf. and Exposition on Exp. and Applied Mechanics, #418 (CD-ROM), (2005).
- [4] Yamaguchi, I. and Zhang, T., Phase-shifting Digital Holography, *Optical Letter*, 22-16, 1268-1270 (1997).
- [5] 高橋功, 森本吉春, 野村孝徳, 米山聡, 藤垣元治, 位相シフトデジタルホログラフィを用いた面外変位計測, *実験力学*, Vol. 3, No. 2, 98-102(2003).
- [6] Morimoto, Y., Nomura, T., Fujigaki, M., Yoneyama, S. and Takahashi, I., Deformation Measurement by Phase-shifting Digital Holography, *Experimental Mechanics*, 45-1, 65-70, (2005).
- [7] 岡澤俊介, 藤垣元治, 松井徹, 森本吉春, 位相シフトデジタルホログラフィを用いた面外・面内変位同時計測, *日本実験力学会講演論文集 2005 年度年次講演会*, 108-112(2005).
- [8] 藤垣元治, 喜多俊行, 松井徹, 森本吉春, 石原照久, 北側彰一, 移動窓関数を用いた位相シフトデジタルホログラフィ干渉法によるひずみ分布計測, *日本機械学会 M&M2005 材料力学カンファレンス講演論文集*, No. 05-9, 131-132(2005).
- [9] 藤垣元治, 松井徹, 森本吉春, 北側彰一, 中谷光良, 目黒栄, 位相シフトデジタルホログラフィ干渉法を用いた可搬型ひずみ分布計測システムの開発, 第 37 回応力・ひずみ測定シンポジウム講演論文集, 143-146(2006).

(13) コンフォーカル顕微鏡における理想的励起光技術と超解像技術

伊集院 敏 (ライカマイクロシステムズ (株) リサーチクリニカル事業部)

コンフォーカル顕微鏡は現在さまざまな分野で普及しています。

特に医学・生物学の分野で利用される近年のレーザー走査型蛍光顕微鏡においては、検出波長の可変技術が発達し多重蛍光染色試料の観察がより効率良く正確に行うことが可能となってきました。

そのような中、コンフォーカル顕微鏡を更に大きく発展させる技術として期待されているのが励起波長の制約と光学顕微鏡分解能の制約からの解放です。

前者、励起波長の制約を解き放つ技術として白色光発振レーザーの実用化とその搭載のための応用技術があげられます。これにより可視光域においては1本のレーザ

ー発振装置から得られるブロードバンド光から任意に複数波長を取り出し、同時照射することが可能となりました。

そして後者、分解能の制約を解き放つ技術として開発されたのは誘導放出と呼ばれる現象を応用した誘導放出制御 (STED) 顕微鏡です。この顕微鏡では容易に従来型光学顕微鏡のおよそ2倍以上の水平分解能を得ることが可能です。

間もなく一般の研究者が従来と同様にかつ容易に利用できる、これら革新的な技術を実用化した装置を紹介いたします。

(14) 蛍光相関分光法

末永 佳代子 (カールツァイスマイクロイメージング (株) プロダクトサポートディパートメン)

蛍光相関分光法 (FCS : Fluorescence Correlation Spectroscopy) は、分子の動きや大きさの違いを、蛍光標識した分子のシグナル強度のゆらぎから解析する、単一分子計測法のひとつである。顕微鏡下で焦点面にレーザー光を集光させると、直径約 $0.3\mu\text{m}$ 、高さ約 $1.5\mu\text{m}$ ほどのごく微小な観察領域を作ることができる。これは *E.Coli* とほぼ同程度の大きさに相当し、その容量は約 $0.1\sim 1\text{fL}$ となる。1モル濃度の溶液が 1L あれば、その中にはアボガドロ数 (6.02×10^{23}) 個の分子が存在する。観察したい生体分子を蛍光標識し、その溶液を $0.1\mu\text{M}$ 以下に希釈すれば、この観察領域内にはわずか数個~数十個の蛍光分子しか存在しないことになる。この領域内を標識した蛍光分子が入り出すと、得られる蛍光強度にはゆらぎが生じる。一定時間内に測定したゆらぎから自己相関関数を求めることで、分子の数 (濃度) や拡散時間、分子の大

きなどを求めることができる。分子数の変化から分子の集合・解離の情報を、また拡散時間の変化から分子の大きさや形状の変化、あるいは溶液内の粘性の変化など、さまざまな情報を得ることができる。FCS は空間的・時間的に非常に分解能の高い手法であるといえる。

これらの測定は、溶液試料のみならず、生細胞内においても可能である。共焦点レーザー顕微鏡と FCS 装置を組み合わせて使用することで、3 次元的な細胞形態をとらえ、さらにそのなかの特定部位における分子の動きを追うことが可能となる。

本講演では、FCS の基本原理から、応用例として2分子間の相互作用を検出する蛍光相互相関分光法 (FCCS: Fluorescence Cross-Correlation Microscopy) や、FCS において検出器として使用している高感度 APD によるイメージング技術なども紹介する。

(15) アポディゼーション位相差法

大瀧 達朗 ((株) ニコン コアテクノロジーセンター 研究開発本部 光学設計部)

見えないものを観る事は顕微鏡開発の夢である。生きた細胞は無色透明な位相物体であり、通常の検鏡法ではコントラストが付かずほとんど見えない。位相差法はゼルニケにより 1930 年代に発見された位相物体を可視化する方法だが、原理的にハロと云う現象を生じる。光学顕微鏡でハロは厚い細胞の像などに光のくまどりのように現れ微細構造を見えなくする欠点となる。ハロを低減した上に微細構造を強調して可視化する方法がアポディゼーション位相差法である。その光学原理を中心に述べる。

光波が位相物体を透過する際には位相差を生じると同時に回折を生じる。ゼルニケ位相差法では位相板と呼ぶ光学フィルタにより回折光と直接光に相対的な位相差を加え、像面で干渉させて明暗のコントラストとして可視化する。コントラスト強調のために通常は直接光を減光するが、高感度を求め減光を大にするとハロも大となり生きた細胞の微細観察に不向きになる。アポディゼー

ション位相差法では、回折角が位相物体の大きさと異なる点に着目して、ハロを低減し微小物体のコントラストを選択的に高めることに成功した。光学的な構成は従来の位相板に換えてアポディゼーション位相板と名付けた光学フィルタを用いる。これは輪帯形状の位相板と、その内外周に沿った減光帯であるアポディゼーション帯で構成される。この減光帯は像の周波数フィルタとして作用し、選択された回折光の強度を弱める。減光帯の幅は選択する位相物体の大きさから求められる。アポディゼーション帯で大きな物体からの回折光を弱めると低コントラスト像になるのでハロが低減され、逆に小さな物体は回折光の大部分がアポディゼーション帯以外の開口を透過して減光されずに直接光と干渉して高コントラスト像となる。結果、生きた細胞の微細構造を高コントラスト像で観察できる。また高開口数の対物レンズを用いて高感度のアポディゼーション位相差法も開発した。

(16) 軟 X 線顕微鏡による生細胞の観察手法

有澤 孝 ((株) アライドレーザー JAEA 関西光科学研究所)

生きた細胞を観察することは通常の光学顕微鏡で行われているが、より精細に内部構造観察を行う目的では X 線顕微鏡が活用されている。また、レーザー蛍光顕微鏡は特定の蛋白質などを観察する上で便利であるが、実体構造を知るには電子顕微鏡など別の手段を用いる必要がある。X 線顕微鏡は波長、輝度、ビーム特性などから放射光がもつぱら使用されているがコンパクトでスタンドアロンで利用しやすいものが実現すれば多くの場所や分野において活用され、生物学や医療診断などで新たな知験が得られ、これにより新たな利用分野が誘起されることが期待できる。このような観点から利用しやすい顕微鏡を開発し、そのプロトタイプを実現した。本装置

は、Schwaldschild 型で波長 4nm の光を用いて細胞の骨格であるカーボンを主体とした CT 像を構築することが出来る、また、運動する細胞をレーザー光でトラップ・操作し長時間にわたって観察できるようになっている。表面に付着して培養される細胞用並びに自由に浮遊する細胞を観察できる観察セルが用意されている。さらにオプションによりレーザー励起された分子像を同軸で見ることの出来るデュアルイメージングシステムが可能である。現在幅広い分野での利用をしていただくために受託計測等を行うバイオセンターでのサービス提供を進めている。

(17) 環境制御・透過電子顕微鏡の進展と応用

竹田 精治 (大阪大学大学院 理学研究科 物理学)

TEM はさまざまな物質構造と特性を評価できる重要な観察装置だが、この特徴に加えて、物質が形成されるプロセスを原子スケールで比較的高速で観察できる唯一の計測装置でもある。従来から、TEM による結晶の照射効果の観察や結晶成長過程の観察例も多いのだが、その大半は試料を真空中において得られたものであった。最近、気体中の試料を、その場で観察できる環境制御 TEM (ETEM) が急速に普及しようとしている。

ETEM の応用分野は多い。例えば、金属ナノ粒子は、気体と反応して触媒作用を示すことがある。しかし、原子スケールでのメカニズムは未解明である。金属ナノ粒子表面における気体反応プロセスが実空間で解明できれ

ば、基礎科学のみならず実用にも多に貢献する。よって、気体が金属ナノ粒子の周りに充満した状態で観察できる ETEM は必須である。

ETEM は、電界放射型電子銃などを高真空に保ったままで、一方では試料の周囲をできるだけ高い圧力のガスで充たすという相矛盾する要求を両立させている。さらに、ETEM の像形成過程を詳しく分析すると未だ多くの困難が予想される。使いこなすには相応の技術と知識が必要である。しかし、物質科学に携わるものから見れば ETEM は極めて魅力的な装置であり、今後、さらなる普及と発展が期待できる。

(18) 隔膜型雰囲気試料室の開発

石川 晃 (日本大学 文理学部 物理学科)

生物試料などの含水試料を乾燥させることなく、自然の状態を観察するために、雰囲気試料室 (Environmental Cell ; EC) が用いられる。隔膜型 EC は、鏡筒外部と EC を結ぶガス通路を備え、観察中に水蒸気を含む任意のガスを還流させることにより試料の乾燥を防ぐもので、上下に開けられた電子線通過用の窓孔に「隔膜」を貼りつけて環境ガスの漏れを塞ぐ。EC 内にはガスだけでなく液体試薬の注入も可能で、試料の薬品との化学反応や生体試料の動的観察に必要な液層環境も設定でき、広範囲な試料環境の制御が可能である。隔膜型 EC の性能と操作性は隔膜の電子線透過性と耐圧性能に左右されるが、厚さ 20nm 以下の真空蒸着カーボン膜で 0.1MPa 以上の耐圧性を持つ隔膜を開発しており、広い環境範囲での観察と、通常の操作での試料交換が可能となっている。

ガス通路を備えた隔膜型 EC は、観察中に電頭外部か

ら環境制御できることが大きな特長であるが、ガス漏れが生じた場合の対策や試料交換時の予備排気制御のために、電頭の改造が必要となる。一方、試料環境の制御を必要とせず、単にガス環境あるいは液体環境での試料観察だけが目的なら、外部とのガス通路を無くしてガスあるいは液体を密閉するだけの密閉型 EC で十分である。0.1MPa 以上の高耐圧性の隔膜を用いれば、大気圧下で密閉して通常の操作で電頭に挿入でき、隔膜が破損してガスが漏れた場合でも、密閉されるガス量が微少なため電頭の真空を損なうことは無いので、通常の電子顕微鏡でそのまま使用できる。密閉型 EC は簡単な構造で実現でき、透過電頭用だけでなく走査電頭用にも容易に応用できるので、使用目的によっては十分な実用性を持つものと考えている。

(19) ガス雰囲気試料室による筋収縮の分子的機構の研究

杉 晴夫¹⁾, 箕田弘義²⁾, 稲吉悠里²⁾, 宮川拓也³⁾, 田野倉優³⁾, 秋元 剛⁴⁾

(1) 帝京大・医・生理, (2) 農工大・理・物理, (3) 東大・農学生命科学, (4) 三光商事)

我々は1986年以来、日大の深見 章教授らが開発した隔膜型ガス雰囲気試料室 (EC) を使用して筋収縮の分子的機構の研究を行い成果をあげている。骨格筋の収縮はアクチンフィラメントとミオシンフィラメント間の滑りによって起こるが、この滑りはミオシンフィラメントから側方に突き出たミオシン分子頭部がアクチンフィラメントと ATP の加水分解と共役した結合・変形・解離サイクルを行うことによると考えられる。しかしミオシン頭部の変形の実体は、間接的な証拠から推論されているに過ぎない。この ATP 加水分解をともなうミオシン頭部の変形 (運動) を明らかにする最も straightforward な方法は、電子顕微鏡下に生きたミオシンフィラメントに於けるミオシン頭部の運動を記録することである。我々は骨格筋から抽出したミオシン分子を重合させ、電顕観察に適した太い双極性ミオシンフィラメントを作製し、さらにミオシン頭部の位置標識として、ミオシン頭部に抗体を介し筋粒子 (直径 20nm) を付着させた。このミオシ

ンフィラメント試料は EC の炭素隔膜上で位置を変えることはない。試料の電子線損傷を防止するため、電顕観察倍率 1 万倍以下とし total incident electron dose が $10^{-5}\text{C}/\text{cm}^2$ 以下の条件で実験を行った。試料像はイメージングプレート (画素数千二百万) に記録した (シャッター速度 0.1s)。主な結果は以下のようである。(1) ミオシン頭部の位置は時間とともに変化せず一定である。(2) ATP を電気泳動的に試料に与えると、ミオシン頭部が 7-8nm フィラメントの長軸にそって運動する。ミオシンフィラメントの中央部 (bare region) の両側でフィラメントの極性は互いに逆であることを反映し、ATP によりミオシン頭部は bare region から遠ざかる方向に運動する。我々の実験系にはアクチンフィラメントが存在しないので、このミオシン頭部の運動は、ミオシン頭部がアクチンフィラメント結合しこれを動かすパワーストロークに先行する”準備ストローク“と考えられる。

21. 筋・骨格系と内臓の痛み研究会

2007年12月6日-12月7日

代表・世話人：水村 和枝 (名古屋大学環境医学研究所)

所内対応者：富永 真琴 (生理学研究所・岡崎統合バイオサイエンスセンター)

- (1) 成体とは全く異なる発達期特異的な温度感受性 TRP チャンネルの役割
柴崎貢志^{1,2,3}, 村山奈美枝³, 富永真琴^{1,2,3}
(¹岡崎統合バイオサイエンスセンター, ²生理学研究所, ³総合研究大学院大学)
- (2) TRPA1 のアルカリによる活性化機構
藤田郁尚^{1,2,3}, 内田邦敏^{1,2,4}, 森山朋子⁵, 柴崎貢志^{1,2,4}, 稲田仁^{1,2}, 富永真琴^{1,2,4}
(¹岡崎統合バイオサイエンスセンター・細胞生理, ²生理学研究所, ³株式会社マングラム,
⁴総合研究大学院大学・生理科学, ⁵弘前大学・脳科学研究所)
- (3) 後根神経節ニューロンにおける二つのタイプの持続型 Na 電流の生理機能
緒方宣邦, 松富智哉, 鄭泰星, 柿村順一, 中本千泉
(広島大学大学院・医歯薬学総合研究科・神経生理学)
- (4) 抗腫瘍薬による脊髄後根神経節細胞からのサブスタンス P 遊離
宮野加奈子, 唐 和斌, 森岡徳光, 井上敦子, 仲田義啓
(広島大学大学院・医歯薬学総合研究科・薬効解析科学)
- (5) 麻酔ラットにおける神経性炎症の部位差-関連痛研究の可能性を考えて
小山なつ (滋賀医科大学生理学講座統合生理学)
- (6) 痛み刺激による脊髄の機能画像
上野雄文^{1,2,3}, 牛田享宏^{2,4}, 池本竜則², 谷口慎一郎², 村田和子², 森尾一夫², Sean Mackey³, 谷俊一²
(¹九州大学大学院医学研究院精神病態医学分野, ²高知大学医学部,
³Stanford 大学医学部, ⁴愛知医科大学・学際的痛みセンター)
- (7) ホスホリパーゼ A₂ 活性化を介したラット脊髄膠様質ニューロンの GABA とグリシンによる
抑制性シナプス伝達の促進
熊本栄一, 柳 涛, 藤田亜美, 岳 海源, 水田恒太郎, 中塚映政
(佐賀大学医学部生体構造機能学講座・神経生理学分野)
- (8) 過酸化水素が脊髄後角膠様質細胞の神経伝達に与える影響
高橋亜矢子, 井浦 晃, 眞下 節 (大阪大学大学院医学系研究科酔・集中医学講座)
- (9) PACAP シグナル伝達を介した nNOS の機能調節の分子機構
大西隆之, 芦高恵美子, 松村伸治, 伊藤誠二 (関西医科大学・医学部・医化学教室)
- (10) ギブス固定慢性痛症モデルにおける痛みの出現と脊髄グリア細胞の変化
大道美香^{1,2,5}, 大道裕介^{1,2,5}, 大石仁², 櫻井博紀^{1,3,5}, 森本温子^{1,5}, 吉本隆彦^{1,3,5},
橋本辰幸¹, 江口国博^{1,4}, 牛田享宏⁵, 山口佳子¹, 熊澤孝朗^{1,5}
(¹愛知医科大学医学部痛み学講座, ²愛知医科大学医学部解剖学講座, ³愛知医科大学医学部生理学
第二講座, ⁴愛知学院大学歯学部生理学講座, ⁵愛知医科大学学際的痛みセンター)
- (11) 炎症性咬筋痛覚過敏に対する抗炎症性サイトカインとグリア阻害薬の影響
清水康平, 岩田幸一 (日本大学歯学部生理学教室)
Ronald Dubner, Ke Ren (Dept. of Biomed. Sci., Dental Sch., & Prog. in Neurosci., Univ. of Maryland)

- (12) IFN- γ によるミクログリアの活性化と神経因性疼痛
増田隆博, 津田 誠, 井上和秀 (九州大学大学院薬学研究院薬理学分野)
- (13) 慢性疼痛治療標的としてのグリア型グルタミン酸トランスポーターGLT-1 に関する研究
中川貴之, 前田早苗, 河本 愛, 金子周司 (京都大学薬学研究所生体機能解析学分野)
- (14) 遅発性筋痛 (DOMS) における COX-2 および NGF の関与について
妹尾詩織, 片野坂公明, 水村和枝 (名古屋大学環境医学研究所神経系分野 II)
- (15) 筋痛動物モデルにおけるイオンチャネルの関与
藤井優子, 尾崎紀之, 杉浦康夫 (名古屋大学大学院医学系研究科機能形態学講座機能組織学分野)
- (16) 腰部筋に起因する侵害受容の神経解剖学的, および電気生理学的研究
田口 徹^{1,2}, ウルリッヒ・ホヘイセル¹, 水村和枝², ジークフリート・メンゼ¹
(¹ハイデルベルグ大学, 解剖・細胞生物学 III, ²名古屋大学環境医学研究所神経系分野 II)
- (17) 腰部圧迫痛み刺激による疼痛関連脳活動について -functional MRI を用いた研究-
小林義尊, 倉田二郎, 佐々木信幸, 国分美加, 赤石沢孝, 関口美穂, 紺野慎一, 菊地臣一
(福島県立医科大学整形外科, 帝京大学麻酔科, 南東北病院放射線科)
- (18) 機械的侵害刺激による脳の活動部位の研究
柴田政彦¹, 前田 倫², 小山哲男³, 大城宜哲⁴, 中田まゆ², 住谷昌彦⁵, 真下 節⁵
(¹大阪大学大学院医学系研究科疼痛医学講座, ²市立西宮中央病院麻酔科, ³西宮協立脳神経外科リハビリテーション部, ⁴Neurobiology and Anatomy Wake Forest University School of Medicine, ⁵大阪大学大学院医学系研究科麻酔・集中治療医学講座)
- (19) GPR103 のリガンドである QRFP26 髄腔内投与の効果
山本達郎 (熊本大学大学院医学薬学研究部生体機能制御学)
- (20) オピオイドによるカエル坐骨神経の活動電位抑制とその化学構造との関連
水田恒太郎¹, 藤田亜美¹, 香月 亮^{1,2}, 小杉寿文^{1,3}, 中塚映政¹, 熊本栄一¹
(¹佐賀大学医学部生体構造機能学講座・神経生理学分野, ²独立行政法人国立病院機構嬉野医療センター麻酔科, ³済生会日田病院麻酔科)
- (21) mono-iodoacetate 誘発関節炎モデルラットの痛み行動に対する温灸刺激の影響
瓜生典子, 林 聖子, 渡部正司, 岡田 薫, 川喜田健司 (明治鍼灸大学生理学教室)
- (22) 痛みによる不快情動生成における腹側分界条床核内 protein kinase A 活性化の役割
出山諭司^{1,2}, 片山貴博¹, 中川貴之², 金子周司², 山口 拓³, 吉岡充弘³, 南 雅文¹
(¹北海道大院・薬・薬理, ²京都大院・薬・生体機能解析, ³北海道大院・医・神経薬理)
- 教育講演 (1) 内臓痛メカニズムの解析法
尾崎紀之, 杉浦康夫 (名古屋大学大学院医学系研究科機能形態学講座機能組織学分野)
- 特別講演 (1) 内臓痛の病態生理
福土 審 (東北大学大学院医学系研究科行動医学)
- 特別講演 (2) 排尿反射における痛みの寛容
河谷正仁 (秋田大学医学部生理学第二講座)

【参加者名】

南 雅文 (北海道大・薬), 河谷正仁 (秋田大・医), 福土 審 (東北大・医), 矢吹省司, 関口美穂, 小林義尊, 佐々木信幸, 小林 洋 (福島県立医大), 小川明子, 清水康平 (日本大・歯), 倉田二郎 (帝京大・医), 水村和枝,

佐藤 純, 片野坂公明, 田口 徹, 舟久保 恵美, 妹尾詩織, 松田 輝, 那須輝顕, 友利公彦, 太田大樹 (名古屋大・環医研), 尾崎紀之, 藤井優子, 堀 紀代美, 安井正佐也, 井上貴行 (名古屋大・医), 田辺 光男, 山本昇平

(名古屋市立大・薬), 肥田朋子, 城 由起子, 下 和弘, 伊東佑太 (名古屋学院大), 熊澤 孝朗, 櫻井博紀, 橋本辰幸, 大道裕介, 吉本隆彦, 森本温子, 大道美香, 山口佳子 (愛知医大痛み学), 牛田 享宏 (愛知医大国際的痛みセンター), 松原貴子 (日本福祉大), 富永真琴, 柴崎貢志, 稲田 仁, 曾我部隆彰, 兼子佳子, 内田邦敏, 望月 勉, 周 一鳴, 藤田郁尚, 柿木隆介, 長友克宏, 竹内雄一, 大鶴直史 (生理研), 小山なつ (滋賀医大), 中川貴之 (京大・薬), 川喜田健司, 瓜生典子, 渡部正司, 林 聖子, 久保 恵梨香 (明治鍼灸大), 真下 節, 高橋

垂矢子, 柴田 政彦 (大阪大・医), 伊藤誠二, 大西隆之 (関西医大), 前田 倫 (西宮中央病院), 緒方宣邦, 仲田義啓, 宮野加奈子 (広島大・医歯薬), 上野雄文 (九州大・医), 増田隆博, 久保山和哉 (九州大・薬), 熊本栄一, 水田恒太郎 (佐賀大・医), 山本達郎 (熊本大・医), 笠井聖仙 (鹿児島大・理), 林 宏樹 (武田薬品工業(株)), 森江俊哉, 峯 幸子, 志水勇夫 (大日本住友製薬(株)), 神代敏郎 (日本ケミファ(株)), 松下雄一郎 (小野薬品工業(株)), 谷口嘉奈, 渡辺修造, 新庄勝浩 (ファイザー(株))

【概要】

痛みの中でも, 筋・骨格系の痛みと内臓の痛みは頻度が非常に高く, 臨床医学的な重要性が高い。皮膚表面痛とは異なった特徴, 例えばストレスの影響が大, 脊髄への入力系として皮膚よりも強力, 他部位への放散, 自律神経系への強い影響, などがあり, 異なる神経機構も示唆されるにもかかわらず, その実験的研究は国内外ともに極めて少なく, 疼痛研究領域のなかでも特に遅れている。そこで, 本研究会では筋・骨格系及び内臓の慢性痛の発生・維持のメカニズムについての研究を促進するため, この研究者ばかりでなく, 神経因性疼痛, 炎症痛研究者など, 幅広い痛み研究者の参加を要請して, 分子基盤を軸に領域横断的に研究成果を交流しあい, 意見・情報交換を行うことを目的とした。22 題の一般発表があり, イオンチャネル・トランスジューサー・末梢神経に関する演題 5 題, 脊髄における情報伝達機構に関して 4 題, 疼痛状態における脊髄グリアの役割に関する演題 4

題が発表された。筋・骨格系における痛み (5 題) については遅発性筋痛モデルや腰痛モデルにおける神経・解剖学的研究結果が報告されるとともに, 筋圧迫時の活動脳部位の fMRI による解析も報告され, 筋性疼痛に関する研究も進展しつつあることが実感された。痛みによる情動の機構や鎮痛機構の演題も計 4 題報告された。また, 内臓痛実験方法についての教育講演, 過敏性腸症候群と膀胱からの痛みについての特別講演は, ある臓器についての痛み刺激が必ずしも侵害刺激ではないこと, 迷走神経と交感神経による二重支配と両者の疼痛における役割の違い, 収縮要素の介在という問題, ストレスが影響するメカニズムなど, 内臓痛における種々の問題点が非常にクリアになった。いままで行われてきた皮膚表面痛との違いは参加者に強いインパクトを与え, その研究の必要性も参加者に広く認識される結果となった。

(1) 成体とは全く異なる発達期特異的な温度感受性 TRP チャネルの役割

柴崎貢志^{1,2,3}, 村山奈美枝³, 富永真琴^{1,2,3}

(¹岡崎統合バイオサイエンスセンター, ²生理学研究所, ³総合研究大学院大学)

温度感受性 Transient Receptor Potential (TRP) チャネルは, 成体の後根神経節 (DRG) 神経細胞の軸索終末において, 痛み・温度受容に関わることが報告されている。しかしながら, 発達期のどの段階でそれら温度感受性 TRP チャネル発現が開始するのかに関しては研究されていなかった。これまでに, 発達期に発現するイオンチャネルや受容体は, 成体における役割とは全く異なる発達

期特異的な役割を有することが報告されてきた。そのため, 温度感受性 TRP チャネルも, 発現時期, 発現場所により今までに報告されてきた機能以外にまったく未知の発達期特異的な生理機能を有している可能性が非常に高いと考えられた。しかも, 発達過程においては侵害刺激温度センサーとして働くための熱・冷刺激が存在しないために, 未知のリガンドが存在することも考察された。

そこで、発達期の DRG・脊髄領域の温度感受性 TRP チャンネルの発現様式を詳細に解析し、胎生マウス DRG・運動神経において、TRPV1, TRPV2, TRPA1, TRPM8 チャンネルがそれぞれ全く異なる時期に発現を開始することを見いだした。また、細胞分裂、アポトーシス、細胞移動、軸索伸展と発達期に特異的な現象にこれらのチャ

ネルが関与しているのかを検証し、今までに報告されていない温度感受性 TRP チャンネルの発達期特異的な役割を明らかとした。今発表では、温度センサーの機能が発達期と成体でダイナミックに変化する点を考察し、胎児期に発現する温度感受性 TRP チャンネルの生理的重要性を述べたい。

(2) TRPA1 のアルカリによる活性化機構

藤田郁尚^{1,2,3}, 内田邦敏^{1,2,4}, 森山朋子⁵, 柴崎貢志^{1,2,4}, 稲田仁^{1,2}, 富永真琴^{1,2,4}
 (1岡崎統合バイオサイエンスセンター・細胞生理, 2生理学研究所, 3株式会社マンダム,
 4総合研究大学院大学・生理科学, 5弘前大学・脳科学研究所)

近年、痛みの知覚メカニズムの一部に温度感受性 TRP チャンネルが関与していることが明らかになってきた。その中でも TRPA1 は低温(約 17°C)で活性化する冷感受容体として報告されたものであるが、ワサビやカラシの主成分であるイソチオシアン酸アリルや、ニンニクの主成分であるアリシンなどの受容体として痛み刺激の受容に強く関わっていることが最近明らかになりつつある。また、痛みの受容メカニズムについても、アミノ末端のシステインがある種のリガンドによって共有結合修飾されることにより活性化されることが報告され、徐々に明らかになりつつある。我々は、TRPA1 が痛み刺激を受容する分子センサーである新たな証拠を見出した。

生命は非常に狭い pH 領域にて生存しており、それらの狭い領域から逸脱した場合のための、生理学的な感知及び防御機能が生命には備わっている。酸性側の痛み

については、最近の研究によって、TRPV1 や ASIC などの特定のイオンチャンネルによって感知されることが明らかになっている。しかし、アルカリ側の痛みの感知については、アンモニアなどによる痛みに関する報告はあるものの、受容メカニズムは見つかっていない。そこで、我々はアルカリが TRPA1 を活性化するものであることを Ca イメージング法、パッチクランプ法を用いて見出した。さらに、アンモニウムイオンの作用によって、細胞内 pH を上昇させる効果がある塩化アンモニウムを用いて、細胞内 pH がアルカリ化することで TRPA1 は活性化することを見出した。また、アルカリによる TRPA1 の活性化は TRPA1 のブロッカーであるルテニウムレッドおよびカンファーによって抑制された。以上の結果から、アルカリの痛みの感知は TRPA1 を介して伝達されることが強く示唆された。

(3) 後根神経節ニューロンにおける二つのタイプの持続型 Na 電流の生理機能

緒方宣邦, 松富智哉, 鄭泰星, 柿村順一, 中本千泉
 (広島大学大学院・医歯薬学総合研究科・神経生理学)

後根神経節ニューロンにおいては、他の神経部位では見られない二つのタイプの持続型 Na 電流が観察される。一つは小型無髄ニューロンで観察され、Na_v1.9 によって引き起こされるものである。もう一つは、大型有髄ニューロンで観察され、恐らく Na_v1.6 によるものである。Tetrodotoxin (TTX) に対して、前者は抵抗性 (Resistant)

であり、後者は感受性 (Sensitive) であるため、それぞれ TTX-R 持続型 Na 電流、TTX-S 持続型 Na 電流とよぶ。今回は、これら知覚神経に特異的な持続型 Na 電流の生理学的役割について、これまでの研究をまとめ、報告する。

TTX-R 持続型 Na 電流は、生理的な細胞内環境では、小型無髄ニューロンにおける活動電位の発生・伝搬を背

景的に調整している。また、この Na 電流は細胞内 ATP 濃度の減少により著しくその活性が増大する ATP-感受性 Na 電流であり、この性質は非常時に対処する機能として働いていると想像されるが、神経損傷時には、一転して、神経の病的可塑的变化を引き起こす一つの原因となると考えられる。

TTX-S 持続型 Na 電流は、TTX-R 持続型 Na 電流を含め他の Na 電流には見られない以下のような特徴的なカインेटクスをもっている。1) 浅い静止膜電位では容易

に不活性化されるが、短時間の脱分極に対しては不活性化し難い、2) 活性化時定数が小さく、その電位依存性が小さい、3) 一旦活性化されると不活性化され難く、細胞の興奮性に大きな影響を及ぼす。これらの性質は、この電流が有髄神経のランビエー絞輪において、活動電位発生の安全率を高めるのに極めて効果的であり、大型有髄神経におけるインパルススの発生・伝導の効率や特異性を高めていると考えられる。

(4) 抗腫瘍薬による脊髄後根神経節細胞からのサブスタンス P 遊離

宮野加奈子, 唐 和斌, 森岡徳光, 井上敦子, 仲田義啓
(広島大学大学院・医歯薬学総合研究科・薬効解析科学)

【目的】パクリタキセル (paclitaxel ; PTX) およびビノレルビン(vinorelbine ; VRB)は、乳癌および非小細胞性肺癌などに用いられる代表的な抗腫瘍薬である。これらの薬剤は、抗腫瘍活性を示すだけでなく、痛覚過敏などの痛覚異常を引き起こすことが知られている。一方、サブスタンス P(SP) は、痛みの伝達物質として知られている神経ペプチドで、近年、痛覚過敏などの神経因性疼痛にも重要な役割を果たしていることが明らかにされつつある。しかしながら、これらの抗腫瘍薬が誘発する痛覚異常と SP 遊離の関係は不明である。そこで、本研究では、PTX および VRB による脊髄後根神経節細胞(DRG 細胞)からの SP 遊離およびその放出機構を検討した。

【方法】DRG 細胞は、Wistar 系成熟ラットより DRG を単離し、酵素分散培養法により作製した。SP はラジオイムノアッセイにより測定し、細胞内 $[Ca^{2+}]_i$ は Fura2 蛍光法

により測定した。

【結果】DRG 細胞において、PTX および VRB 処置により SP が濃度・時間依存的に遊離された。PTX および VRB による SP 遊離は、細胞外 Ca^{2+} 除去および電位依存性 Ca^{2+} チャンネルブロッカーである La^{3+} 存在下により完全に抑制された。また、cPKC・nPKC 阻害薬 bisindolylmaleimide I および cPKC 阻害薬 Gö6976 によっても有意に抑制された。さらに、DRG 細胞において、PTX および VRB は細胞内 $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させ、この反応は細胞外 Ca^{2+} 除去および Gö6976 により抑制された。

【考察】本研究により、PTX および VRB は DRG 細胞の cPKC 活性化および電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを介した細胞外からの Ca^{2+} 流入を介して SP を遊離させることが示唆された。

(5) 麻酔ラットにおける神経性炎症の部位差—関連痛研究の可能性を考えて

小山なつ (滋賀医科大学生理学講座統合生理学)

筋肉や内臓が傷害される時に、患部から離れた部位に関連痛が生じることがある。関連痛のメカニズムには、中枢説および末梢説の諸説があり、現在最も受け入れられている中枢説は、Ruch の収束投射説であろう。末梢説の Sinclair の軸索反射説は、内臓を支配する求心性神経

が皮膚にも枝分かれしているために、内臓に生じた傷害時に、皮膚に軸索反射性の神経性炎症が生じ、関連痛が生じるという可能性である。関連痛における軸索反射の関与を検討するために、体表面のあらゆる部位で同様に、軸索反射が生じる可能性を検討しようとした。

ネンブタール麻酔ラットの皮膚温をサーモグラフィで解析すると、体幹部有毛部の皮膚温は、足趾部無毛部の皮膚温よりも高かった。足趾にメリチン（ハチ毒主要成分）を皮下投与すると、体幹部と同程度まで皮膚温が徐々に上昇した。皮膚温上昇は注入部付近から始まり、足趾全体に上昇領域が広がった。しかし体幹部にメリチンを皮下投与しても、局所皮膚温の上昇はみられなかった。レーザースペックル法を使った血流計で血流量の2次元分布を解析すると、側腹部に血流量の高い部位があるものの、足趾の血流量よりも低い領域が、体幹部を占

めていた。しかし皮膚を切開して展開すると、体幹部の皮下血流量は足趾の皮膚血流量よりも高かった。足趾へのメリチン注入により、注入直後から著しい血流上昇が生じたが、上昇領域は足趾全体には広がらなかった。体幹部への投与後の血流上昇は顕著ではなかった。今後手技の問題点、無毛部と有毛部におけるC線維の分布の違い、交感神経が関わる血管収縮反応を検討することによって、軸索反射による神経性炎症が麻酔ラットのあらゆる部位で生じるか否かを評価したい。

(6) 痛み刺激による脊髄の機能画像

上野雄文^{1,2,3}, 牛田享宏^{2,4}, 池本竜則², 谷口慎一郎², 村田和子², 森尾一夫², Sean Mackey³, 谷俊一²

(¹九州大学大学院医学研究院精神病態医学分野 ²高知大学医学部

³Stanford 大学医学部, ⁴愛知医科大学・学際的痛みセンター)

温度刺激による痛みの脊髄における機能画像化を試みた。MEDOC 社による温度の刺激装置を用いて GE3T の MRI スキャナーの中で3種類（低, 中, 高）の刺激を行い、その信号の変化を見た。画像は spiral sequence を用いて撮像した。温度刺激に対して C5, C6 付近の脊髄に賦活と思われる領域を認めた。この BOLD (Blood Oxygen Level Dependent Signal) の反応がどのような機構で起こっているかは分からないが、温度の変化で、賦活の広さ、および BOLD の信号の変化も見られ興味深い。一般線形モデルでの賦活領域の探索では VAS (visual

analogue scale) を用いて検定を行ったものではより一般的に理解しやすい結果となっており、BOLD の自覚的な痛み感覚に関する一致は Gate Control という側面から考えても興味のある結果である。EPI (Echo Planar Imaging) での撮像は困難を極め、画像が Magnetic Distortion のために捉えられなかった。これは EPI での動きに対する雑音の発生の影響のためかもしくは脊髄が気道と隣接しており、空気による Magnetic Distortion の影響のためと考えられる。今後の検討を必要とするものと考えられる。

(7) ホスホリパーゼ A₂活性化を介したラット脊髄膠様質ニューロンの GABA とグリシンによる抑制性シナプス伝達の促進

熊本栄一, 柳 涛, 藤田亜美, 岳 海源, 水田恒太郎, 中塚映政

(佐賀大学医学部生体構造機能学講座・神経生理学分野)

痛み伝達制御に重要な役割を果たす脊髄後角第 II 層 (膠様質)ニューロンの興奮性や抑制性のシナプス伝達はホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) 活性化により促進されることを我々は以前明らかにしている。今回、痛み伝達制御における PLA₂ の役割を更に明らかにするために、PLA₂ 活性化ペプチドであるメリチンによる GABA とグリシン

による抑制性シナプス伝達の促進作用の違いを調べた。実験は、成熟雄性ラットから作製した脊髄横断スライス標本の膠様質ニューロンにブラインド・ホールセル・パッチクランプ法を適用して行った。Na⁺チャネル阻害剤テトロドトキシン(0.5 μM), グルタミン酸受容体阻害剤の CNQX (10 μM) と APV (50 μM), 細胞外の無 Ca²⁺, α₁

アドレナリン受容体阻害剤 WB-4101 (0.5 μ M), マスカリン性とニコチン性のアセチルコリン受容体阻害剤であるアトロピン (1 μ M) とメカミラミン (20 μ M), の各々は、メリチンによる GABA 作動性シナプス伝達の促進を抑制した。一方、これらの条件下でメリチンによるグリシン作動性シナプス伝達の促進は有意に影響を受けなかった。以上の結果は、メリチンはグリシン作動性のシナプス伝達を直接促進するが、メリチンによる GABA 作動性シナプス伝達の促進は興奮性シナプス伝達の促進と活動

電位発生を介するものであり、 α_1 アドレナリン受容体、マスカリン受容体およびニコチン受容体の活性化が関与することを示している。前回、メリチンによるグリシン作動性シナプス伝達の促進にリボキシゲナーゼ代謝物が関与することを指摘したが、今回の実験結果から、この代謝物の作用は細胞外から細胞内への Ca^{2+} 流入を必要としないことが明らかになった。以上より、PLA₂ 活性化はグリシンと GABA を介する抑制性シナプス伝達を異なった経路で促進すると結論される。

(8) 過酸化水素が脊髄後角膠様質細胞の神経伝達に与える影響

高橋亜矢子, 井浦 晃, 眞下 節 (大阪大学大学院医学系研究科酔・集中医学講座)

脊髄侵害受容伝達経路におけるシナプスの可塑性が、脊髄損傷後の痛みの悪化メカニズムに深く関与していることがこれまでの研究で明らかにされている。また、過酸化水素 (H_2O_2) は、主としてミトコンドリアで産生される内因性の活性酸素で、脊髄損傷後にその産生が増加すること、さらに大脳においてシナプスの可塑性に影響を及ぼすことが報告されている。脊髄後角膠様質 (SG) 細胞は侵害受容伝達経路の中継核として重要な役割を持っている。そこで、本研究では SG 細胞のシナプス伝達に及ぼす H_2O_2 の影響を、電気生理学手法を用いて検討した。

【方法】 3-5 週齢のマウスの腰部脊髄スライスを作成し、顕微鏡下に SG 細胞をパッチクランプした。テトロドト

キシンを灌流液 (ACSF) に加え 0mV に電位固定し、微小抑制性後シナプス電流 (mIPSC) を記録した。 H_2O_2 を ACSF に溶解し灌流投与し、mIPSC の頻度、振幅、減衰時間に対する影響を調べた。

【結果】 H_2O_2 は濃度依存的 (100 μ M-1mM) に、また可逆的に mIPSC の頻度を有意に増加した。薬理学的実験にて種々のブロッカーを投与した結果、シナプス前細胞の小胞体からの IP_3 受容体を介するカルシウムの放出が、 H_2O_2 による mIPSC の頻度増加のメカニズムに関与することが明らかになった。さらにノックアウトマウスを用いた結果、 IP_3 受容体のタイプ 1 アイソフォームがこのメカニズムに関与すると考えられた。

(9) PACAP シグナル伝達を介した nNOS の機能調節の分子機構

大西隆之, 芦高恵美子, 松村伸治, 伊藤誠二 (関西医科大学・医学部・医化学教室)

NMDA 受容体を介した Ca^{2+} の流入による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇によって活性化される酵素の 1 つに神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) がある。神経系株細胞である PC12 細胞において nNOS は主に細胞質に存在するが、神経ペプチドである PACAP と NMDA の共刺激下により、nNOS は細胞膜にトランスロケーションすることで NO 産生が促進され、この nNOS のトランスロケーションには PACAP シグナル伝達経路が重要であることを明らか

になっている。nNOS は N 末端に存在する PDZ ドメインと catalytic ドメインから構成され、nNOS は PDZ ドメインを介して PSD-95 や NMDA 受容体の NR2B サブユニットと相互作用することで nNOS のトランスロケーションが起こると予想している。我々は nNOS の N 末端に存在する PDZ ドメインを含む 1-299aa の nNOS 欠変異体 (nNOS NT) と YFP との融合タンパク (nNOS NT-YFP) を作製し、PC12 細胞において細胞膜への nNOS NT-YFP の

トランスロケーションを定量的に測定する系を構築した。PACAPは少なくともPKAとPKCのこの2つのシグナル系に関与することが明らかになっている。今回nNOSの細胞膜へのトランスロケーションには薬理的な実験からPKAとPKCの両方の経路が必要であることを示唆する結果が得られた。PDZドメインはmain body

とb-fingerから構成されている。nNOSの細胞膜へのトランスロケーションに重要な部位を決定するために更に5つの欠失変異体を作製し、これらの変異体が細胞膜へのトランスロケーションするのかを調べた。その結果、b-fingerを欠く変異体のみで細胞膜へのトランスロケーションが観察されなかった。

(10) ギプス固定慢性痛症モデルにおける痛みの出現と脊髄グリア細胞の変化

大道美香^{1,2,5}, 大道裕介^{1,2,5}, 大石仁², 櫻井博紀^{1,3,5}, 森本温子^{1,5}, 吉本隆彦^{1,3,5},
橋本辰幸¹, 江口国博^{1,4}, 牛田享宏⁵, 山口佳子¹, 熊澤孝朗^{1,5}

(¹愛知医科大学医学部痛み学講座, ²愛知医科大学医学部解剖学講座, ³愛知医科大学医学部生理学第二講座, ⁴愛知学院大学歯学部生理学講座, ⁵愛知医科大学学際痛みセンター)

我々は運動器障害性の慢性痛症のメカニズム解明のため、2週間の片側下肢不動化（ギプス固定）による慢性痛症モデルラットを開発し、これまでに報告してきた。今回、本実験モデルの痛みの出現において脊髄の可塑的変容機序の一つとして考えられているグリア細胞の変化に着目し、行動実験および免疫組織化学（OX42, GFAP）を用いて検討を行った。固定部局所より離れた足底部の痛み行動が出現するギプス除去後1日目では、第4腰椎後角にミクログリアの活性化を示す所見が同側優位に確認された。さらに痛み行動が足底部で極大を示し、尾部にまで拡大を示すギプス除去後6日目においては、第4

腰椎後角においてアストロサイトの活性化を示す所見が両側において認められ、ミクログリアの活性化が減弱を示していた。さらに尾髄ではミクログリアの活性化を示す所見が確認され、グリア細胞活性化の空間的広がりが示唆された。すべての痛み行動が減弱を示すギプス除去後13週目では、これまでに活性化を示していた両グリア細胞の所見は減弱傾向を示した。以上により本実験モデルにおける痛み行動および脊髄グリア細胞の空間的・時間的変化に関連性を認めた。このことから本実験モデルの痛み行動出現および維持には脊髄の可塑的変容におけるグリア細胞の関与の可能性が示唆されると考える。

(11) 炎症性咬筋痛覚過敏に対する抗炎症性サイトカインとグリア阻害薬の影響

清水康平, 岩田幸一（日本大学歯学部生理学教室）

Ronald Dubner, Ke Ren (Dept. of Biomed. Sci., Dental Sch., & Prog. in Neurosci., Univ. of Maryland)

これまでの研究で、三叉神経脊髄路核の中間亜核/尾側亜核移行部 (Vi/Vc) および三叉神経脊髄路核尾側亜核 (Vc) は、口腔顎顔面領域に発症する深部痛あるいは表在痛発症に関して重要な役割を担っていることが報告されている。本研究では、抗炎症性サイトカインの1つであるinterleukin(IL)-10, グリア阻害剤であるfluorocitrateあるいはminocyclineをこれら二領域にそれぞれ微量注入し、口腔顔面痛に対する影響を系統的に比較検討した。SD系ラットの片側咬筋あるいはそれを覆う皮内にCFA

を注入し、深部炎症痛モデルあるいは表在炎症痛モデルを作製し、CFA誘導性痛覚過敏に対する機械的逃避閾値をvon Frey filamentsをもちいて計測した。CFAを片側咬筋に注入すると、顎顔面領域咬筋相当部に両側性に痛覚過敏を誘導する。一方、咬筋を覆う片側皮内に注入すると、注入側相当部に同側有意に痛覚過敏を誘導した。痛覚過敏により誘導される閾値の低下は注入30分後より始まり24時間後にピークを示し、約14日後まで持続した。IL-10 (0.006-1 ng), fluorocitrate (1 μg), あるいは

minocycline (0.1-1 µg) を Vi/Vc 腹側部に微量注入すると、片側咬筋に注入した場合に誘導される痛覚過敏は両側に有意に減少したが、片側皮内注入による痛覚過敏に対する影響は認められなかった。同薬剤を Vc に注入すると、咬筋内あるいは皮内への CFA 注入により誘導性される同側性痛覚過敏は有意に減少されたが、咬筋内 CFA 誘

導性の対側痛覚過敏には影響が認められなかった。以上より、Vi/Vc 移行部は口腔顔面深部痛に選択的に関与していること、また、中枢におけるサイトカインカスケードやグリア活性の阻害は炎症性疼痛に対して鎮痛作用を引き起こす可能性が示された。

(12) IFN- γ によるミクログリアの活性化と神経因性疼痛

増田隆博, 津田 誠, 井上和秀 (九州大学大学院薬学研究院薬理学分野)

激的な痛みを呈する神経因性疼痛は、近年その発症メカニズムの解明に向けて数多くの研究がなされているが未だ不明な点が多い。我々は、神経損傷後の脊髄後角において、ミクログリアが活性化状態 (増殖, 肥大化など) となり、ミクログリアに過剰発現した P2X₄ 受容体などの分子を介して放出された因子により神経の異常興奮を引き起こされていることを明らかにしてきた。しかし、ミクログリアがどのように活性化状態へとシフトするのかという点は依然謎である。本研究では、末梢神経損傷後に損傷側脊髄内で発現量の増加が報告されているインターフェロン γ (IFN- γ) に着目し、脊髄内ミクログリアの活性化への関与について検討した。IFN- γ を脊髄くも膜下腔内に投与することにより、用量依存かつ持続的な

アロディニアが発現し、それと同時にミクログリアの活性化が観察された。これらの変化は minocycline の投与によりほぼ完全に抑制された。さらに、神経因性疼痛における役割を解析するため、IFN- γ 受容体欠損マウスを用いて検討した。神経損傷後に野生型マウスで見られるアロディニアおよび脊髄後角内でのミクログリアの活性化は、IFN- γ 受容体欠損により著明に抑制された。また、IFN- γ を初代培養ミクログリアに処置したところ、濃度依存的なミクログリアの増殖が認められた。以上の結果より、IFN- γ 受容体を介する IFN- γ のシグナルが神経損傷後に誘発するミクログリアの活性化と神経因性疼痛に重要な役割を有していることが示唆された。

(13) 慢性疼痛治療標的としてのグリア型グルタミン酸トランスポーターGLT-1に関する研究

中川貴之, 前田早苗, 河本 愛, 金子周司 (京都大学薬学研究科生体機能解析学分野)

脊髄内のグルタミン酸は、痛覚情報伝達物質としてだけでなく、慢性疼痛の基盤となる中枢感作にも関与しており、グルタミン酸受容体は重要な創薬標的とされてきた。しかしながら、NMDA 受容体拮抗薬ケタミンが鎮痛補助薬として用いられているが、精神作用等の副作用も多く、満足のいくものは未だ得られていない。一方、グルタミン酸トランスポーターのうち、特にアストロサイトに存在する GLT-1 は、その発現量が他の膜蛋白質と比較して圧倒的に多く、またアストロサイトはグルタミン酸代謝酵素を特異的に有しているため、細胞外グルタミン酸除去の大部分を担っているとされている。そこで

本研究では、ラットおよびマウスを用いて、モルヒネ鎮痛耐性および慢性疼痛発症への脊髄内 GLT-1 の関与について検討した。その結果、GLT-1 活性化作用を有する MS-153, あるいは GLT-1 発現を特異的に増加させる β ラクタム系抗生剤セフトリアキソンをモルヒネと併用あるいは前処置することにより、モルヒネ反復投与による鎮痛耐性の形成は有意に減弱された。さらに、炎症性疼痛モデルや神経因性疼痛モデル動物の脊髄において、GLT-1 発現量が減少しており、組換えアデノウイルスベクターによる脊髄内への GLT-1 遺伝子導入により、慢性疼痛の発症が緩解されることを見出した。これらの結果

から、我々は、GLT-1が慢性疼痛治療標的として有望であると考えている。

(14) 遅発性筋痛 (DOMS) における COX-2 および NGF の関与について

妹尾詩織, 片野坂公明, 水村和枝 (名古屋大学環境医学研究所神経系分野 II)

当研究室ではこれまでに、伸張性収縮 (LC) 負荷前に選択的 COX-2 inhibitor である celecoxib や zaltoprofen を経口投与すると、LC 後に生じる筋機械痛覚過敏 (遅発性筋痛, DOMS) の発現が抑制されることを明らかにしている。また人における最近の研究で、NGF の筋注が持続する圧痛を発現させることが報告されている。そこで本研究では、LC 負荷後の筋における COX-2 および NGF の筋肉内発現を調べた。また、抗 NGF 抗体の筋注が DOMS の発現を抑制するか調べた。

雄性 SD ラット長指伸筋に LC を負荷し、DOMS モデルを作成した。ラットの長指伸筋を LC 負荷前、負荷直後、3、6、12 時間後、1、2、3 および 5 日後に取り出し、RT-PCR により COX-2 および NGF mRNA 発現変化を、また Western blotting により COX-2 タンパク発現変化を調べた。その結果 LC 負荷側の筋において、COX-2 mRNA およびタンパクの発現は負荷直後から 12 時間後まで有

意に増加し、DOMS が発現する 1 日後には LC 負荷前値に戻っていた。COX-2 inhibitor を LC 負荷前に投与した場合は DOMS の発現を抑制したが、2 日後に投与した場合は効果がなかったという過去の研究結果を考え合わせると、COX-2 は DOMS 発現の引き金を引いていると考えられる。一方、NGF mRNA の発現は LC 負荷側において 12 時間後から 2 日後まで増加し、3 日目には LC 負荷前値に戻った。これは報告されている DOMS 発現の時期と重なっていた。さらに NGF が DOMS を引き起こしているかどうかを調べるために、LC 負荷 6 時間後のラットの長指伸筋に抗 NGF 抗体を投与し、筋圧痛閾値の変化を調べた。抗 NGF 抗体投与群では LC による圧痛閾値の低下が LC 負荷後 1 日目から有意に抑制された。これらの結果から運動筋由来の NGF が LC 後の筋機械痛覚過敏を引き起こしている可能性が示唆された。

(15) 筋痛動物モデルにおけるイオンチャネルの関与

藤井優子, 尾崎紀之, 杉浦康夫 (名古屋大学大学院医学系研究科機能形態学講座機能組織学分野)

筋痛の分子メカニズムを解明する為、筋痛動物モデルを作製し、筋の知覚神経におけるイオンチャネルの発現を調べた。SD ラットの腓腹筋 (GM) に、4%カラゲニンを投与 (CI) あるいは伸長性収縮 (ECC) を行った。GM の圧痛閾値を Randall-Selitto テストで、GM 表面の皮膚の痛覚を von Frey テストを用いて計測した。筋の知覚神経細胞体における、ASIC3, TRPV1, TRPV2, P2X₃ の発現を免疫組織染色で調べた。これらのイオンチャネルに対するアンタゴニスト [ASIC3: Amiloride (AM), TRPV1: Capsazepine (CA), TRPV1,2: Ruthenium Red (RR)] を投与し、GM の圧痛閾値の変化を計測した。CI 群では、投与

後 6~24 時間で、ECC 群では、ECC 後 1~3 日目にかけて、GM の圧痛閾値が低下し、痛覚過敏が見られた。両群とも GM 表面の皮膚の痛覚に有意な差はなかった。両群とも筋の知覚神経におけるイオンチャネルの発現に変化はなかったが、AM および RR の投与により、CI 群では部分的に、ECC 群では完全に閾値が回復した。CA 投与では ECC 群でのみ閾値が回復した。CI は急性、ECC は遅発性筋痛のモデルとして有用と思われた。また、CI では ASIC3 および TRP チャネルが、ECC では ASIC3 と TRPV1 を含む TRP チャネルが、筋の痛覚過敏に関与していることが示唆された。

(16) 腰部筋に起因する侵害受容の神経解剖学的, および電気生理学的研究

田口 徹^{1,2}, ウルリッヒ・ホヘイセル¹, 水村和枝², ジークフリート・メンゼ¹

(¹ハイデルベルグ大学, 解剖・細胞生物学 III, ²名古屋大学環境医学研究所神経系分野 II)

腰痛は臨床的に極めて重要であるが, その神経機構はよくわかっていない。本研究では腰部筋に起因する痛みの神経解剖学的研究, および腰部に受容野をもつ脊髄後角ニューロンの電気生理学的記録を体系的に行い, 以下の所見を得た。神経解剖学的研究では, 1) 神経トレーサー (True blue) をラット多裂筋 (L5 椎体レベル) に投与して, 標識される後根神経節 (DRG) 細胞の腰部髄節レベルを調べた結果, 標識された DRG 細胞は L3 をピークに分布した。すなわち, L3 DRG に細胞体をもつ多裂筋を支配する求心性神経は L5 椎体レベルに主として分布することがわかった。2) 多裂筋 (L4/5 椎体レベル) に 5% フォルマリンで痛みを惹起し, 脊髄後角に発現する c-Fos 陽性細胞の分布を調べた。その分布は Th12~L5 髄節の後角表層最外側部にみられ, 多裂筋からの痛み伝達経路は脊髄内で頭尾方向に広く分布しているが, 一方で

は, その経路が脊髄内で整然と構築されていることがわかった。3) 5% フォルマリンで惹起した多裂筋からの痛みの上脊髄投射を, 視床外側と腹側外側中脳中心灰白質において調べた。その結果, 後者は腰部筋からの侵害受容に重要な中枢神経部位であることがわかった。電気生理学的な記録では, 1) 腰部に受容野をもつ脊髄後角ニューロン (以下, LB ニューロン) は non-LB ニューロンに比べ, 自发放電を示す割合と放電頻度が有意に高かった。2) LB ニューロンの大部分は収束入力をもち, その受容野の中心が位置する椎体レベルは, 記録脊髄分節より常に 2~3 分節尾側に位置していた。3) 多裂筋への神経成長因子の前投与や完全フロイントアジュバントによる慢性炎症により, LB ニューロンは機械刺激に対して顕著に感作されることがわかった。以上の所見は, 腰痛の神経機構を理解する上で重要であると考えられる。

(17) 腰部圧迫痛み刺激による疼痛関連脳活動について —functional MRI を用いた研究—

小林義尊, 倉田二郎, 佐々木信幸, 国分美加, 赤石沢孝, 関口美穂, 紺野慎一, 菊地臣一

(福島県立医科大学整形外科, 帝京大学麻酔科, 南東北病院放射線科)

【目的】近年, functional magnetic resonance image を用いた研究が注目されている。体性感覚の脳賦活部位は多く報告されているが, 腰痛に特異的な脳賦活部位はほとんど分かっていない。我々は, 腰部圧迫刺激を加えることにより腰痛を生じるモデルを用い, 腰痛に関連する脳活動について検討した。

【対象と方法】慢性腰痛患者 7 人と正常ボランティア 5 人を対象とした。MRI は, 3.0 テスラ高速 MRI スキャナーを使用した。腹臥位とし, 第 4, 5 腰椎椎間で正中から 5cm 左外側を圧迫刺激した。圧迫装置は, 注射用 20ml シリンジを用いた。撮像前に, 圧迫刺激の程度を visual analogue scale (VAS) 3 と 5 の痛み刺激に設定した。圧迫刺激時間は 30 秒間, 安静期 30 秒とし, その間に高速エコープランナー法による脳の T2 強調 MRI スキャンを行

い blood-oxygenation-level dependent signal を 3 回繰り返して捉えた。撮像時の刺激に対する痛みと不快感を VAS で記録した。解析ソフトウェア Brain voyager を用いて解析した。

【結果】慢性腰痛患者では VAS3 と 5 の疼痛域値は 30% ($p<0.05$) 小さく, 不快感はより大きな値を示した ($p<0.01$)。脳賦活は, 主に右半球の前頭皮質, 島皮質, 補足運動野, 運動前野, また腹側後帯状皮質や前帯状皮質で認められ, 正常ボランティアと比較して増大していた。

【考察】慢性腰痛患者では, 腰部圧迫痛み刺激に対しより高い不快感を示し, 痛みに関連する脳皮質の賦活が増大している。また, 腹側後帯状皮質の賦活は我々の腰部圧迫刺激モデルに特有で, 更なる検討が必要である。

(18) 機械的侵害刺激による脳の活動部位の研究

柴田政彦¹, 前田 倫², 小山哲男³, 大城宜哲⁴, 中田まゆ², 住谷昌彦⁵, 真下 節⁵
 (¹大阪大学大学院医学系研究科疼痛医学講座, ²市立西宮中央病院麻酔科, ³西宮協立脳神経外科
 リハビリテーション部, ⁴Neurobiology and Anatomy Wake Forest University School of Medicine,
⁵大阪大学大学院医学系研究科麻酔・集中治療医学講座)

【目的】ヒトの痛みの認知機構の脳機能画像による研究が進んでいる。多くの研究の痛み刺激は熱であり臨床上最も多い機械的刺激による研究は少ない。当研究では、下腿の骨膜・筋への圧刺激で被験者に痛みを与え、脳の活動部位を fMRI で調べた。

【対象】正常成人 12 名 (男性 7, 女性 5)

【方法】デジタル式圧痛計にて、右脛骨前面 (骨膜痛) と、内側約 3cm の腓腹筋 (筋痛) に圧刺激を加えた。疼痛は、NRS で 3 (痛みと認識できる最低の刺激) と 8 (20 秒間の刺激で体動なく我慢できる最大の痛み) の痛みを与える刺激強度を実験直前に測定し、5 回計測の中間 3 回の平均値を疼痛刺激とした。これら 4 種類の刺激を 20 秒間、

40 秒の間隔をあけてそれぞれ 3 回与えるのを 1 タスクとした。この 1 回 3 分のタスクをランダムに、1 分の間隔をあけて 12 回 (4 種類 X3 回) 繰り返し、各回の痛みを NRS (11 段階) で評価した。各タスク中 fMRI で測定し、SPM99 を用いて解析した。

【結果】骨膜痛では左側の視床、前障に、筋痛では右側の被殻、視床、左側の帯状回 (Broadman24 野)、両側の Broadman 40 野で認められた。強い筋痛・骨膜痛では NRS に有意差を認めなかったが、機能画像では両側の尾状核、右側の被殻、前帯状回に脳活動の差が認められた。

【考察】筋痛は骨膜痛と比べると、辺縁系に関与し、感覚だけでなく情動に関与している可能性が示唆された。

(19) GPR103 のリガンドである QRFP26 髄腔内投与の効果

山本達郎 (熊本大学大学院医学薬学研究部生体機能制御学)

GPR103 (SP9155, AQ27 と呼ばれる) は、orexin 受容体, neuropeptide FF 受容体, cholecystokinin 受容体に類似の orphan GPCR である。近年、GPR103 の内因性作動物質として QRFP26, QRFP43 が報告された。ラット脊髄での検討では、脊髄後角の浅層で GPR103 mRNA の強い発現が見られ、しかも QRFP26 が脊髄浅層に結合していることが示されている。従って、GPR103-QRFP26 system が侵害刺激伝達を調節する役割があることが想定される。今回の研究では、QRFP26 をラット髄腔内投与し、炎症性疼痛モデルであるホルマリンテストとカラゲニンモデルを用いて鎮痛効果を検討したので報告する。

髄腔内投与のため、腰膨大部にカテーテルを挿入した。ホルマリンテストは 5%ホルマリン 50 μ l をラット後

肢に皮下注することにより作製した。カラゲニンモデルは、ラット後肢にカラゲニン 2mg を皮下注して作製した。QRFP26 髄腔内投与により、ホルマリンテストでは 0.01~10 μ g の範囲で、またカラゲニンテストでは 0.1~10 μ g の範囲で、投与量依存性の鎮痛効果を示した。GRFP26 を 10 μ g 腹腔内投与しても鎮痛効果は得られなかった。QRFP26 の鎮痛効果はナロキソンにより拮抗されることもなかった。

今回の結果から、QRFP26 を髄腔内投与すると脊髄を介した鎮痛効果が得られ、その効果は GPR103 を介していることが示唆され、GPR103-QRFP26 system が侵害刺激伝達を調節している可能性が示された。

(20) オピオイドによるカエル坐骨神経の活動電位抑制とその化学構造との関連

水田恒太郎¹, 藤田亜美¹, 香月 亮^{1,2}, 小杉寿文^{1,3}, 中塚映政¹, 熊本栄一¹

(¹佐賀大学医学部生体構造機能学講座・神経生理学分野, ²独立行政法人国立病院機構 嬉野医療センター麻酔科, ³済生会日田病院麻酔科)

オピオイドは、その受容体活性化を介して1次感覚ニューロンの中枢端では脊髄後角ニューロンへのグルタミン酸放出を抑制し、また、末梢端では活動電位発生を抑制して鎮痛に働くことはよく知られている。一方、神経線維に対するオピオイドの作用について、活動電位の伝導を抑えることは古くから知られているが、この作用にオピオイド受容体が関与するかどうかは不明である。我々は、以前、非麻薬性オピオイドであるトラマドールとその代謝物モノ-O-デメチル-トラマドールがオピオイド受容体の活性化とは無関係に神経線維の活動電位を抑制し、その作用にはこれらのベンゼン環の置換基である-OHと-OCH₃の違いが重要であることを明らかにした。これを更に検討するために、カエル坐骨神経に air gap 法

を適用して、化学構造の異なる一連のオピオイド(モルヒネ、コデイン、エチルモルヒネ、ジヒドロコデイン)が複合活動電位(CAP)に及ぼす作用を調べた。いずれのオピオイドも非選択的オピオイド受容体阻害剤ナロキソンに非感受性にCAPの振幅を減少させ、その効果はエチルモルヒネ(IC₅₀=4.6 mM)、コデイン、ジヒドロコデイン、モルヒネの順に小さくなった。エチルモルヒネ、コデイン、モルヒネのCAP抑制作用とそれらの化学構造の違いを比較した結果、オピオイドのベンゼン環の置換基が大きくなるほどCAPの抑制作用が強いことが明らかになった。以上より、オピオイドによる神経伝導遮断にはオピオイド受容体の活性化は無関係である一方、その化学構造の違いが重要であることが示唆された。

(21) mono-iodoacetate 誘発関節炎モデルラットの痛み行動に対する温灸刺激の影響

瓜生典子, 林 聖子, 渡部正司, 岡田 薫, 川喜田健司(明治鍼灸大学生理学教室)

【目的】変形性関節症(osteoarthritis: OA)の痛みに対する灸刺激の鎮痛効果を検討するために、モノヨード酢酸(mono-iodoacetate: MIA)誘発関節炎モデルラットに対する温灸刺激の影響を検討した。

【方法】Wistar系雄性ラット(n=20, 296-421g)を用い、Pentobarbital麻酔下でMIA溶液(90mg/ml, 生理食塩水)50μlを片側の膝関節内に注入して関節炎を誘発した。関節炎ラットは灸刺激群(n=14)と無刺激群(n=17)に分け、灸刺激群は誘発した翌日から隔日で4週間、誘発側の膝関節外側部に温灸1壮を行った。無処置群は灸刺激の際に使用する布製のホルダーに5分間の拘束のみとした。痛み行動は後肢の荷重の左右差を指標に、誘発3日前から誘発後7日間と14, 21, 28日目の灸刺激前に測定を行った。一部のラットでは、灸治療前後の荷重変化や薬物投与についても検討を行った。

【結果】無刺激群ではベースラインに対して誘発後1日目

から28日目まで誘発側の有意な荷重減少が認められた。一方、灸刺激群では荷重減少の早期回復が観察されたが、どの時点でも灸刺激前後の荷重に変化はみられなかった。また誘発側の荷重がほぼベースラインまで回復した灸刺激群ラットに対してナロキソン(3mg/kg i.p.)を投与すると、荷重はふたたび減少する傾向がみられた。モルヒネ投与(5mg/kg i.p.)では、誘発側の荷重減少は回復した。

【考察および結語】今回の実験では、灸刺激による急性鎮痛が起こっていないにも関わらず時間経過と共に後肢の荷重が徐々に回復した。さらにその効果はナロキソンで拮抗されたことから、作用機序には内因性鎮痛物質の関与が示唆された。これは従来の鍼灸刺激によって誘発される急性のオピオイド鎮痛とは異なる機序の存在を示唆するものであった。

(22) 痛みによる不快情動生成における腹側分界条床核内 protein kinase A 活性化の役割

出山諭司^{1,2}, 片山貴博¹, 中川貴之², 金子周司², 山口 拓³, 吉岡充弘³, 南 雅文¹
 (1北海道大院・薬・薬理, 2京都大院・薬・生体機能解析, 3北海道大院・医・神経薬理)

「痛み」は感覚的成分と情動的成分よりなるが、情動的成分を担う物質的基盤に関する研究は未だ緒についたばかりである。我々はこれまでに腹側分界条床核 (vBST) におけるβアドレナリン受容体を介したノルアドレナリン神経情報伝達亢進が、痛みによる不快情動生成に重要であることを示唆する結果を報告している。そこで本研究では、β受容体を介した細胞内情報伝達の下流に位置する protein kinase A (PKA) の活性化が、痛みによる不快情動生成に関与するか否かについて検討した。実験には雄性 SD 系ラットを用い、条件付け場所嫌悪性 (CPA) 試験により不快情動の評価を行った。β受容体作動薬

isoproterenol の vBST 内投与による条件付けを行った結果、用量依存的に CPA が惹起された。この CPA は PKA 阻害薬 Rp-cAMPS の vBST 内同時投与により消失した。次に、ホルマリン後肢足底内投与により惹起される CPA および侵害受容行動に対する vBST 内 Rp-cAMPS 投与の効果について検討した。その結果、ホルマリン投与 10 分前に vBST 内に Rp-cAMPS を投与することにより、ホルマリン誘発 CPA は用量依存的に減弱されたが、侵害受容行動は影響を受けなかった。以上の結果から、侵害刺激による vBST 内 PKA 活性化が痛みによる不快情動生成に重要な役割を担っていることが示唆された。

教育講演 (1) 内臓痛メカニズムの解析法

尾崎紀之, 杉浦康夫 (名古屋大学大学院医学系研究科機能形態学講座機能組織学分野)

【目的】内臓の痛みは、疾患に伴って頻度が高く臨床的に重要であるが、対象が深部にありアプローチが難しく適切な動物モデルが無かったこともあり、メカニズムの解明は遅れている。本発表では内臓痛のメカニズムを解析する方法を概説しながら、それを応用して実験的胃潰瘍や機能性胃腸症の動物モデルにおける痛覚過敏のメカニズムを解析した結果を報告する。

【材料と方法】胃の痛みを定量化するためにラットの胃をバルーン伸展したときの行動を筋電図の変化として記録した。胃の知覚神経の活動を調べるため、迷走神経、大内臓神経より単一神経記録、Na⁺チャンネルの記録を行った。胃における神経線維の分布、胃や知覚神経におけるメディエーターの発現を免疫組織学的に調べた。また実験的胃潰瘍やストレスによる胃の痛覚の変化を調べ、各

種拮抗薬や中和抗体の効果を行動薬理学的に調べた。

【結果】バルーン伸展による筋電図の変化はバルーンの圧に伴って増大した。単一神経記録より、胃の知覚神経は炎症性メディエーターや、神経成長因子 (NGF) で感作されることがわかった。胃潰瘍では胃の痛覚過敏が見られ、潰瘍の組織には NGF が発現し、潰瘍周辺部で神経線維が増加した。NGF の中和抗体は、胃潰瘍における痛覚過敏を抑えた。またストレスにより胃の痛覚は亢進し、CRF (副腎皮質刺激ホルモン放出因子) や ASIC (酸感受性イオンチャンネル) の拮抗薬で抑制された。

【結論】胃潰瘍における胃の痛覚過敏の発現には NGF が重要な役割を果たしていると考えられる。また機能性胃腸症への CRF や ASIC の関与が示唆された。

特別講演 (1) 内臓痛の病態生理

福土 審 (東北大学大学院医学系研究科行動医学)

内臓痛は、限られた特殊な問題と捉えられて来た。しかし、過敏性腸症候群 (irritable bowel syndrome: IBS) の病態生理に関する研究を契機として、その普遍性と重要性は日に日に高まっている。IBS は、腹痛もしくはその軽度の感覚である腹部不快感が一定期間持続し、それが便秘異常 (下痢もしくは便秘) に関連しているという機能性消化管障害である。われわれは、代表的な心身症でもある IBS の病態生理を追求することにより、身体 (内臓) 感覚から情動形成に至る脳内過程の正常像と異常像を抽出できると考えて来た。大腸にパロスタットバッグを挿入し、伸展刺激を加え、同時に H²¹⁵O を静注した時の positron emission tomography (PET) にて局所脳血流量 (rCBF) を測定すると、視床、前帯状回、前頭前野の活性化が認められる。この時、同時に内臓感覚と不快情動が惹起される。健常者と IBS 患者には rCBF の賦活化様式に差が認められる。IBS の治療法として有効性が証明されている催眠により、内臓刺激下の前頭前野と前帯状回機能に変化し、内臓知覚も修飾される。また、

corticotropin-releasing hormone (CRH) 拮抗薬は IBS 患者の大腸運動、腹痛、不安を改善し、CRH-R1 拮抗薬は IBS モデルラットに同様の効果をもたらす。健常者と IBS 患者の双方において、CRH 拮抗薬は辺縁系と前頭前野の賦活状態を修飾した。IBS には消化管由来信号の脳内処理過程の異常が存在し、少なくともその一部に CRH の関与が示唆される。内臓知覚、特に内臓痛は、重大な疾患を示唆する警告症状として多くの内科疾患患者の受診動機になるだけでなく、その quality of life の低下、臨床検査に際しての苦痛の要因となる。また、疼痛制御の上でも、慢性で原因を特定することが困難な腹痛を除去し、また、癌性の腹痛を便秘異常を起こさずに除去することは、必ずしも容易ではない。内臓痛の形成機序が明らかにされれば、これら全ての問題を解決できる可能性があり、その意味でも、内臓知覚は普遍性の高い医学的問題である。IBS で見出された現象の脳科学と疼痛の生理学における普遍性が注目される。

特別講演 (2) 排尿反射における痛みの寛容

河谷正仁 (秋田大学医学部生理学第二講座)

【背景および目的】膀胱は、排尿を誘発する仙骨副交感神経と、排尿を調整し蓄尿を促進する腰椎交感神経の支配を受ける。最近、尿路上皮細胞がニューロンに類似した特性 (神経伝達物質を分泌したり受容体を持つ) をもつことから、膀胱感覚神経系を調節すると思われる尿路上皮細胞の機能が予測された。この研究では、ラット膀胱の尿路上皮での 1D アドレナリン受容体の発現と、下部尿路機能制御におけるこの受容体の生理的役割を調べた。

【方法】Wistar 系雌ラットの全膀胱組織および尿路上皮細胞層の抽出物を用いて、ウエスタンブロット法と免疫組織染色により、尿路上皮および全膀胱組織の 1D 受容体の発現を評価した。受容体活性化の作用は、意識のある動物を用いた膀胱内持続灌流によっておこる膀胱内圧測定、膀胱における ATP 放出および膀胱求心性神経の神経

放電記録により検討した。1D 受容体拮抗薬のナフトピジル (0.75~1.66mg/kg) は外頸静脈内に投与した。酢酸の膀胱内投与により急性膀胱炎症モデルを作製した。

【結果】ナフトピジルの静注は、膀胱求心性神経活性、および膀胱拡張に誘発される ATP の膀胱内腔への放出を抑制し、膀胱内持続灌流によっておこる膀胱収縮間隔を延長した。ナフトピジルは、膀胱拡張によって生じる膀胱求心性神経活性と尿中 ATP 量を抑制した。さらに、酢酸による膀胱内投与により生じる膀胱収縮の短縮、求心性神経放電の増強を酢酸投与前の状態に抑制した。

【結論】この結果は、正常状態または病的状態では、血中または神経から放出されたカテコールアミンによる尿路上皮の 1D 受容体の持続的な活性化が、蓄尿時の膀胱の感覚神経性機序に関与する可能性を示唆した。

22. 体温調節, 温度受容研究会

2007年9月26日-9月27日

代表・世話人：永島 計（早稲田大学人間科学学術院）

所内対応者：富永 真琴（細胞生理）

- (1) ショウジョウバエ温度感受性 TRP チャネルの生理機能
曾我部隆彰（岡崎統合バイオサイエンスセンター）
- (2) 小麦の monoacylglycerol は TRPV1 を活性化する
岩崎有作（静岡県立大学大学院 生活健康科学研究科食品栄養科学専攻）
- (3) TRPA1 アゴニストの allyl isothiocyanate と cinnamaldehyde のアドレナリン分泌促進効果
田辺学（静岡県立大学大学院 生活健康科学研究科食品栄養科学専攻）
- (4) 食品による体温調節作用～温度受容 TRP チャネルのリガンドによる検討～
正本有紀子（京都大学大学院 農学研究科 食品生物科学専攻栄養化学分野）
- (5) 暑熱暴露によるラット前視床下部の神経細胞新生の可能性について
松崎健太郎（島根大学 医学部）
- (6) 脱同調パラダイムによるヒト生物時計の構造解析
山仲勇二郎（北海道大学大学院 医学研究科）
- (7) 絶食による休眠時の体温調節反応
時澤健（早稲田大学 人間科学学術院）
- (8) Effects of Ethanol on Temperature Regulation
Larry Crawshaw (Portland State University)
- (9) メスラットにおける視床下部へのエストロゲン投与が体温調節に与える影響
内田有希（早稲田大学 人間科学研究科）
- (10) 体温調節性求心路と遠心路
中村和弘 (Oregon Health & Science University)
- (11) 遺伝的高温耐性適応
古山富士弥（名古屋市立大学大学院 医学研究科）
- (12) AMP によるマウスの芯温低下
安田周平（京都大学情報学研究科知能情報学専攻）
- (13) 終板器官周囲部での GABA 作動性伝達の抑制と PGE2 発熱
大坂寿雅（国立健康・栄養研究所）
- (14) アラキドン酸による脳血管内皮シクロオキシゲナーゼ 2 の誘導機構
松村潔（大阪工業大学 情報科学部）
- (15) 生体信号を用いた温冷感計測
仲山加奈子（株式会社東芝）
- (16) 暑熱環境下における起立性ストレス負荷時の皮膚血流量調節
芝崎学（奈良女子大学 生活環境学部）
- (17) ヒト褐色脂肪：FDG-PET による同定・機能評価と寒冷刺激の影響
斉藤昌之（天使大学大学院 看護栄養学研究科）
- (18) 温熱的感覚の部位差
中村真由美（早稲田大学 スポーツ科学研究科）

【参加者名】

富永 真琴(岡崎統合バイオサイエンスセンター), 福見知子(岡崎統合バイオサイエンスセンター), 柴崎 貢志(岡崎統合バイオサイエンスセンター), 曾我部 隆彰(岡崎統合バイオサイエンスセンター), 望月 勉(岡崎統合バイオサイエンスセンター), 島 麻子(岡崎統合バイオサイエンスセンター), 内田 邦敏(岡崎統合バイオサイエンスセンター), 斉藤 昌之(天使大学大学院看護栄養学研究科), 水口 暢章(早稲田大学スポーツ科学研究科修士課程), 中村 真由美(早稲田大学スポーツ科学研究科修士課程), 松村 潔(大阪工業大学情報科学部), 兼久 智和(日本たばこ産業株式会社), 前川 竜也(日本たばこ産業株式会社), 古山 富士弥(名古屋市立大学大学院医学研究科, 脳神経生理学), 大坂 寿雅(国立健康・栄養研究所), 紫藤 治(島根大学医学部生理学(環境生理学)), 松崎 健太郎(島根大学医学部生理学(環境生理学)), 渡邊 達生(鳥取大学医学部統合生理), 仲山 加奈子(株式会社東芝), 宇野 忠(山梨県環境科学研究所・生気象学研究室), 中村 和弘(Oregon Health & Science University), 中村 佳子(Oregon Health & Science University), 小林 茂夫(京都大学情報学研究科知能情報学専攻), 細川 浩(京都大学情報学研究科知能情報学専攻), 田地野 浩二(京都大学情報学研究科知能情報学専攻), 安田 周平(京都大学情報学研究科知能情報学専攻), 芝崎 学(奈良女子大学生活環境学部), 山下 均(中部

大学 生命健康科学部 生命医科学科), 楠堂 達也(中部大学 生命健康科学部 生命医科学科), 山仲 勇二郎(北海道大学大学院医学研究科時間生理学分野), 川端 二功(京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻), 正本有紀子(京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻), 森村 あかね(京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻), 時澤 健(早稲田大学人間科学学術院), 岩崎 有作(静岡県立大学大学院生活健康科学研究科食品栄養科学専攻), 渡辺 達夫(静岡県立大学食品栄養科学部), 田辺 学(静岡県立大学大学院生活健康科学研究科食品栄養科学専攻), 内田 有希(早稲田大学人間科学研究科修士課程), 上條 義一郎(信州大学大学院医学研究科・スポーツ医科学分野), 狩野 真清(早稲田大学人間科学研究科修士課程), 安原 祥(早稲田大学人間科学研究科修士課程), Larry Crawshaw (Portland State University), 橋本 公男(サンスター株式会社), 八木 章(江崎グリコ株式会社), 松山 佳世(江崎グリコ株式会社), 辻田 隆一(旭化成ファーマ), 齊藤 武比斗(ダイキン工業), 中井 定(中京女子大学), 志内 哲也(生理学研究所 生殖内分泌), 箕越 靖彦(生理学研究所 生殖内分泌), 檜山 武史(基礎生物学研究所 統合神経), 岡本 士毅(生理学研究所 生殖内分泌), 張 藍帆(基礎生物学研究所 統合神経), 戸田 知得(生理学研究所 生殖内分泌), 永島 計(早稲田大学人間科学学術院)

【概要】

平成19年9月26~27日にわたり研究会が行われた。今回で3回目になる研究会は体温をテーマに分子, 神経, 心理生理学に至るまで様々な分野の研究者が集まり, 研究発表, 情報交換, 議論, 新たな研究テーマの模索を行っている。

今回のテーマは大きく, TRPを中心とした体表の温度受容の分子機構の基礎的研究, およびその生理作用; 暑熱, 絶食, 性周期など外部環境, 内部環境の変化に体する体温調節反応の変化およびその神経機構; 低体温, 発熱などの病態生理学的な応答の神経機構; 人での温度感覚, 暑熱下での循環応答にわけられ, 各々の項目についてセッションをもうけた。概略は下記の通りである。

TRPについてはショウジョウバエをもちいた温度感受性チャンネルの基礎研究の発表を岡崎バイオサイエンスセンターの曾我部(以下敬称略)が行い, 次いで静岡県

立大, 岩崎, 田辺が食品科学の観点から TRPV1 アゴニスト, A1 アゴニストの生理作用について解説した。また京大, 正本はいくつかの食品成分から TRP チャンネルのリガントとなる物質を提示し, その体温への作用を示した。

北大, 山仲は運動と体温, 生物時計の関係を示し, 早大, 時澤は摂食条件が体温リズムに与える影響を示した。早大, 内田は女性ホルモンと体温の関係を示した。ポートランド大クローショーはアルコールの体温に対する作用を示した。島根大, 紫藤ら, 名古屋市大, 古山は暑熱順化時の神経細胞新生, FOK ラットの遺伝学的解析についてそれぞれ示した。オレゴン健康科学大, 中村は暑熱暴露時の体温調節に関する神経機構について発表した。

京大, 安田は AMP がもたらす低体温について示し, 栄養研, 大坂, 大阪工大, 松村は, 発熱の神経機構, 生

化学的な機構について発表をおこなった。東芝、仲山は温度感覚に関わる生体信号についての発表を行い、早大、中村は人の温度感覚の地域差について示した。奈良女、

芝崎は運動後の起立性低血圧の原因を皮膚血管の調節の観点から示し、天使大、斉藤は成人の褐色脂肪の存在について発表した。

(1) ショウジョウバエ温度感受性 TRP チャネルの生理機能

曾我部隆彰¹，門脇辰彦²，富永真琴¹

(¹岡崎統合バイオサイエンスセンター 細胞生理，²名古屋大学 生命農学研究科)

最近、ショウジョウバエにおいて、侵害熱刺激応答に必要な因子として Painless が同定された。Painless は、TRP チャネルの A サブファミリーに分類されており、哺乳類およびハエの TRPA1 が温度感受性 TRP チャネルであることから、Painless もその一員と考えられているが、現在までに直接的な証拠は示されていない。そこで、我々は Painless の熱刺激応答性について、Ca²⁺イメージング法とパッチクランプ法により検討した。

熱刺激によって、Painless 発現細胞内の Ca²⁺濃度は顕著に上昇し、細胞外 Ca²⁺をキレートすると見られなくなった。パッチクランプ法においても、熱刺激依存的な活

性化電流が生じ、活性化温度閾値は約 44 度であった。また、非常に高い Ca²⁺透過性を示し、実際、熱活性化電流は細胞内外に Ca²⁺が存在しない状態ではほとんど見られなかった。しかしながら、細胞内に Ca²⁺を加えると、細胞外に Ca²⁺が無くても大きな電流を生じた。細胞内 Ca²⁺が存在する場合の活性化温度閾値は約 42 度で、これまでの報告に近い値となった。また、活性化電流を生じるための細胞内 Ca²⁺濃度の EC₅₀ は約 100 nM であった。これらの結果から、Painless は生理的濃度の細胞内 Ca²⁺存在下で機能的な熱感受性 TRP チャネルであることが示された。

(2) 小麦の monoacylglycerol は TRPV1 を活性化する

岩崎有作¹，斉藤織音²，田辺学³，古旗賢二¹，守田昭仁¹，渡辺達夫¹

(¹静岡県立大院・生活健康，グローバル COE プログラム，

²静岡県立大・食品栄養，³静岡県立大院・生活健康)

トウガラシの辛味成分 capsaicin (CAP) は、感覚神経に発現する Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) の活性化を起点とし、体熱産生を亢進させる。本研究では、TRPV1 を活性化させる食品成分の中に体熱産生亢進成分があると考え、19 種の食品から TRPV1 活性化成分を探索した。

TRPV1 を安定的に発現させた HEK293 細胞の細胞内 Ca²⁺濃度上昇を指標に、食品抽出物の TRPV1 活性を測定した。小麦粉のヘキサリン抽出物に活性がみられ、オレイン酸，リノール酸， α -リノレン酸が結合した

1-monoacylglycerol (1-MG) が活性成分であることを決定した。これら 1-MG の EC₅₀ と最大活性は、CAP の約 60 倍と 1/2 であった。これら 1-MG のラット後肢足底皮下投与は嫌悪行動を誘発し、TRPV1 アンタゴニストの capsazepin を同時投与することで有意に抑制された。一方、ラットの目にこれら 1-MG を滴下しても嫌悪行動を示さなかった。したがって、これら 1-MG は低・無辛味の TRPV1 アゴニストであり、食品成分として利用しやすい化合物と位置づけられた。

(3) TRPA1アゴニストの allyl isothiocyanate と cinnamaldehyde のアドレナリン分泌促進効果

田辺 学¹, 岩崎 有作², 渡辺 達夫²

(¹静岡県大院・生活健康, ²静岡県大院・生活健康, グローバル COE プログラム)

カラシ, シナモンは体を温める食品として利用されているが, その作用成分・機構は不明である。これら辛味成分の allyl isothiocyanate (AITC)と cinnamaldehyde (CNA) は感覚神経に発現する TRPA1 (Transient Receptor Potential A1)を活性化する。一方, トウガラシも体を温める食品であり, 辛味成分 capsaicin (CAP)が感覚神経に発現する TRPV1 (V:Vanilloid)を活性化させ, その刺激がアドレナリン分泌を促進し, 最終的に体温上昇を引き起こすことが明らかである。そこで, TRPA1 活性化成分にも TRPV1 活性化成分同様, 体熱産生亢進作用があると考えた。本研究では, ラットアドレナリン分泌促進効果を指標とした AITC, CNA の体熱産生効果について検討した。

AITC (10 mg/kg), または CNA (10 mg/kg)を, 麻酔下ラット (SD 系, 雄) に血中投与したところ, アドレナリン分泌が促進された。この反応はアセチルコリン受容体阻害剤 (atropine + hexamethonium)投与により有意に抑制され, 交感神経活動由来の副腎髄質性アドレナリン分泌であることが示唆された。また, CAP 処理により求心性感覚神経を脱感作させたラットにおいてもアドレナリン分泌は抑制された。従って, AITC と CNA は, TRPA1 に作用することで求心性神経を活性化させ, 交感神経性に副腎からのアドレナリンを分泌させ, 体温を上昇させている可能性が考えられた。

(4) 食品による体温調節作用～温度受容 TRP チャネルのリガンドによる検討～

正本有紀子, 川端二功, 伏木亨 (京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻)

温度受容を担う機能分子である TRP チャネル (温度受容 TRP チャネル) はこれまでに9種が同定されており, その一部は温度だけでなく様々な食品成分を受容することが明らかとなっている。例えば, 熱刺激受容体 TRPV1 はトウガラシの辛味成分カプサイシンを, 涼冷刺激受容体 TRPM8 は薄荷の主成分メントールを受容する。これまでに TRPV1 リガンドであるカプサイシンを消化管に投与すると熱の産生及び放散を惹起することを明らかにした。このことから消化管に発現している温度受容 TRP チャネルを活性化させることで体温調節系が動員される可能性が考えられる。本研究では食品摂取によって積極的な体温調節が可能か検証するとともに, 温度受容 TRP

チャネルと体温調節系との関連を検討することを目的とした。麻酔下のマウスに温度受容 TRP チャネルのリガンドとなる食品成分を投与して体温変化を測定した結果, 涼冷刺激受容体 TRPM8 のリガンドは熱産生を惹起すること, 冷刺激受容体 TRPA1 のリガンドは熱産生を惹起し熱放散を阻害すること, 温刺激受容体 TRPV3 のリガンドは熱産生も熱放散も惹起しない可能性が示された。温度受容 TRP チャネルに作用する食品成分の中には体温を調節する作用を有するものがあることが明らかとなった。また, 消化管に発現する涼冷刺激受容体 TRPM8 および冷刺激受容体 TRPA1 を活性化すると身体を温める方向に体温調節系が動員される可能性が考えられた。

(5) 暑熱暴露によるラット前視床下部の神経細胞新生の可能性について

松崎 健太郎, 片倉 賢紀, 原 俊子, 紫藤 治
(島根大学医学部生理学講座 (環境生理学))

【目的】暑熱順化により体温調節中枢の機能的変化が起こるが、その機序は解明されていない。本研究では、暑熱に暴露されたラットのの前視床下部における神経前駆細胞の分裂と分化を解析した。

【方法】Wistar 雄ラットを明暗周期 12:12 時間、自由摂食・摂水下、環境温 24°C で 2 週間飼育した後、32°C の高温環境に暴露した。暴露開始から 1 日後、11 日後、21 日後にそれぞれ Bromodeoxyuridine (BrdU; 50 mg/kg/day) を 5 日間腹腔内投与した。28 日後、麻酔したラットから脳を摘出し、前視床下部切片を作成し、抗 BrdU 抗体お

よび抗成熟ニューロン抗体を用いて免疫組織化学的に染色した。

【結果・考察】暑熱暴露により、ラット前視床下部における BrdU 陽性細胞数が顕著に増加し、その数は暑熱暴露期間に依存していた。さらに、BrdU 陽性細胞の一部は抗成熟ニューロン抗体により染色された。以上の結果より、暑熱順化によりラット前視床下部の神経前駆細胞が分裂し、その一部が神経細胞に分化することが示唆された。ラットの暑熱順化の中枢機序として、前視床下部における神経細胞の新生の可能性を考えた。

(6) 脱同調パラダイムによるヒト生物時計の構造解析

山仲勇二郎 (北海道大学大学院 医学研究科 時間生理学分野)

ヒトの生物時計は、明暗周期を同調因子としてメラトニンリズム、深部体温リズムを支配する振動体 (視床下部視交叉上核) と社会的因子を同調因子とし睡眠覚醒リズムを支配する振動体の 2 振動体機構であることが推測されている。我々の教室では、社会的同調因子として運動に着目し、連続的な運動は 23 時間 40 分の強制的睡眠スケジュールへの血中メラトニンリズムの同調を促進することを報告した。しかし、運動のどの要因が振動体に影響しているのかは不明である。さらに、運動が 2 つの振動体に対してどのような機序で作用するのかは不明

である。最近、私たちは健常男性を対象に、低照度環境下で就寝時刻をふだんより 8 時間前進させた強制睡眠覚醒スケジュールで 4 日間過ごした後、フリーラン環境へ移行する脱同調パラダイム実験を実施した。4 日間の強制睡眠覚醒スケジュール時に運動を行う運動群と運動を行わない非運動群の間で、血中メラトニンリズムと睡眠覚醒リズムの位相変化を比較した。本研究では、これらの結果と動物モデルを用いた実験結果の一部を紹介する。

(7) 絶食による休眠時の体温調節反応

時澤 健¹, 内田 有希², 永島 計¹

(¹早稲田大学人間科学学術院, ²早稲田大学人間科学研究科)

【背景】体温の概日リズムは調節された生理現象であることを我々は明らかにしている。しかし絶食時には、非活動期に特異的な体温の低下が生じる。この時間特異的な体温低下がいかなるメカニズムで生じるかは明らかで

はない。

【方法】9~13 週令の ICR 系統の雄マウスを、27°C の環境温において 12 時間の明暗サイクルで飼育した。体温と活動の概日リズムが確認されたのちに、2 日間の絶食を

行った。絶食開始時刻は午前9時もしくは午後9時とし、各この時間の48時間後、午前8時(明期)と午後8時(暗期)に、20°C、180分間の中程度寒冷暴露を行い、この間の体温をテレメトリーにて測定した。

【結果】明期寒冷暴露時には、深部体温は30分目以降に有意に低下した(5.5±2.0°C)。一方、暗期寒冷暴露時には、130分目以降に有意に低下した(2.0±0.5°C)。深部体温の

低下は明期が暗期と比較して有意に大きかった(p<0.05)。自由摂食時には、寒冷暴露による深部体温の低下は認められなかった。

【総括】摂食条件は体温調節に大きく関わっており、絶食時には寒冷時の体温調節を時間特異的に抑制することが明らかになった。体温調節には食餌および時間の2つの要因が大きく関与していることが予想された。

(8) Effects of Ethanol on Temperature Regulation

Larry Crawshaw (Department of Biology, Portland State University)

依田珠江 (獨協大学国際教養学部)

彼末一之 (早稲田大学スポーツ科学学術院)

Initially, unique aspects of the pharmacology of ethanol will be covered. Next, the thermoregulatory responses to ethanol in fish, mice, and humans will be shown. Finally,

commonalities and differences in the responses will be discussed.

(9) メスラットにおける視床下部へのエストロゲン投与が体温調節に与える影響

内田有希¹, 時澤健², 永島計²

(¹早稲田大学人間科学研究科, ²早稲田大学人間科学学術院)

【目的】耐寒反応時のエストロゲンの作用機序を明らかにすることが目的である。

【方法】成熟メスラットの腹腔内に体温測定ラジオテレメトリーデバイスを埋め込み、卵巣を摘出した。術7日後、脳の視床下部内側視索前野(MPO)、視床下部背内側部(DMH)、対照実験として大脳基底部(HDB)にガイドカニューレを設置し、エストロゲン(E+)またはコレステロール(E-)に4時間局所暴露した。暴露後48時間後、2時間室温10°Cで寒冷暴露した。

【結果】MPO群において、E+試行では暴露開始後30~40分に体温変化量に有意な上昇がみられた。E-試行では有意差はなかった。寒冷暴露時の体温変化量は、E-試行と

比べてE+試行において有意に高かった。DMH群、HDB群では、E-試行とE+試行ともに体温変化量に有意差はなかった。寒冷暴露時の体温変化量は、E+試行とE-試行の間に有意差はなかった。寒冷暴露時の体温変化量を投与箇所別に比較すると、E-試行では投与箇所によって有意差はなかった。E+試行では、MPO群はDMH群と比べて有意に高かった。

【考察】脳視床下部MPOへのエストロゲン投与は耐寒反応に影響していることが示唆され、エストロゲンは少なくとも中枢へ作用し体温調節反応を引き起こしていると考えられる。

(10) 体温調節性求心路と遠心路

中村 和弘, Shaun F. Morrison (Neurological Sciences Institute, Oregon Health & Science University)

ヒトを含めた恒温動物の体深部温は、めまぐるしく変動する環境温の下においてもほぼ一定に保たれている。これは、環境温変化の情報が皮膚の感覚神経から脳にある体温調節中枢である視索前野に伝達され、環境温変化によって体温が変動してしまう前に即座に末梢効果器における体温調節反応を引き起こすことによって実現されている。しかし、その一連の情報伝達を担っている神経回路は解明されていない。最近私達は、皮膚からの温度情報を視索前野へ伝達するフィードフォワード経路を同定した。これは、皮膚からの温度情報が脊髄の二次体性感覚ニューロンを介して外側結合腕傍核に輸入され、そ

こから視索前野に直接伝達されるというもので、温度知覚を担う脊髄視床皮質路とは独立した、体温調節性の新たな体性感覚経路であった。また私達は、皮膚冷却による褐色脂肪組織熱産生を引き起こすための、視索前野からの遠心性神経経路も明らかにした。これは、視索前野ニューロンによる視床下部背内側核ニューロンの抑制が、皮膚から視索前野への冷温度情報入力によって解除され、視床下部背内側核ニューロンの興奮性信号が延髄縫線核ニューロンを介して交感神経出力の亢進を引き起こすというものであった。

(11) 遺伝的高温耐性適応

古山富士弥 (名古屋市立大学大学院 医学研究科 脳神経生理学分野)

われわれは、選抜交配によって遺伝的高温耐性 FOK ラットを開発し、その耐性を解析している。FOK ラットは、急性高温暴露に対して既存ラット系統の数倍の耐熱時間を示す。この耐性は多遺伝子遺伝であった。既存ラットの 2-3 倍の脱水 (体重 14%減まで) に耐えながら唾液によって熱放散をおこなった、しかし、摘出唾液腺では対象系統と唾液分泌量に差がなかった。これは、FOK ラットの耐性が体温調節系にあることを明確に示している。その視床下部には、抗酸化ストレス関連遺伝子、および aldosterone 関連遺伝子が発現していた。aldosterone

は、水・Na 平衡、脂質代謝、血管上皮 apoptosis に関係がある。FOK ラットはまた寒冷耐性であり、急性寒冷暴露によって NST が高進した。FOK ラットの血中中性脂肪は顕著に低く、そのアラキドン酸値が高かった。血中リン脂質はやや高く、その DHA 値が高かった。これらの結果は、高温耐性のメカニズムを示唆するものと考えられる。(なお、この度 FOK ラットを National BioResource Project にて受精卵保存し、107 表現型と 356 遺伝子型を測定し、登録する運びとなった)

(12) AMP によるマウスの芯温低下

安田周平, 細川浩, 松村潔, 小林茂夫

(京都大学情報学研究科 知能情報学専攻 生体情報処理分野)

マウスは絶食させると、呼吸・心臓の拍動を抑えてエネルギーを節約する休眠状態へ移行する。このときマウスの体内ではアデノシンリン酸 (AMP) 濃度の上昇が見られる。また、AMP をマウスの腹腔内へ投与すると芯

温低下を引き起こすことから、AMP 投与時のマウスの体温調節反応に着目して実験を行った。生後 2~3 ヶ月のマウスを、熱産生に関わる褐色脂肪細胞 (BAT) の燃焼が見られる 20℃の環境温度下におき、生理食塩水に溶かし

た AMP を体重 1 g あたり 5 μ mol だけ腹腔内投与した。注射後のマウスの様子をサーモグラフィでモニターし、尻尾の温度と背中中の皮膚温度を測定した。その結果、AMP 投与後の背中中の皮膚温度は、BAT に相当する部位も含めて一様に環境温度付近にまで低下することが見られた。この結果から、AMP は BAT の活性を抑制して熱

産生を阻害していると推察される。また尻尾の温度も環境温度まで低下したことから、尻尾からの熱放散は生じていないことが明らかとなった。さらに、AMP をマウスの脳室に投与すると、腹腔内投与と同様に芯温低下が見られたことから、AMP は脳に作用して体温調節反応を阻害していると考えられる。

(13) 終板器官周囲部での GABA 作動性伝達の抑制と PGE2 発熱

大坂寿雅 (国立健康・栄養研究所)

プロスタグランジン (PG) E2 は視床下部の吻側部にある終板器官 (OVLT) の周囲部で EP3 受容体に作用して発熱をおこすとされている。発熱時には全身での熱産生促進、熱放散抑制、心拍数増加等の反応が同時に誘起されるが、EP3 受容体からこれらの全身性反応に至る脳機構は分かっていない。PGE2 は前視床下部の温度感受性ニューロンへの GABA 入力をシナプス前抑制することが報告され、また交感神経系では EP3 受容体が前シナプス終末に存在して PGE2 による伝達抑制をしていることが知られている。そこで、OVLT 周囲部での PGE2 による発熱誘起における GABA の関与を検討した。この部位へ PGE2 を局所注入すると 57 fmol - 2.8 pmol の範囲で用量

依存性に酸素消費率、心拍数、結腸温度が上昇した。GABA-A 受容体拮抗薬である bicuculline や gabazine を 5-20 pmol 注入したときにも PGE2 投与時と同様な反応が誘起された。GABA-A 受容体作動薬である muscimol (4-10 pmol) の投与では酸素消費率や体温等に通常は影響しなかったが、10 分後に投与した PGE2 による反応は大きく減弱した。溶媒である生理食塩水の前投与は PGE2 発熱に影響しなかった。これらの結果から平熱時には OVLT 周囲部において常時放出されている GABA により体温上昇が抑制されており、PGE2 はこの GABA 作動性シナプス伝達を抑制することによって発熱が誘起されると考えられる。

(14) アラキドン酸による脳血管内皮シクロオキシゲナーゼ2の誘導機構

松村 潔¹, 堀あいこ², 山本知子², 細川浩², 小林茂夫²

(¹大阪工業大学情報科学部, ²京都大学大学院情報学研究所)

【背景】アラキドン酸 (AA) をラット脳室内に投与すると、2 相性に深部体温が上昇する。第 1 相の体温上昇はシクロオキシゲナーゼ-1 (COX-1) 依存性に産生された PGE₂ により、第 2 相は COX-2 依存性に産生された PGE₂ による。この第 2 相で働く COX-2 は AA 投与により新たに脳血管内皮細胞に誘導されたものである。すなわち、AA は PGE₂ の原料であると同時に、COX-2 の誘導因子でもある。今回は AA が COX-2 を誘導する分子機構について検討した。

【実験1】COX-2 の誘導は AA の代謝産物によるか？ AA は COX 経路、リポキシゲナーゼ経路、エポキシゲナーゼ経路により様々な生理活性物質に転換される。AA 代

謝産物の COX-2 誘導への寄与を明らかにするために、ラットを AA 代謝酵素の阻害剤で前処置し、脳室に AA を投与した。どの阻害剤も AA による COX-2 誘導を抑制しなかった。すなわち、AA の COX-2 誘導作用は AA の代謝産物によるものではなく、AA 自体によることが示唆された。

【実験2】AA 以外の脂肪酸は COX-2 を誘導するか？ AA 以外の不飽和脂肪酸 (オレイン酸, リノール酸, エイコサペンタエン酸) を、ラット脳室に投与すると、脳血管内皮細胞に COX-2 が誘導された。それに対応して体温も上昇した。一方、飽和脂肪酸 (ラウリン酸) にはこれらの作用はなかった。

【考察】以上の結果は、細胞内でホスホリパーゼ A₂ が活性化され、不飽和脂肪酸濃度が上昇することが、COX-2

の誘導に促進的に作用している可能性を示唆する。

(15) 生体信号を用いた温冷感計測

仲山加奈子（株式会社東芝 研究開発センター）

特に四季のある日本では、夏の暑さ、冬の寒さ、季節の変わり目の不安定な温度変化など、温度に左右されることが多い。しかし、そのような温熱環境も、昨今、空調機等の普及により大幅に緩和されてきた。一方、温熱環境の不適切な制御から、オフィス等では冷やしすぎによる自律神経失調症の人が増加し、睡眠中は温度が原因で中途覚醒を発生するといったような問題も起きている。このような問題を解決するためには、個人の感覚に適応した環境温度制御が重要となり、そのため、客観的な温冷感計測方法が求められている。人体には、生命を守るため様々な温度調節機構が備わっており、体温調節

の結果は生体信号として現れる。末梢（指先）の皮膚温度は、環境温度が人にとって快適である場合、微少な揺らぎを生じ、暑さ・寒さを感じる場合には揺らぎが無くなる。本研究では、このことに着目し、末梢皮膚温度と環境温度より温冷感を計測する方法を考案した。環境温度一定環境における実験を行い、提案手法により算出された温冷感と、実際の被験者の温冷感申告値を比較した結果、平均二乗誤差は70%の場合で1以内となり、申告値と一致した。少ないセンサ情報での温冷感計測の可能性が示された。

(16) 暑熱環境下における起立性ストレス負荷時の皮膚血流量調節

芝崎 学（奈良女子大学生生活環境学部）

暑熱負荷によって核心温度が上昇すると、発汗量や皮膚血流量が増加する。皮膚血流量は、アドレナリン作動性の皮膚血管収縮神経とコリン作動性の皮膚血管拡張神経によって支配されており、暑熱負荷時には後者の血管拡張神経系が主に皮膚血流量を制御している。高体温時には心拍数が増加し、心拍出量は増加するが、そのほとんどが皮膚循環へ配分されている。すなわち、暑熱環境下での皮膚血流量調節は血圧を維持するために非常に重要である。起立性ストレスを負荷すると、血圧を維持す

るために皮膚をはじめ多くの臓器の血管は収縮するが、暑熱環境下では Pre-syncope の状態にあっても、暑熱負荷によって増加した皮膚血流量が暑熱負荷前のレベルまで収縮することはないことが報告されている。なぜ、血圧を維持するために十分な収縮反応を示さないのか。皮膚血管の神経支配の特殊性に着目して検討している。今回、暑熱環境下における起立性ストレス時の血管収縮反応に関する神経性および局所性のメカニズムについて、最近の実験結果をまとめて報告する。

(17) ヒト褐色脂肪：FDG-PET による同定・機能評価と寒冷刺激の影響

斉藤昌之（天使大学大学院看護栄養学研究所）

松下真美，渡辺久美子，岡松優子，辻崎正幸

褐色脂肪はミトコンドリア脱共役タンパク質 UCP1 によって熱産生をする特異的組織であるが、マウスなどの

実験動物と異なりヒトでは新生児期を除いて褐色脂肪は存在しないとされてきた。しかし最近、fluoro - deoxyglucose

(FDG) を用いた positron emission tomography (PET) と X 線 CT を組合わせた PET-CT により, ヒト褐色脂肪の検出が可能になってきた。本研究では, 健康被験者を対象に寒冷刺激の効果や年齢, 体脂肪量との関係を検討した。

健康な男女 57 名 (24~65 歳) を被験者とし, 寒冷期 (1-3 月) に急性寒冷刺激を与えた後, FDG を投与し 30 分後に PET と CT 撮影を行ったところ, 若年者 (24~35 歳) の 60% に肩部および傍脊柱領域の脂肪組織に左右対称性の FDG 集積が認められた。同一被験者について寒冷刺激をせずに同様に撮影したところ, これらの FDG 集積

は全く認められなかった。同様の急性寒冷刺激を, 温暖期 (8-10 月) に与えた場合には, FDG 集積は減弱ないしは消失した。これらの結果はこの FDG 集積が褐色脂肪の活性化によることを示している。壮年者 (38~65 歳) に同様の寒冷刺激を与えた場合には, 28 名中 2 名しか検出できなかった。更に, 褐色脂肪量と体脂肪率とが逆相関することが判明した。

これらの結果は, マウスでの成績と一致しており, ヒト成人でも褐色脂肪が高頻度に存在し, 体温や体脂肪量の調節に関与する可能性を示唆している。

(18) 温熱的感覚の部位差

中村真由美¹, 依田珠江², 齊藤恭世³, 安原祥³, 春日桃子¹,
Larry I. Crawshaw⁴, 永島計³, 彼末一之¹

(¹早稲田大学スポーツ科学学術院, ²獨協大学国際教養学部, ³早稲田大学人間科学学術院,
⁴Department of Biology, Portland State University)

温度感覚, 温熱的快・不快感の部位差を調べるため, 暑熱・寒冷環境下で頭部, 胸部, 腹部, 大腿部の局所的な加温, 冷却実験を行った。暑熱環境下では頭部の冷却による快適感は特に強く, 腹部の冷却による快適感は弱かった。また頭部の加温は他部位の加温と比べて不快感が強い傾向が認められた。寒冷環境下では, 冷却により生じる不快感は頭部において特に弱かった。加温による快適感胸部, 腹部において強く, 頭部では低かった。以上の結果をまとめると, 頭部には熱放散に都合がよく「脳を熱による障害から守る」, 体幹部, 特に腹部には冷えを予防するために都合がよく「冷えによる内臓機能の

失調を防ぐ」為に役立つような感覚の特徴があると言える。暑熱環境下で頭部の温度刺激により, 快・不快感が強く生じたことは, 顔に温点・冷点が多く分布しており, 末梢から中枢への温度情報の入力が多いことで説明がつくかもしれない。しかし寒冷環境下では, 頭部の加温・冷却による快・不快感は他部位と比べて弱かったことから, 末梢の温度受容器分布だけでは説明できない温熱的快・不快感の部位差があるといえる。温熱的快・不快感の部位差が生じるメカニズムには中枢神経系も関与しているのではないかと考える。

23. TRP チャネルの機能的多様性とその統一的理解

2007年7月19日－7月20日

代表・世話人：森泰生（京都大学大学院 工学研究科 合成・生物化学専攻）

所内対応者：富永真琴（生理学研究所 細胞生理）

- (1) 新規酸受容チャネル複合体 PKD1L3/PKD2L1 の電気生理学的解析
稲田仁（自然科学研究機構 生理学研究所 細胞生理）
- (2) Anti-proliferative role of PKD1 in the human coronary smooth muscle cells
大場貴喜（秋田大学 医学部 機能制御医学講座）
- (3) TRPC3 channel の単粒子解析による構造解明とそこから推測される機構
佐藤主税（産業技術総合研究所 脳神経情報研究部門）
- (4) Diacylglycerol-activated Ca^{2+} influx through TRPC3 mediates sustained PKC β translocation and activation
沼賀拓郎（京都大学大学院 工学研究科 合成・生物化学専攻）
- (5) エンドセリン A 型受容体を介して活性化される Ca^{2+} シグナリングの分子メカニズム
堀之内孝広（北海道大学大学院 医学研究科 細胞薬理学分野）
- (6) 三量体 G_{12} ファミリー蛋白質を介した TRPC6 発現増加の生理的意義
西田基宏（九州大学大学院 薬学研究院）
- (7) TRPC6 と病的心筋リモデリング
桑原宏一郎（京都大学大学院医学研究科 内分泌代謝内科）
- (8) Functional analysis of TRP isoforms expressed in human colonic myofibroblast cell line CCD-18Co
海琳（福岡大学 医学部 生理学教室）
- (9) TRPV4 チャネルの神経細胞における高浸透圧感受の可能性
水野敦子（自治医科大学 医学部 分子薬理学部門）
- (10) TRPA1 の関与する痛み感覚
細川浩（京都大学大学院 情報学研究科 知能情報学専攻）
- (11) TRPV1 mediates neurotoxicity induced by G_q -coupled receptor agonists at slightly low pH
白川久志（京都大学大学院 薬学研究科）
- (12) Snapin を介する α_{1A} アドレナリン受容体の受容体作動性 Ca^{2+} 流入 (ROC) 増強メカニズム
森島繁（福井大学・医学部・薬理学領域）
- (13) Nitric oxide (NO) serves as a tonic brake via protein kinase G (PKG) for Ca^{2+} entry through vascular transient receptor potential (TRP) channel TRPC6
井上隆司（福岡大学 医学部 生理学教室）
- (14) ウシ毛様体筋における M3 ムスカリン受容体作動性陽イオンチャネルと TRPC チャネル
高井章（旭川医大・生理・自律機能分野）
- (15) 膵 β 細胞から分泌されるインスリンによる TRPV2 のオートクリン調節
小島至（群馬大学 生体調節研究所）
- (16) HUVEC の伸展刺激感受性における TRPV2 ノックダウンの効果
片野坂友紀（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 システム循環生理学）

【参加者名】

毛利 聡 (岡山大・医歯薬総合), 桑原 宏一郎 (京都大・医), 竹口 紀晃 (富山医科薬科大), 三輪 聡一 (北海道大・医), 堀之内 孝広 (北海道大・医), 森 泰生 (京都大・工), 沼賀 拓郎 (京都大・工), 山本 伸一郎 (京都大・工), 加藤 賢太 (京都大・工), 大場 貴喜 (秋田大・医), 金子 周司 (京都大・薬), 白川 久志 (京都大・薬), 中尾 賢治 (京都大・薬), 杉下 亜維子 (京都大・薬), 金野 真和 (京都大・薬), 三平 和明 (京都大・薬), 松谷 一慶 (京都大・薬), 山口 健太郎 (京都大・薬), 曾我部 正博 (名古屋大・医), 井上 隆司 (福岡大・医), 海 琳 (福岡大・医), 山村 寿男 (名古屋市立大・薬), 舩橋 賢司 (名古屋市立大・薬), 村田 秀道 (名古屋市立大・薬), 大野 晃稔 (名古屋市立大・薬), 池田 知佳子 (名古屋市立大・薬), 荻原 和信 (名古屋市立大・薬), 木村 拓哉 (名古屋市立大・薬), 水谷 浩也 (名古屋市立大・薬), 加藤 大樹 (名古屋市立大・薬), 谷口 賢 (名古屋市立大・薬), 橋爪 圭吾 (名古屋市立大・薬), 藤高 啓右 (名古屋市立大・薬),

山本 清司 (名古屋市立大・薬), 小林 茂夫 (京都大・情報), 細川 浩 (京都大・情報), 田地野 浩司 (京都大・情報), 杉山 鷹人 (京都大・情報), 角 康憲 (京都大・情報), 佐藤 主税 (産総研), 三尾 和弘 (産総研), 笹村 崇 (小野薬品工業), 川原田 宗一 (小野薬品工業), 水野 敦子 (自治医科大・医), 大場 愛 (ポーラ化粧品), 橋本 公男 (サンスター), 高橋 信之 (生理研), 沼田 朋大 (生理研), 佐藤 かお理 (生理研), 富永 真琴 (岡崎統合バイオ), 柴崎 貢志 (岡崎統合バイオ), 稲田 仁 (岡崎統合バイオ), 曾我部 隆彰 (岡崎統合バイオ), 兼子 佳子 (岡崎統合バイオ), 松井 誠 (岡崎統合バイオ), 内田 邦敏 (岡崎統合バイオ), 島麻子 (岡崎統合バイオ), 藤田 郁尚 (岡崎統合バイオ), 川端 二功名 (岡崎統合バイオ), 望月 勉 (岡崎統合バイオ), 広井 理人 (昭和大学), 金子 祐次 (昭和大学), 小池 慎太郎 (昭和大学), 張 藍帆 (基生研), 重枚 秀樹 (OIB), 漆谷 博志 (岡崎統合バイオ), 檜山 武史 (基生研)

【概要】

細胞外からの Ca^{2+} 流入は, 多くの細胞応答において必須であることがこれまでに明らかにされている。それらは神経伝達物質の放出や筋収縮といった組織特異的なものから, 細胞増殖・分化あるいは細胞死といった全ての細胞において普遍的なものまでである。神経伝達物質の放出や筋収縮には, 電位依存性 Ca^{2+} チャンネルやリガンド作動性 Ca^{2+} チャンネルが主として機能するのに対し, 細胞増殖等の普遍的細胞応答において Ca^{2+} 流入を担っていると考えられているのが, TRP チャンネル群である。ここ数年で TRP チャンネルの研究は目覚ましい進展を見せている。またその多様性や活性化機構の複雑さに対する統一的理解の必要性が近年高まっている。そのため, 平成

17 年度から日本国内において TRP 研究を精力的に進めている多くの研究者が集まり, 最近の知見や個々の考えを紹介し議論を通して, 今後の TRP 研究の新たな展開を促すべく研究会を開催している。本年度の第3回の研究会においては, その活性化機構にとどまらず, 構造や細胞内シグナル伝達系における scaffolding 機能, あるいは急性の Ca^{2+} 応答への関与だけでなく, 細胞応答における TRP チャンネルの発現レベルの変化といった新たな研究展開が多く紹介された。ますます, TRP チャンネルの機能の多様性が明らかにされつつあるが, より研究成果を確かなものにするための定量的な解析手法等も紹介され非常に有意義な研究会となった。

(1) 新規酸受容チャネル複合体 PKD1L3/PKD2L1の電気生理学的解析

稲田仁 (自然科学研究機構 生理学研究所 細胞生理)

動物において, 酸味受容は傷んだ食物や刺激の強い液体を避けるために必須な感覚である。酸味受容の分子機構は長年不明のままであったが, 近年, PKD1L3/PKD2L1

チャネル複合体が有力な酸味受容体候補として同定された。PKD1L3 および PKD2L1 は, 嚢胞性腎臓疾患 (Polycystic Kidney Disease : PKD)の原因因子とされる

polycystin-1 および polycystin-2 のホモログとして同定された膜タンパク質で、PKD2L1 は TRP チャネルファミリーとして分類されている。マウスにおいて、PKD1L3 および PKD2L1 の発現は一部の味細胞で観察された。HEK293 細胞を用いた強制発現系において、PKD1L3 および PKD2L1 は複合体を形成し、膜表面へ移行することが組織化学的・生化学的に確認された。PKD1L3 および PKD2L1 を共発現させた HEK293 細胞では、酸刺激特異

的に細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が観察されたが、他の味物質（甘味・旨味・苦味・塩未物質）では、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は引き起こされなかった。パッチクランプ法を用いた電気生理学的解析によって、PKD1L3/PKD2L1 チャネル複合体を発現させた HEK293 細胞において、pH 3.0 以下の酸刺激によって一過性の膜電流が引き起こされることが確認された。

(2) Anti-proliferative role of PKD1 in the human coronary smooth muscle cells

大場貴喜（秋田大学 医学部 機能制御医学講座）

抗高血圧薬である amlodipine は CDK inhibitor である p21 の発現上昇を介して冠状動脈平滑筋細胞 (CASMC) の増殖を抑制することが知られている。また PKD1 (TRPP1) の発現は p21 を介して、CASMC 増殖に関与していることが知られている。演者らはこれら知見に基づき、amlodipine が PKD1 の関与する経路を制御することで CASMC 増殖抑制に関わると予測し、そのメカニズムの解明に乗り出した。amlodipine は dose および時間依存的に p21 の発現量を増加させるが、PKD1 の PKD2 の発現

量には影響を与えなかった。PKD1 の過剰発現はそれのみで CASMC の増殖を抑制したが、PKD の原因変異体である R4227X の過剰発現は逆の効果を示した。さらに演者らは、PKD1 は下流の STAT シグナル経路に関与することを明らかにした。以上から PKD1 は JAK/STAT 経路を介して p21 の発現を調節し、CASMC の増殖を制御していることを明らかにした。また amlodipine は PKD1 に対して何らかの影響を与え、CASMC の増殖抑制を引き起こすと予測されるが、詳細は現在検討中である。

(3) TRPC3 channel の単粒子解析による構造解明とそこから推測される機構

佐藤主税（産業技術総合研究所 脳神経情報研究部門）

TRP channel の super family は、温度感受や酸化ストレスおよび浸透圧の検知、発生・分化、アポトーシス、味覚等々、様々のセンサー的な役割を担っている。しかし、その構造は全くの未知であった。本研究では単粒子解析法を用い、このファミリーの中で最も生理学的な研究の積み重ねの多い TRPC3 の構造解析を、クライオ電子顕微鏡で撮影した画像を用いて行った。TRPC3 はホスホリパーゼ $\text{C}\gamma$ が産生する Diacylglycerol により、またホスホリパーゼ $\text{C}\gamma$ の直接的結合により活性化する。さらには細胞内小胞膜からの Ca 放出チャンネルである IP_3 受容体も TRPC3 に結合し、活性を調節する。今回分解能 15Å で決定された構造から、この TRPC3 は、高さ 240

Å 幅 200Å の隙間だらけの膨れあがった構造を持つことが分かった。外側はワイヤー状の構造で中心にはイオンが入り込むと思われる小部屋状になっていた。外側のワイヤーが 3 次元的な結合スペースをつくり出し、そのアンテナの様な張り出しが様々な制御タンパク質を同時に結合することを可能にしていると思われる。これはマルチセンサーである TRP チャネルとしては極めて理にかなった構造であると言える。本報告は TRP superfamily の中で初めての構造解明であると共に、そこから得られた表面構造からは、 IP_3 受容体と 1:1 の比率で結合する可能性が示唆された。

(4) Diacylglycerol-activated Ca^{2+} influx through TRPC3 mediates sustained $\text{PKC}\beta$ translocation and activation

沼賀拓郎 (京都大学大学院 工学研究科 合成・生物化学専攻)

免疫 B 細胞において、B 細胞受容体 (BCR) 刺激に惹起される細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は、細胞内ストアからの放出による一過的な上昇と、それに引き続く細胞外からの流入による持続的なオシレーションにより構成される。演者らは今回、DT40 に内在的に発現する TRPC3 のノックアウト (KO) 細胞株を作製し、その解析から、内在的 TRPC3 が、ジアシルグリセロール (DAG) 活性化チャネルを構成していることが示唆された。また TRPC3-KO 細胞において、 $\text{PLC}\gamma 2$ の膜集積が抑制され、この結果と一致して Ca^{2+} オシレーションおよび NFAT の活性化も抑制されていた。一方、 $\text{PLC}\gamma 2$ のもうひとつの産物である

DAG について、シグナル経路の解析を行った結果、TRPC3 チャネルの欠損により $\text{PKC}\beta$ の持続的な形質膜への移行も抑制されることを明らかにした。 $\text{PKC}\beta$ の持続的な膜移行は下流のシグナルとして ERK の持続的な活性化に重要であることを明らかにした。さらにこの持続的な ERK の活性化は従来よく知られた Ras 依存的な経路ではなく、Rap1 依存的な活性化経路を経ていることを明らかにした。以上から TRPC3 は B 細胞において Ca^{2+} および DAG を中心としたシグナル経路の中核においてそれらの持続的な活性化に重要であることを明らかにした。

(5) エンドセリン A 型受容体を介して活性化される Ca^{2+} シグナリングの分子メカニズム

堀之内孝広 (北海道大学大学院 医学研究科 細胞薬理学分野)

エンドセリン A 型受容体 (ETAR) を強制発現させた CHO 細胞において、エンドセリン-1 (ET-1; 0.3 nM) による一過性及び持続性の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇反応は、YM-254890 (Gq/11 阻害薬) 及び U-73122 (PLC 阻害薬) を前処理することによって、完全に消失した。また、細胞外 Ca^{2+} の除去、SK&F 96365 (ストア作動性 Ca^{2+} チャネル/受容体作動性 Ca^{2+} チャネル阻害薬) 前処理、 La^{3+} (TRPC チャネル阻害薬) 前処理、Krebs-HEPES 溶液中の Na^+ と Li^+ との等張性置換により、著しく減弱した。さらに、持続性の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇反応は、EIPA (Na^+/H^+ 交換体 (NHE) 阻害薬)、SEA0400 ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体 (NCX) 阻害薬)、の前

処理により抑制された。NHE の活性を制御する p38MAPK の阻害剤である SB203580 の前処理により、ET-1 による持続性の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇反応はほぼ消失し、p38MAPK のリン酸化量は経時的に増加した。

これらの結果から、TRPC チャネルといったカチオンチャネル及び NHE を介した細胞外 Na^+ の流入により、細胞内 Na^+ 濃度が上昇し、その結果、NCX がリバースモードに駆動することによって、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇反応が生じていると考えられた。興味深いことに、p38MAPK のリン酸化量は、ET-1 処理後、経時的に増加した。

(6) 三量体 G_{12} ファミリー蛋白質を介した TRPC6 発現増加の生理的意義

西田基宏 (九州大学大学院 薬学研究院)

演者らは以前、心線維芽細胞においてアンジオテンシン (Ang) II 刺激による nuclear factor of activated T cells (NFAT) の活性化が、三量体 G_{12} ファミリー蛋白質

($\text{G}_{12}/\text{G}_{13}$) を介して引き起こされることを報告した。さらに、恒常的活性型 $\text{G}\alpha_{13}$ を発現させた心線維芽細胞では、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が起こることを最近見出している。しかし、

その詳細なメカニズムは依然として明らかでない。そこで本研究では、受容体作動性 TRPC チャンネルに着目し、 G_{12}/G_{13} 蛋白質を介した Ca^{2+} シグナリング活性化の分子メカニズムを解析した。

$G_{\alpha_{12}}/G_{\alpha_{13}}$ を介した TRPC6 の発現増加がエンドセリン (ET-1) 刺激による Ca^{2+} シグナリング活性化に関与することが明らかとなった。心線維芽細胞に ET-1 刺激を行うと、 α -smooth muscle actin (SMA) が発現し、筋線維芽細胞へと変化する。ET-1 刺激による α -SMA の発現増加は $G_{\alpha_{12}}/G_{\alpha_{13}}$ の機能阻害により抑制された。この結果から、 $G_{\alpha_{12}}/G_{\alpha_{13}}$ シグナリングは ET-1 刺激による線維化を仲介

することが示された。ところが、TRPC6 siRNA または cyclosporin A の処置は、ET-1 刺激による α -SMA の発現を逆に増強させた。以上の結果から、 $G_{\alpha_{12}}/G_{\alpha_{13}}$ は線維化促進と抑制の 2 つのシグナル経路を活性化しうること、および $G_{\alpha_{12}}/G_{\alpha_{13}}$ を介した TRPC6 発現増加と NFAT の活性化は ET-1 刺激による α -SMA 発現に対して抑制的に働くことが明らかとなった。 $G_{\alpha_{12}}/G_{\alpha_{13}}$ を介した TRPC6 の発現増加は、過剰な ET-1 刺激に対する心臓のネガティブフィードバック制御機構として働いているのかもしれない。

(7) TRPC6と病的心筋リモデリング

桑原宏一郎 (京都大学大学院医学研究科 内分泌代謝内科)

筋リモデリングの課程においてカルシウム依存性の細胞内シグナルが様々な心筋遺伝子発現を引き起こすことが知られており、 Ca^{2+} /カルモジュリン依存性 phosphatase である calcineurin は転写因子 NFAT を介してそうした遺伝子発現変化ひいては心筋のリモデリングに関わることが報告されている。しかしどのような Ca^{2+} ソースが calcineurin-NFAT 系の活性化に関わるかはまだ明らかでない。著明な心肥大を示す calcineurin Tg マウスにおいて TRPC family の遺伝子発現を検討したところ、TRPC6 の発現が選択的に有意に亢進していることを見出した。TRPC6 はマウスの圧負荷肥大心、ヒトの負全心においても発現が亢進していた。そこで TRPC6 の発現亢進機序を探るためにそのプロモーター解析をしたところ、TRPC6 遺伝子上流に 2 箇所の NFAT 結合サイトの存在を

同定し、その NFAT が TRPC6 の病的刺激による発現亢進に重要であることを突き止めた。さらに培養細胞において TRPC6 の過剰発現は calcineurin-NFAT 経路を活性化させることを見出した。そこで TRPC6 を心筋に過剰に発現するマウス (TRPC6 Tg) を作製したところ、これらマウスは心機能の低下および心不全発症を起こしやすいことが明らかとなった。またこれらマウスでは心筋胎児型遺伝子である beta-MHC 遺伝子発現の亢進が認められ、実際 beta-MHC のプロモーター領域には NFAT および NFAT と会合することが知られる GATA 因子の結合サイトが認められた。以上より TRPC6 は calcineurin-NFAT 経路の positive circuit loop を形成し、心筋の病的リモデリングに関与している可能性が示唆された。

(8) Functional analysis of TRP isoforms expressed in human colonic myofibroblast cell line CCD-18Co

海琳 (福岡大学 医学部 生理学教室)

腸管上皮筋線維芽細胞株である CCD-18Co は cyclooxygenase を発現し、 PGE_2 の産生する能力を保持している。 PGE_2 の分泌は細胞外 Ca^{2+} 依存的であり、さらに $TNF\alpha$ や $IL1\beta$ により増強される。演者らは、 PGE_2 分泌に関わる Ca^{2+} 流入経路を同定するため、CCD-18Co 細胞に

おける TRPC, TRPV, TRPM の発現を RT-PCR 法により解析した。またいくつかの TRP を活性化する試薬により、非選択的カチオン電流が観察されることを電気生理学的解析により明らかにした。また $TNF\alpha$ 刺激も同様に非選択的カチオン流入を惹起した。演者らは 24 時間の $TNF\alpha$

刺激は TRPC1 の発現を誘導し、ストア作動性 Ca^{2+} 流入の増強が引き起こされることを見出した。これらの現象

が、 $\text{TNF}\alpha$ による PGE_2 産生の誘導に必須であると演者らは推測していた。

(9) TRPV4チャネルの神経細胞における高浸透圧感受の可能性

水野敦子 (自治医科大学 医学部 分子薬理学部門)

演者らは、TRPV4 欠損マウス (TRPV4^{-/-})への高張食塩水投与による血中浸透圧の上昇時にはバソプレッシン (AVP)分泌が昂進していることから、TRPV4 は AVP 抑制に働いていると報告した。一方、Liedtkeらは、TRPV4^{-/-}での断水実験では、正常より血中浸透圧がより高く飲水量は少なく AVP 分泌は低下すると報告しており、生体内における TRPV4 の役割には議論がある。そこで今回、TRPV4^{-/-}での断水による血中浸透圧変化を再確認するとともに、神経細胞において高浸透圧下で反応する TRPV4 の存在の可能性について検証した。

1) TRPV4^{-/-}マウスを約 96 時間の断水条件に置いたが、飲水量に野生型マウスとの差は無く、血清浸透圧は 72

時間断水群でわずかに低下しているのみであった。

2) 培養神経細胞株 Neuro2A から、TRPV4 が発現し高浸透圧に応答する細胞をサブクローニングし、高浸透圧に反応する TRPV4 が存在し、その応答は、高浸透圧感受性チャネルとして最近報告された TRPV1 splice variant の有無とは無関係であった。また、その活性化の機序には、低浸透圧と同様に PLA_2 を経由するアラキドン酸カスケードの関与が明らかとなった。以上の結果から、生体内の浸透圧調節において、脳内で高浸透圧に反応して抑制的に微調整に働く TRPV4 の存在の可能性が示唆される。

(10) TRPA1の関与する痛み感覚

細川浩 (京都大学大学院 情報学研究科 知能情報学専攻)

感覚神経細胞に発現しているいくつかの TRP チャネルは、温度や化学物質に応答し、特定の感覚神経を興奮させることで、感覚の惹起を引き起こすと考えられている。この中でも、TRPA1 は、炎症や刺激性物質による痛み感覚に関与すると考えられている。本実験では、他にどのような痛み感覚に TRPA1 が関与するかを明らかにする目的で、さまざまな化学物質や物理刺激に対する TRPA1 の応答を検討した。温度刺激に関する活性化を検討したところ、冷刺激により TRPA1 の活性化が見られ

た。この活性化は、細胞膜表面で起こっていた。化学物質による活性化を検討したところ、いくつかの TRPA1 を活性化させる物質を見出した。このうち過酸化水素による活性化について解析を行ったところ、TRPA1 は、過酸化水素による細胞内領域の酸化により、直接的に活性化されることを見出した。また、過酸化水素によって誘発される痛み行動に TRPA1 が関与していた。これらのことから、TRPA1 は過酸化水素を介した様々な痛み感覚に関与する可能性が示唆された。

(11) TRPV1 mediates neurotoxicity induced by G_q -coupled receptor agonists at slightly low pH

白川久志 (京都大学大学院 薬学研究科)

演者らは、培養大脳皮質神経細胞における TRPV1 の

生理的機能を研究した。培養神経細胞に、カプサイシン

を処置することにより神経細胞死が惹起され、TRPV1 のアンタゴニストであるカプサゼピンおよび細胞外 Ca^{2+} の除去により細胞死が阻害された。また L 型電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの阻害薬である nifedipine によっても神経細胞死は抑制された。さらに、活性酸素種の scavenger も神経細胞死は抑制された。それ自身では細胞死を惹起しない低 pH 条件に細胞を置き、TRPV1 を活性化することが知られる細胞外刺激 (カプサイシン, N-arachidonoyl dopamine およびヒスタミンやブラジキニンなどの G_q -

coupled receptor アゴニスト) を与えた場合、TRPV1 を介した細胞死が誘導された。これら細胞外刺激も通常の pH 条件においては細胞死を誘導しない。またヒスタミン刺激により惹起される細胞死はアラキドン酸代謝経路やプロテインキナーゼ C の阻害薬により抑制された。以上から、TRPV1 は一過的虚血などの神経変性疾患において引き起こされる穏やかな酸性条件での細胞死の重要な原因因子と考えられた。

(12) Snapin を介する α_{1A} アドレナリン受容体の受容体作動性 Ca^{2+} 流入 (ROC) 増強メカニズム

森島繁 (福井大学・医学部・薬理学領域)

主として小胞体膜上に存在する Snapin 蛋白は SNARE 複合体に結合する蛋白として知られている。我々は、two-yeast hybrid 法や免疫共沈降法などにより、 α_{1A} アドレナリン受容体 (α_{1A} -AR) に Snapin が結合していることを明らかにした。Snapin は α_{1A} AR の C 末端近くの細胞内領域に結合する。その結合は、 α_{1A} -AR をアゴニスト刺激により活性化すると、促進され、Snapin は細胞膜近傍に移動した。Snapin と α_{1A} -AR を共発現させた PC12 細胞を、 α_{1A} -AR のみを発現させた PC12 細胞と比較すると、 α_{1A} -AR を刺激後、sustained phase にみられる細胞外 Ca^{2+} の流入による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇が著しく増強された。Snapin と α_{1A} -AR

を共発現させた PC12 細胞に Snapin に対する siRNA を導入すると、これらの増強作用は消失した。また、 α_{1A} -AR のみを発現させた PC12 細胞に Snapin に対する siRNA を導入し、内在性の Snapin を抑制すると、細胞外 Ca^{2+} の流入はほとんど消失した。また、 α_{1A} 受容体活性化により、Snapin は TRPC6 チャンネルとも相互作用し、細胞膜表面上の TRPC6 の発現を増加させることが明らかになったことから、この Ca^{2+} 流入の増強は、 α_{1A} 受容体-Snapin-TRPC6 の三量体形成によるものであることが示唆された。

(13) Nitric oxide (NO) serves as a tonic brake via protein kinase G (PKG) for Ca^{2+} entry through vascular transient receptor potential (TRP) channel TRPC6

井上隆司 (福岡大学 医学部 生理学教室)

TRPC6 は血管組織における主要な TRP チャンネルであり、vascular tone generation や remodeling に関与する非選択的のカチオンチャンネルを構成している。これまでに TRPC6 は CaMKII や PKC による制御を受けていることが明らかにされている。演者らは、新たに NO/cGMP/PKG を介した経路により TRPC6 が持続的な抑制を受けていることを見出した。HEK293 細胞に TRPC6 を発現させると muscarinic receptor 刺激や $\text{GTP}\gamma\text{S}$ の投与により TRPC6 依存的な非選択的のカチオン電流が観察される。これらの

電流は NO 供与体である SNAP の処置により強く抑制された。免疫細胞染色により、この TRPC6 の抑制は形質膜での発現を抑制されることに起因しないことが明らかにされた。また膜透過性の $\text{GTP}\gamma\text{S}$ アナログである 8-bromo cGMP によっても同様に TRPC6 は抑制された。SNAP と 8-bromo cGMP による TRPC6 の抑制は、PKG の阻害薬および PKG によるリン酸化部位のアラニン置換により完全に消失した。血管平滑筋においては、隣接する内皮細胞から放出される NO に構成的に曝されている

ことから、この PKG によるリン酸化を介した TRPC6 抑制機構は、生理条件下において血管収縮物質に引き起こ

される Ca^{2+} 流入に対する持続的なブレーキとして働いていると推測された。

(14) ウシ毛様体筋における M3ムスカリン受容体作動性陽イオンチャネルと TRPC チャンネル

高井章 (旭川医大・生理・自律機能分野)

視覚遠近調節を司る毛様体筋は副交感神経支配の平滑筋であり、ムスカリン受容体の刺激の続く限り一定の張力を保持し続け、安定な焦点調節を可能にしている。最近われわれは M3 ムスカリン受容体刺激に応じて開口する 2 種類の非選択性陽イオンチャネル (NSCCL と NSCCS) を同定し、それらが持続的な筋収縮に必要な細胞外からの Ca^{2+} 流入の主要経路として機能することを示す知見を得た。

ウシ毛様体筋単離細胞において、カルバコール (0.5-2 μM) は NSCCL/NSCCS 電流の活性化と、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇を起した。G_{q/11} 阻害剤である YM-254890 (3-10 μM) の細胞

外投与により、それらの初期相、持続相とも完全に抑制された。一方、多くの TRP チャンネルにも抑制効果を示す La^{3+} , Gd^{3+} および SKF-96365 は 1-100 μM の濃度範囲で持続相のみを濃度依存性に抑制した。TRPC6 電流を増強する fulfenamate は、10-100 μM の濃度で NSCCL 電流にも増強作用を示した。免疫染色による実験では、細胞膜標本の α アクチン陽性領域に集中して、M₃R, G_{q/11}, TRPC1, TRPC3, TRPC4 および TRPC6 に特異的な抗体の結合を示す蛍光スポットが、いずれも 1 μm^2 以上という高密度で検出された。まだ検討すべき点が多いが、TRPC は NSCCL and/or NSCCS の有望な分子候補といえる。

(15) 膵β細胞から分泌されるインスリンによる TRPV2のオートクリン調節

小島至 (群馬大学 生体調節研究所)

最近の研究により、膵β細胞から分泌されるインスリンがβ細胞の増殖や分化機能維持に重要であることが明らかになっている。カルシウム透過性チャネル TRPV2 は、インスリンを分泌するβ細胞に高発現している。β細胞株 MIN6 細胞に GFP-TRPV2 を導入し、その細胞内局在の変化を検討した。非刺激時、TRPV2 の多くは細胞内に存在し、一部は細胞膜上に発現していた。血清刺激を行うと細胞内の TRPV2 は細胞膜上に移行した。MIN6 細胞を低密度に培養しインスリンを添加すると、TRPV2 は細胞膜上に移行した。またインスリン受容体をノックダウンすると抑制された。さらに TRPV2 の細胞膜移行はインス

リン分泌を刺激するグルコースやフォルスコリンによっても惹起され、インスリン分泌を抑制すると細胞膜上の TRPV2 発現量も減少した。インスリンにより細胞外からの Ca^{2+} 流入が増加し、この Ca^{2+} 流入は TRPV2 を抑制する tranilast により抑制された。MIN6 細胞の増殖は tranilast により抑制され、また TRPV2 のノックダウンにより抑制された。インスリン分泌もまた tranilast により抑制された。以上の結果から、膵β細胞に発現する TRPV2 は分泌されたインスリンによるオートクリン制御を受け細胞膜上に移行し、これがインスリンによるβ細胞の増殖や分化機能維持に関与していると考えられた。

(16) HUVEC の伸展刺激感受性における TRPV2ノックダウンの効果

片野坂友紀 (岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 システム循環生理)

演者らは、ヒト臍帯内皮細胞 (HUVEC) の伸展刺激受容メカニズムを明らかにしたいと考えている。これまでに、HUVEC は、(1) 外部からの伸展刺激に対して細胞内の Ca^{2+} を上昇させるという一過的な伸展刺激に対する応答を示すこと、(2) 伸展軸に対して垂直方向にストレスファイバーを配向させるという長期的な周期的伸展刺激に対する応答を示すことを報告している。これらの反応には、細胞外からの伸展刺激依存的 Ca^{2+} 流入が必要であるものの、現在までに HUVEC の伸展刺激依存性 Ca^{2+} 流入経路が明らかにされていない。HUVEC における伸展刺激センサーの一部として、TRPV2 が関与している可能

性が考えられると同時に、細胞の伸展刺激受容には、単にこのような伸展刺激センサーが発現しているだけではなく細胞膜直下に細胞骨格の適切な構造を備えていることが必要であることを示唆する結果を得ている。HUVEC において、TRPV2 をモルフォリノオリゴによりノックダウンした場合の伸展刺激感受性について報告する。TRPV2 ノックダウン細胞では、一過的伸展刺激に対しても、長期的な周期的伸展刺激に対しても細胞応答が大きく変化したことから、HUVEC の伸展刺激感受性に対する TRPV2 の役割は大きいことが考えられた。

24. 伴侶動物の臨床医学研究会および第38回日本比較臨床医学会総会

2007年11月30日-12月1日

代表・世話人：丸尾幸嗣（岐阜大学応用生物科学部獣医臨床腫瘍学）

所内対応者：木村 透（自然科学研究機構動物実験センター）

(1) 乳がんの病理学的概要 医学

廣瀬善信（岐阜大学医学部附属病院病理部）

(2) 乳がんの病理学的概要 獣医学

中山裕之（東京大学大学院農学生命科学研究科獣医病理学）

(3) 乳がんの臨床における現状 医学

細野芳樹（岐阜大学医学部附属病院第2外科）

(4) 乳がんの臨床における現状 獣医学

伊東輝夫（青葉動物病院）

(5) 炎症性乳がんの現状と課題 医学

川口順敬（岐阜大学医学部附属病院第2外科）

(6) 炎症性乳がんの現状と課題 獣医学

森 崇（岐阜大学応用生物科学部獣医臨床腫瘍学）

(7) 乳がんの最新トピックス 医学

川口順敬（岐阜大学医学部附属病院第2外科）

(8) 乳がんの最新トピックス 獣医学

丸尾幸嗣（岐阜大学応用生物科学部獣医臨床腫瘍学）

【参加者名】

丸尾 幸嗣（岐阜大学応用生物科学部），酒井 洋樹（岐阜大学応用生物科学部），児玉 篤史（岐阜大学応用生物科学部），山田 隆紹（麻布大学獣医学部），土屋 亮（麻布大学獣医学部），小松 嵩弘（麻布大学獣医学部），土田 修一（日本獣医生命科学大学比較細胞生物学教室），荒島 康友（日本大学医学部臨床病理学），小暮 一雄（所沢愛犬病院），廣田 順子（帝京科学大学理工学部アニマルサイエンス），臼井 玲子（臼井動物病院），森 崇（岐阜大学応用生物科学部），廣瀬 善信（岐阜大学附属病院病理部），細野 芳樹（岐阜大学附属病院第2外科），川口 順敬（岐阜大学附属病院第2外科），伊東 輝夫（青葉動物病院），中山 裕之（東京大学大学院農学生命科学研究科），井口 尚子（みささぎ動物病院），伊藤 寛将（岐阜大学），犬塚 直樹（金沢獣医科），宇野 正人（獣医臨床），大矢 善一郎（麻布大学附属動物病院内科），加藤 みづほ（大阪市獣医師会 / ロッキー動物病院），

兼島 孝（みずほ台動物病院），木村 直人（（財）日本モンキーセンター），蔵所 宏好（大阪市獣医師会会 / ロッキー動物病院），桑原 正人（日本大学），小谷 和彦（鳥取大学医学部），駒澤 敏（知多愛犬病院），小宮 智義（北里研究所），佐々木 勝義（とこなめ動物病院），柴田 久美子（麻布大学附属動物病院），関口 智子（てらかど動物病院），瀬山 昇（NCA），竹内 康博（たけうち獣医病院），武富 和夫（武富動物病院），土居 弘典（岐阜大学），戸田 知得（生理学研究所），長坂 真由（豊田市おざわどうぶつ病院），並河 和彦（麻布大学），長谷 晃輔（おざわ動物病院），松尾 康博（岐阜大学獣医病理），松本 光和（愛知県獣医師会），水野 累（岐阜大学腫瘍科），南 千佳（岐阜大学），村上 麻美（村上 麻美），村松 梅太郎（日本獣医生命科学大学），吉田 治弘（専修大学），若園 多文（ながまつ動物病院），渡邊 尚樹（岐阜大学獣医学科）

【概要】

愛玩動物から伴侶動物へと小動物臨床の対象は推移し

つつある。家族と同様に生活をともにする伴侶動物は長

命化し、加齢性疾患に罹患する動物が増加している。今や臨床獣医師はがんの症例を避けて通ることはできない。難治性疾患であるがんは治療を尽くしても良い結果がもたらされるとは限らない。それでも我々臨床獣医師が治療を継続できるのは、がん動物の飼主の飽くなきがん撲滅への熱望があるからである。

このように、獣医学におけるがんを始めとする伴侶動物医学分野には毎年およそ50%の獣医大学卒業生が進路としているだけでなく、伴侶動物医学の進展は社会のニーズとなっている。そのような状況の中で、我々臨床獣医師が心がけねばならないことは、適切な診断と治療の実践である。すなわち、エビデンスに基づいた獣医療を

行使することである。そのためには、獣医学と密接に関連する医学、実験動物科学との連携が不可欠である。

今年度の研究会は医学と連携して、乳がんをテーマにシンポジウムを企画した。内容は乳がんの病理学的概要、乳がんの臨床における現状、炎症性乳がんの現状と課題、乳がんの最新トピックスの4つのテーマについて、医学および獣医学からの話題提供をお願いした。医学と獣医学が交流することによって、比較腫瘍学という観点からの論議が活発化し、新たな知見を生み出す原動力となることを期待している。今回の研究会開催が比較腫瘍学発展のきっかけとなれば望外の喜びである。

(1) 乳がんの病理学的概要 医学

廣瀬善信（岐阜大学医学部附属病院病理部）

ヒト乳腺腫瘍の病理について概説する。

乳癌は、本邦では罹患率・死亡率のいずれも低率であったのが最近では急増しており、その原因としてはライフスタイル（食事など）の欧米化などが関与すると考えられている。乳腺発がんの病因論としてはBRCA遺伝子変異、ホルモン受容体やHER2タンパクの過剰発現などが挙げられる。これらは、ヒト乳腺発がんに関与する重要な関与をしており、将来的に診断・治療に応用できる可能性を孕む。

ヒト乳腺腫瘍の組織学的分類は、日本乳癌学会編の「乳癌取扱い規約第15版（2004年6月）」に則ったものが全国的に普及している。各乳腺腫瘍の代表的な組織型の病理像は、自験例をスライド供覧する。生物学的特性

では、ホルモン受容体、HER2の発現、マイクロアレイ解析、センチネルリンパ節生検が注目されている。

当院において生検診断で心懸けている点としては、無理な診断は極力避けることが挙げられる。早期あるいは境界病変の鑑別にはこれまでの形態学の限界も指摘されており、臨床側とのコミュニケーションを保ちつつ、場合によって再検や摘出生検を求めていくことが重要と考える。

今後の解決すべき課題としては、乳管内上皮増殖病変（ADH、乳頭腫、DCISなど）の診断や、縮小手術材料の病理検索、特に断端検索が重要になってくる。

ヒト乳癌における知見の幾つかは、当然のことながら獣医学的診断治療に応用可能であると思われる。

(2) 乳がんの病理学的概要 獣医学

中山裕之（東京大学大学院農学生命科学研究科獣医病理学）

犬・猫に発生する腫瘍のうちで乳腺腫瘍は最も発生率が高く、それぞれ全腫瘍例中の40%弱を占めている。良性：悪性比率は犬でおおよそ1:1であるのに対し、猫では90%以上が悪性である。発生原因として、雌性ホルモンの関与が指摘されているが、その機構は未だ明らかで

ない。

治療法は外科的摘出がほとんどで、化学療法、放射線療法なども試みられているが効果は定かでない。外科的に摘出する場合は腫瘍が発生している側の乳腺を全摘出するのが一般的である。

病理組織分類では、犬の乳腺腫瘍はまず「良性」と「悪性」に大きく分け、それぞれで「上皮由来腫瘍」、「間葉由来腫瘍」および「混合腫瘍」に分ける。さらに上皮性は「単純上皮性」、「筋上皮を混じる複合性」、「扁平上皮などへの分化を示す特別な上皮性」に細分している。猫の乳腺腫瘍分類も犬と同様であるが、ほとんどが腺癌(悪性単純腺癌)である。

予後決定因子は、犬では人と同様、組織型、細胞の悪

性度、腫瘍サイズ、局所リンパ節転移の有無などであるが、猫の場合はほとんどが悪性なので、手術時期が予後を大きく左右する。

犬と猫の乳腺腫瘍は多発性であること、雌性ホルモン依存性であることなど生物学的に類似する点が多い。そこで、人疾患のモデルあるいはモニターとして犬、猫の乳腺腫瘍を研究することには大いに意義がある。

(3) 乳がんの臨床における現状 医学

細野芳樹 (岐阜大学医学部附属病院第2外科)

①乳がんの疫学

年齢別死亡数の変化、危険因子、発生と進展

②乳癌の検査と治療方針の流れ 1 (乳癌と診断するための検査) 乳房の触診・視診、マンモグラフィの基礎、超音波検査、病理学的検査(穿刺吸引細胞診、針組織診)

③乳癌の検査と治療方針の流れ 2 (治療方針を決めるための検査) 造影MRI検査(腫瘍進展範囲の検索)

④乳癌の検査と治療方針の流れ 3 (他臓器へ転移の有無を確認)

⑤乳癌の治療の流れ

乳癌の病期分類と治療方針(ステージ別治療方針)

⑥乳癌の進展に関する考え方

手術可能な乳癌は局所病である。Halstedの考え方

手術可能な乳癌であってもすでに全身病の状態である。

Fisherの考え方

⑦手術療法の変遷(縮小手術の方向へ)

⑧乳房部分切除術の適応

乳房部分切除後の放射線治療について

⑨腋窩リンパ節郭清の功罪

センチネルリンパ節生検の利点と欠点

⑩乳癌の検査と治療方針の流れ

(摘出標本による組織診 術後の治療方針の決定)

⑪術後の合併症

患肢のリンパ浮腫が問題になることが多い

⑫乳癌の治療方針

乳癌の予後規定因子とリスク分類

⑬術後療法(化学療法)

現在使用されている化学療法の有効性、副作用

⑭術後療法(内分泌療法)

抗エストロゲン剤などについて

⑮術後療法(分子標的治療薬)

トラスツズマブ(商品名ハーセプチン)

⑯再発乳癌の治療方針

転移性乳癌及び進行乳癌の生存率の変遷

⑰術後の経過観察期間

手術後10年間が目安、定期検診は必要となる

(4) 乳がんの臨床における現状 獣医学

伊東輝夫 (青葉動物病院)

ここでは犬の乳癌に関する臨床の現状について述べる。

発生状況

乳腺腫瘍は雌犬ではもっとも多い腫瘍であり、その約半数が悪性の乳癌で、乳癌の約半数が遠隔転移や再発を

おこすといわれている。

診断

犬の悪性乳腺腫瘍に適用されるWHOのTNM分類の評価基準に集約されている。

治療

犬の乳癌の治療は古くから手術切除が中心であり、悪性良性を問わず、見つかった腫瘍に対しては早期切除が原則となる。以下は術式の決定における考慮事項である。

腫瘍の進行度と術式：犬の乳癌では切除範囲の違いによる生存期間の差はないと報告されている。

予防としての乳腺全摘出術：腫瘍とともに乳腺全体を摘出しておくことがきわめて有効な予防手段となる。

補助療法としての避妊手術：前提としてホルモン依存性の腺癌であることが望ましい。

その他の補助療法：現段階では補助療法に関する情報は少ない。

患者のリスク評価

乳癌の再発や転移が予想されるハイリスク患者をどう選別するかは重要な課題になっている。

臨床的観点からの今後の課題

演者が特に重要と思うのは以下の5つである。

- ①国内の疫学データの作成
- ②術前評価の精度の向上
- ③各術式の効果を示すエビデンスをつくる
- ④信頼できる術後のリスク判定法の確立
- ⑤有効な術後補助療法の確立

医学・獣医学相互への提言

種を超えた乳癌の比較で病態の理解が深まることで、新たな治療戦略が生まれることに期待したい。

(5) 炎症性乳がんの現状と課題 医学

川口順敬（岐阜大学医学部附属病院第2外科）

炎症性乳がん (inflammatory breast cancer IBC) は広義の局所進行乳がんの特殊形で、急速に進行し予後も不良とされている。

1. 定義：IBCは1924年Lee and Tannenbaumによって命名され、「明らかな腫瘍を触れず、乳房の1/3を超える広範な浮腫、発赤、熱感、疼痛を伴い、急速な進展を示す予後不良な乳がん」と定義される。
2. 炎症性乳がんの頻度：日本の1994-2001年では、比率0.4-0.5%である。米国NCIによると、1990-92年0.7例/10000人・年となっている。
3. 各種マーカーと動向：炎症性乳癌は予後不良であり、癌細胞自体に生物学的異常増殖因子が潜在していると考

えられる。

4. 基本的治療の変遷と成績：IBCはほとんどが既にmicrometastasisを来したsystemic diseaseと考えるべきで、局所治療では改善できない。そこで術前化学療法neoadjuvant chemotherapyが考えられた。

5. 新規抗癌剤の導入と成果：1995年頃よりpaclitaxelやdocetaxelが、2000年頃よりtrastuzumabが臨床導入され、炎症性乳がんに一定の効果が示された。

6. 今後の展望：炎症性乳癌が他の一般的な乳癌と比べ、どのような生物学的な違いがあるのかを調べ遺伝子発現から解析する試みが行なわれている。

(6) 炎症性乳がんの現状と課題 獣医学

森 崇（岐阜大学応用生物科学部獣医臨床腫瘍学）

炎症性乳癌とは、浮腫や紅斑、熱感、疼痛などを伴い、極めて急速な進展を示す乳癌であり、その予後は極めて不良である。獣医学領域では、ほとんどの報告で浮腫や紅斑、疼痛などの臨床的な特徴のみで炎症性乳癌を分類しており、原発性と二次性を含めているものが多い。

犬の発生率は全乳癌に対して4.4%あるいは7.6%との報告がある。発症年齢は11.4歳であり、通常の乳腺腫瘍(9.9歳)よりも有意に高齢との報告がある。その臨床所見は特徴的で、乳腺の腫脹やびまん性の硬結、広範な発赤、浮腫、局所の熱感、疼痛等が認められる。来院したとき

にはすでに全身症状を示している場合が多い。

通常はその特異的な臨床症状から診断がつけられる。乳腺組織および皮膚の生検や、細針吸引による細胞診によっても充分確定できる。

腫瘍組織中の COX-2 濃度を EIA 法にて測定した報告によると、炎症性乳癌では最も COX-2 濃度が高く、さらに COX-2 濃度は皮膚の潰瘍、再発、転移、無病期間、生存期間と有意に関連していた。

現在のところ炎症性乳癌に対する有効な治療法は報告されていない。緩和的治療のみの場合、平均生存日数はわずか 25 日である。外科治療は禁忌と考えられており、化学療法や放射線治療と組み合わせた複合治療が必須となる。炎症性乳癌では COX-2 が上昇しているとの報告が存在することから、COX-2 阻害薬の有用性が期待される。

(7) 乳がんの最新トピックス 医学

川口順敬 (岐阜大学医学部附属病院第2外科)

1. 診断に関する最新トピックス

(1) センチネルリンパ節生検法

「センチネルリンパ節」を摘出し、転移の有無を確認し、患者の QOL を向上させることができる。

(2) DNA microarray

21 種の遺伝子の発現プロファイルを解析し、10 年後までの患者の予後予測、化学療法有効性の予測を行う。

2. 治療に関する最新トピックス

(1) 低侵襲手術

手術は縮小の一途をたどり、現在、乳房部分切除+放射線照射が標準的局所治療となっている。

a. RFA (Radion Frequency Ablation)

ラジオ波を用いて熱凝固を図る方法。

b. MR ガイド下集束超音波手術

MRI 撮影下に、超音波を腫瘍に集中させ、その熱によって腫瘍を熱凝固させる方法。

(2) 分子標的治療薬

HER-2 をターゲットとした分子標的治療

・Trastuzumab

分子量 148KDa のヒト化モノクローナル抗体である。

・Lapatinib

HER-1/HER-2 を共に阻害する新しい薬剤で、Trastuzumab 同様、HER-2 陽性乳癌患者に用いられる。

今後、EGFR や VEGFR に対する特異的抗体、小分子型チロシンキナーゼ阻害剤が続々と開発されている。

3. まとめ

これからの乳癌治療は集学的医療であり、また個別化治療になっていくものと思われる。

(8) 乳がんの最新トピックス 獣医学

丸尾幸嗣 (岐阜大学応用生物科学部獣医臨床腫瘍学)

伴侶動物の乳がん臨床における克服すべき課題

難治性乳がん焦点を絞って論議すべきである。

1. 犬高悪性度乳がんの効果的治療法の開発

悪性度が高く、術後早期に再発と遠隔転移が出現する乳がん症例に対する効果的治療法の検討が必要である。

2. 犬炎症性乳がんの効果的治療法の開発

炎症性乳がんについてはシンポジウム3で論議される。

3. 猫乳がんの効果的術後補助療法の開発

短命となる症例に対する補助療法の検討が必要である。

4. リンパ節切除範囲の見極め

センチネルリンパ節の識別法の研究が散見される。

5. 難治性乳がんの生物学的特性の解明と治療戦略

HER-2 がん遺伝子、血管新生因子 (VEGF)、COX-2 などの検討がなされている。

6. 遠隔転移など進行がん症例への対応

転移症例に対する効果的治療法および抗転移療法の

開発が期待される。

伴侶動物がん臨床の今後の方向性

がんの動物とその飼主を前にして、我々獣医師は何をしなければならぬのかを考察する。

1. エビデンスの発掘と集積

(1) がんデータベースの立ち上げ

わが国における犬猫がんデータベースを確立する。

(2) 臨床試験の実施体制の確立

早急に臨床試験を実施する体制づくりを確立すべきである。

2. 医学と獣医学の交流

がんの登録制度や臨床試験の実施など、医学からの情報を得るとともに、医学と獣医学の交流が継続的に行われることが大切である。

25. Okazaki Symposium 2007 On Obesity & Diabetes

2007年4月14日—4月15日

代表・世話人：児島 将康 (久留米大学分子生命科学研究所)

所内対応者：箕越 靖彦 (自然科学研究機構・生理学研究所)

- (1) Appetite control by gastrointestinal hormones and therapeutic potential of ghrelin for cachexia
Masamitsu Nakazato (Miyazaki Univ)
- (2) Young-adult specific hyperphagia due to NPY neuron hyperactivity is coupled with visceral obesity and leptin resistance in type 2 diabetic GK rats
Toshihiko Yada (Jichi Medical Univ)
- (3) A new anorexigenic molecule, nesfatin-1
Hiroyuki Shimizu (Gunma Univ)
- (4) Role of clusterin (apoprotein J) in the regulation of food intake and body weight
Minseon Kim (Ulsan Univ)
- (5) Pathophysiological roles of adiponectin and adipoRs
Toshimasa Yamauchi (Tokyo Univ)
- (6) Activation of the central melanocortin system mediates the restoration of skeletal muscle AMP-activated protein kinase in mice fed high fat diet
Hiroaki Masuzaki (Kyoto Univ)
- (7) Angiotensin-like factors (Angptls): potential new targets for therapy of obesity and related insulin resistance
Yuichi Oike (Kumamoto Univ)
- (8) Chemical shift of redox state of pyridine nucleotides reverses obesity and metabolic syndrome
Minho Shong (Chungnam National Univ)
- (9) Role of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma co-activator-1 alpha (PGC-1 alpha) in diabetes ; Friend and foe
In-Kyu Lee (Kyungpook Univ)
- (10) Genipin inhibits UCP2-mediated proton leak and acutely reverses obesity- and high glucose-induced β cell dysfunction in isolated pancreatic islets
Chen-Yu Zhang (Nanjing Univ)
- (11) LXR-mediated lipotoxicity in pancreatic beta-cells
Jae Bum Kim (Seoul National Univ)
- (12) Adipo-vascular crosstalk in obesity and cardiovascular disease
Ichiro Manabe (Tokyo Univ)
- (13) Molecular basis for obesity-related adipose tissue inflammation
Yoshihiro Ogawa (Tokyo Med Dent Univ)
- (14) Stresses on adipose tissue in obesity; ROS and Hypoxia, and their impact on adipocytokine dysregulation
Morihiro Matsuda (Osaka Univ)
- (15) Clinical implication of adipocytokines in pre-diabetes and high-risk patients of type 2 diabetes mellitus
Sung-Hee Choi (Seoul National Univ)
- (16) The role of forkhead transcription factor Foxo1 in pancreatic β cells and brain hypothalamus
Tadahiro Kitamura (Gunma Univ)

- (17) Activation of AMP-kinase in the paraventricular hypothalamus increases the preference for high carbohydrate diet in mice

Yasuhiko Minokoshi (NIPS)

- (18) Autonomic nerve circuits modulate energy and glucose metabolism

Tetsuya Yamada (Tohoku Univ)

- (19) Identification of neuromedin S and its possible role in the mammalian circadian oscillator system and feeding behavior

Takanori Ida (Kurume Univ)

【参加者名】

Inkyu Lee (Kyungpook National University), Kyong Soo Park (Seoul National University College of Medicine), Young-Bum Kim (Harvard Medical School), Jae Bum Kim, Sung Hee Choi (Seoul National University), Min-Seon Kim (University of Ulsan College of Medicine), Minho Shong (Chungnam National University School of Medicine), Chen-Yu Zhang (Nanjing University), 中里雅光 (宮崎大学), 尾池雄一 (熊本大学), 児島将康, 佐藤貴弘, 井田隆得 (久留米大学), 松田守弘 (大阪大学), 益崎裕章,

村松成暢, 宮木貴志 (京都大学), 山内敏正, 真鍋一郎, 大石由美子, 窪田哲也 (東京大学), 小川佳宏 (東京医科歯科大学), 北村忠弘, 清水弘行 (群馬大学), 黄虎 (筑波大学), 矢田俊彦, 前島裕子, 鳥谷真佐子, 須山成朝, 吉田なつ, 山本早和子 (自治医科大学), 山田哲也 (東北大学), 富永真琴, 福見-富永知子, 兼子佳子 (岡崎統合バイオサイエンスセンター), 箕越靖彦, 岡本土毅, 志内哲也, 鈴木敦, 李順姫, 戸田知得, 大和麻耶 (生理学研究所)

【概要】

肥満, 糖尿病などいわゆる生活習慣病は, 今や先進諸国のみならず一部の発展途上国における大きな社会問題であり, その克服は急務である。本研究会は, 当該分野における主として基礎的研究に携わる日韓研究者が集まり, 最新研究成果を発表することによって肥満・糖尿病の発症機構を理解するとともに, 今後の研究に役立てる事を目的とする。

近年, 肥満・糖尿病の発症, 増悪機構に関する研究は,

大きく進歩しつつある。中でも, 肥大した脂肪細胞を主因とするインスリン抵抗性の発現機構, 及び摂食行動の調節機構に関する個体・分子レベルの研究は大きく進展した。そこで本研究会では, 1) 摂食・エネルギー消費の調節機構, 2) インスリン・シグナルとインスリン抵抗性発症機構, 3) 肥満・糖尿病の発症にかかわる新規調節因子の3つのテーマに関して発表を行う。

- (1) Appetite control by gastrointestinal hormones and therapeutic potential of ghrelin for cachexia

Masamitsu Nakazato (Miyazaki Medical College, University of Miyazaki)

The gastrointestinal tract produces a large array of substances to regulate feeding. Energy balance is controlled by the complicated and minute interactions of substances to stimulate or suppress food intake and energy expenditure. The molecular mechanisms of energy balance are coming to light by the recent robust progresses in the molecular biology and neuroscience. Hypothalamus, the center of energy homeostasis, receives information related to satiety and fast from the body

and other brain regions, integrate them, and mediate interactions with efferent pathways. We have identified peptide ligands for orphan G-protein coupled receptors and studied their physiological and clinical implications in the regulation of energy homeostasis. We have clarified that the vagal afferent is the major pathway conveying signals of gut hormones to the brain. I will talk about a feeding-stimulating (orexigenic) peptide, ghrelin and its therapeutic potential in

cachexia. These findings will provide a clue to our better understanding of the molecular etiology of body weight control and the pathogenesis of obesity and anorexia in humans.

Ghrelin, an endogenous peptide ligand for the growth hormone secretagogue receptor, is produced mainly by stomach cells and stimulates hunger centers in the hypothalamus which controls food intake and body mass. Ghrelin secretion is stimulated upon energy deficits and induces food intake. The plasma ghrelin concentration is upregulated before meal and decreases after feeding. At present ghrelin is the only peptide to transmit hunger information from the periphery to the brain. Gastric ghrelin functions to maintain energy homeostasis. Plasma ghrelin levels in cachexic patients suffered from cancer, chronic heart

failure and respiratory failure are upregulated compared with non-cachexic patients, but its anabolic effect is insufficient to maintain body weight. Peripherally administered ghrelin stimulates appetite in normal volunteers. Some clinical trials to investigate therapeutic potentials of ghrelin in cachexia have started for patients with anorexia nervosa, cancer, chronic heart failure, and chronic obstructive pulmonary disease in Japan, USA, and European countries. Ghrelin suppresses proinflammatory cytokines expression in leukocytes and this anti-inflammatory activity has a potency to inhibit the development of cachexia induced by cancer progression. The effects of ghrelin on energy balance have implications in its potential use as a therapeutic target associated with cachexic and/or inflammatory diseases.

(2) Young-adult specific hyperphagia due to NPY neuron hyperactivity is coupled with visceral obesity and leptin resistance in type 2 diabetic GK rats

Toshihiko Yada¹, Fumihiko Maekawa¹, Daisuke Kohno¹, Yuko Maejima¹, Hideharu Kurita^{1,2} and Masako Toriya¹

(¹Division of Integrative Physiology, Department of Physiology,

²Department of Neurosurgery, Jichi Medical University School of Medicine)

GK rats, a model of type-2 diabetes with impaired insulin release and action, exhibited hyperphagia selectively at 6-13 weeks of age, while body weight was not changed, as compared to control Wistar rats. In 11 weeks-old hyperphagic GK rats, visceral fat was accumulated and plasma leptin was elevated. Leptin-induced suppression of food intake and phosphorylation of STAT3 in the hypothalamic arcuate nucleus (ARC) were markedly reduced, and NPY mRNA level in ARC was elevated. Intracerebroventricular (icv) injection of NPY Y1 receptor antagonist corrected the hyperphagia. The results indicate that the young-adult hyperphagia in GK rats is caused by hyperactivity of ARC NPY neurons, which may result from and/or lead to visceral fat accumulation and leptin resistance. Young-adult GK rats exhibit hyperphagia, visceral obesity and diabetes, providing a unique model of metabolic syndrome.

Here, an important question is “How leptin regulates NPY neurons?”, NPY neurons were isolated from young-adult (6 week) rats, and cytosolic Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) was measured by fura-2 fluorescence imaging. Ghrelin increased $[Ca^{2+}]_i$ in NPY neurons, and leptin counteracted the ghrelin-induced $[Ca^{2+}]_i$ increases. The leptin effect was blocked by inhibitors of PI3 kinase and phosphodiesterase 3 (PDE3), but not STAT3 and ATP-sensitive K^+ channels. Furthermore, stimulation of feeding by icv ghrelin in rats was counteracted by leptin in a PDE3-dependent manner.

Thus, the PI3 kinase- and PDE3-dependent leptin signaling plays a central role in suppressing the activity of ARC NPY neurons and thereby feeding. Dysfunction of this pathway may be involved in hyperphagia and visceral obesity in GK rats and possibly other models of diabetes and metabolic syndrome.

(3) A new anorexigenic molecule, nesfatin-1

Hiroyuki Shimizu, Shinsuke Oh-I, Masatomo Mori

(Department of Medicine and Molecular Science, Gunma University Graduate School of Medicine)

We identified a new anorexigenic molecule, nesfatin-1 by subtraction cloning assay. Nesfatin/NUCB2 is expressed in hypothalamic nuclei that are involved in the regulation of feeding behavior. The i.c.v. injection of nesfatin/NUCB2 inhibited food intake in rats, while i.c.v. injection of the antibody against nesfatin/NUCB2 increased food intake. Prohormone convertase-1, 3 and -2 co-localized with nesfatin/NUCB2, indicating that this molecule can be processed by PC-1, 3 or -2. Nesfatin-1 existed in rat cerebrospinal fluid. The i.c.v. injection of nesfatin-1 decreased food intake in a dose-dependent manner, whereas injection of an antibody neutralizing nesfatin-1 stimulated appetite. In contrast, i.c.v. injection of other possible fragments processed from nesfatin/NUCB2 (nesfatin-2, nesfatin-3) did not promote satiety, and the mutant form of nesfatin (A83A84) failed to show any inhibition of food intake. These data indicated that conversion of nesfatin/NUCB2 to nesfatin-1 is necessary to induce feeding

suppression. Chronic i.c.v. injection of nesfatin-1 reduced body weight, whereas rats gain body weight after chronic icv injection of an antisense morpholino-oligonucleotide against the nesfatin gene. The i.c.v. injection of nesfatin-1 reduced food intake in Zucker fatty rats with a leptin receptor mutation, and an anti-nesfatin-1 antibody did not block the leptin-induced anorexia. Treatment with i.c.v. injection of SHU9119, an antagonist specific for the melanocortin 3/4 receptor, completely abolished the anorexia by i.c.v. nesfatin-1 injection. However, i.c.v. injection of nesfatin-1 did not affect the expression of the genes encoding proopiomelanocortin in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. Intraperitoneal injection of nesfatin-1 dose-dependently inhibited food consumption in mice. Nesfatin-1 may be involved in the physiological regulation of appetite, and it inhibits food intake, independent of leptin pathway. Nesfatin-1 may be one of possible candidates for the treatment of human obesity.

(4) Role of clusterin (apoprotein J) in the regulation of food intake and body weight

Minseon Kim

(Department of Internal Medicine University of Ulsan College of Medicine)

Clusterin (apoprotein J) is the 80 kDa disulfide-linked glycoprotein that is abundantly present in plasma, cerebrospinal fluid and seminal fluid. Clusterin has been implicated in lipoprotein transport, complement-mediated cell lysis, sperm maturation, cell migration and apoptosis. However, its major physiologic role is not still unclear.

Clusterin (apoprotein J) is expressed in the hypothalamus, a key organ regulating food intake and body weight. We have found that hypothalamic clusterin expression was increased by food intake but this change was blunted in obese ob/ob mouse, suggesting that clusterin may have a role in the control of food intake and body weight. To investigate the

role of clusterin in the hypothalamus, we administered synthetic full length secretory form of clusterin into the 3rd cerebroventricle, adjacent to the hypothalamus, of C57BL/6J mice and monitored food intake and body weight. ICV administration of clusterin significantly decreased fasting-induced feeding and reduced body weight at 24 h post injection. Consistent with these findings, bilateral injection of clusterin-adenovirus in mediobasal hypothalamus decreased food intake but increased energy expenditure, resulting in decreased body weight. Similarly to leptin, a representative anorexigenic hormone, ICV administration of clusterin increased Signal Transducer Activated Transcript (STAT)-3

phosphorylation in the hypothalamic neurons. Co-administration of sub-clinical dose of clusterin potentiates the

anorexigenic effect of leptin. Our data identify clusterin as a novel anorexigenic molecule.

(5) Pathophysiological roles of adiponectin and AdipoRs

Toshimasa Yamauchi¹, Takashi Kadowaki²

(¹Department of Integrated Molecular Science on Metabolic Diseases,
22nd Century Medical and Research Center

²Department of Metabolic Diseases, Graduate School of Medicine,
University of Tokyo)

We identified adiponectin as therapeutic target for metabolic syndrome by using the combination of genome-wide scanning and the use of DNA chips. Genetic studies on SNPs of adiponectin gene as well as functional analyses including generation of adiponectin transgenic or knockout mice suggest that reduced adiponectin levels play a causal role in the development of metabolic syndrome. Moreover, the human adiponectin mutations analyses led to identification of high molecular weight (HMW) adiponectin as most active form. We then developed a novel ELISA system and showed that measurement of HMW is useful for the prediction of metabolic syndrome.

We also identified adiponectin receptors (AdipoR1 and R2) by expression cloning and found that AdipoRs were also decreased in obesity. Functional analyses including

generation of AdipoRs knockout mice or overexpression by adenoviruses suggest that AdipoRs are required for adiponectin binding and effects thus the major adiponectin receptors, and that not only agonism of AdipoRs but also strategies to increase AdipoRs should serve as versatile treatment strategies for metabolic syndrome. Moreover, network analyses revealed that AdipoR1 may be tightly linked to activation of AMP kinase pathway, whereas AdipoR2 may be tightly linked to activation of PPAR alpha pathway.

Finally, we showed that PPARgamma agonist up-regulated total and HMW adiponectin, whereas PPARalpha agonist up-regulated adiponectin receptors. Moreover, we showed osmotin, present in fruits and vegetables, activated AMPK via AdipoRs in myocytes.

(6) Activation of the central melanocortin system mediates the restoration of skeletal muscle AMP-activated protein kinase in mice fed high fat diet

Hiroaki Masuzaki¹, Tomohiro Tanaka¹, Shintaro Yasue¹, Takako Ishii¹, Naoki Arai¹,
Toru Kusakabe¹, Fumiko Miyanaga¹, Ken Ebihara¹, Masakazu Hirata¹, Kiminori Hosoda¹,
Tetsuya Shiuchi², Yasuhiko Minokoshi², Kazuwa Nakao¹

(¹Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Medicine and Clinical Science,
Kyoto University Graduate School of Medicine

²Department of Developmental Physiology, National Institute for Physiological Sciences)

Little is known about a role of central melanocortin system in the control of fuel metabolism in the peripheral tissues. Skeletal muscle AMP-activated protein kinase (AMPK) is

activated by leptin and serves as a master regulator of fatty acid β -oxidation. To elucidate an unidentified role of central melanocortin in muscle AMPK regulation, we treated

conscious, unrestrained mice intracerebroventricularly with melanocortin agonist: MT-II or antagonist: SHU9119. MT-II augmented phosphorylation of AMPK and its target acetyl-CoA carboxylase (ACC) independent of caloric intake. Conversely, AMPK/ACC phosphorylation by leptin was abrogated by the co-administration of SHU9119, or in KKAY mice, which centrally express endogenous melanocortin

antagonist. Importantly, high-fat diet-induced attenuation in AMPK/ACC phosphorylation in leptin-overexpressing transgenic mice was not reversed by central leptin, but markedly recovered by MT-II. Our data provide the first evidence of a critical role of central melanocortin in leptin-skeletal muscle AMPK axis, and highlight the system as a therapeutic target in leptin-resistance.

(7) Angiopoietin-like factors (Angptls): potential new targets for therapy of obesity and related insulin resistance

Yuichi Oike^{1,2,3}

¹Department of Molecular Genetics, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University,

²Laboratory of Vascular Biology & Metabolism, Center for Integrated Medical Research, School of Medicine, Keio University,

³PRESTO, Japan Science Technology Agency (JST))

Obesity is an increasingly prevalent medical and social problem with potentially devastating consequences because it clusters with type 2 diabetes, hypertension and hyperlipidemia in the metabolic syndrome, which is an important risk factor for cardiovascular disease incidence and mortality. The molecular mechanisms underlying obesity have not been fully clarified, and effective therapeutic approaches are currently of general interest. We identified angiopoietin-related growth factor (AGF, also known as Angptl6 and encoded by the gene *Angptl6*) as a member of the *Angptl* family and showed that it is a circulating orphan protein that induces angiogenesis.

Furthermore, AGF has been shown to counteract obesity and related insulin resistance, suggesting a possible role of AGF in the reduction of the cardiovascular disease. More recently, we analyzed the associations between serum AGF concentrations and several clinical parameters using our newly developed ELISA system in human. In this presentation, as a first topic, I will discuss recent findings regarding the role of AGF in obesity and insulin resistance in mice and human. And then, as a second subject, I would like to show the new role of *Angptl2*, which is a member of the *Angptl* family, in obesity and insulin resistance in mice.

(8) Chemical shift of redox state of pyridine nucleotides reverses obesity and metabolic syndrome

Minho Shong

(Laboratory of Endocrine Cell Biology, National Research Laboratory Program, Department of Internal Medicine, Chungnam National University School of Medicine)

Due to increasing worldwide incidence of metabolic syndrome, there is urgent need for effective novel therapeutic modalities to treat this disease. Currently, the most reliable therapeutic approach to metabolic syndrome is to restrict

caloric intake and to increase energy expenditure through exercise, thus creating a negative energy balance and subsequent weight loss. The pyridine nucleotides, NAD(P)⁺ and NAD(P)H play important roles in cellular energy

metabolism and metabolic homeostasis by regulating mitochondrial oxidative phosphorylation and numerous enzymatic functions such as Sirt family proteins. When the cytoplasmic NAD(P)⁺ to NAD(P)H ratio is high, the rates of glycolysis, fatty acid oxidation and mitochondrial oxidative phosphorylation increase. This observation suggests that a pharmacologically-induced increase in the cytoplasmic NAD(P)⁺/NAD(P)H ratio might stimulate mitochondrial oxidative phosphorylation and adaptive mitochondrial biogenesis. Furthermore, this might be a useful therapeutic approach for patients with metabolic syndrome. When cytoplasmic NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) is activated by exogenous compounds, the cytoplasmic NAD(P)⁺/NAD(P)H equilibrium is shifted towards oxidized NAD(P)⁺. Under these conditions, the high NAD(P)⁺/NAD(P)H ratio stimulates mitochondrial oxidative phosphorylation and glycolysis and activates sirtuins. Here we show that the mechanism by which NQO1-mediated oxidation of NAD(P)H leads to enhanced mitochondrial fatty acid oxidation involves activation of AMP-activated protein kinase (AMPK). Furthermore, NQO1-mediated oxidation of NAD(P)H ameliorates most of phenotypes of metabolic syndrome, including obesity, glucose intolerance, dyslipidemia, and fatty liver disease in ob/ob mice and in mice on a high-calorie diet with diet-induced obesity. These phenotypic changes are associated with increased mitochondrial biogenesis and higher energy expenditure. These observations demonstrate that an NQO1-mediated shift in the NAD(P)⁺/NAD(P)H ratio may provide a novel pharmacological approach for treating the symptoms of metabolic syndrome including obesity. Due to increasing worldwide incidence of metabolic syndrome, there is urgent need for effective novel therapeutic modalities to treat this disease. Currently, the most reliable therapeutic approach to metabolic syndrome is to restrict caloric intake and to

increase energy expenditure through exercise, thus creating a negative energy balance and subsequent weight loss. The pyridine nucleotides, NAD(P)⁺ and NAD(P)H play important roles in cellular energy metabolism and metabolic homeostasis by regulating mitochondrial oxidative phosphorylation and numerous enzymatic functions such as Sirt family proteins. When the cytoplasmic NAD(P)⁺ to NAD(P)H ratio is high, the rates of glycolysis, fatty acid oxidation and mitochondrial oxidative phosphorylation increase. This observation suggests that a pharmacologically-induced increase in the cytoplasmic NAD(P)⁺/NAD(P)H ratio might stimulate mitochondrial oxidative phosphorylation and adaptive mitochondrial biogenesis. Furthermore, this might be a useful therapeutic approach for patients with metabolic syndrome. When cytoplasmic NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) is activated by exogenous compounds, the cytoplasmic NAD(P)⁺/NAD(P)H equilibrium is shifted towards oxidized NAD(P)⁺. Under these conditions, the high NAD(P)⁺/NAD(P)H ratio stimulates mitochondrial oxidative phosphorylation and glycolysis and activates sirtuins. Here we show that the mechanism by which NQO1-mediated oxidation of NAD(P)H leads to enhanced mitochondrial fatty acid oxidation involves activation of AMP-activated protein kinase (AMPK). Furthermore, NQO1-mediated oxidation of NAD(P)H ameliorates most of phenotypes of metabolic syndrome, including obesity, glucose intolerance, dyslipidemia, and fatty liver disease in ob/ob mice and in mice on a high-calorie diet with diet-induced obesity. These phenotypic changes are associated with increased mitochondrial biogenesis and higher energy expenditure. These observations demonstrate that an NQO1-mediated shift in the NAD(P)⁺/NAD(P)H ratio may provide a novel pharmacological approach for treating the symptoms of metabolic syndrome including obesity.

(9) Role of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma co-activator-1 alpha (PGC-1 alpha) in diabetes ; Friend and foe

In-Kyu Lee

(Department of Internal Medicine, Kyungpook National University Hospital, School of Medicine, Kyungpook National University)

The peroxisome proliferators-activated receptor- γ co-activator-1 α (GC-1 α) is a transcriptional coactivator identified as an upstream regulator of mitochondrial number and function. PGC-1 α is expressed in human aortic smooth muscle cells (HASMCs) as well as endothelial cells (HAECs) and is up-regulated by AMPK activators including metformin, rosiglitazone and alpha-lipoic acid. Tumor necrosis factor- α (TNF- α), major proinflammatory factor in the development of vascular inflammation, stimulated intracellular ROS production through increases in both mitochondrial ROS and NAD(P)H oxidase activity.

Adenovirus-mediate overexpression of the PGC-1 α gene to HASMCs and HAECs profoundly reduced intracellular ROS production, mitochondrial ROS production and

NAD(P)H oxidase activity. Consequently, it decreased NF- κ activation and expression of MCP-1 and VCAM-1 that were induced by TNF- α . This study presents the possibility that the agents increasing PGC-1 α expression in the vasculature may help prevent the development of atherosclerosis.

Recent report showed that PGC-1 α is also expressed in pancreatic β cells and its expression level is markedly elevated in diabetic animal models, including partially pancreatectomized rats. Defective insulin secretion was found in PGC-1 α -overexpressed pancreatic islets through down-regulation of the expression of transcription factor including PDX-1 as well as ATP production.

Herein, we found new molecular mechanism by which PGC-1 α decreases insulin gene expression.

(10) Genipin inhibits UCP2-mediated proton leak and acutely reverses obesity- and high glucose-induced β cell dysfunction in isolated pancreatic islets

Chen-Yu Zhang

(State Key Laboratory of Pharmaceutial Biotechnology, School of Life Sciences, Nanjing University)

Uncoupling protein (UCP) 2 negatively regulates insulin secretion. UCP2 deficiency (by means of gene knockout) improves obesity and hyperglycemia-induced β -cell dysfunction, and consequently improves type 2 diabetes. In the present study, we have identified a cell-permeable inhibitor of UCP2, genipin. In isolated mitochondria, genipin specifically inhibits UCP2- and UCP3-mediated proton leak, which is induced by exogenously added superoxide. In pancreatic islets, genipin

increases mitochondrial membrane potential and stimulates insulin secretion in a UCP2- dependent manner. Importantly, acute addition of genipin to isolated islets reverses hyperglycemia-and obesity-induced β -cell dysfunction. Therefore, genipin (or derivatives) represent a new class of compounds that might be useful for the treatment of β -cell dysfunction and type 2 diabetes.

(11) LXR-mediated lipotoxicity in pancreatic beta-cells

Sung Sik Choe, A Hyun Choi, Joo Won Lee, Jae Bum Kim

(Department of Biological Sciences, Research Center for Functional Cellulomics, Seoul National University)

Type 2 diabetes mellitus is characterized by hyperglycemia, insulin resistance, and defective insulin secretion. During the early phase of type 2 diabetes, normal blood glucose levels are maintained by a compensatory response in which pancreatic β cells increase insulin secretion. However, these cells gradually lose their ability to keep up with the prolonged high demand and eventually undergo apoptosis. The accumulation of excess lipid in the pancreatic islets of obese subjects (with type 2 diabetes) has been implicated as being one of the main causes of β -cell dysregulation. It has also been observed that chronic hyperlipidemia contributes to β -cell dysfunction in an interdependent manner with hyperglycemia. Despite considerable effort to decipher the detailed mechanisms behind this phenomenon, it is still unclear how hyperlipidemia induces β -cell failure under hyperglycemic conditions of type 2 diabetes.

Liver X receptor (LXR) α and LXR β play important roles in fatty acid metabolism and cholesterol homeostasis.

Although the functional roles of LXR in the liver, intestine, fat, and macrophage are well established, its role in pancreatic β -cells has not been clearly defined. In this study, we revealed that chronic activation of LXR contributes to lipotoxicity-induced β -cell dysfunction. We observed significantly elevated expression of LXR in the islets of diabetic rodent models, including fa/fa ZDF rats, OLETF rats, and db/db mice. In primary pancreatic islets and INS-1 insulinoma cells, activation of LXR with a synthetic ligand, T0901317, stimulated the expression the lipogenic genes ADD1/SREBP1c, FAS, and ACC, and resulted in increased intracellular lipid accumulation. Moreover, chronic LXR activation induced apoptosis in pancreatic islets and INS-1 cells, which was synergistically promoted by high glucose condition. Taken together, we suggest lipid accumulation due to chronic activation of LXR in β -cells as a possible cause of β -cell lipotoxicity, a key step in the development of type 2 diabetes mellitus.

(12) Adipo-vascular crosstalk in obesity and cardiovascular disease

Ichiro Manabe

(Nano-Bioengineering Education Program, The University of Tokyo Graduate School of Medicine)

We identified KLF5, a member of the Krüppel-like zinc finger transcription factor family, as a factor that plays a critical role in cardiovascular disease. KLF5 heterozygous knockout (KLF5^{+/-}) mice exhibit much reduced neointima formation, adventitial reactivity, and angiogenesis following vascular injury. They also showed reduced cardiac hypertrophy and fibrosis. Interestingly, KLF5 also crucially involved in adipogenesis. KLF5^{+/-} exhibited impaired WAT development. KLF5 is induced by C/EBP β and δ and activates PPAR γ promoter, thus mediating the early and late differentiation programs of 3T3-L1 adipocytes. Moreover, when KLF5^{+/-} were fed with high fat diet, they showed clear

resistance to high-fat diet-induced obesity and were protected from hypercholesterolemia, glucose intolerance and hepatic steatosis. Thus KLF5 appears to play roles in both injurious stress response and metabolic stress response, suggesting that it may be a common stress response factor in the cardiovascular and metabolic systems. Given that other transcription factors including C/EBP and Foxo play roles in the both systems, there might be a number of common stress response mechanisms. Indeed, by developing a novel living tissue imaging method we found that obesity of adipose tissue involves structural changes similar to those observed in atherogenesis. Furthermore, adipogenesis in obesity was

tightly coupled with angiogenesis. Taken together, there appear to be extensive crosstalk between blood vessels and adipocytes in obesity and there may be common molecular

mechanisms that regulate cellular stress response and tissue remodeling in obesity and atherosclerosis.

(13) Molecular basis for obesity-related adipose tissue inflammation

Yoshihiro Ogawa^{1,2}, Takayoshi Suganami¹

(¹Department of Molecular Medicine and Metabolism,

²Center of Excellence Program for Frontier Research on Molecular Destruction and Reconstitution of Tooth and Bone, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University)

Evidence has accumulated indicating that weight gain is associated with infiltration of fat by macrophages. Using an in vitro co-culture system composed of 3T3-L1 adipocytes and RAW264 macrophages, we demonstrated that a paracrine loop involving saturated fatty acids and TNF α derived from adipocytes and macrophages, respectively, establishes a vicious cycle that aggravates inflammatory changes in obese adipose tissue (Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 25:2062-2068, 2005). Pharmacological inhibition of NF- κ B suppressed the co-culture-induced production of pro-inflammatory cytokines and adipocyte lipolysis. Peritoneal macrophages obtained from C3H/HeJ mice carrying a TLR4 mutation exhibited marked attenuation of TNF α production in response to saturated fatty acids. Notably, co-culture of hypertrophied adipocytes and C3H/HeJ macrophages resulted in the marked inhibition of pro-inflammatory cytokine production and adipocyte

lipolysis. We also observed that endogenous fatty acids, which are released from adipocytes via the β -adrenergic stimulation, result in the activation of the TLR4/NF- κ B pathway. Collectively, we postulate that saturated fatty acids, which are released in large quantities from hypertrophied adipocytes via the macrophage-induced adipocyte lipolysis, serve as a naturally occurring ligand for TLR4, thereby inducing the inflammatory changes in obese adipose tissue (Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 27:84-91, 2007). Very recently, we have demonstrated the attenuation of adipose tissue inflammation in C3H/HeJ mice relative to control C3H/HeN mice during a high-fat diet (Biochem. Biophys. Res. Commun. 354:45-49, 2007). Our data suggest that the saturated fatty acids/TLR4/NF- κ pathway plays a critical role in obesity-related adipose tissue inflammation and thus help identify the therapeutic targets that may reduce obesity-induced inflammation and the metabolic syndrome.

(14) Stresses on adipose tissue in obesity; ROS and hypoxia, and their impact on adipocytokine dysregulation

Morihiro Matsuda, Iichiro Shimomura

(Department of Metabolic Medicine, Graduate School of Medicine, Osaka University)

Obesity is linked to a variety of metabolic disorders, such as insulin resistance. Dysregulated production of fat-derived secretory factors, adipocytokines, is partly responsible for obesity-linked metabolic disorders. However, the mechanistic role of obesity per se to adipocytokine dysregulation has not

been fully elucidated. In this regard, we have focused on two kinds of obesity-associated stresses in adipose tissue, ROS and hypoxia.

First, we investigated oxidative stress in adipose tissue. Fat accumulation correlated with systemic oxidative stress in

humans and mice. Production of ROS increased selectively in adipose tissue of obese mice, accompanied by augmented expression of NADPH oxidase and decreased expression of antioxidative enzymes. In cultured adipocytes, elevated levels of fatty acids increased oxidative stress via NADPH oxidase activation, and oxidative stress caused dysregulated production of adipocytokines, including adiponectin, PAI-1, IL-6, and MCP-1. Finally, in obese mice, treatment with NADPH oxidase inhibitor reduced ROS production in adipose tissue, attenuated the dysregulation of adipocytokines, and improved diabetes.

Next, we investigated hypoxia in obese adipose tissue. Tissue hypoxia was confirmed by an exogenous marker, pimonidazole, and by elevated concentration of lactate, an endogenous marker. Moreover, local tissue hypoperfusion (measured by colored microspheres) was confirmed in

adipose tissue of obese mice. Adiponectin mRNA expression was decreased, and mRNA of C/EBP homologous protein (CHOP), an ER-stress mediated protein, was significantly increased in adipose tissue of obese mice. In 3T3-L1 adipocytes, hypoxia dysregulated the expression of adipocytokines, such as adiponectin and PAI-1, and increased the mRNAs of ER stress marker genes, CHOP and GRP78. Expression of CHOP attenuated adiponectin promoter activity, and RNA interference of CHOP partly reversed hypoxia-induced suppression of adiponectin mRNA expression in adipocytes.

Collectively, our results suggest that increased oxidative stress and hypoxia in adipose tissues underlie the dysregulated production of adipocytokines and metabolic syndrome in obesity.

(15) Clinical implication of adipocytokines in pre-diabetes and high-risk patients of type 2 diabetes mellitus

Sung Hee Choi, Soo Heon Kwak, Soo Lim, Young Min Cho, Kyong Soo Park,
Hong Kyu Lee, Young Bum Kim, Hak Chul Jang
(Department of Internal Medicine, Seoul National University)

Dysregulation of adipokines is closely associated with glucose homeostasis and affects insulin sensitivity in many tissues.

Studies suggest that alterations in circulating levels of RBP4 and adiponectin may regulate systemic glucose metabolism and represent a possible mechanism linking insulin resistance to type 2 diabetes mellitus (DM). We want to investigate the possible clinical role of these novel adipocyte-derived adipokines in prediabetes and gestational diabetes patients, who are at high risk for developing type 2 DM.

To determine whether circulating adipokines contribute to the development of abnormal glucose homeostasis in women with a history of GDM, we measured plasma retinol binding protein-4 (RBP4), adiponectin, and the metabolic parameters of insulin resistance. Here we show that plasma RBP4 levels were significantly higher in subjects with DM-pGDM and IGT-pGDM, than in subjects with NGT-pGDM and NP.

RBP4 levels correlated positively with blood pressure, fasting plasma glucose levels, fasting insulin levels, triglyceride levels, abdominal fat area, and HOMA-IR. In contrast, circulating adiponectin levels were reduced in subjects who had type 2 diabetes after GDM compared to the other groups and correlated inversely with parameters of insulin resistance. Moreover, an inverse correlation between plasma RBP-4 and adiponectin levels was observed, suggesting reciprocal regulation of these adipokines.

In other study we measured endothelial dysfunction of metabolic syndrome patients compared to type 2 DM patients. For improvement of endothelial dysfunction after PPAR-gamma agonist treatment, the level of adiponectin increment shows strongest correlation in both group. The amount of adiponectin increment was 2-fold higher in metabolic syndrome group. Our group measured plasma concentrations of human RBP4 and compared them with various parameters associated with insulin resistance in the

subjects with normal glucose tolerance (NGT, n = 57), impaired glucose tolerance (IGT, n = 48), and type 2 diabetes mellitus (DM, n = 49). The plasma RBP4 concentrations were higher in IGT and DM groups compared to NGT group

(median [range] was 18.9 [11.2-45.8], 20.9 [9.9-48.5], and 18.1 [9.3-30.5] μ /ml, respectively). However, there was no difference in plasma RBP4 concentration between IGT and DM groups.

(16) The role of forkhead transcription factor Foxo1 in pancreatic β cells and brain hypothalamus

Tadahiro Kitamura

(Metabolic Signal Research Center, Institute for Molecular and Cellular Regulation, Gunma University)

Type 2 diabetes is caused by the insulin resistance in peripheral tissues, such as liver, skeletal muscle and adipose tissue and the dysfunction of pancreatic β cells. It has been recently suggested that the failure of central regulation of energy homeostasis also accounts for the development of type 2 diabetes. Recent studies showed that PI3-kinase/Akt pathway is the most important pathway in the metabolic functions of insulin. We focused on forkhead transcription factor FoxO1, a downstream target of Akt. FoxO1 regulates glucose and lipid metabolism in liver, as well as preadipocyte, myoblast and vascular endothelial cell differentiation. In the symposium, I will talk about the roles of FoxO1 in pancreatic β cells and brain hypothalamus. FoxO1 inhibits β cell proliferation through competition with FoxA2 for binding to Pdx1 promoter. On the other hand, the expression pattern of FoxO1 during pancreas development is identical to the pattern

of Pdx1, Nkx2.2 and Pax4, transcription factors known to be critical for β cell development, suggesting that FoxO1 may play an important role in β cell differentiation.

Insulin and leptin control energy homeostasis through regulation of orexigenic (Agrp) and anorexigenic (Pomc) neuropeptides in the hypothalamus. However, the molecular mechanism by which insulin and leptin regulate Agrp and Pomc expression is unclear. We performed microinjection of adenovirus expressing constitutively active FoxO1 directly into the hypothalamic arcuate nucleus of rats, and showed that food intake and body weight were increased in these rats compared to control rats. FoxO1 increases Agrp and decreases Pomc transcription through the competition with Stat3 for binding to Agrp and Pomc promoters, which results in the increase in food intake.

(17) Activation of AMP-kinase in the paraventricular hypothalamus increases the preference for high carbohydrate diet in mice

Shiki Okamoto, Tetsuya Shiuchi, Atsushi Suzuki, Suni Lee, Yasuhiko Minokoshi

(Division of Endocrinology and Metabolism, National Institute for Physiological Sciences)

The hypothalamic AMP-kinase regulates feeding behavior in response to hormonal and nutrient signals. Decrease of AMP-kinase activity in the paraventricular (PVH) and arcuate hypothalamus plays an important role in anorexic effect of leptin. However, the effect of AMP-kinase on long-term energy balance remains to be established. In the present study, we examined the effect of chronic expression of

constitutively-active AMP-kinase (CA-AMPK) in the PVH on food intake and body weight in male C57BL/6J mice, using lenti-viral vector with neuron specific-synapsin 1 promoter.

CA-AMPK in the PVH significantly increased body weight (CA-AMPK mice: 11.0 ± 1.5 g vs. the control mice: 3.5 ± 0.3 g, during 3 months after the infection). CA-AMPK mice also increased food intake before the increase in body weight

(CA-AMPK mice: 14.8 ± 0.9 kcal vs. control mice: 12.9 ± 0.1 kcal/day, 1 month after the infection). Interestingly, CA-AMPK mice increased food intake only under high carbohydrate diet (lob chow or high sucrose diet) but not under high fat diet (68% lard), while the control mice increased the intake of high fat diet but not high carbohydrate diet (intake of high fat diet in CA-AMPK mice: 11.7 ± 0.9 kcal and in the control mice: 16.5 ± 0.9 kcal/day). When high sucrose and high fat diets are simultaneously available, CA-AMPK mice chose high sucrose diet, whereas the control mice chose high fat diet. CA-AMPK increased the mRNA

expression of fatty acid oxidation-related genes in the PVH such as PPAR alpha, FATP1, acyl-CoA synthetase1 and CPT-1c. Direct administration of etomoxir, an inhibitor of CPT-1 and fatty acid oxidation in mitochondria, into the PVH in the CA-AMPK mice, reversed to the high preference for high fat diet.

Thus, these findings suggest that AMP-kinase in the PVH regulates not only calorie intake but also the preference for carbohydrate and fat diets. AMP-kinase in the PVH may control the food preference by changing fatty acid metabolism in the nucleus.

(18) Autonomic nerve circuits modulate energy and glucose metabolism

Tetsuya Yamada¹, Hideki Katagiri²

¹Division of Molecular Metabolism and Diabetes

²Division of Advanced Therapeutics for Metabolic Diseases

Tohoku University School of Medicine)

Cross-talk between organs/tissues plays important roles in regulating energy metabolism and maintaining glucose homeostasis. However, it remains unclear whether and how the liver transmits metabolic signals to other tissues/organs. In this study, we have identified a neuronal pathway that participates in this cross-talk. Reportedly, hepatic PPAR γ expression is functionally enhanced in obese models and plays a role in not only hepatic but also peripheral lipid accumulation. Herein, adenovirus-mediated PPAR γ 2 expression in the liver acutely aggravated hepatic steatosis on high fat chow loading, but remarkably diminished adipose tissues. For example, epididymal fat weight was decreased by 46.6% in PPAR γ -mice as compared to controls. In addition, resting oxygen consumption was markedly increased, by 29.4%, in PPAR γ 2-mice. Glucose tolerance and insulin tolerance tests as well as hyperinsulinemic euglycemic clamp experiments showed that hepatic expression of PPAR γ 2 markedly improved glucose tolerance and insulin sensitivity.

Furthermore, improved insulin sensitivity in the periphery was confirmed by enhanced tyrosine phosphorylation of the insulin receptor and IRS-1 in response to insulin administration. In PPAR γ 2-mice, hepatic vagotomy had no effect on the PPAR γ 2-induced phenotypes in the liver, but, interestingly, blocked the remote effects, including the reduction in peripheral adiposity, the increments in resting oxygen consumption and the improvements of glucose tolerance as well as insulin sensitivity. Furthermore, perivagal capsaicin application blocked the reduction in peripheral adiposity, confirming involvement of the afferent vagus in the remote effects of hepatic PPAR γ 2 expression. Thus, the liver is likely to transmit metabolic signals via the afferent vagus. This novel neuronal pathway originating in the liver may regulate energy expenditure, fat storage redistribution as well as systemic insulin sensitivity, and is a potential therapeutic target against the metabolic syndrome.

(19) Identification of neuromedin S and its possible role in the mammalian circadian oscillator system and feeding behavior

T. Ida¹, K. Mori², M. Miyazato², N. Murakami³, K. Kangawa², T. Sato¹, M. Kojima¹

¹Department of Molecular Genetics, Institute of Life Sciences, Kurume University

²Department of Biochemistry, National Cardiovascular Center Research Institute

³Department of Veterinary Physiology, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki

We identified a novel neuropeptide of 36 amino-acid residues in rat brain as an endogenous ligand for the orphan G protein-coupled receptor FM-4/TGR-1, which was identified to date as the neuromedin U (NMU) receptor, and designate this peptide 'neuromedin S (NMS)' because it is specifically expressed in the suprachiasmatic nuclei (SCN) of the hypothalamus. NMS shares a C-terminal core structure with NMU. In rat brain, NMS expression is restricted to the core of the SCN and has a diurnal peak under light/dark cycling. Intracerebroventricular (icv) administration of NMS in rats activates SCN neurons and induces nonphotic type phase shifts in the circadian rhythm of locomotor activity and

decreased 12-h food intake during the dark period in rats. This anorexigenic effect was more potent and persistent than that observed with the same dose of NMU. Icv administration of NMS increased POMC mRNA expression in the arcuate nucleus (Arc) and CRH mRNA in the paraventricular nucleus (PVN). Pretreatment with SHU9119 (antagonist for α melanocyte-stimulating hormone) and α -helical CRF-(9-41) (antagonist for CRH) attenuated NMS-induced suppression of 24 h food intake. These findings suggest that NMS is implicated in the regulation of circadian rhythms and feeding behavior.

26. 位相差電子顕微鏡から見た顕微鏡染色体構造とダイナミクス

2007 年 7 月 19 日

代表・世話人：仁木 宏典 (国立遺伝学研究所 系統生物研究センター)

所内対応者：永山 國昭 (岡崎統合バイオサイエンスセンター)

(1) はじめにー「核酸特異的電子顕微鏡観察と染色体構造」

永山 國昭 (岡崎統合バイオサイエンスセンター)

(2) リボソーム RNA 遺伝子の増幅のダイナミクス

小林 武彦 (国立遺伝学研究所細胞遺伝研究部門)

(3) Capture と Tension の分子感知システム

高橋 考太 (久留米大学 分子生命科学研究所 細胞工学研究部門)

(4) 核内染色体テリトリーの 3 次元解析について

田辺 秀之 (総合研究大学院大学 先導科学研究科)

(5) 染色体を構築する分子メタボリズム

広田 亨 (癌研究会癌研究所)

(6) 核小体の分離と均等分配

仁木 宏典 (国立遺伝学研究所 系統生物研究センター)

(7) 染色体を「見る」ー分裂期染色体のヒトゲノムの高次構造

前島一博 (理化学研究所・中央研究所今本細胞核機能研究室)

(8) キネトコアタンパク質複合体の機能解析と電子顕微鏡観察への展望

深川 竜郎 (国立遺伝学研究所分子遺伝研究部門)

(9) Live CLEM を使った核膜形成ダイナミクスの解析

原口徳子 ((独) 情報通信研究機構, 未来 ICT 研究センター)

(10) 染色体研究において電子顕微鏡に期待するもの

平岡 泰 ((独) 情報通信研究機構, 未来 ICT 研究センター)

【参加者名】

小林武彦, 仁木宏典, 深川竜郎 (遺伝研), 高橋考太 (久留米大・分子生命科学研), 田辺秀之 (総研大先導科学研), 広田亨 (癌研究所), 前島一博 (理研), 原口徳子, 平岡泰 (未来 ICT 研究センター), 大山隆 (早大・教), 加藤幹男 (大阪府大・院理), 金子康子 (埼玉大・教), 清水光弘 (明星大・理), 水田龍信 (東京理科大・生命科学研),

吉川祐子 (環太平洋大・次世代教育), 秋山芳尾, 森博幸 (京大・ウィルス研), 田中雅嗣 (老人研), 橋本祥子, 橋山一哉, 近藤武史 (基生研), 喜多山篤 (テラベース (株)), 片岡正典 (生理研), 永山國昭, 重松秀樹, 新田浩二 (統合バイオ)

【概要】

染色体は DNA が様々タンパク質因子と共に作り上げた細胞の機能的な構造体である。遺伝子 DNA の複製や分配といった遺伝維持はもちろんのこと, 転写等を通じ発生や細胞分化など多彩な局面で生命現象に関わる。これまでの研究から, 多種多様なタンパク質が DNA に作用して, 染色体の機能を調整していることが明らかになっている。これは, また細胞周期によっても動的に変化

し, 細胞周期特異的な染色体の機能を作り出している。その一つにセントロメア DNA がある。セントロメア DNA は酵母からヒトまで共通する因子とさらに高等生物だけに見られる因子などがあり, 複雑なタンパク質と核酸の構造体を構築し, 微小管タンパク質を結合する染色体の部位, キネトコアを形成する。キネトコアでのタンパク質の構築は主に蛍光顕微鏡により, そのタンパク

質のキネトコア局在を基に観察している。しかし、蛍光顕微鏡自体の解像度の問題もあり、分子レベルでの微細な構造の研究は困難である。染色体の凝縮過程における研究でも同じ問題に直面している。どのようにして長い DNA が折り畳まれ染色体構造を形成できるのか、これまでの電子顕微鏡観察では解明されておらず、大きな疑問として残っている。今回の研究会では、位相差電子顕微鏡の活用により、どのような点が明らかになると期待できるのか討議を行った。分子生物学研究方法を用いて染

色体の研究を展開している国内の研究から最新の研究成果を紹介してもらおうと同時に、どのような局面に位相差電子顕微鏡が応用可能なのかが明らかになった。技術的に克服されていかなければならない点が明確に成ると共に、位相差電子顕微鏡の改良により解明の期待できる点も本研究会で見出すことができた。ますます、複雑化する分子レベルの染色体研究分野への位相差電子顕微鏡の導入は、この染色体研究を革新的に発展させるであろうことを印象づける研究会となった。

(1) はじめにー「核酸特異的電子顕微鏡観察と染色体構造」

永山 國昭 (岡崎統合バイオサイエンスセンター)

通常核も染色体もその大きさと高密度故に、電子顕微鏡にとっては極めて手ごわい対象である。過去何度か無染色のクライオ電顕を試みたが、いずれも多重散乱と非弾性散乱の壁にはばまれ、内部構造を同定するまでにいたらなかった。本研究会では、果たして核構造、染色体構造の研究に電顕が有効な手段となり得るかが焦点の1つである。バクテリアなどを用いて無染色電子顕微鏡法開発してきた経験から、DNAの細胞内局在について、位相差低温電顕が有望だとわかってきた。特にシアノバ

クテリア、大腸菌という小さな細胞について、DNAの局在観察を行った。1つは、シアノバクテリア DNA への BrdU 取り込みによる、Br 化 DNA の電顕観察、もう1つは大腸菌 DNA への Bodipy-U の取り込みによる Bodipy 化 DNA の蛍光-電顕相関イメージングである。特に後者は Bodipy 中のホウ素 (B)、フッ素 (F) の電子分光イメージング (ESI) を試みた。これらの結果を専門家に紹介し、電顕の新手法が染色体構造、核構造研究に有効かどうか見極めたい。

(2) リボソーム RNA 遺伝子の増幅のダイナミクス

小林 武彦 (国立遺伝学研究所)

リボソーム RNA 遺伝子 (rDNA) はゲノム中で最も多量に存在する遺伝子であり、真核細胞では 100 コピー以上がタンデムに連なった巨大反復遺伝子群を染色体上に形成している。通常このような反復遺伝子はリピート間で組換えによりコピーが欠落し徐々に減少していくが、rDNA は独自の遺伝子増幅作用を有し、減った分のコピー数を絶えず回復させ、変動しながらもほぼ一定のコピー数を常に維持している。遺伝子の増幅は rDNA に存在する複製阻害活性により引き起こされた DNA2 本鎖切断末端がスイッチバックすることで一度複製された領域が

再複製され進行していく。また最近、増幅作用の調節に noncoding な転写活性が関わっていることが判明した。この転写活性はコピー数減少時に上昇し、スイッチバック反応を活性化することで増幅を誘導することが判ってきた。さらに 100 コピー以上が存在する増幅ユニットの全てで、このような調節機構が独立に起こっているとは考えにくく、マイクロな調節に加えマクロな構造も増幅調節に寄与していると考えられる。rDNA ダイナミクス研究における電子顕微鏡観察の有効性を議論したい。

(3) Capture と Tension の分子感知システム

高橋 考太 (久留米大学 分子生命科学研究所 細胞工学研究部門)

遺伝情報が過不足なく次世代へと伝達されるためには、染色体分配過程において動原体 (キネトコア) と紡錘体 (スピンドル) が正しく相互作用しなければならない。キネトコアとスピンドルの結合状態は M 期チェックポイントとよばれる細胞周期制御機構によって監視されている。すべてのキネトコアがスピンドルと正常に結合するまで、M 期後期の開始は M 期チェックポイントによって抑制される。M 期チェックポイントを構成する蛋白質の一つである Mad2 は、M 期になると「スピンドルと正しく結合していない」キネトコアを特異的に識別して局在化するが、その局在制御については不明な部分が多い。M 期初期においてキネトコアは、まず、1) 一方の

紡錘体極から伸びる微小管に捕らえられ (capture)、次いで、2) 他方の極からの微小管とも結合し、スピンドルとの二方向的 (bi-oriented) な結合を確立する。二方向的に結合した姉妹キネトコア間には「張力 (tension)」が発生する。我々は、分裂酵母βチューブリン変異体を顕微鏡下で許容条件に移して M 期進行を再開させることにより、上述の M 期初期過程を詳細にライブ観察し、局在化した Mad2 がキネトコアから離脱する過程に、「capture」と「tension」がどのように影響するかを解析した。これまでの結果をもとに、それぞれの素過程を監視し Mad2 局在を促進する分子機構について議論したい。

(4) 核内染色体テリトリーの3次元解析について

田辺 秀之 (総合研究大学院大学 先端科学研究科)

真核細胞の核内染色体は無秩序に入り混じった状態ではなく、個々の染色体ごとに高度に区画化された「染色体テリトリー」として一定の空間配置を占めている。その構造的な特性や動態において、ゲノム機能発現やゲノム進化と重要な関わり合いを持つ。染色体テリトリーの3次元核内配置を決定付けるパラメータとして、個々の染色体の物理サイズ、遺伝子密度や GC 含量、複製時期、転写活性、遺伝子発現状態などが挙げられているが、細胞周期や核形態の影響、細胞の種類や生物種間、発生、分化段階で異なる特性を持つことなども報告されており、その生物学的意義については未知な部分が多く残されている。我々は 3D-FISH 法と生細胞蛍光観察系を組み

合わせ、次の2つの側面からのアプローチを行っている。

- 放射状核内配置 (radial positioning) : 核の中心付近から核膜周辺部にかけて、放射状のどの領域に分布するかを示す核内配置。
- 相対核内配置 (relative positioning) : 個々の染色体テリトリーの相互関係を示す相対的な核内配置。

本研究では、霊長類リンパ球を用いた解析例を中心とし、最新知見を踏まえた関連するトピックスを紹介し、核内染色体テリトリーの3次元解析を通じて得られる、ゲノム進化、腫瘍化、あるいは個体発生における細胞分化との関連について核内環境という観点から関連分野への議論の場を提供したい。

(5) 染色体を構築する分子メタボリズム

広田 亨 (癌研究会癌研究所)

細胞分裂期において、クロマチン線維は凝縮して「染色体」に変換される。近年、その分子背景が明かされつ

つあり、染色体の形成に伴って、コンデンシンなどの染色体に取り込まれる分子群と、コヒーシンのように染色

体から取り除かれる分子群とが存在することが分かってきた。これらの染色体構成因子を GFP で標識すると、生細胞において分子の振る舞いを検討することができるが、私たちは、ヒトの細胞に存在する 2 種類のコンデンシン I および II 子動態とその制御機構を検討した。その結果、細胞周期を通じて核に存在するコンデンシン II は前期に入ると安定してクロマチンと結合するのに対して、細胞質に分布するコンデンシン I は核膜崩壊後に染色体に取り込まれるが、その染色体への移行は、活発な分子のターンオーバーに基づいていることが示唆され

た。さらに、コンデンシン I のダイナミックな分子動態は、分裂期キナーゼ Aurora B によって調節されていることを見出した。また、Aurora B の活性は、染色体凝縮の進行に伴うコヒーシンの除去に必要であることが知られているが、ヘテロクロマチンタンパク質 HP1a や Shugoshin といった分子群も、Aurora B 依存性に染色体から解離することが分かった。総じて、染色体の形成は、“分子のメタボリズム”を基盤として進行し、Aurora B がこれら分子の動態の制御において重要なはたらきを担うと考えられる。

(6) 核小体の分離と均等分配

仁木 宏典 (国立遺伝研・系統生物, 総研大・遺伝学専攻)

核小体は、真核細胞の核の中に見られる分子密度の高い領域で、この内部では rDNA の転写が行われている。一般に核分裂に際して、核膜が消失する細胞では同時に核小体も消える。一方、核膜の消失を伴わない酵母では、核小体は核分裂と同時に分離・分配されている。出芽酵母では、娘細胞へその一部しか分配されない不均等分配型である。分裂酵母では、核分裂時に均等分配される。

分裂酵母 *Schizosaccharomyces japonicus* の核分裂時において、核小体蛋白質である Gar2p を指標に核小体が分離・分配される過程を追った。核小体は、染色体を骨格としてまとわり付き、染色体の分配と共に分離・分配されている。また、核小体が分離するとき、その一部は核から取り除かれ、これは細胞中央に捨てられるということがわかった。

(7) 染色体を「見る」—分裂期染色体のヒトゲノムの高次構造

前島 一博 (理化学研究所・中央研究所今本細胞核機能研究室)

全長 2m にも及ぶヒトゲノム DNA は人体の設計図であり、間期では直径 10 μ m の細胞核に納められている。また、細胞が分裂する際、ゲノム DNA は、わずか数十分のうちに長さ数 μ m の 46 本の染色体に束ねられる。直径 2nm のゲノム DNA はまず、塩基性蛋白質のヒストンに巻かれて、ヌクレオソームと呼ばれる直径約 10nm の構造体になる。このヌクレオソームが折り畳まれて直径約 30nm のクロマチン繊維になるとされてきた。このクロマチン繊維がどのようにして、直径約 0.7 μ m の分裂期染色体を作るのかについては全くの謎であり、長年に渡って生物学者たちの興味を集めてきた。古くから提唱されているモデルでは、「30nm のクロマチン繊維が、100nm, 200-250nm と、らせん状

の階層構造を形成しているのではないかと予想している。

この分裂期染色体に内在する規則性構造の全体像を捉えるため (高次構造解明)、私たちは X 線散乱解析 (SAXS) をおこなっている。X 線散乱は計測したい試料に X 線を照射し、その散乱パターンからその試料に内在する構造や規則性を知る手段であり、染色体中の規則性構造の検出に非常に適していると考えられる。実際、X 線散乱はゲルなどの高分子構造解析にも盛んに用いられてきた。

私たちはこれまで理研播磨 SPring-8 の SAXS ビームラインを用いて、単離した染色体と細胞核の X 線散乱測定を繰り返してきた。その結果、染色体中に 6nm,

12nm, 30nm の散乱ピークを検出した。それぞれ、コアヒストンの幅、ヌクレオソームの直径、30nm 繊維に相当すると考えられている。これまでのところ、大きな構造は検出していない。このことから、古くからの

モデルが提唱するような階層構造（高次構造）は存在しないのではないだろうか？ 本研究で得られた知見の意味を、私たちがおこなっているクライオ電子顕微鏡観察の結果もあわせて議論したい。

(8) キネトコアタンパク質複合体の機能解析と電子顕微鏡観察への展望

深川 竜郎 (国立遺伝学研究所分子遺伝研究部門)

生物が生命を維持するためには、全ゲノム情報を包括する構造体である染色体は安定に保持・増殖されなければならない。正常な細胞では、ほぼ決まった時間周期で染色体の複製と分配が正確に行われる。染色体の複製・分配といった基本的な生体反応に狂いが生じると染色体の異数化、癌化など細胞に対する悪影響が生じる。我々は、染色体分配に本質的な役割を担うセントロメアの分子構築機構についての研究を行っている。特に、セント

ロメアクロマチンが形成され、機能的なキネトコア構造が構築される過程に注目しており、キネトコアを構成するタンパク質複合体の同定と構成タンパク質因子の機能解析を通じたキネトコア構造形成の分子機構の理解を目指している。本研究では、我々の研究成果とともに、私たちの研究に電子顕微鏡観察がどのように活用されるべきか、最近の報告を紹介しながら展望を語ってみたい。

(9) Live CLEM を使った核膜形成ダイナミクスの解析

原口徳子 ((独) 情報通信研究機構, 未来 ICT 研究センター)

細胞の核膜を構成する生体因子のほとんどは、生化学的に高度に不溶性であり、生化学的な解析が困難である。その上、細胞分裂周期の分裂期では、disassembly と assembly が短時間に起こることによって著しい構造変化を起こす。そのために、核膜の形成過程を解析には、個々の細胞内の核膜構造の「その場」観察が必要不可欠である。そのため、我々は、生きた細胞で核膜構成分子の分子動態や分子間相互作用を解析するための方法として、蛍光顕微鏡を用いた方法を開発した。蛍光観察は、分子特異性が高く、シグナルの S/N 比が高い鮮明な画像を得ることができ、生きた細胞での観察ができるために、核膜再形成過程の解析には有用であったが、一方、核膜の膜構造の有無や、蛍光が局在する領域の微細構造の観察

ができないという問題があった。その問題を解決するために、我々は、生きた細胞での分子動態と超構造情報の 2 つが得られる Live CLEM (live correlative light and electron microscopy) を考案した。この方法は、まず蛍光顕微鏡を用いて、生きた細胞で生体分子の挙動を検討し、次に生細胞観察した同一細胞の微細構造を、電子顕微鏡を用いて検討するものである。これにより、蛍光顕微鏡法が持つ生細胞での時間変化の解析と分子特異性という 2 つの特長を生かしながら、電子顕微鏡法の持つナノメートルオーダーの高い分解能を達成することが可能となる。本講演では、この方法の有用性と問題点について、核膜形成過程の解析を例にとり議論したい。

リボソーム RNA 遺伝子の増幅のダイナミクス

(10) 染色体研究において電子顕微鏡に期待するもの

平岡 泰 ((独) 情報通信研究機構 未来 ICT 研究センター 生物情報プロジェクト)

DNA は段階的な構造形成を経て、染色体に収納される。これは、ヌクレオソームに始まり、30nm クロマチン線維から、さらに数段階の構造形成を経て、最も凝縮した中期染色体に至る。教科書には、このすべての段階が、見てきたように描かれているが、実は、確証が得られている構造は、ヌクレオソーム、30nm クロマチン線維と中期染色体であって、30nm クロマチン線維と中期染色体の間をつなぐ構造がどのように形作られるかにつ

いては、いまだ議論の分かれるところである。染色体の構造については、実に多くの電子顕微鏡による観察が為されてきたにもかかわらず、さまざまな構造が観察され、すべてを説明する統一されたモデルはない。この混沌の意味するところを考え、背後に隠された秩序を見いだすために、電子顕微鏡に何が期待できるかについて議論したい。