

博士論文

神経回路機能障害の膜電位感受性色素を用いた
光計測に関する研究
—Cuprizone 誘発性脱髄による前頭前野障害と
加齢による海馬機能変調—

徳島文理大学大学院薬学研究科
薬学専攻 博士課程

佃京華

指導教授 富永貴志

令和七年提出

目次

略語・用語一覧.....	6
第1章 緒論.....	8
1-1 研究の概要.....	8
1-1-1 多発性硬化症と Cuprizone 誘発性脱髄モデルの関連.....	9
1-1-2 Cuprizone 誘発性脱髄のメカニズムと神経病理.....	10
1-1-3 膜電位感受性色素 イメージング (Voltage Sensitive Dye Imaging; VSDI) の特徴及 び病態モデルへの適用.....	12
1-2 研究の目的.....	13
第2章 膜電位感受性色素イメージング法を用いた CPZ 誘発性脱髄によるマウス前頭 前野障害の解明.....	14
2-1 序論.....	14
2-2 方法.....	16
2-2-1 使用動物.....	16
2-2-2 CPZ 含有粉末飼料の作製.....	16

2-2-3	CPZ 飼料給餌投与による脱髄マウスと再髄鞘化マウスの作製	17
2-2-4	スライス作製と VSD 染色.....	17
2-2-5	測定条件と刺激.....	18
2-2-6	VSD 光信号の計測.....	19
2-2-7	光計測のデータ処理と統計学的処理.....	19
2-2-8	凍結切片の作製.....	20
2-2-9	FluoroMyelin™ Green による髄鞘の蛍光色素染色.....	21
2-2-10	抗 PLP 抗体による免疫組織化学染色	21
2-2-11	組織染色のデータ処理と統計学的処理	22
2-3	結果	23
2-3-1	Cuprizone 誘発性脱髄による神経活動の半球間伝播の抑制	23
2-3-2	SL3 で最も顕著であった Cuprizone 投与の効果	24
2-3-3	脱髄と神経興奮伝播の遅延	25
2-3-4	CC における脱髄と再髄鞘化の組織学的解析.....	26
2-3-5	抗 PLP 抗体を用いた前頭前皮質における脱髄または再髄鞘化の免疫組織化学的 解析.....	27
2-4	まとめ及び考察.....	28
2-4-1	脱髄の頭尾方向の位置に依存する脆弱性と不均一な効果.....	28

2-4-2	機能的回復と構造的回復の不一致	29
2-4-3	長距離線維と局所的微小回路の役割	29
2-4-4	MS への影響と今後の展望	31
第3章 膜電位感受性色素イメージング法を用いた加齢による海馬機能変調の解明		32
3-1	序論	32
3-2	方法	33
3-2-1	使用動物	33
3-2-2	スライス作製と VSD 染色	33
3-2-3	光計測条件	35
3-2-4	VSD 光信号の計測	35
3-2-5	凍結切片の作製	36
3-2-6	抗原賦活化処理	36
3-2-7	免疫蛍光染色	37
3-2-8	データ処理と統計学的処理	38
3-3	結果	38
3-3-1	海馬 CA1 領域の刺激に対する海馬全体の VSD 光信号イメージング	38
3-3-2	海馬 CA1 領域における VSD 光信号のトレース解析	39

3-3-3	海馬全体の抗 Iba1 抗体と抗 GFAP 抗体を用いた免疫染色	39
3-4	まとめと考察.....	41
3-4-1	加齢に伴う興奮性の増大傾向	41
3-4-2	ミクログリアとアストロサイトの加齢に伴う活性化.....	42
3-4-3	加齢や刺激による過興奮と脳内炎症の関係.....	43
3-5	今後の展望	44
第4章	総括	45
図表一覧	46
参考文献	66
業績リスト	85
謝辞	91

略語・用語一覧

ACC: Anterior cingulate cortex [前帯状皮質]

ACSF: artificial cerebrospinal fluid [人工脳脊髄液]

AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid

CA1,3: cornu ammonis [アンモン角]

CC: corpus callosum [脳梁]

Cg1,2: cingulate cortex area 1,2 [帯状皮質領域 1,2]

CMOS: complementary metal oxide semiconductor

CNS: central nervous system [中枢神経系]

CPZ: cuprizone [クプリゾン]

EAE: Experimental autoimmune encephalomyelitis [実験的自己免疫性脳脊髄炎]

EPSP: excitatory postsynaptic potential [興奮性シナプス後電位]

FMG: FluoroMyelinTM Green

GABA: γ -aminobutyric acid [γ アミノ酪酸]

GAD: glutamic acid decarboxylase [グルタミン酸脱炭酸酵素]

GFAP: Glial fibrillary acidic protein [グリア線維性酸性タンパク質]

GZ: gabazine

Iba1: Ionized calcium-binding adapter molecule 1 [イオン化カルシウム結合アダプター分子 1]

LT α : lymphotoxin α

MAG: myelin associated glycoprotein [ミエリン関連糖タンパク質]

MHC II: major histocompatibility complex II [主要組織適合性複合体II]

MS: multiple sclerosis [多発性硬化症]

PB: phosphate buffer [リン酸緩衝液]

PBS: phosphate buffer saline [リン酸緩衝生理食塩水]

PFA: paraformaldehyde [パラホルムアルデヒド]

PLP: myelin proteolipid protein [ミエリンプロテオリピドタンパク質]

TNF α : tumor necrosis factor [腫瘍壊死因子]

VSD: voltage sensitive dye [膜電位感受性色素]

VSDI: voltage sensitive dye imaging [膜電位感受性色素イメージング]

第1章 緒論

1-1 研究の概要

神経細胞は軸索といわれる細い管状の突起を使って遠くまで活動電位を伝導させ、情報を伝えている。脳の神経細胞の多くは軸索を髄鞘（ミエリン）によって覆うことで神経の伝導速度を飛躍的に高めた有髄神経である。脳の白質といわれる部位は、ほとんどが有髄神経の軸索で構成され、脳の離れた領域間、左右半球間の情報のやり取りを行っている。難病として知られる多発性硬化症（Multiple Sclerosis ; MS）では、髄鞘が損傷されて機能低下すること（以下、「脱髄」）により脳内の領域間の情報伝達が阻害され、様々な神経症状がおこると考えられている。これまでに MS の病態は、分子病理学的な観点や fMRI などの非侵襲的機能評価を用いて調べられている。しかし、神経回路レベル、特に脳内の左右大脳半球間における機能的な欠損については解析手法が限られており、十分には解明されていない。そこで、本研究では、脱髄による前頭前野の神経回路機能障害を明らかにすることを目的として、これまでに前頭前野の急性脳スライスにおける広範囲の神経回路解析に成功している膜電位感受性色素を使用したイメージング（VSDI）と免疫組織学的解析を組み合わせ、Cuprizone（CPZ）誘発性脱髄モデルマウスにおける前頭前野の神経興奮伝播障害について解析した。また、後半では、加齢による脳内炎症を伴った神経回路機能の変調を明らかにすることを目的とし、上記と同様の解析手法により、記憶の座とされる海馬における、神経回路機能変調と脳内炎症の関係について解析した。

1-1-1 多発性硬化症と Cuprizone 誘発性脱髄モデルの関連

多発性硬化症（MS）は中枢神経系における代表的な脱髄疾患として世界的に知られている（Dobson and Giovannoni. 2019; Lubetzki et al. 2014; Vercello et al. 2009）。中枢神経系（CNS）は免疫特権部位であるため、血液脳関門が分子や細胞の侵入を選択的に制御しているが、MSではこの免疫特権が破壊され、抗原特異的 T 細胞と B 細胞の異常活性化につながる。これにより自己損傷プロセスのカスケードが引き起こされ、CNS 炎症、脱髄、軸索損傷、神経変性が生じる（Mohammed 2016; Frischer 2009; Dobson and Giovannoni. 2019）。また、炎症によって引き起こされる断続的な再発・寛解期を経て、その後脱髄と軸索喪失（神経変性）を特徴とする進行期が継続する（Mohammed. 2016）。慢性的な脱髄により視力障害、疲労、気分障害、認知障害、痛み、膀胱/腸機能障害、性機能障害、歩行困難、筋痙攣、脱力感等様々な症状がみられる（Lakin et al. 2021）。一方、疾患の初期段階においても認知障害や精神神経症状が発生する可能性がある（Oset et al. 2020; Marrie et al. 2015; Murphy et al. 2016）。このように MS は多くの異なる特徴と側面をもつ疾患であると考えられており、MS の明確な発症機序は未解明である。現在のところ、ヒトの MS 病態の複雑さの全体を網羅する実験動物モデルはいないが、実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）モデルマウスや Cuprizone（CPZ）により脱髄を誘発したモデルマウスが MS モデルマウスとして研究で頻用されている（Oveland et al. 2021; Zhang et al. 2022）。特に実験用化合物である CPZ は銅キレーターであり、CPZ を投与して作製した脱髄モデルでは、多発性硬化症のほとんどの患者で見られる病気の再発と寛解における脱髄と再髄鞘化を再現できることが特徴である（Zendedel and Kipp. 2013）。また、CPZ を与えられたマウスでは神経繊維の束である脳梁だけでなく広範な皮質脱髄が示されており、この病理学的パターンは MS で見られる

広範な軟膜化脱髄と類似している可能性がある (Bø et al. 2003; Bö et al. 2006)。さらに、Lucchinetti らは、MS における 4 つの異なる病変サブタイプの発見を発表しており、パターン 1 および 2 の病変はそれぞれ T 細胞媒介性または T 細胞と抗体媒介性の自己免疫性、パターン 3 および 4 の病変は主にオリゴデンドロサイト原発性であることが示唆され、特にパターン 3 の病変 (①ミクログリアまたはマクロファージが多く存在する活発な脱髄病変 ②代謝ストレスとミトコンドリア欠損の兆候を伴う低酸素症様組織損傷を伴うオリゴデンドロサイトアポトーシス ③他のミエリンタンパク質 mRNA 発現がダウンレギュレーションされる前に軸索伸長阻害因子 MAG mRNA 発現がダウンレギュレーションされる ④病変の境界が不明瞭で、静脈や細静脈を中心としていない) は CPZ 誘発性病変と多くの病理学的類似点を示す (Lucchinetti et al. 2001)。その他にも、空間記憶障害や社会性行動の減少 (Xu et al. 2010; Xu et al. 2011) が報告されており、多発性硬化症で見られる認知障害や精神神経症状と類似した行動異常を示すことが明らかにされている。

1-1-2 Cuprizone 誘発性脱髄のメカニズムと神経病理

近年では、CPZ モデルマウスの作製には主に C57BL/6 マウスが使用されており、多くの場合、脱髄を誘発するために CPZ は 0.2~0.3% の濃度で 4~6 週間投与されている (Armstrong et al. 2002; Emery et al. 2006)。しかしながら同じ期間投与しても CPZ の濃度によって脳梁の脱髄の程度が異なり、0.2% CPZ を使用した場合、投与中にもかかわらず投与 4 週目と比較して投与 6 週目に再髄鞘化する。対照的に、0.3% CPZ を使用した場合は投与 6 週目に脱髄が完了することが免疫組織染色、色素染色、電子顕微鏡写真やこれらの定量解析により確認されている (Lindner et al. 2007)。

1950年、CPZはGustav Nilssonによって初めて報告され、CPZが銅の指示薬であり、銅の共存で比色変化を起こすことが発見された (Nilsson et al. 1950)。その後数年で、CPZは齧歯類の神経系と末梢臓器に重篤な全身作用を引き起こすことも明らかになった。その後、標準化されたCPZ投与プロトコルの採用により、研究の信頼性が向上し、現在はCPZの毒性における炎症関連遺伝子の発現レベルや脱髄誘発経路、各種免疫細胞固有の役割をより詳細に分析できるようになった。しかし、いくつかの作用機序は示されつつあるが、CPZ給餌投与により脱髄を誘発するメカニズムは未だ不明である。

CPZ脱髄では、様々な要因によるオリゴデンドロサイトの死とミエリン喪失が示されており、大きくは内因的および外因的原因に分類されている (Zirngibl et al. 2022)。内因性原因としては、オリゴデンドロサイトにおけるミトコンドリアの障害によるエネルギー不足や活性酸素種の蓄積、脂質タンパク質の合成障害 (Praet et al. 2014; Gudi et al. 2014)、外因性要因としては、アストロサイトから放出される細胞障害性サイトカインであるLT α やTNF α などのオリゴデンドロサイトへの作用 (Plant et al. 2004,)、アストロサイトから放出されたCXCL10などの他のサイトカインによるミクログリアの増殖や活性化を介したオリゴデンドロサイトの障害 (Clarner et al. 2015)、オリゴデンドロサイトからのミエリン破片の放出や、補体とアナフィラトキシンによる損傷オリゴデンドロサイトからのサイトカイン放出によるミクログリアの活性化に伴うオリゴデンドロサイトの障害 (Ingersoll et al. 2010) が示唆されている。

上記の機序との関連は不明であるが、CPZ誘発性脱髄後の神経病理学的変化も報告されている。CPZ投与8週間後のグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) 阻害作用による抑制性神経伝達物質 γ -アミノ酪酸 (GABA) の生成量低下が示唆されているが、投与3週間ではGABA濃度の上昇が見られたという報告があり (Biancotti et al. 2008)、CPZ投与期間によって脳内のGABA濃度が増加することを示唆している可能性がある。また、

グルタミン酸受容体である α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA) 受容体の神経発現は脱髄中に減少し、再髄鞘形成中に再び増加する。このプロセスはマイクロ RNA (miR-124) 依存的であり、miR-124 の増減と反比例して AMPA 受容体の神経発現が変化することで、記憶や学習に影響を与えることが示唆されている (Dutta et al. 2013)。さらに、急性 CPZ 投与 (6 週間以内) には脱髄後の脳梁における Na^+ や K^+ チャンネルの拡散が見られ (Crawford et al. 2009)、脱髄による神経興奮性の低下の原因として示唆されている。

1-1-3 膜電位感受性色素 イメージング (Voltage Sensitive Dye Imaging; VSDI) の特徴及び病態モデルへの適用

これまでの先行研究では、膜電位感受性色素 (VSD) を使用して生きた脳スライスでのリアルタイムで包括的な光学イメージングが行われている (Tominaga et al. 2002; Juliandi et al. 2015; Utsumi et al. 2023; Gusain et al. 2023)。他のパッチクランプや細胞外記録といった電気生理学的手法では、記録電極の設置点でしか細胞膜電位の変化を記録できない。この問題を解決する手法の一つとして VSD イメージングは利用可能である。海馬は記憶研究において重要な領域であり、これまでにアルツハイマー病などの認知症に関連した研究が多数行われている。海馬の層構造は比較的単純であるため、光信号の変化により細胞層の機能性を評価しやすいと考えられる。一方で、前頭前野の神経回路は複雑で、未解明なことが多い。しかし、VSD イメージングの特徴である広視野を活かせば、大脳の左右半球間連絡を含めた解析をすることでスライスにおける神経活動の位置特異的な新たな特徴を見出すことが可能である。

1-2 研究の目的

本論文では、脳神経機能障害をターゲットとし、特に有効な治療薬開発が進んでいない多発性硬化症とアルツハイマー病（認知機能障害）に関連している、CPZ 誘発性脱髄モデルでの前頭前野障害の解明と、老齢マウスを用いた海馬機能変調の解明を目的とした。

第2章 膜電位感受性色素イメージング法を用いた CPZ

誘発性脱髄によるマウス前頭前野障害の解明

(本章の内容に関しては、*eNeuro*. 12 (1) ENEURO.0511-24.2024 (2025) に発表済み)

2-1 序論

Cuprizone (Bis (cyclohexanone) Oxalyldihydrazone: CPZ) は、齧歯類モデルで脱髄を誘発するために広く使用されている薬剤で、多発性硬化症 (MS) などの脱髄関連疾患の研究に特に有用である (Lucchinetti et al. 2000, 1999)。CPZ の脱髄効果は、大脳半球間のコミュニケーションを担う主要構造である脳梁 (CC) において最も顕著であり、CC の脱髄は、運動協調や認知処理といった高次脳機能を著しく損なう。他の MS モデルとは異なり、CPZ の投与は脱髄を誘発するだけでなく、投与中止後に再髄鞘化が起こりうるため、脱髄と再髄鞘化の両方のプロセスを調査するための独自のプラットフォームとなりうる (Matsushima and Morell. 2001; Praet et al. 2014)。対照的に、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) などの他の毒素誘発モデルは、主に炎症メカニズムに焦点を当てており、再髄鞘化の研究には適さない (Storch et al. 1998)。

CC は、脳の左半球と右半球間の情報の統合を促進し、半球間コミュニケーションに不可欠である (Aboitiz and Montiel. 2003; Rovira and Geijo-Barrientos. 2016)。CPZ による CC の損傷は、この半球間の接続を破壊し、運動協調 (Li et al. 2016) や認知処理 (Degraeve et al. 2022; Fabri and Polonara. 2023; Fenlon and Richards. 2015; Gazzaniga et al.

2005; Höller-Wallscheid et al. 2017; Huang et al. 2015; Liu et al. 2010; Russo et al. 2022; Tovar-Moll et al. 2007) を含む認知機能と運動機能の障害につながる。

前頭前野で重要な領域である前帯状皮質 (ACC) (Fuster, 2001; Merre et al. 2021) は、認知プロセス、感情の調節、感情情報の統合など、さまざまな機能に関与している。これらの機能はすべて、半球間の効果的な調整のために CC の接続性が損なわれていないことに依存している (Rolls et al. 2022) 。したがって、CC が損傷すると、半球間で活動を同期させる ACC の能力が直接損なわれ、認知処理と感情処理の両方に支障が生じる可能性がある。

私たちの先行研究では、単一光子広視野膜電位感受性色素イメージング (VSDI) を使用して、半球内および半球間の接続の両方を含む ACC 内のニューロン活動の伝播を視覚化することに成功した (Gusain et al. 2023) 。 VSDI は 1970 年代に初めて開発された後 (Cohen et al. 1978; Knöpfel and Song. 2019a; Loew et al. 1992; Milicevic et al. 2023; SALZBERG et al. 1973) 、当研究チームにより改良され、神経活動の広範囲記録のための定量的ツールとして利用可能となった (Gusain et al. 2023; Ojima et al. 2024; Suh et al. 2011; Tominaga et al. 2023; Utsumi et al. 2023) 。 VSDI は技術的な制限により CC からの生理学的データを記録できない。しかし、認知機能と情動機能の調整において中心的な役割を果たす ACC は、VSDI を使用してその機能的ダイナミクスを捉え、CPZ 誘発性脱髄を研究するための理想的なターゲットであり続けている。

本研究では、CPZ 誘発性脱髄が、ACC 内の半球内および半球間神経伝達にどのように影響するかを評価することを目的とした。CC 脱髄の構造的影響についてはかなりの研究が行われているが、半球間接続の機能的評価は比較的まれである。特に ACC に関し

て、半球間の神経伝達に対する脱髄のリアルタイムな影響を具体的に調査した研究はほとんどない (Bando et al. 2008; Crawford et al. 2009)。VSDI 技術を適用することで、脱髄段階と再髄鞘形成段階の両方で、ACC 内の神経活動と CC を介した伝播の定量的な分析結果を提示することを目指している。これらの機能障害を理解することは、中枢神経系 (CNS) 脱髄に関する知識を深め、潜在的な治療ターゲットを特定するために不可欠である。

2-2 方法

2-2-1 使用動物

本研究で使用した C57B L/6J 雄マウスは、日本エスエルシー株式会社から導入し、12 時間の明暗周期 (8:00/20:00)、適切な温度および湿度 (20-24 °C、50-60%) 下に管理された動物施設で飼育管理して動物実験に使用した。本研究における動物実験ならびに動物の飼育管理は「徳島文理大学における動物実験と動物の飼育及び保管に関する規定」に準拠して行った。また、全ての動物実験は徳島文理大学の動物委員会によって承認されている (承認番号: KP22-83-2, KP23-83-2, KP24-83-2)。

2-2-2 CPZ 含有粉末飼料の作製

CPZ (Cat No:04198-30、Kanto Chemical Co., Inc) を実験動物用粉末飼料 (粉末状 CE-2, CLEA Japan, Inc.) に 0.3% (w/w) になるように添加し、攪拌とメッシュ 40 (目開き; 約 0.425 mm) のふるいを用いた塊の解砕により、均一になるように混和した。こ

の作業を 5 回繰り返して、0.3 % (w/w) CPZ 含有粉末飼料 (CPZ 飼料) を調製した。濃度の決定には、本博士論文の研究の背景「1-1-2 Cuprizone 誘発性脱髄のメカニズムと神経病理」で示した論文を参考にした。(Armstrong et al. 2002; Emery et al. 2006; Lindner et al. 2007)。

2-2-3 CPZ 飼料給餌投与による脱髄マウスと再髄鞘化マウスの作製

生後 10 週齢のマウスに対し、自由摂食摂水下で 0.3 %CPZ 含有粉末試料を 6 週間給餌投与することにより脱髄を誘発させ、CPZ マウスとした。通常粉末飼料で 6 週間同様に飼育したマウスを対照とした。また、同様にして脱髄を引き起こした後、5 週間通常固形飼料を与えて飼育し、再髄鞘化を期待したマウスを Recovery (Rec) とした。

2-2-4 スライス作製と VSD 染色

すべての動物実験は、徳島文理大学実験動物委員会の承認を得たプロトコルに従って行った。16 または 21 週齢の雄マウス (C57BL6J, SLC, Hamamatsu, Japan) を深イソフルラン麻酔下で断頭し、厚さ 350 μm の急性前頭葉スライス標本 (冠状断) を作製した。スライス標本の作成、VSD の調製や染色は、富永ら (Tominaga et al. 2019) が発表した方法を採用した。

具体的な手順として、脳を氷冷人工脳脊髄液 (ACSF; 124 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgSO₄, 1.25 mM NaHPO₄, 26 mM NaHCO₃ and 10 mM glucose, pH 7.4, 95% O₂/5% CO₂ 混合ガスでバブリング) 中で急速に冷却した。5 分間冷却した後、冠状断で前頭葉を切り離し、前頭葉を寒天ブロック上に置いた。尾側の垂直面側をシアノアク

リレート接着剤でビブラトーム (VT-1000 及び VT-1200S, Leica) に取り付け、bregma からおおよそ 1.34, 0.98, 0.62, 0.26 mm の位置でそれぞれ切り離し、350 μm 厚の切片を 4 枚作製した (図 1A)。各切片をメンブレンフィルター (Omnipore, JHWP01300, 孔径 0.45 μm , Merck Millipore Ltd., MA, USA) が固定されたアクリルリング (内径 11 mm, 外径 15 mm, 厚さ 1~2 mm) 上のフィルターに移した。

ACSF を通して 95% O_2 /5% CO_2 混合ガスが連続的にバブリングされているモイストチャンバー内にプレキシガラスリングを入れ、28°C の温度で 25 分間保ち、その後 10 分間室温に戻した。スライスを 110 μL の VSD 染色液 [0.1 mM Di-4-ANEPPS (D-1199, Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) , 2.7% エタノール, 0.13% Cremophor EL (Sigma-Aldrich Co.) , 50% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich Co.) , 50% ACSF] で、20 分間染色した。その後、スライスの余分な VSD 染色液を ACSF で洗い流し、遮光して室温で少なくとも 1 時間インキュベートした。

2-2-5 測定条件と刺激

VSD で染色した前頭葉スライスをアクリルリングごと記録チャンバーに移し、95% O_2 /5% CO_2 混合ガスでバブリングしながら 1 mL/min の速度で ACSF を連続的に灌流した。スライス条件で生じる可能性のある過剰な抑制シナプス伝達を阻害し、生体内で観察される皮質活性と同様の活性を維持するために GABA_A 受容体拮抗薬の 1 μM SR95531 (gabazine; GZ, Tocris, Bristol, UK) 存在下で測定した (Iijima et al. 1996; Kajiwara et al. 2019)。内部を ACSF で満たしたガラス電極 (外径 1.0 mm, 内径 0.75 mm) に Ag/AgCl ワイヤを挿入し、刺激電極として使用した。また、内部を 3M KCl 溶液で満たしたチップに Ag/AgCl ワイヤ (直径 0.3 mm) を挿入し、接地電極として使用した。刺激周

期は、各刺激点に対して 20 s ごとに 0.5 ms の長さで 4 回刺激されるように設定した。

刺激強度は、電気刺激装置 (ESTM-8, Brainvision, Inc., Tokyo, Japan) で 40 V に設定した。電気刺激は、刺激装置からスライス内の 4 つの異なる部位 (運動皮質, 前帯状皮質 [ACC]: 図 1B) に与えた。実験全体を通して、電気刺激を加えた皮質は同側皮質とし、反対側は対側皮質とした。

2-2-6 VSD 光信号の計測

スライスの可視化には、2 つの同一レンズ (#10447242; 実体顕微鏡 MZ シリーズ用の $\times 5$ 対物レンズ, Leica Microsystems) を備えた落射蛍光光学系を使用した。一つは対物レンズ用、もう一つはチューブレンズ用 (F1.4 85 mm, SAMYANG) として使用した。スライスは、フィルター (530 ± 30 nm) を通した安定化 LED 光源 (LEX2-LZ4, Brainvision, 東京, 日本) からの励起光で照らされ、蛍光は、発光フィルター (> 590 nm) を通過し、カメラ (MiCAM03, Brainvision, 東京, 日本) に投影された。このシステムにより、高フレームレート (特に明記しない限り 1 ms / フレーム) と高空間解像度 (256×256 ピクセル) で冠状スライス全体の神経活動を記録した。VSD 蛍光の初期蛍光量に対する変化の割合 ($\Delta F/F$) を光信号として用いた。

2-2-7 光計測のデータ処理と統計学的処理

得られたデータは、専用解析プログラム (BV_Ana, Brainvision) と IgorPro (ver. 9, WaveMetrics, Portland, OR) のカスタム マクロ プログラムを使用して解析した。数値および統計評価には、IgorPro 内で特別に設計されたマクロを使用した。すべてのデータ

は平均 ± 標準誤差で表示し、n はスライス数を表す。この実験では、すべての統計分析で IgorPro 内の多重比較 Tukey (HSD) テスト機能を用いた。統計学的有意差は、 p 値が 0.05 未満の場合を有意差ありと判断した。図中では統計学的有意差を、擬似カラーまたは記号* ($p < 0.05$) で表記した。

2-2-8 凍結切片の作製

スライスを光計測した後、4% PFA (4 % paraformaldehyde / 0.1M phosphate buffer, pH 7.2) を入れたスクリー管瓶に入れ、4 °C で固定した。セルカルチャープレート 12 ウェルに必要なスライスを取り出し、PB (0.1 M phosphate buffer, pH 7.2) で 5 分間の振盪を 3 回行うことにより余分な 4% PFA を除去し、氷晶形成防止のため、氷上で 7 % sucrose / PB により 15 分間振盪した後、30 % sucrose / PB に変えて同様に振盪した。次に、予めプラスチック容器 (Tissue-Tek Cryomold, 4565 or 4566, Sakura Finetek Japan Co., Ltd.) に包埋材 (Tissue-Tek O.C.T.Compound, 4583, Sakura Finetek Japan Co.,Ltd.) を入れて -20 °C に設定したクリオスタット (HM525NX, Thermo Fisher Scientific) の中で凍結させておき、350 μ m スライスを貼り付けるために表面を削って平にした。ショ糖置換を終えた 350 μ m スライスを透明なフィルムに乗せ、余分なショ糖液をろ紙で除いた後、凍結した包埋材の平らな面に貼り付け、直ちにフィルムを剥がして上から包埋材を塗り、凍結させた。この凍結スライスから厚さ 12 μ m の凍結切片を作製し、切片を PBS (0.01 M phosphate buffer saline, pH 7.2) に浮かべてスライドガラス (クレストコートスライドガラス, SCRE-01, Matsunami Glass Ind., Ltd) ですくい取り、余分な PBS をキムワイプで除いた後、室温で乾燥させた。作成した凍結切片は乾燥用シリカゲルを入れた遮光ボックスに入れ、使用するまで -80 °C で保管した。

2-2-9 FluoroMyelin™ Green による髄鞘の蛍光色素染色

凍結保存していた切片を室温に戻した後、PBS 中で 5 分間の洗浄を 3 回行った。以後の操作で反応液が拡散するのを防ぐため、撥水材（ブロックペン、株式会社硝英製作所、51002）で切片を丸く囲った。0.2 %Triton-PBS（0.2% Triton X-100 を含む PBS）で 300 倍に希釈した FluoroMyelin™ Green（F34651, Thermo Fisher Scientific, Lot. No. j821818）を用いて 4 °C で一晩反応させた。切片を軽く振って余分な反応溶液を除いた後、PBS 中で 5 分間の洗浄を 5 回行った。その後、無蛍光 Glycerol（66.7 % Glycerol, 0.167 M Sodium carbonate buffer, pH 8.6）を封入剤としてカバーガラス（22 mm×24mm Matsunami Glass Ind., Ltd.）を被せた。これらの蛍光染色標本を、共焦点レーザー走査型顕微鏡（FV1000, Olympus）で観察し、脳梁領域を撮影した。

2-2-10 抗 PLP 抗体による免疫組織化学染色

凍結保存していた切片を室温に戻した後、PBS 中で 5 分間の洗浄を 3 回行った。以後の操作で反応液が拡散するのを防ぐため、撥水材（ブロックペン、株式会社硝英製作所、51002）で切片を丸く囲った。各切片について 0.2% Triton-PBS で 5% に調製した正常 donkey 血清（Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, USA）を用いて、室温で 1 時間ブロッキングを行った。PBS 中で 5 分間洗浄し余分な正常 donkey 血清を除去した後、0.2% Triton-PBS で 1000 倍に希釈した一次抗体（rabbit 抗 PLP（myelin proteolipid protein）抗体; 抗原ペプチドとして Cys- GRGTKF-COOH を用いた自家製抗体）を用いて 4 °C で一晩反応させた。切片を軽く振って余分な反応溶液を除いた後、PBS 中で 5 分間の洗浄を 3 回行った。続いて 0.2% Triton-PBS で 200 倍に希釈した二次抗体、

Alexa488 標識 donkey 抗 rabbit IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, USA, 711-546-152) と 500 倍に希釈した細胞核検出用のプローブ (TO-PRO[®]-3 ヨウ化物, Thermo Fisher Scientific, T3605) を加え、室温で 2 時間反応させた。切片を軽く振って余分な二次抗体液を除いた後、PBS 中で 5 分間洗浄を 5 回行った。その後、無蛍光 Glycerol (66.7% Glycerol, 0.167 M Sodium carbonate buffer, pH8.6) を封入剤としてカバーガラス (22 mm x 24 mm, Matsunami Glass Ind., Ltd) を被せた。これらの免疫蛍光染色標本は、共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FV1000, Olympus) で観察し、ACC に隣接する皮質及び cg2 領域を撮影した。

2-2-11 組織染色のデータ処理と統計学的処理

比較する切片は全て同一の厚さで薄切し、同一試薬を用いて同じ操作で同時に染色した。また、比較に用いる画像は、対象サンプルを全て同日中に同一条件 (同一設定) で撮影した。これらの画像における蛍光面積を比較するため、画像処理ソフトウェア ImageJ のディストリビューションである Fiji (version 2.14.0/1.54f) により二値化した画像で全面積に対する蛍光面積の割合を算出した。このとき、同日中に取得されていた全ての計測画像を通してバックグラウンドノイズを排除できる最小値を閾値として設定し、その日に取得された画像全てに同じように適用し解析した。蛍光面積の割合は、対照群を基に正規化した値で表した。統計解析は、R (The R Foundation for Statistical Computing, オーストリア, ウィーン) のグラフィカルユーザーインターフェイスである EZR (自治医科大学附属さいたま医療センター, 埼玉, 日本) を使用して多重比較 Tukey (HSD) テストを行った。統計学的有意差は、 p 値が 0.05 未満の場合を有意差ありと判断した。図中では統計学的有意差を示す記号を、* ($p < 0.05$)、** ($p < 0.01$) で表記し

た。

2-3 結果

2-3-1 Cuprizone 誘発性脱髄による神経活動の半球間伝播の抑制

前頭葉冠状断スライスの背側（上部、頭蓋冠に近い側）にある前帯状皮質（ACC）のII/III層の電気刺激（図1BのSL3への刺激「a」）は、ACCに沿って神経活動の伝播を誘発し、背側から内側（正中線に近い側）および腹側（下部、頭蓋底に近い側）に向かって移動した。活動は背側皮質の運動野に向かって横方向にも伝播した。興奮が脳梁（CC）近くのACCの端に達すると、その後反対側の半球に広がり、対側ACCの最も腹側に現れた。対照マウスの代表的なピクセル単位の光信号トレースを図2A（黒のトレース）に示し、スライスの蛍光画像に重ねた。活動伝播の連続画像を図2B左に示し、隣には、各ピクセルのピーク信号値（振幅マップ）を示した（図2B中央パネル）。また、これらのピーク値の20%に達するまでの立ち上がり時間（潜時マップ）の蛍光画像への投影を表している（図2B,右パネル）。

CPZを投与したマウス（CPZマウス）の冠状スライスを用いて対照マウスと同様に刺激し、その代表的なピクセル単位の光信号を赤いトレースで図2Aに示した。対応する連続画像と、振幅および潜時マップは、図2Cに示した。注目すべきことに、CPZマウスのスライスでは、活動の半球間伝播は見られなかった。しかし、RECマウスでは、図2Aの緑のトレースと図2Dの活動伝播の画像で示すように、半球間伝播が回復した。なお、VSDは脂質に富む成分に優先的に取り込まれるため、CCなどの有髄軸索で

バックグラウンド蛍光が上昇する。その結果、CCからの生理学的データは記録できなかった。代わりに、ACC内の半球内および半球間の神経信号伝播に焦点を当てた。

2-3-2 SL3で最も顕著であったCuprizone投与の効果

計15匹のマウスから得た60枚のスライスからの平均データを使用して、CPZ投与の効果の評価した。図3Aは、図の左側（同側皮質）の部位a~dでの刺激時の対照およびCPZマウスのSL1~SL4の平均振幅マップを示している。

対照スライスでは、すべての振幅マップで、神経活動が刺激部位から同側（刺激と同じ側の脳）と対側（刺激と反対側の脳）の両方に伝播していることが示された。半球間の広がり程度は、SL3の刺激b~dで最も顕著であった。これらの条件では、同側と対側の活動マップはほぼ対称であり、対側皮質の広がり同側皮質の広がりと同程度であった。この対称性は、図3Cの黒線で示したように、ACCの背腹軸に沿ったピーク振幅プロファイルでも明らかであり、SL3でほぼ対称的な伝播が示されている。

他のスライス（SL1、SL2、およびSL4）では、対側で観察された活動は同側と比較して弱い応答を示した。この活動の低下は、スライスの背側（上部）領域で特に顕著であった。図3Cに示したプロファイルでは、この領域は中心（0）から遠い側として表示され、対側での弱い応答が強調されている。この観察結果は、これらのスライスでの半球間接続の低下を反映している可能性がある（Gusain et al. 2023）。同側皮質の腹側付近の刺激は、対側へのより強力な半球間伝播を引き起こす傾向があった。しかし、対側皮質の伝播活動は、皮質の背側（上部）領域に向かって弱い広がりを示した。

CPZマウスのSL3では、活動の半球間伝播がほぼ完全にブロックされた。同側は対照マウスと比較して反応が低下し、対側は実質的に反応を示さなかった。

2つのグループ間の光信号の違いを明確にするために、2つの光学データセット間で詳細なピクセル単位の統計比較を実行した。これらのピクセル単位の統計解析による p 値は、有意な領域を示すために、図 3A の右端のパネルに疑似カラーで示している。SL3 の対側では、対照マウスと CPZ 投与マウスの間で統計的に有意な差 ($p < 0.05$) がみられた。また、SL3 の同側 ACC 内下部の cg2 (帯状皮質領域 2) における最も腹側の端でも有意差がみられた。この変化は、半球間伝播のほぼ完全な喪失と同時に発生し、局所的な接続性の顕著な変化を示唆している。同側の違いは、ACC の II/III 層内の SL2 と SL3 でも明らかであった。

CPZ の摂取を中止してから 5 週間回復したマウス (REC マウス) も対照マウスと比較した (図 3B)。SL3 では、CPZ によって引き起こされた半球間伝播の喪失がほぼ完全に回復し、対照マウスと比較してわずかな統計的差異が認められた。全体として、通常固形餌に戻してから 5 週間で、半球間および半球内の接続の両方で CPZ 誘発性障害がほぼ完全に回復した。

興味深いことに、振幅マップのラインプロファイル (図 3C) では、REC マウス振幅強度が増加した。この増加は特に SL1 と SL2 で顕著であり、同側皮質における背側の振幅が対照と比較して大幅に増大した。この過剰な回復は、特に皮質の背側領域で皮質活動の過剰補償の可能性を示唆している。

2-3-3 脱髄と神経興奮伝播の遅延

図 4 は、対照、CPZ、および REC マウスの平均潜時マップを示しており、刺激時点からの時間をピクセル単位で疑似カラーとして示している。これらのマップは、各刺激点において皮質全体で潜時がどのように変化するかを示している。ほとんどの場合、

潜時のパターンと関連する p 値がスライスのほとんどの領域で有意差を示さなかった (図 4A, B)。

半球間接続がほぼ完全に失われた SL3 でも、同側皮質の潜時は対照マウスと比較して有意差を示さなかった。

これらの観察結果は、同側皮質と対側皮質の両方について示した白い線に沿ったプロットでもなお明らかであり、グループ間で有意差がなく、ほぼ同じ潜時を示している (図 4C)。

2-3-4 CCにおける脱髄と再髄鞘化の組織学的解析

次のセクションでは、VSD イメージングに使用した切片を 12 μm の厚さに再薄切し、組織学的解析を行った。図 5A は、対照、CPZ、および REC マウスの各切片を FluoroMyelin Green (FMG) で染色した際の CC の代表的な画像を示している。

CPZ マウスは、対照マウスと比較して CC の FMG 蛍光が大幅に減少しており、髄鞘形成が著しく低下していることを示している。

図 5B は、対照、CPZ、および REC マウスの各スライスを FMG で染色した時の CC 画像の蛍光領域における、対照マウス SL1 の平均値を 1 として他のスライスの値を正規化したグラフを示している。CPZ マウスは、対照マウスと比較して蛍光領域が大幅に減少している。また、REC マウスでは、通常固形餌を 5 週間摂取した後も、蛍光領域は対照マウスと比較して減少したままであり、再髄鞘形成プロセスが不完全であることを示している。この結果は、REC マウスにおいて CC の FMG 蛍光が減少していることか

ら、髄鞘形成がある程度の回復するものの、髄鞘形成が対照マウスレベルまで完全に回復するには不十分であったことを示唆している。

2-3-5 抗 PLP 抗体を用いた前頭前皮質における脱髄または再髄鞘化の免疫組織化学的解析

皮質組織の髄鞘形成の程度をさらに調査するため、図 6A に示すように抗 PLP 抗体染色を行った。この解析は、皮質領域における髄鞘形成をより正確に定量化するために使用され、特に髄鞘の重要な構成要素であるプロテオリポドタンパク質 (PLP) をターゲットとしている (Lindner et al. 2008)。

図 6B は、SL1 から SL4 にわたる抗 PLP 抗体染色の結果を示している。CPZ マウスでは、特に ACC 内上部の cg1 (帯状皮質領域 1) に隣接する皮質領域で、対照マウスと比較して PLP レベルが大幅に低下した。また、cg2 領域でも対照マウスと比較して PLP レベルが低下した。

REC マウスでは、対照マウスと比較して cg1 に隣接する皮質領域と cg2 領域の両方で PLP レベルが部分的に回復したが、依然として統計学的な有意差が認められた。

注目すべきことに、PLP 染色によって示された髄鞘の構造的回復は、VSD 光信号で観察された機能的回復と完全には相関していなかった。VSD イメージングでは神経興奮伝播の大幅な機能的回復を示したが、基礎となるミエリン構造はまだ対照レベルに戻っておらず、この機能の回復には完全な再髄鞘形成とは無関係な代償メカニズムが関

与している可能性があることを示唆している。

2-4 まとめ及び考察

この研究では、CPZの投与がACCの半球間神経伝達を、特に冠状スライスの特定の部位で障害することを実証している。単一光子広視野膜電位感受性色素イメージング（VSDI）（Gusain et al. 2023）を使用して、特定のスライス（SL3）で障害が最も深刻であることが観察され、CPZ誘発性脱髄がACCの接続性に部位依存的な影響を示すことが示唆された。興味深いことに、CPZ投与中止後の活動の半球間伝播の機能回復は、対照と同程度にほぼ回復したが、組織学的解析では、特にCCで部分的な再髄鞘化しか示されなかった。この矛盾は、機能回復が完全な構造回復に厳密に依存しているわけではないことを示しており、神経の回復力をより包括的に理解するための生理学的アッセイの必要性を浮き彫りにしている。

2-4-1 脱髄の頭尾方向の位置に依存する脆弱性と不均一な効果

測定したスライスのうち、SL3（ブレグマから0.62 mm）で障害が最も顕著であり、ACCにおけるCPZ誘発性脱髄に対する脆弱性が位置に依存していることを示唆している。このスライス固有の効果は、特定の領域がCPZ毒性に対してより影響を受けやすいCC領域間の解剖学的または機能的差異を反映している可能性がある（Steelman et al. 2012）。

2-4-2 機能的回復と構造的回復の不一致

FMG および抗 PLP 抗体染色による組織学的解析により、CPZ 投与後の髄鞘構造が大幅に減少し、再髄鞘形成期には部分的な回復しか見られないことが明らかになった (Matsushima および Morell, 2001)。対照的に、VSDI では、CPZ 投与の中止後、SL3 における半球間伝播がほぼ完全に機能回復した。構造的回復と機能的回復のこの不一致は、ミエリンの完全な回復がなくても神経興奮伝播の機能的接続を可能にする代償メカニズムが関与していることを示唆している。これらのメカニズムには、シナプス可塑性、神経軸索の発芽、またはミエリンの喪失を補い、半球間コミュニケーションを維持できる代替神経経路が含まれる可能性がある (Kwiecien, 2010; Phokeo et al. 2002)。

また、本研究で使用した髄鞘形成の組織学的マーカーは、信号伝播に機能的に関連するミエリンの側面を完全には捉えていない可能性もある。これらの知見は、組織学的データのみを頼ると、神経回復の真の程度と中枢神経系の可塑性が過小評価される可能性が生じるため、構造評価と並行して機能的尺度を考慮する必要性を強く示している。

2-4-3 長距離線維と局所的微小回路の役割

本研究で観察された神経活動の伝播には、脳梁を介した直接的な半球間接続と前頭前野内の局所的微小回路活性化の両方が関与している可能性がある。機能的な半球間接続の喪失はこれまで十分に報告されていなかったが、いくつかの電気生理学的研究では、脱髄後の半球間接続の潜時が長くなることが報告されている (Bando et al. 2008 年, Crawford et al. 2009 年)。興味深いことに、私たちの研究では、部分的に脱髄の影響を

受けたスライス（SL2 および SL4。SL3 では完全な機能喪失のため潜時を測定できなかった。）でも、半球間伝播の潜時に大きな変化は見られなかった。電気生理学的測定で観察される潜時差は、VSDI で測定されるものと直接比較できない可能性がある。VSDI での応答は、主に単一シナプスおよび/または多シナプス接続から生じる興奮性シナプス後電位（EPSP）を表す（Tominaga et al. 2009）。この観察された脆弱性は、必ずしもこの脳領域の分子的または生理学的特異性を示すものではない。これらの差は、前頭前野のさまざまな位置で観察される不均一な脆弱性に寄与している可能性があり、局所的な接続性、髄鞘形成密度、または細胞構成の変動を反映している可能性がある。SL3 で観察された半球間接続の重大な障害は、CC の長距離線維の喪失に関連している可能性があるが、機能的コミュニケーションの回復は、局所回路が重要な代償的役割を果たしている可能性があることを示唆している。SL3 の cg2 の最も腹側の端で観察された大幅な蛍光強度の減少は、半球間伝播の全体的な喪失に寄与する可能性のある局所的な微小回路の変化を反映している可能性がある。これは、長距離接続が中断された場合、本研究で視覚化された半球内コミュニケーションが微小回路の活性化に大きく依存する可能性があることを示唆している。興味深いことに、半球間コミュニケーションの中断にもかかわらず、重大な障害のあるスライスでさえ、神経伝播の潜時に有意な変化は観察されなかった。これは、接続性の低下は、機能線維の伝導速度の低下ではなく、機能線維の数の減少による可能性があることを示唆している。脱髄および再髄鞘化中の電位依存性チャネルの再分配（Kanda et al. 2019; Lai and Jan. 2006; Lubetzki et al. 2020）も、伝導速度に大きな影響を与えることなく機能伝播を維持することに寄与する可能性がある。また、シナプスの喪失と GABA 作動性ネットワークの変化（Dutta et al. 2006; Werneburg et al. 2020）の寄与も考慮する必要がある。これらは、直接的な伝導特性とは無関係に神経興奮性を変化させる可能性があるためである。

2-4-4 MS への影響と今後の展望

この研究の知見は、中枢神経系における脱髄と機能回復の関係について重要な洞察を示した。REC マウスで観察された構造的回復と機能的回復の不一致は、生理学的評価と髄鞘形成などの構造マーカーでの組織学的評価を統合することの重要性を強調している。VSDI などの機能イメージング技術は、構造的評価では見逃される可能性のある機能的代償メカニズムを明らかにし、CNS の回復力と可塑性に関するより包括的な理解を提供する。

今後の研究では、光遺伝学的刺激や遺伝的にコード化されたカルシウム指標などのツールを利用して、これらの発見をさらに拡大し、脳内および脳半球間の接続における特定の経路と細胞構成成分の寄与をさらに分析する必要がある (Inagaki et al. 2019; Koga et al. 2024; Li et al. 2023; Luo et al. 2018; Petreanu et al. 2007)。さらに、脱髄に直面しても機能的接続を維持する局所微小回路の役割を理解することで、MS 患者の回復を促進するための新しい治療ターゲットを提供できる可能性がある。また、女性被験者を含めて性差を研究することも、性別を問わず効果的な治療法の開発に不可欠である。

この研究は、CPZ 誘発性の脱髄が ACC 接続の重大な障害を引き起こし、特に脳半球間のコミュニケーションに影響を与えることを示している。ただし、ミエリンが完全に回復しなくても機能的回復が観察されたため、神経伝達を維持する代償メカニズムが関与していることが示唆された。これらの知見は、脱髄疾患の研究において構造評価とともに機能的評価を組み込むことの重要性を示している。局所的な微小回路と代償メカニズムが機能回復にどのように貢献するかをより深く理解することで、多発性硬化症および関連疾患に対するより効果的な治療介入への道が開かれる可能性がある。

第3章 膜電位感受性色素イメージング法を用いた加齢による海馬機能変調の解明

3-1 序論

近年、医学や医療技術のめざましい進歩により、寿命は延び、高齢人口が急増している。そのため、加齢に伴う神経変性疾患（アルツハイマー病など）や認知機能障害の有病率も上昇している。したがって、神経変性疾患によるものや加齢に伴う通常の認知障害の根底にあるメカニズムの解明は、高齢化に伴う認知機能低下を予防または改善するために重要である。

加齢に伴う認知障害に関する研究において、記憶の符号化を成功させる上で海馬が重要であり、主な出力が海馬 CA1 錐体ニューロンを介することから、CA1 錐体ニューロンの加齢に伴う変化を特定することに焦点が当てられてきた。CA1 錐体ニューロンの加齢に伴う変化については、Ca²⁺イメージングや電気生理学的手法、ウェスタンブロット法、免疫組織化学的手法等により検討されており（Hajieva et al. 2009; Moyer Jr et al. 1992; Veng et al. 2002）、老化した CA1 錐体ニューロンにおける活動電位のバースト後過分極の増大は、活動電位のバースト中に細胞質カルシウムが増加することが一因である可能性が示唆されている。さらに、齧歯類への L 型電位依存性カルシウムチャネル阻害剤の投与により加齢関連学習障害が改善することも報告されている（Oh et al. 2016）。これらは、カルシウム恒常性の変化と老化に関連する認知障害との間の潜在的な関連を示している。一部の文献では、リポ多糖類（LPS）による海馬神経細胞の慢性炎症が神経興奮性の増大を引き起こすことが示されており（Giansante et al. 2020）、

過興奮と脳内炎症の関連性が示唆されている (Kurki et al. 2023; Aloï et al. 2023)。

また、加齢は炎症反応の増強と関連することが多く、細菌やウイルスの感染、慢性炎症によってサイトカインや炎症性分子が生成され、これらが初期は脳内で神経保護に役立つが、その後は神経変性の原因となる。その結果、炎症は認知機能障害を引き起こすことが示唆されている (Blalock et al. 2003; Moore et al. 2009)。

これらの知見の蓄積にもかかわらず、正常な加齢動物における海馬の機能的な理解は未だ十分でなく、神経興奮伝播を可視化した例はほとんどない。そこで、本研究は、免疫組織化学的解析を通じて、海馬における加齢に伴う神経回路の異常と脳内炎症指数を明らかにすることを目的とした。

3-2 方法

3-2-1 使用動物

本研究で使用した C57BL/6J 雄マウスは、日本エスエルシー株式会社から導入し、12 時間の明暗周期 (8:00/20:00)、適切な温度および湿度 (20-24 °C、50-60 %) 下に管理された動物施設で飼育管理して動物実験に使用した。本研究における動物実験ならびに動物の飼育管理は「徳島文理大学における動物実験と動物の飼育及び保管に関する規定」に準拠して行った。また、全ての動物実験は徳島文理大学の動物委員会によって承認された (承認番号: KP22-83-2, KP23-83-2, KP24-83-2)。

3-2-2 スライス作製と VSD 染色

すべての動物実験は、徳島文理大学実験動物委員会の承認を得たプロトコルに従って行った。若齢マウス（対照）として 8-9 週齢、老齢マウスとして 70 週齢の雄マウス（C57BL6J, SLC, Hamamatsu, Japan）を深部イソフルラン麻酔下で断頭し、厚さ 350 μm の急性前海馬スライス標本を作製した。スライス標本の作成、VSD の調製や染色は、富永ら（Tominaga et al. 2019）が発表した方法を採用した（図 7）。

具体的な手順として、摘出した脳を氷冷人工脳脊髄液（ACSF; 124 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgSO₄, 1.25 mM NaHPO₄, 26 mM NaHCO₃ and 10 mM glucose, pH 7.4, 95% O₂/5% CO₂ 混合ガスでバブリング）中で急速に冷却した。5 分間冷却した後、海馬を周囲の皮質とともに切り離し、海馬構造全体を寒天ブロック上に置いた。腹側の垂直面側をシアノアクリレート接着剤でビブラトーム（VT-1000 及び VT-1200S, Leica）に取り付け、海馬を含む 350 μm 厚の横断切片を切り出した。各切片をメンブレンフィルター（Omnipore, JHWP01300, 孔径 0.45 μm , Merck Millipore Ltd., MA, USA）が固定されたプレキシガラスリング（内径 11 mm, 外径 15 mm, 厚さ 1-2 mm）上のフィルターに移した。

ACSF を通して 95% O₂/5% CO₂ 混合ガスが連続的にバブリングされているモイストチャンバー内にプレキシガラスリングを入れ、28°C の温度で 25 分間保ち、その後 10 分間室温に戻した。スライスを 110 μL の VSD 染色液 [0.1 mM Di-4-ANEPPS（D-1199, Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA）, 2.7% エタノール, 0.13% Cremophor EL（Sigma-Aldrich Co.）, 50% fetal bovine serum（Sigma-Aldrich Co.）, 50% ACSF] で、20 分間染色した。その後、スライスの余分な VSD 染色液を ACSF で洗い流し、遮光して室温で少なくとも 1 時間インキュベートした。

3-2-3 光計測条件

VSD で染色した海馬スライスをプレキシガラスリングごと記録チャンバーに移し、95% O₂/5% CO₂ 混合ガスでバブリングしながら 1 mL/min の速度で ACSF を連続的に灌流した。本研究では、抑制性神経を完全に遮断して興奮性神経の活性の違いを調査するために、10 μM GZ 存在下、非存在下で還流下して測定した。本研究では、内部を ACSF で満たしたガラス電極（外径 1.0 mm, 内径 0.75 mm）に Ag/AgCl ワイヤを挿入し、刺激電極として使用した。また、内部を 3M KCl 溶液で満たしたチップに Ag/AgCl ワイヤ（直径 0.3 mm）を挿入し、接地電極として使用した。刺激周期は、各刺激点に対して 0.5 ms の長さで 1 回刺激されるように設定した。電気刺激装置（ESTM-8, Brainvision, Inc., Tokyo, Japan）で 25 V の刺激強度で出力されるように設定し、スライス内の CA1 の放線状層（図 8）に電気刺激を加えた。

3-2-4 VSD 光信号の計測

スライスの可視化には、2 つの同一レンズ（#10447242; 実体顕微鏡 MZ シリーズ用の ×5 対物レンズ, Leica Microsystems）を備えた落射蛍光光学系を使用した。一つは対物レンズ用、もう一つはチューブレンズ（F1.4 85 mm, SAMYANG）として使用した。スライスは、フィルター（530 ± 30 nm）を通した安定化 LED 光源（LEX2-LZ4, Brainvision, 東京, 日本）からの励起光で照らされ、生成された蛍光は、発光フィルター（>590 nm）を通過し、カメラ（MiCAM03, Brainvision, 東京, 日本）に投影された。このシステムにより、高フレームレート（特に明記しない限り 1 ms/フレーム）と高空間解像度（256 × 256 ピクセル）で海馬スライス全体の神経活動が記録可能となった。VSD 蛍光の初

期蛍光量に対する変化の割合 ($\Delta F/F$) を光信号として用いた。

3-2-5 凍結切片の作製

スライスを光計測した後、4% PFA を入れたスクリー管瓶に入れ、4℃で固定した。セルカルチャープレート 12 ウェルに必要なスライスを取り出し、PB で5分間の振盪を3回行うことにより余分な4% PFA を除去し、氷晶形成防止のため、氷上で7% sucrose / PB により15分間振盪した後、30% sucrose / PB に変えて同様に振盪した。次に、予め、プラスチック容器 (Tissue-Tek Cryomold, 4565 or 4566, Sakura Finetek Japan Co., Ltd.) に包埋材 (Tissue-Tek O.C.T.Compound, 4583, Sakura Finetek Japan Co., Ltd.) を入れて-20℃に設定したクリオスタット (HM525NX, Thermo Fisher Scientific) の中で凍結させておき、350 μm スライスを貼り付けるために表面を削って平にした。ショ糖置換を終えた350 μm スライスを透明なフィルムに乗せ、余分なショ糖液をろ紙で除いた後、凍結した包埋材の平らな面に貼り付け、直ちにフィルムを剥がして上から包埋材を塗り、凍結させた。この凍結スライスから厚さ 12 μm の凍結切片を作製し、切片を PBS に浮かべてスライドガラス (クレストコートスライドガラス, SCRE-01, Matsunami Glass Ind., Ltd) ですくい取り、余分な PBS をキムワイプで除いた後、室温で乾燥させた。作製した凍結切片は乾燥用シリカゲルを入れた遮光ボックスに入れ、使用するまで-80℃で保管した。免疫染色に用いるため、マイクロームでカットした直後のスライスでも同様に厚さ 12 μm の凍結切片を作製した。

3-2-6 抗原賦活化処理

-80°Cで保管していた遮光ボックスを室温に戻した後、切片を PBS に 5 分浸潤する操作を 3 回行い、余分な包埋材を除去した。切片を 75°C に加温した 0.05% citraconic acid 水溶液 (pH7.4) に浸し、75°C の恒温槽中で 1 時間静置した後、PBS 中での 5 分間洗浄を 3 回行った。以後の操作で反応液が拡散するのを防ぐために、撥水剤 (ブロックペン, 株式会社硝英製作所, 51002) で切片を丸く囲った。

3-2-7 免疫蛍光染色

凍結保存していた切片を室温に戻した後、PBS 中で 5 分間の洗浄を 3 回行った。以後の操作で反応液が拡散するのを防ぐため、撥水材 (ブロックペン, 株式会社硝英製作所, 51002) で切片を丸く囲った。各切片を 0.2% Triton X-100 を含む PBS (0.2% Triton-PBS) で 5% に調製した正常 donkey 血清 (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, USA) を用いて、室温で 1 時間ブロッキングを行った。PBS 中で 5 分間洗浄し余分な正常 donkey 血清を除去した後、0.2% Triton X-100 を含む PBS (0.2% Triton-PBS) で 1000 倍に希釈した一次抗体 (rabbit 抗 Iba1 抗体; 019-199741, 富士フィルム和光純薬株式会社, chicken 抗 GFAP 抗体; 6701-2, EnCor Biotechnology 社) を用いて 4°C で一晩反応させた。切片を軽く振って余分な反応溶液を除いた後、PBS 中で 5 分間の洗浄を 3 回行った。続いて 0.2% Triton-PBS で 200 倍に希釈した二次抗体である、Cy3 標識 donkey 抗 rabbit 抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, USA, 711-166-152) または Alexa488 標識 donkey 抗 chicken IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, USA, 703-546-155) と 500 倍に希釈した核検出用のプローブ (TO-PRO[®]-3 ヨウ化物, Thermo Fisher Scientific, T3605) と室温で 2 時間反応させた。切片を軽く振って余分な二次抗体液を除いた後、PBS 中で 5 分間洗浄を 5 回行った。その後、無蛍光 Glycerol

(66.7% Glycerol, 0.167 M Sodium carbonate buffer, pH8.6) を封入剤としてカバーガラス (22 mm x 24 mm, Matsunami Glass Ind., Ltd) を被せた。これらの免疫蛍光染色標本は、共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FV1000, Olympus) で観察し、海馬全体を撮影した。

3-2-8 データ処理と統計学的処理

光計測で得られたデータは、専用解析プログラム (BV_Ana, Brainvision) と IgorPro (ver. 9, WaveMetrics, Portland, OR) のカスタム マクロ プログラムと Excel を使用して解析した。すべてのデータは平均 ± 標準誤差で表示し、n はスライス数を表す。統計学的有意差は、 p 値が 0.05 未満の場合を有意差ありと判断した。図中では統計学的有意差を示す記号を、* ($p < 0.05$)、** ($p < 0.01$) で表記した。

免疫組織染色で得られたデータは、画像処理ソフトウェア ImageJ のディストリビューションである Fiji (version 2.14.0/1.54f) を用いて適切な閾値を設定し画像全体の蛍光面積を測定した。また、測定領域の全面積に対する蛍光面積の割合も算出し、対照群を基に正規化した値を求めた。

3-3 結果

3-3-1 海馬 CA1 領域の刺激に対する海馬全体の VSD 光信号イメージング

代表的な神経興奮伝播の連続画像を図 9 に示した。連続画像は、各ピクセルのピーク信号値 (振幅マップ) を表し、活動の振幅を示している。

海馬スライスの背側（上部、大脳皮質に近い側）にある CA1 領域の放線状層の電気刺激（図 9A,C）は、CA1 領域から CA3 領域への神経活動の伝播を誘発した。この神経活動の伝播範囲は、未処置（ACSF のみ）の状態では対照マウスと比較して老齡マウスの海馬では減少していた（図 9A）が、GZ を反応させると老齡マウスの海馬での伝播範囲は対照マウスと同程度になった（図 9C）。

3-3-2 海馬 CA1 領域における VSD 光信号のトレース解析

連続画像に示した振幅マップのうち、海馬 CA1 放線状層における蛍光強度変化のトレースを図 9B,D に示した。トレースは連続画像と同様に解析点でのピーク信号値を表し、活動の振幅を示している。

未処置では、刺激後 10ms ほどで急激な神経活動が生じ、その後 100 ms ほどで活動が急速に減弱し、徐々に反応がなくなった。初めの急激な神経活動は対照マウス（黒のトレース）よりも老齡マウス（赤のトレース）の方が増強したが、その後、活動が急速に減弱して持続し、対照マウスよりも早く反応がなくなった（図 9B）。GZ を反応させると、未処置の時と同じく刺激後 10 ms ほどで急激な活動の増大が生じたが、その後 30 ms ほどかけてピークに達し、興奮性を保ったまま緩やかに活動が減弱した。この反応は常に老齡マウスの方が強い神経活動を示した（図 9D）。

3-3-3 海馬全体の抗 Iba1 抗体と抗 GFAP 抗体を用いた免疫染色

対照マウスと老齡マウスにおける、マイクロトームでスライスにした直後（刺激を受けていないスライス）と光計測で電気刺激した後（刺激を受けたスライス）の海馬の脳

内炎症の程度を調査するため、抗 Iba1 抗体（図 10）と抗 GFAP 抗体（図 11）染色を行った。この解析は、脳内炎症の指標であるミクログリアとアストロサイトの発現を調査するために行われた。Iba1（Ionized calcium-binding adapter molecule 1）はミクログリア活性化における細胞イベントの基礎となるアクチン細胞骨格の再編成を制御しており、活性化ミクログリアで強く反応する（Imai and Kohsaka. 2002）。GFAP（Glial fibrillary acidic protein）は中間系フィラメントを構成しており、その増加はアストロサイト活性化の重要な指標として知られている（Reilly et al. 1998）。この二つの抗体は脳内炎症の指標としてヒトを含めたさまざまな動物の研究で使用されている。

抗 Iba1 抗体染色において、両マウスとも刺激を受けたスライスでは、刺激を受けていないスライスと比較して、赤色の領域が増加しており（図 10A）海馬全体で抗 Iba1 抗体免疫活性が有意に増大していた。また、刺激を受けたスライスでは対照マウスと比較して老齢マウスの海馬全体で抗 Iba1 抗体の免疫活性が増大傾向であった（図 10B）。

抗 GFAP 抗体染色において、刺激を受けた老齢マウスのスライスでは、刺激を受けていないスライスと比較して、緑色の領域が増加しており（図 11A）海馬全体で抗 GFAP 抗体の免疫活性が有意に増大していた。また、刺激を受けたスライスでは対照マウスと比較して老齢マウスの海馬全体で抗 GFAP 抗体の免疫活性も有意に増強していた（図 11B）。

刺激を受けたスライスと老齢マウスでの抗 Iba1 抗体または抗 GFAP 抗体の免疫活性の増強と VSD 光信号で観察された興奮性の増強は相関していた。老齢マウスの海馬では、特に GZ 添加時の VSD イメージングで興奮性の増強傾向を示し、脳内炎症の指標であ

るミクログリアやアストロサイトの活性化が示唆された。

3-4 まとめと考察

この研究では、加齢に伴い海馬において過興奮性が見られること（Yassa et al. 2011; Haberman et al. 2017）や脳内炎症が進行すること（Kurki et al. 2023; Aloï et al. 2023）を実証している。単一光子広視野膜電位感受性色素イメージング（VS-DI）（Tominaga et al. 2019）を使用して、加齢により海馬 CA1 での過興奮性が見られることや、加齢や電気刺激によりミクログリアやアストロサイトといった脳内炎症を誘発するグリア細胞が活性化する可能性が示唆された。興味深いことに、組織学的評価では、抗 Iba1 抗体の免疫活性は刺激の有無によらず老齢マウスの方が増大していたが、抗 GFAP 抗体の免疫活性は刺激を受けていないスライスでは両マウスにおいて同程度であったが、刺激を受けたスライスでは老齢マウスの方が増大していた。これらの結果は、加齢による興奮性の増大と脳内炎症の進行を強く示している。また、電気刺激によって引き起こされるミクログリアやアストロサイトの活性化において、老齢マウスの方がより脆弱であることも示唆している。

3-4-1 加齢に伴う興奮性の増大傾向

VSD 光計測では、海馬スライスの未処置の状態と GZ を添加した状態で神経興奮の伝播と蛍光強度の変化を記録した。連続パネルに示した神経興奮の伝播画像において、未処置の状態では対照マウスと比較して老齢マウスの伝播範囲が減少していたが（図 9A）、GZ を添加すると老齢マウスの伝播は対照マウスと同程度となった（図 9C）。

蛍光強度の変化は神経活動の振幅を表しており、未処置の状態では、老齢マウスの方が対照マウスと比較して刺激直後の神経活動が大きくなり、その後は対照マウスよりも活動が低下し神経活動の持続反応が小さい状態が続いた（図 9B）。これは老齢マウスの方が神経細胞の脱分極性と過分極性が増加している可能性を示唆している（Moyer et al. 1992; Landfield and Pitler. 1984）。また、GZ 添加の状態では、両マウスにおいて神経活動が大きくなり、その後興奮が持続した。これはシナプス前 GABA_A 受容体を介したグルタミン酸作動性伝達の持続性促進が GABA_A 受容体阻害薬により阻害されたものと考えられる（Jang et al. 2005）。その反応は、対照マウスよりも老齢マウスの方が増大傾向であった（図 9D）。したがって、老齢マウスの海馬では対照マウスと比較して興奮性が高まっている傾向があり、刺激に対して過興奮性を示しやすくなっている可能性が示唆された。このような海馬の興奮性上昇は、加齢に伴う記憶機能の低下やアルツハイマー病の前駆症状である認知障害の主な原因として浮上しており、疾患神経病理のない加齢モデルにおいて海馬と機能的に相互接続された皮質構造の興奮性増加の証拠が示されている（Haberman et al. 2017）。

3-4-2 ミクログリアとアストロサイトの加齢に伴う活性化

VSD 光計測で使用したスライスを用いて脳内炎症の指標であるミクログリアのマーカーである抗 Iba1 抗体とアストロサイトのマーカーである抗 GFAP 抗体により免疫蛍光染色した結果、特に GZ 添加により興奮性を高めた老齢マウスの方において免疫活性の増大傾向が確認された（図 10,11）。これまでに、加齢脳における中枢神経系では主要組織適合遺伝子複合体 II（MHC II）や補体受容体 3（CD11b）などの炎症マーカーの発現が増加し、これらの多くは加齢脳のマクログリアに特異的に存在することが報告

されており、加齢に伴うミクログリアの炎症状態の増加が示されている (Godbout et al. 2005; Frank et al. 2006)。また、齧歯類とヒトの両方で加齢に伴いアストロサイトに特異的に存在する GFAP の発現が増加していることが報告されている (Nichols et al. 1993; Porchet et al. 2003)。さらに、ミクログリアから放出される炎症性サイトカインはアストロサイトの活性化に寄与しており、加齢脳や認知的衰退の悪化を誘発していることも報告されており (Clarke et al. 2018)、本研究結果はその一端を示している可能性がある。

3-4-3 加齢や刺激による過興奮と脳内炎症の関係

本研究では、GABA_A 受容体拮抗薬である GZ を添加し、抑制性神経活動を抑制した状態で VSD 光計測を行うと、老齢マウスは対照マウスと比較して興奮性が増大傾向であることが明らかとなった。これは加齢に伴う抑制性シナプスの退行、喪失、機能不全が多く、脳構造で観察されている (Dickstein et al. 2007) という過去の報告を裏付ける結果であると考えられる。このことは、私たちの VSD イメージングにより広範囲にわたる神経興奮伝播を捉えることで老齢マウスにおける神経興奮性の増大を視覚的に強調している。

さらに、免疫蛍光染色の結果は、ミクログリアにおける加齢と電気刺激による活性化傾向と、アストロサイトにおける電気刺激による老齢マウスでのより大きな活性化を示しており、老齢マウスの海馬での刺激に対するミクログリアとアストロサイトの過敏性を示唆している可能性がある。これまでに、老齢のヒトや齧歯類などでは若齢の成体と比較して脳のミクログリアがより活性化した形態へシフトしているという知見が蓄積されている (Choi et al. 2007; Perry et al. 1993; Kaunzner et al. 2010)。さらに、老齢の齧歯類のミクログリアは活性化後に炎症性サイトカインをより多く産生し、貪食

能の増強を示す。また、アストロサイトについても老化脳の海馬 CA1 における活性化の証拠が蓄積されている (Hayakawa et al. 2007; Kim et al. 2024)。加えて、ミクログリアとアストロサイトの神経興奮性については、活性化したミクログリアが放出する ATP が P2Y1R を介してアストロサイトを活性化し、このアストロサイトからグルタミン酸が放出され、神経興奮性を高めることも報告されており (Pascual et al. 2012)、抑制性シナプスの障害だけでなくミクログリアとアストロサイトの活性化が老化脳での過興奮に関与している可能性が考えられる。

3-5 今後の展望

この研究の知見は、海馬における加齢や電気刺激による神経興奮性や炎症性グリア細胞への影響について重要な洞察を示す。老齢マウスで観察された過興奮性と、加齢と電気刺激による脳内炎症の増大傾向は、生理学的評価と脳内炎症マーカーでの組織学的評価を統合することの重要性を強く示している。VSDI などの機能イメージング技術は、構造的評価では見逃される可能性のある機能的メカニズムを明らかにし、老化した海馬の電気刺激に対する過敏性に関するより包括的な理解を提供する。

今後の研究では、老齢マウスや神経過興奮を示すモデルを使用してミクログリアの機能を阻害するミノサイクリン等を用いた薬理学的実験や光遺伝学的刺激法などのツールを利用して、これらの発見をさらに拡大し、加齢に伴う過興奮と脳内炎症の関係をさらに分析する必要がある。

第4章 総括

第1章：多発性硬化症と CPZ モデルの関連性や半球間の情報伝達において重要な役割を果たす脳梁と ACC、多発性硬化症モデルの作製に古くから用いられている CPZ の給餌投与による脱髄のメカニズムと神経病理、そして VSD イメージングの特徴と病態モデルへの適用について述べた。

第2章：CPZ 誘発性脱髄マウスモデルの冠状断前頭前野スライスを用いて VSD 光計測と組織染色をおこなった。VSD 光計測により、脱髄した脳の特定の位置でのスライスにおける顕著な半球間連絡の障害が明らかとなった。興味深いことに、組織染色では再髄鞘化が不十分であったにもかかわらず VSD 光計測では対照マウスと同レベルに及ぶ神経興奮伝播の回復が見られた。これらの結果は、神経回路研究における生理学的手法を用いた機能解析と組織病理学的手法による構造解析を組み合わせた評価の必要性を示唆している。

第3章：加齢に伴う海馬機能変調を解明するために、70 週齢の老齢マウスの海馬スライスを用いて VSD 光計測と免疫蛍光染色をおこなった。VSD 光計測では老齢マウスにおいて過興奮の傾向が見られた。また、免疫蛍光染色では老齢マウスにおける加齢に伴うミクログリアの活性化と、刺激によるミクログリアおよびアストロサイトの活性化が見られ、老化脳の炎症性グリア細胞の刺激に対する過敏性が示唆された。近年、アルツハイマー病での過興奮や脳内炎症が報告されており、加齢での生理学的な特徴の理解はアルツハイマー病の発症予防のために重要となる可能性がある。

図表一覧

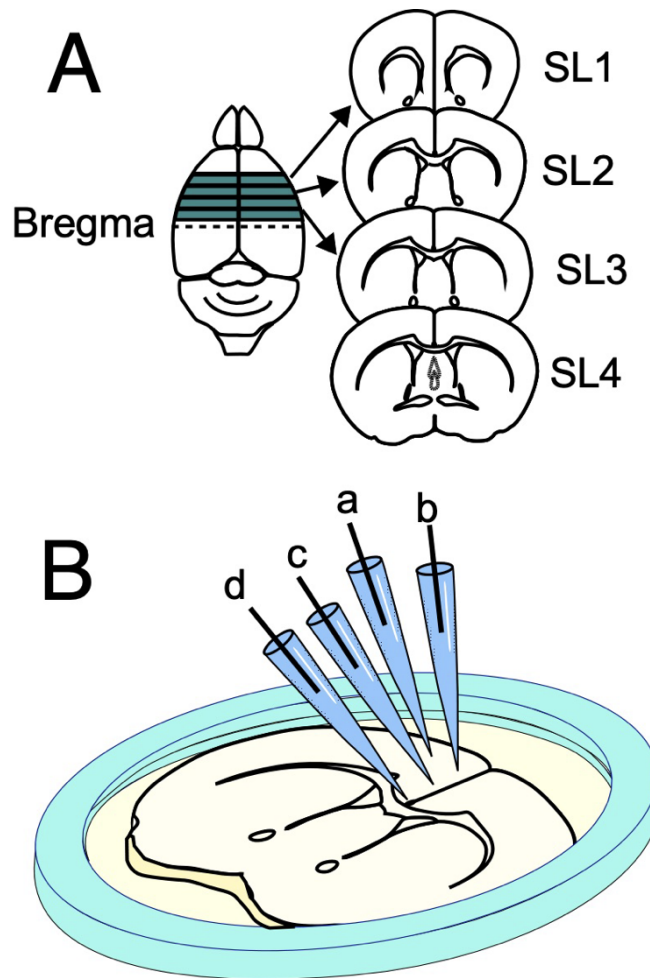


図1 使用したスライスの位置と刺激部位

(A) 前頭前野の吻側から尾側にかけての連続した冠状スライス。これらのスライスは、
脳の前側（前方）から後側（後方）の領域へと移動する前頭前野のさまざまな領域
を表している。

(B) 膜フィルター付きのリング上に置かれた SL3 スライスの概略図。皮質の層 II/III に
沿った 4 つの刺激部位 (a-d) を示している。

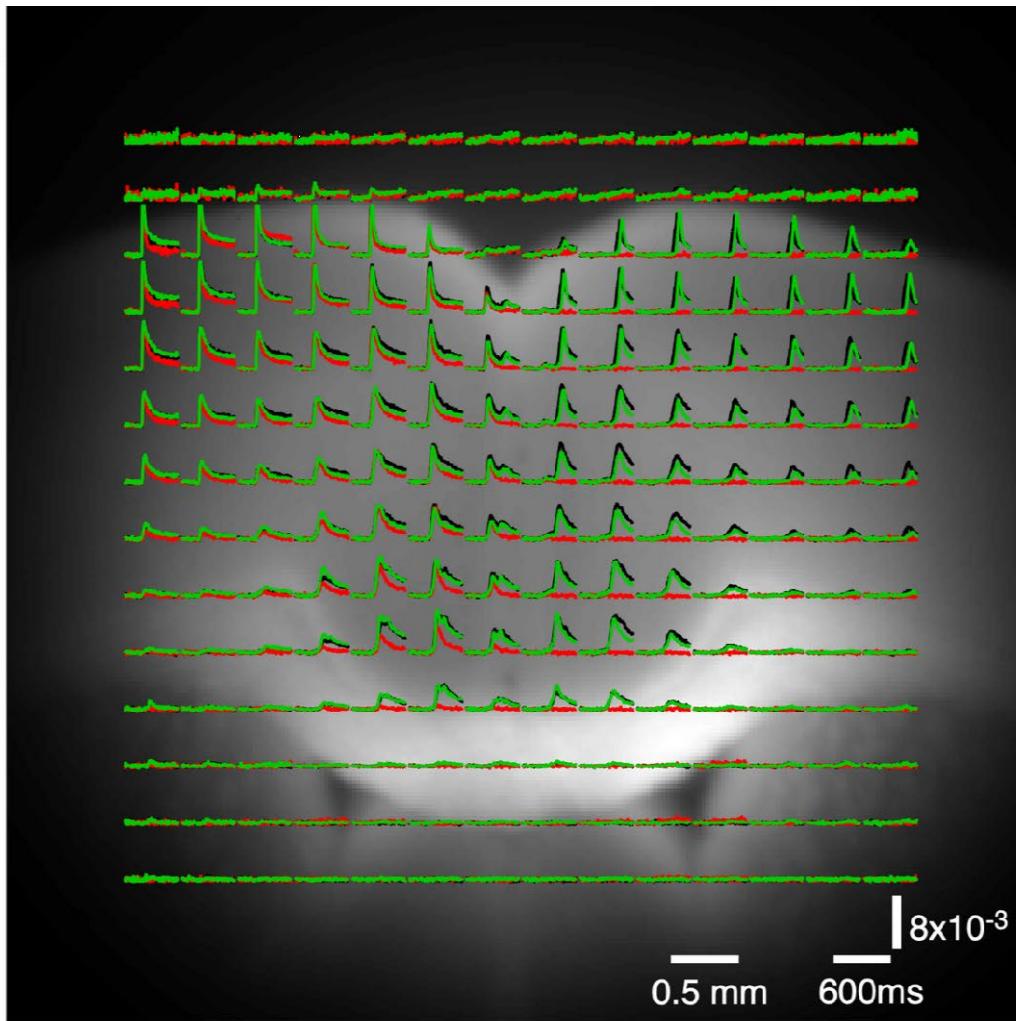
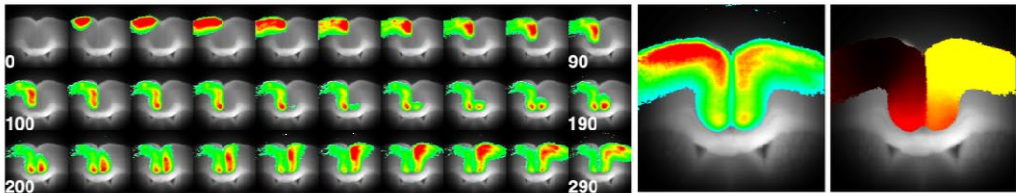
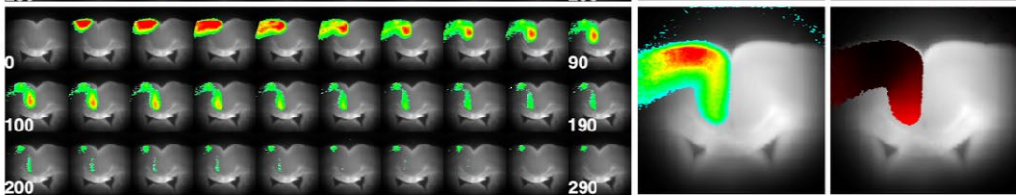
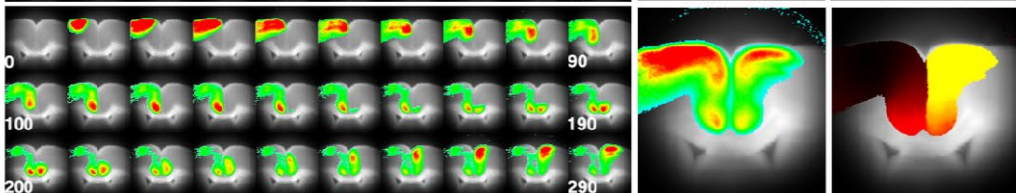
A**B****C****D**

図2 冠状スライスの前帯状皮質 (ACC) の層 II/III における刺激点 a の電気刺激に対する代表的な反応

(A) 高速 256 x 256 イメージング システムを使用して取得した ACC 冠状スライスの蛍光画像。この画像には、選択したピクセルから測定された光信号を表すトレースを重ねて表示している。黒いトレースは対照マウス (CPZ 非投与群) のデータに対応し、赤いトレースは CPZ マウス、緑のトレースは REC マウス (CPZ 投与中止群) を表す。

(B) 連続画像は、電気刺激後のニューロン活動の伝播を 10 ミリ秒単位で示している。これらの画像の隣には、各ピクセルのピーク信号値を元の蛍光画像に投影したパネルを示し、応答の振幅が強調されている。右端のパネルには、刺激時からの遅延値を表示し、スライス全体に活動が広がる速度を示している。

(C) および (D) CPZ マウス (パネル C) および REC マウス (パネル D) の同様のデータセットを示しており、対照マウスと比較した活動の広がりや伝播時間の違いが強調されている。

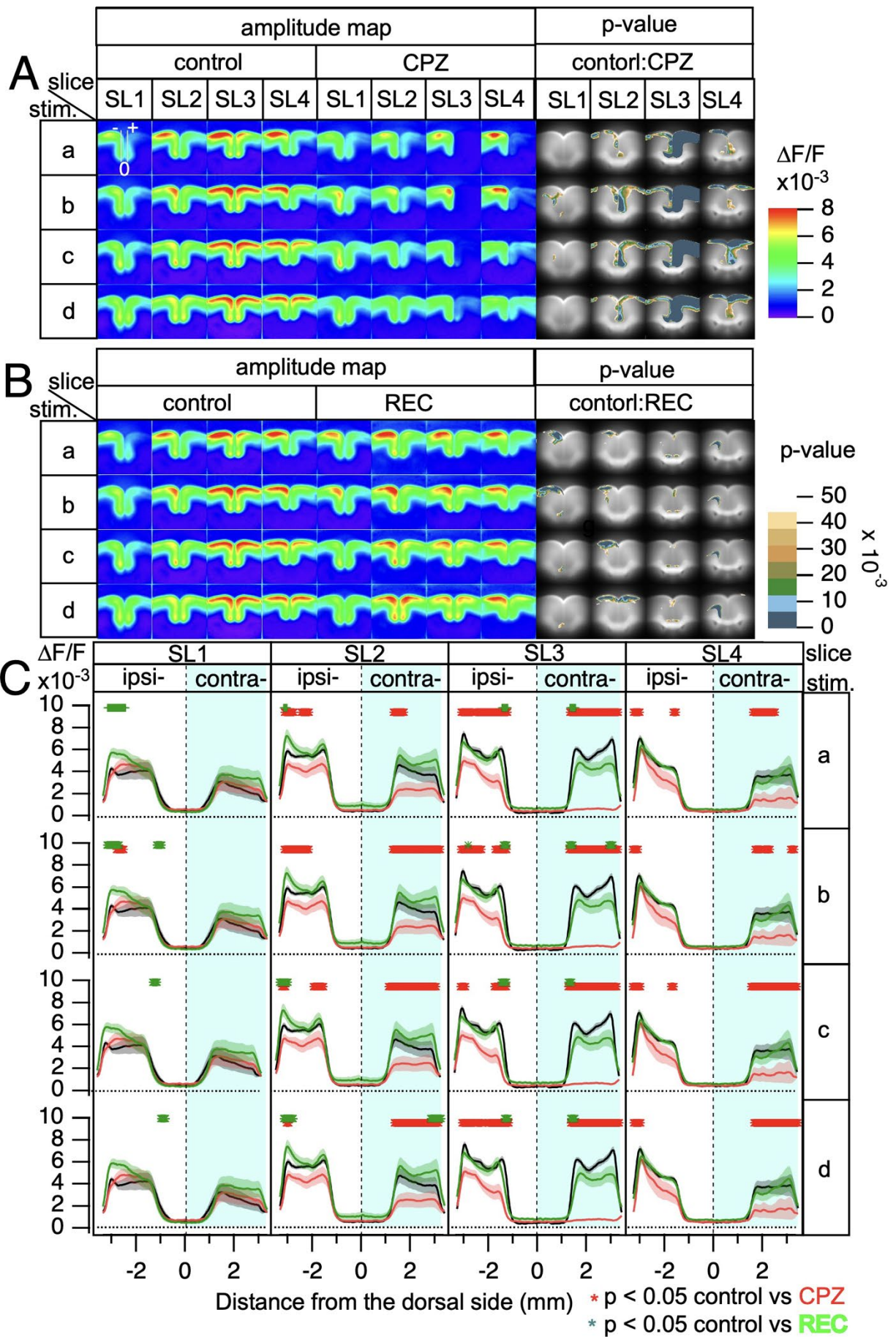


図3 スライス SL1 から SL4 にわたる電気刺激の平均振幅マップとラインプロファイル

(A) SL1 から SL4 (吻側から尾側へ位置を変えたスライス) に対する刺激 a から d の平均振幅マップを疑似カラーで表示している。各ピクセル値は応答振幅を表し、ANOVA を使用してピクセル単位の統計分析を実行し、対照マウスと CPZ マウスを比較した。p 値は、有意差を強調するために疑似カラーで表示している。

(B) パネル A に示されているのと同じ疑似カラー表現とピクセル単位の ANOVA 分析を使用して、対照マウスと REC マウスを比較した平均振幅マップ。

(C) 選択したラインに沿った振幅のラインプロファイルを SL1-stim 画像に重ね合わせ、対照 (黒線)、CPZ (赤線)、および REC (緑線) マウスのデータが平均の標準誤差 (SEM) とともにプロットしている。対照マウスと CPZ マウスの間の統計的に有意な差 ($p < 0.05$) を赤い記号で示し、対照マウスと REC マウスの間の差は対応するラインプロファイルグラフの上に配置された緑の記号で示している。

すべてのパネルで、刺激をスライスの半球ごとに加えた。各グループで $n = 6 \sim 10$ 。

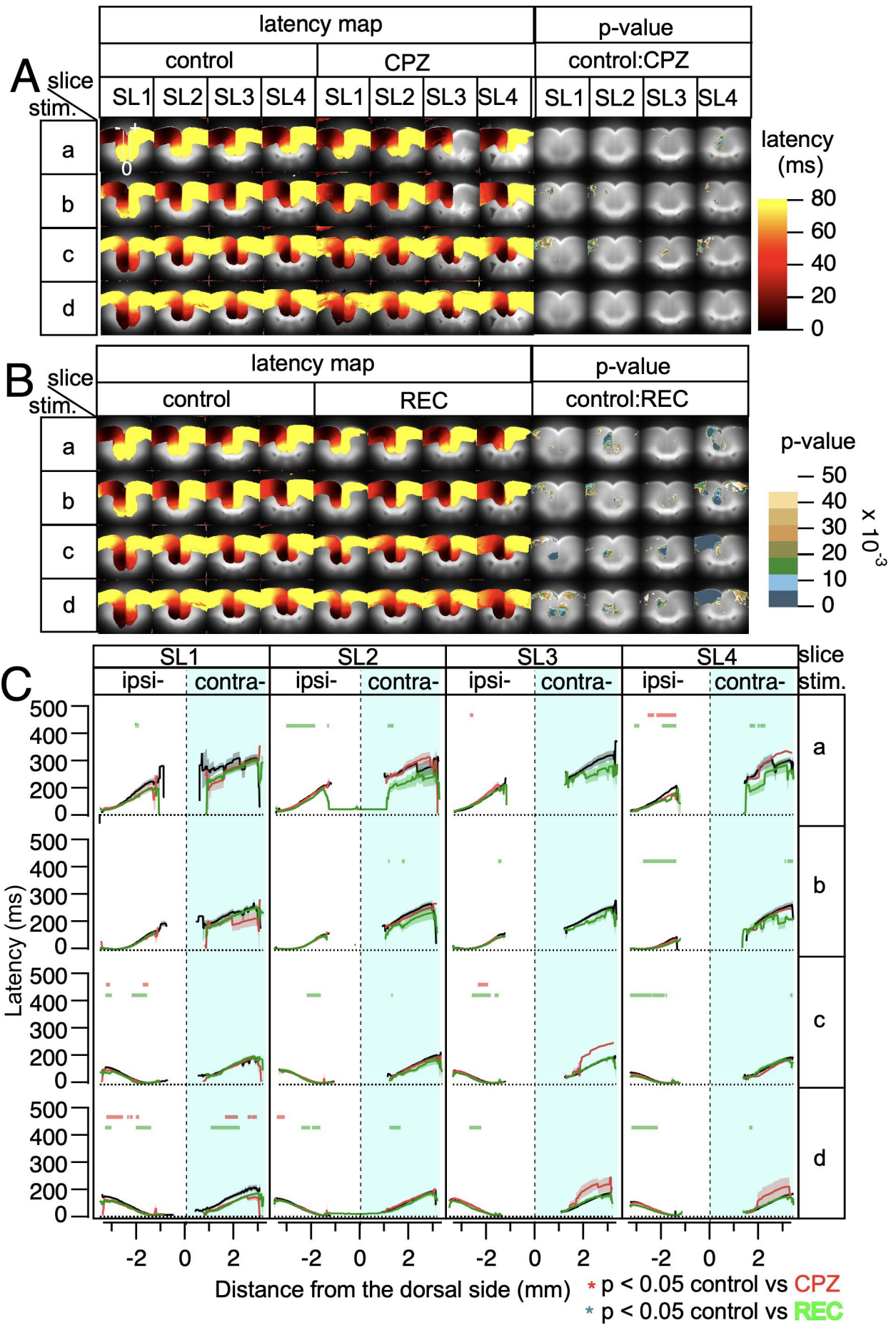


図4 スライス SL1~SL4 にわたる電気刺激の平均潜時マップとラインプロファイル

(A) SL1~SL4 での刺激 a~d 後の平均潜時マップを疑似カラーで表示。各ピクセル値は

応答潜時を表し、対照マウスと CPZ マウスを比較するために ANOVA を使用してピクセル単位の統計比較を行った。有意な潜時差がある領域は、対応する p 値を疑似カラーで示した。

(B) パネル A に示したのと同じ疑似カラー表現とピクセル単位の ANOVA 分析を使用して、対照マウスと REC マウスを比較した平均潜時マップ。

(C) 選択した線に沿った潜時のラインプロファイルが SL1-stim 画像に重ね合わされ、対照（黒線）、CPZ（赤線）、および REC（緑線）マウスのデータをプロットし、平均の標準誤差（SEM）も表示した。対照マウスと CPZ マウス間の統計的に有意な差 ($p < 0.05$) を赤の記号で示し、対照マウスと REC マウス間の有意な差は対応するラインプロファイルグラフの上に緑の記号で示した。

すべてのパネルで、電気刺激はスライスの半球ごとに加えた。各グループで $n = 6\sim 10$ 。

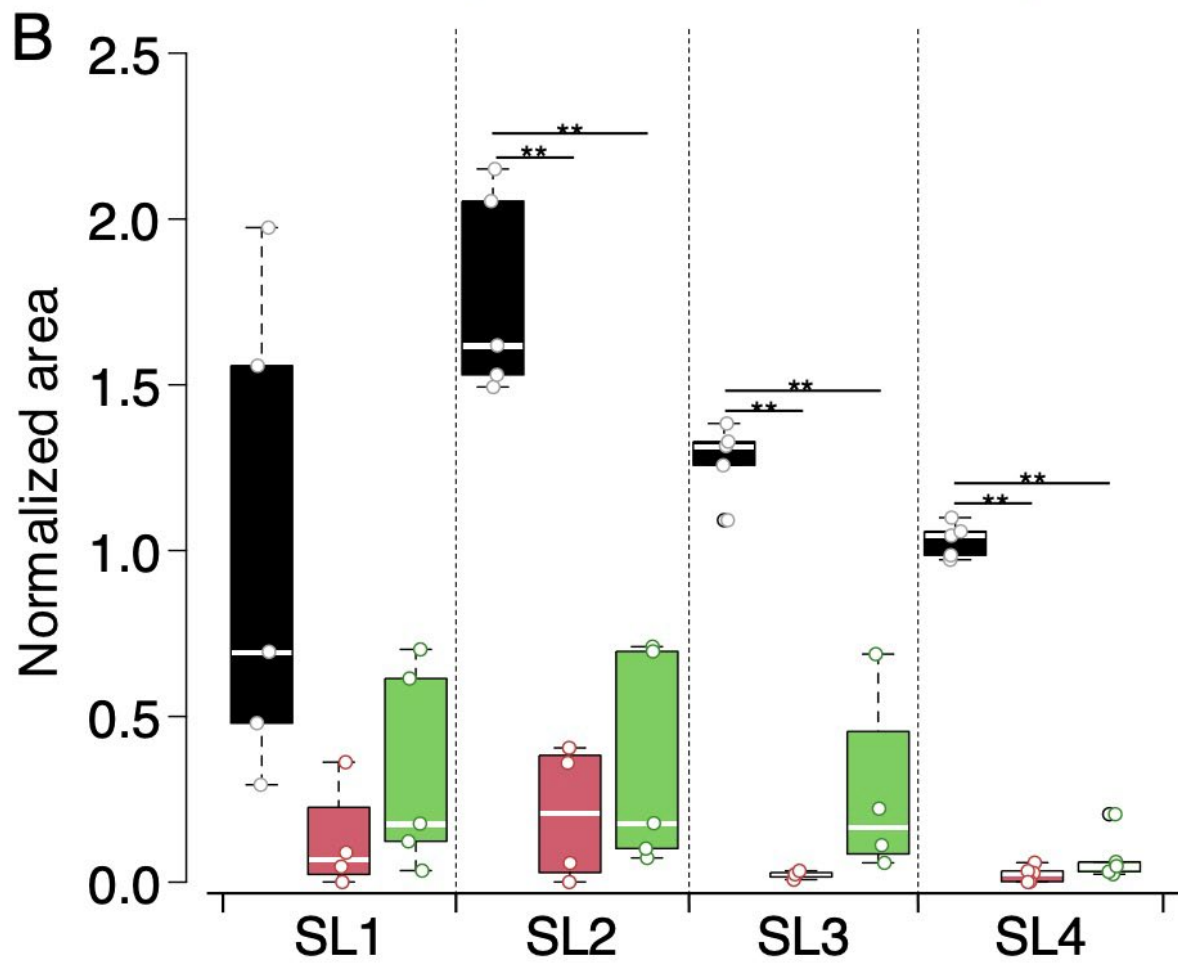
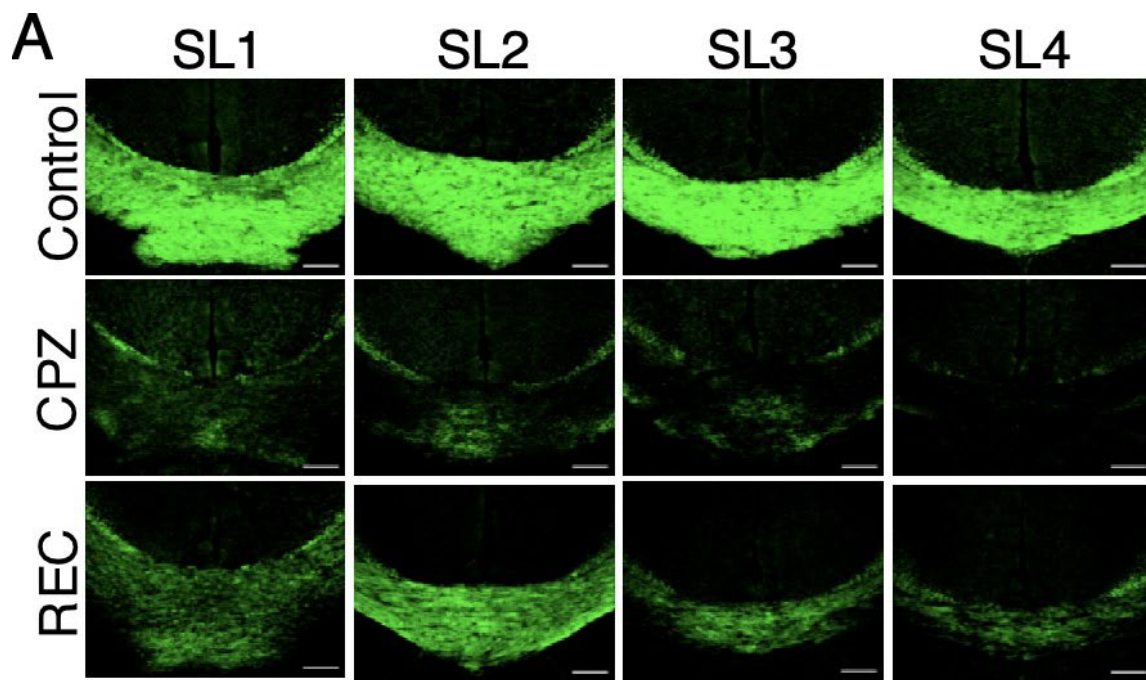


図 5 FluoroMyelin™ Green (FMG) を使用した電圧感受性色素イメージング (VSDI) 実験で使用したスライスのみエリン染色

(A) 対照、CPZ、および REC マウスのスライス SL1~SL4 における脳梁 (CC) 領域の FluoroMyelin™ Green (FMG) 蛍光画像。画像は各グループのみエリン含有量を示しており、蛍光の減少は脱髄を示している。スケールバー:200 μm 。

(B) 対照、CPZ、および REC マウスの FMG で染色した正規化されたみエリン領域を表すボックスプロット。対照 (黒)、CPZ (赤)、および REC (緑) マウスのデータを表示している。有意差は** $p < 0.01$ で示した。各グループの $n = 4 \sim 6$ 。

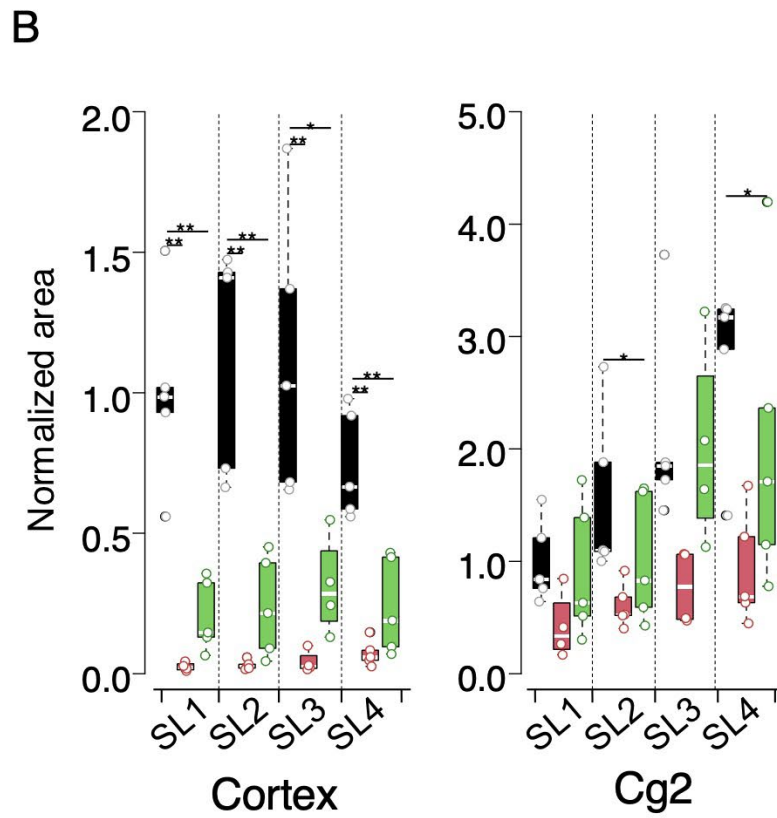
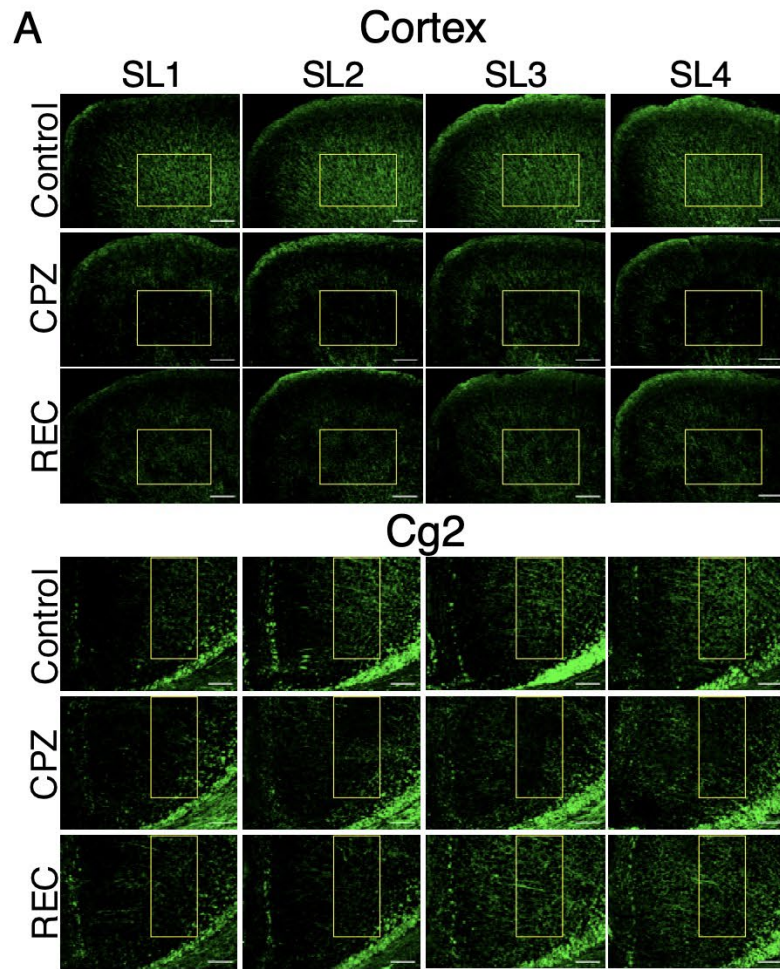


図 6 PLP 抗体を使用した電圧感受性色素イメージング (VSDI) 実験で使用したスライスのミエリン染色

(A) VSDI 実験で使用したスライスの抗 PLP 抗体免疫蛍光染色。対照、CPZ、および REC マウスのスライス SL1 から SL4 にわたって背側運動皮質と腹側皮質 (ACC の cg2) を撮影ターゲットにしている。染色された領域はミエリンの存在を示し、染色の減少は脱髄を示唆している。スケールバー:200 μm (Cortex)、100 μm (cg2)。

(B) 関心領域 (ROI、パネル A の四角いボックスで示している) の正規化された蛍光領域を表すボックスプロット。対照 (黒)、CPZ (赤)、および REC (緑) マウスのデータを表示し、有意水差は* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ で示した。各グループの $n = 4 \sim 6$

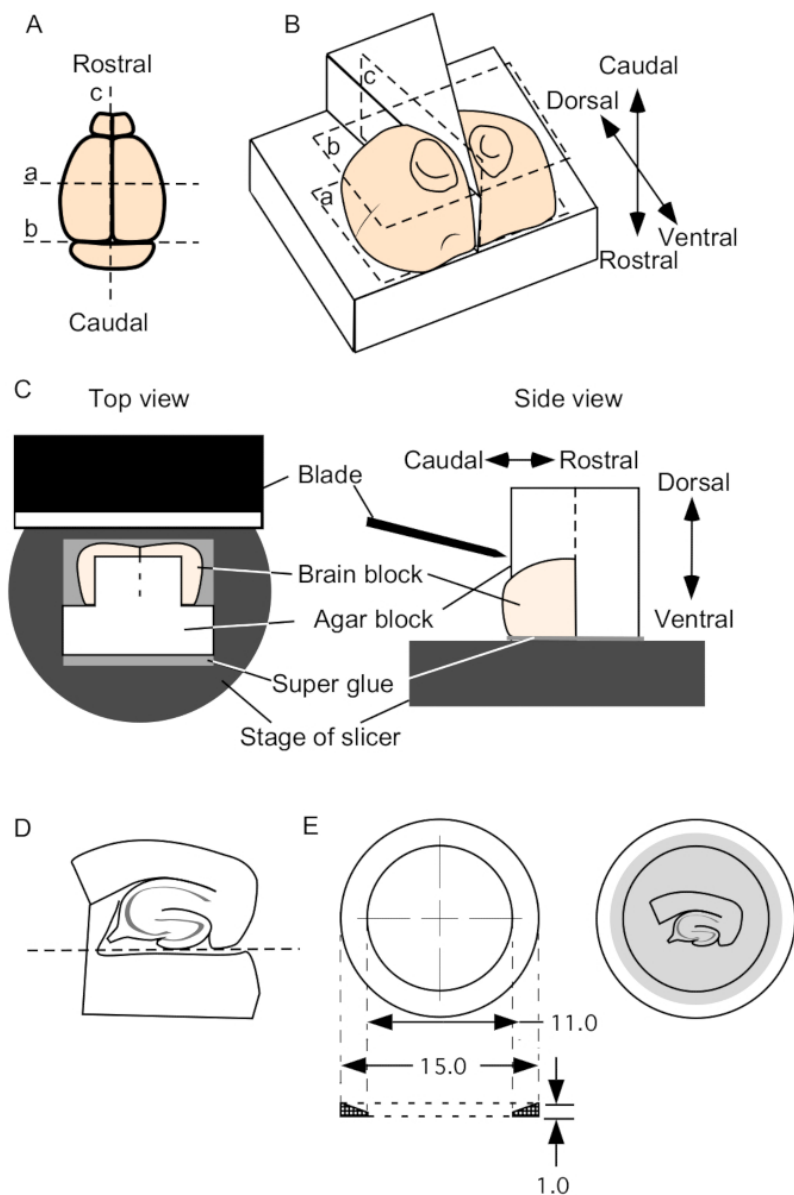


図7 マウス脳からの海馬スライス標本の作成

[Tominaga et al. 2019 より引用]

(A) 脳の切断方法の模式図。(B) 切断後の寒天ブロックへの載せ方。(C) スライサーでの切断様式。(D) 海馬切片（脳幹部をカット）。(E) メンブレンフィルター（孔径 $0.45 \mu\text{m}$ ）付きのプレキシガラスリング。Rostral は鼻側；Caudal は尾側；Dorsal は背側；Ventral は腹側。

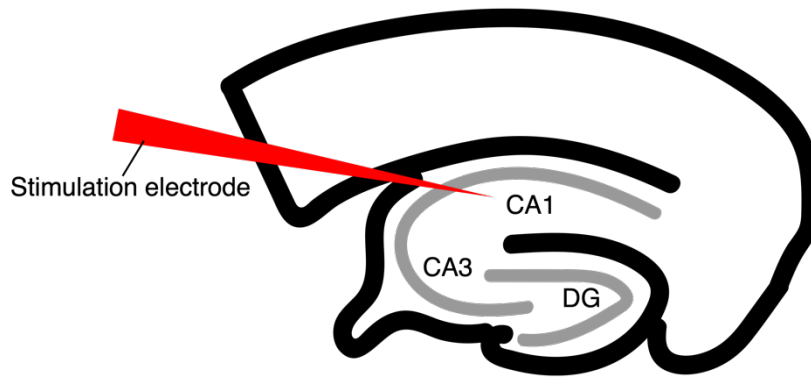
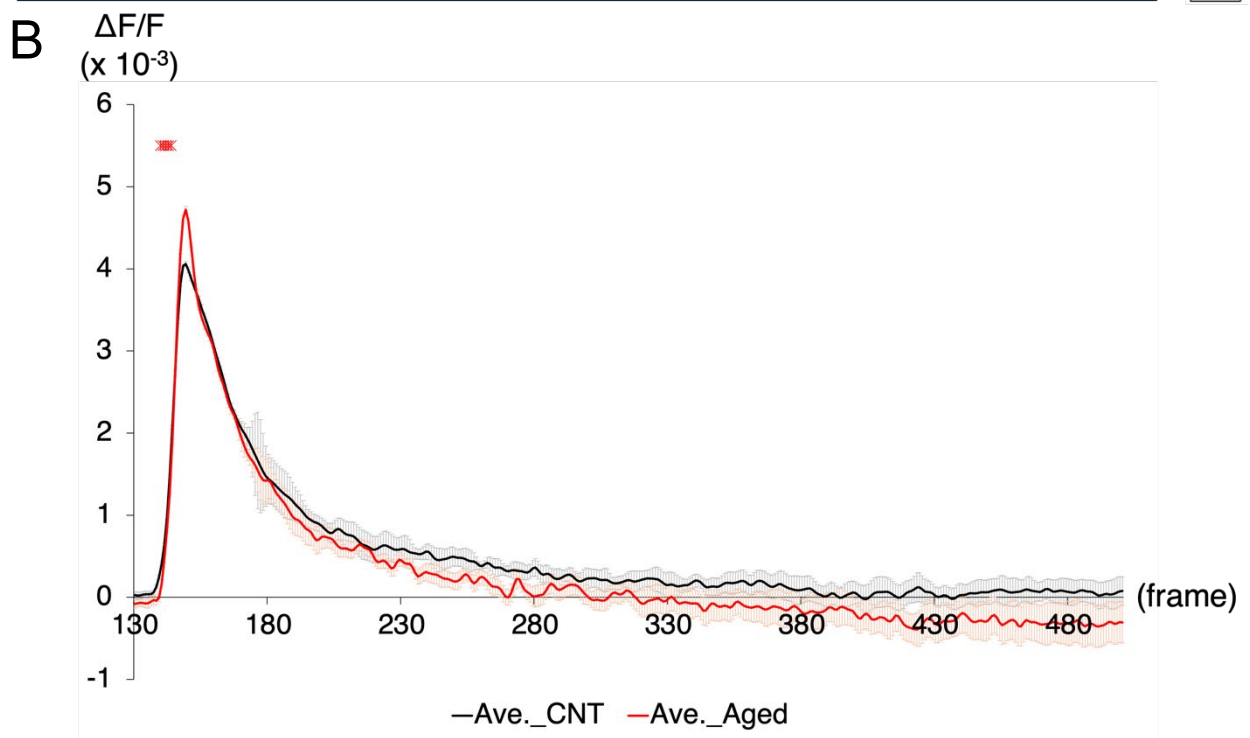
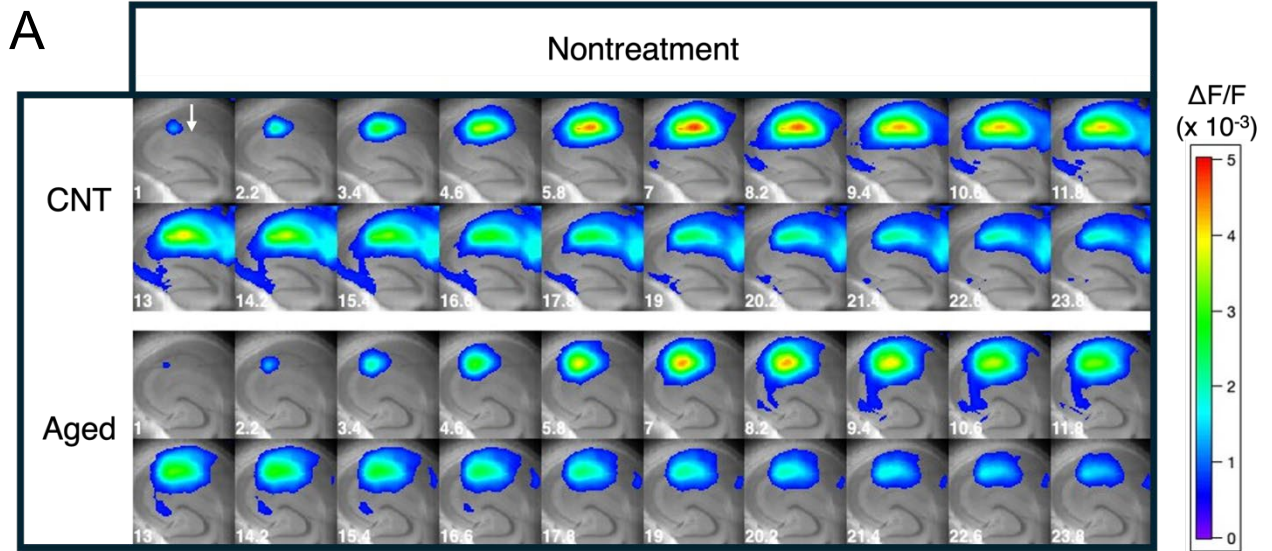


図 8 VSD 光計測における刺激部位

内部を ACSF で満たしたガラス電極（外径 1.0 mm, 内径 0.75 mm）に Ag / AgCl ワイヤーを挿入し、刺激電極（Stimulation electrode）として使用した。電気刺激装置（ESTM-8, Brainvision, Inc. Tokyo, Japan）で 25 V の刺激強度で出力されるように設定し、スライス内の CA1 の放線状層に電気刺激を加えた。



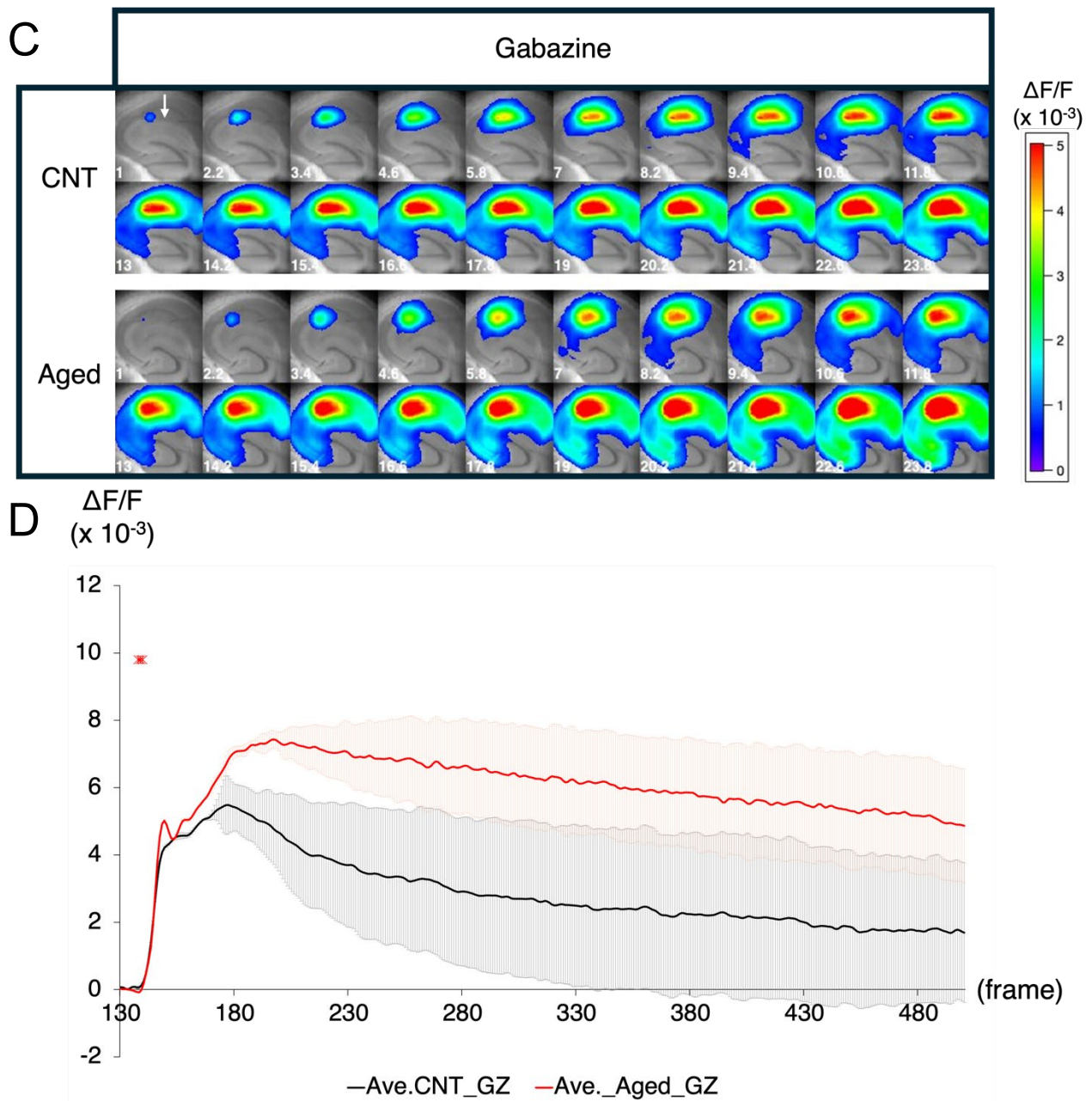


図9 海馬 CA1 電気刺激による神経興奮伝播の連続パネル

(A, C) Nontreatment (未処置: GZ 非存在下) 状態と Gabazine (GZ 存在下) 状態での対照 (CNT: 上段) と老齢 (Aged: 下段) マウスにおけるそれぞれの電気刺激による代表的な神経興奮伝播の連続画像を示している。連続画像は、電気刺激後のニューロン活動の伝播を 1.1 ミリ秒単位で示している。スケールバーは蛍光強度変化の大きさを擬似カラーで示している。

(B, D) GZ 非存在下 (A)、GZ 存在下 (C) の海馬スライスに、白い矢印で示した位置で電気刺激を加え、得られた蛍光強度の最大値の変化を示している。対照マウスは黒、老齢マウスは赤のラインでそれぞれの平均値を示している。また、対照マウスは薄いグレー、老齢マウスは薄い赤で標準誤差を示している。赤い印は両群間に有意差 ($p < 0.05$) 各グループの $n = 4\sim 8$ 。横軸はフレーム数 (frame)、縦軸は蛍光強度変化量 ($\Delta F/F \times 10^{-3}$)。

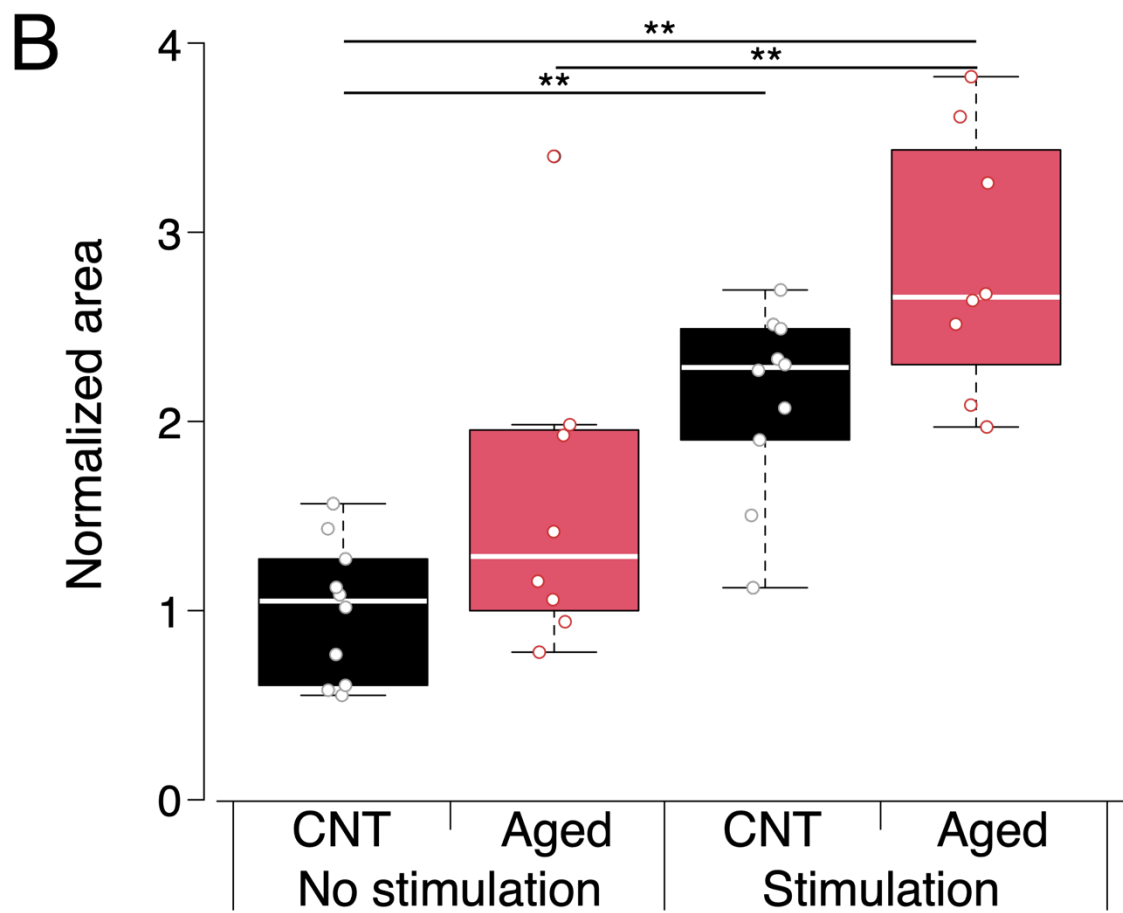
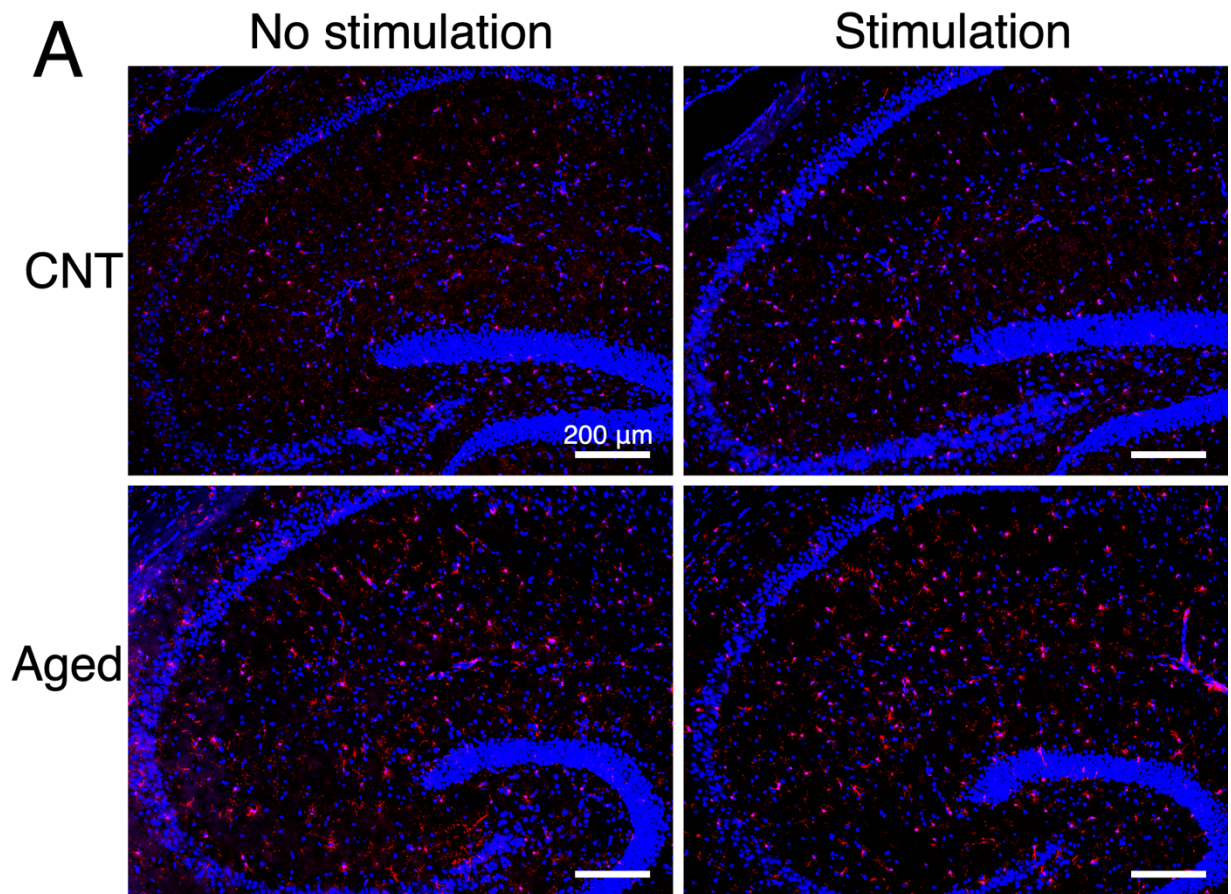


図 10 抗 Iba1 抗体を用いた免疫蛍光染色

- (A) 対照 (CNT) マウスと老齢 (Aged) マウスの電気刺激を加えていないスライス (No stimulation) と電気刺激を加えた後 (Stimulation) の海馬全体における抗 Iba1 抗体 (ミクログリアのマーカー) を用いた免疫蛍光染色像 (赤色)。TO-PRO[®]-3 ヨウ化物を用いた核染色は青色で示されている。スケールバー: 200 μm 。
- (B) 対照 (CNT) マウスと老齢 (Aged) マウスの抗 Iba1 抗体で免疫蛍光染色した正規化された免疫活性領域を表すボックスプロット。対照 (黒) マウスと老齢 (赤) マウスにおける電気刺激を加えていないスライス (No stimulation) と電気刺激を加えた後 (Stimulation) のデータを表示している。有意差は** $p < 0.01$ で示した。各グループの $n = 8 \sim 10$ 。

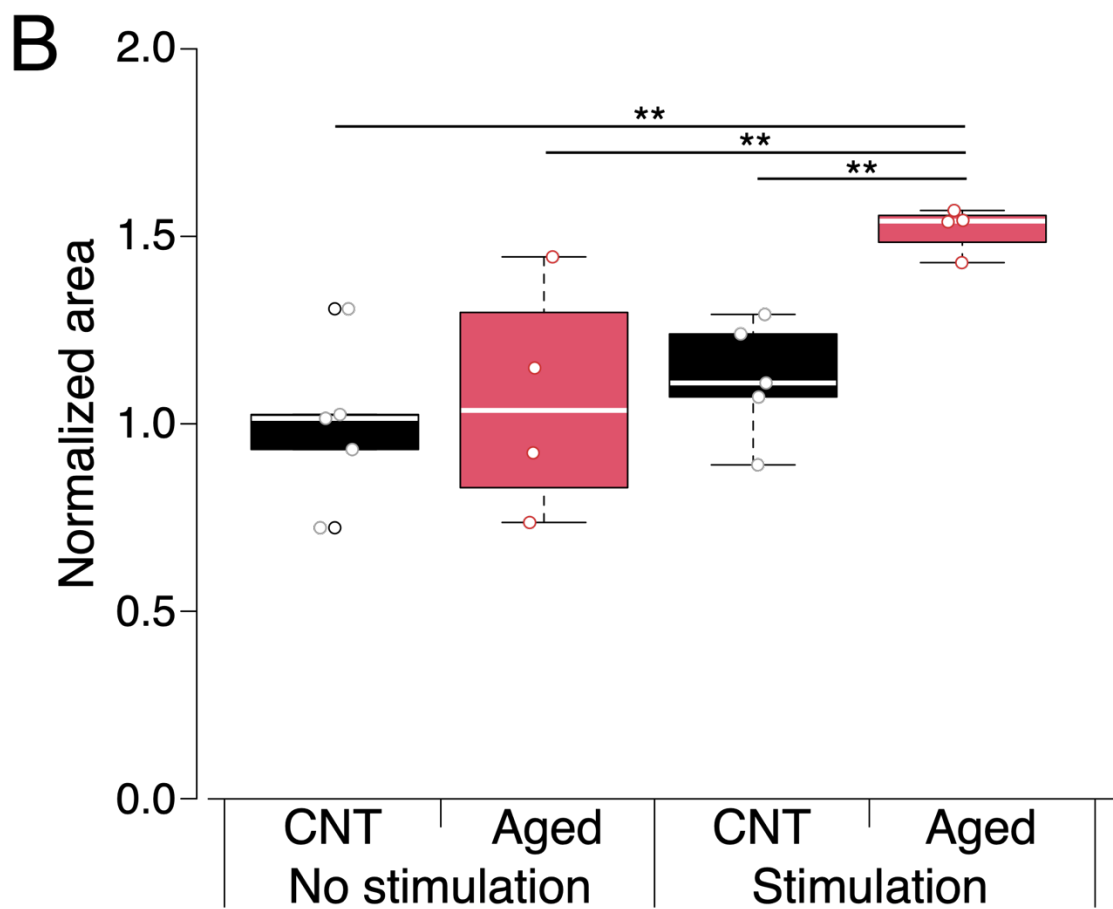
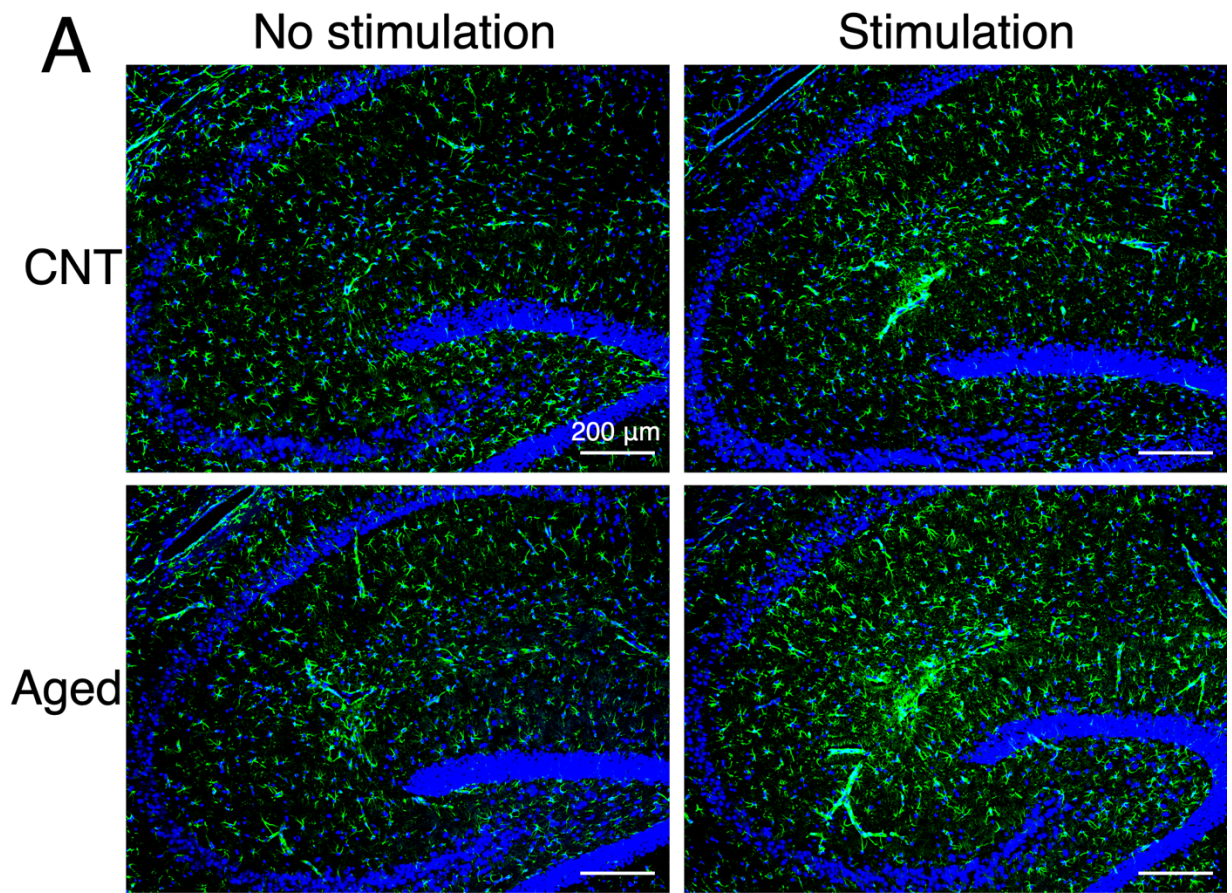


図 11 抗 GFAP 抗体を用いた免疫蛍光染色

(A) 対照 (CNT) マウスと老齢 (Aged) マウスの電気刺激を加えていないスライス (No stimulation) と電気刺激を加えた後 (Stimulation) の海馬全体における抗 GFAP 抗体 (アストロサイトのマーカー) を用いた免疫蛍光染色像 (赤色)。TO-PRO[®]-3 ヨウ化物を用いた核染色は青色で示されている。スケールバー: 200 μm 。

(B) 対照 (CNT) マウスと老齢 (Aged) マウスの抗 GFAP 抗体で免疫蛍光染色した正規化された免疫活性領域を表すボックスプロット。対照 (黒) マウスと老齢 (赤) マウスにおける電気刺激を加えていないスライス (No stimulation) と電気刺激を加えた後 (Stimulation) のデータを表示している。有意差は** $p < 0.01$ で示した。各グループの $n = 4 \sim 5$ 。

参考文献

Aboitiz, F., and J. Montiel. 2003. “One Hundred Million Years of Interhemispheric Communication: The History of the Corpus Callosum.” *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 36, no. 4: 409–20. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2003000400002>.

Aloi, Macarena S., Katherine E. Prater, Raymond E. A. Sánchez, Asad Beck, Jasmine L. Pathan, Stephanie Davidson, Angela Wilson, et al. 2023. “Microglia Specific Deletion of MiR-155 in Alzheimer’s Disease Mouse Models Reduces Amyloid- β Pathology but Causes Hyperexcitability and Seizures.” *Journal of Neuroinflammation* 20, no. 1: 60. <https://doi.org/10.1186/s12974-023-02745-6>.

Armstrong, Regina C., Tuan Q. Le, Emma E. Frost, Rosemary C. Borke, and Adam C. Vana. 2002. “Absence of Fibroblast Growth Factor 2 Promotes Oligodendroglial Repopulation of Demyelinated White Matter.” *The Journal of Neuroscience* 22, no. 19: 8574–85. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-19-08574.2002>.

Bakker, Arnold, Marilyn S. Albert, Gregory Krauss, Caroline L. Speck, and Michela Gallagher. 2015. “Response of the Medial Temporal Lobe Network in Amnesic Mild Cognitive Impairment to Therapeutic Intervention Assessed by fMRI and Memory Task Performance.” *NeuroImage: Clinical* 7: 688–98. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2015.02.009>.

Biancotti, Juan Carlos, Shalini Kumar, and Jean de Vellis. 2008. “Activation of Inflammatory Response by a Combination of Growth Factors in Cuprizone-Induced Demyelinated Brain Leads

to Myelin Repair.” *Neurochemical Research* 33, no. 12: 2615–28.

<https://doi.org/10.1007/s11064-008-9792-8>.

Blalock, Eric M., Kuey-Chu Chen, Keith Sharrow, James P. Herman, Nada M. Porter, Thomas C. Foster, and Philip W. Landfield. 2003. “Gene Microarrays in Hippocampal Aging: Statistical Profiling Identifies Novel Processes Correlated with Cognitive Impairment.” *The Journal of Neuroscience* 23, no. 9: 3807–19. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-09-03807.2003>.

Bö, L., J. J. G. Geurts, S. J. Mørk, and P. van der Valk. 2006. “Grey Matter Pathology in Multiple Sclerosis.” *Acta Neurologica Scandinavica* 113, no. s183: 48–50.

<https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2006.00615.x>.

Bø, Lars, Christian A. Vedeler, Harald I. Nyland, Bruce D. Trapp, and Sverre J. Mørk. 2003. “Subpial Demyelination in the Cerebral Cortex of Multiple Sclerosis Patients.” *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 62, no. 7: 723–32.

<https://doi.org/10.1093/jnen/62.7.723>.

Choi, Jung Hoon, Choong Hyun Lee, Dae Won Chung, In Ku Hwang, Moo Ho Won, Yeo Sung Yoon, Heungshik S. Lee, and In Se Lee. 2007. “Age-Related Changes in Ionized Calcium-Binding Adapter Molecule 1 in the Gerbil Hippocampal CA1 Region.” *Neuroscience Research* 58: S74. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2007.06.436>.

Clarner, Tim, Katharina Janssen, Lara Nellessen, Martin Stangel, Thomas Skripuletz, Barbara Krauspe, Franz-Martin Hess, et al. 2015. “CXCL10 Triggers Early Microglial Activation in the Cuprizone Model.” *The Journal of Immunology* 194, no. 7: 3400–3413.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401459>.

Cohen, L B, B M Salzberg, and A Grinvald. 1978. “Optical Methods for Monitoring Neuron Activity.” *Annual Review of Neuroscience* 1, no. 1: 171–82.

<https://doi.org/10.1146/annurev.ne.01.030178.001131>.

Crawford, Daniel K, Mario Mangiardi, and Seema K Tiwari-Woodruff. 2009. “Assaying the Functional Effects of Demyelination and Remyelination: Revisiting Field Potential Recordings.” *Journal of Neuroscience Methods* 182, no. 1: 25–33.

<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2009.05.013>.

Crawford, D.K., M. Mangiardi, X. Xia, H.E. López-Valdés, and S.K. Tiwari-Woodruff. 2009. “Functional Recovery of Callosal Axons Following Demyelination: A Critical Window.” *Neuroscience* 164, no. 4: 1407–21. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.09.069>.

Degraeve, Béatrice, Henrique Sequeira, Halima Mecheri, and Bruno Lenne. 2022. “Corpus Callosum Damage to Account for Cognitive, Affective, and Social-Cognitive Dysfunctions in Multiple Sclerosis: A Model of Callosal Disconnection Syndrome?” *Multiple Sclerosis Journal* 29, no. 2: 160–68. <https://doi.org/10.1177/13524585221091067>.

Dickstein, Dara L., Doron Kabaso, Anne B. Rocher, Jennifer I. Luebke, Susan L. Wearne, and Patrick R. Hof. 2007. “Changes in the Structural Complexity of the Aged Brain.” *Aging Cell* 6, no. 3: 275–84. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00289.x>.

Dobson, R., and G. Giovannoni. 2019. “Multiple Sclerosis – a Review.” *European Journal of Neurology* 26, no. 1: 27–40. <https://doi.org/10.1111/ene.13819>.

Dutta, Ranjan, Anthony M. Chomyk, Ansi Chang, Michael V. Ribaldo, Sadie A. Deckard,

Mary K. Doud, Dale D. Edberg, et al. 2013. "Hippocampal Demyelination and Memory Dysfunction Are Associated with Increased Levels of the Neuronal MicroRNA MiR - 124 and Reduced AMPA Receptors." *Annals of Neurology* 73, no. 5: 637–45.
<https://doi.org/10.1002/ana.23860>.

Dutta, Ranjan, Jennifer McDonough, Xinghua Yin, John Peterson, Ansi Chang, Thalia Torres, Tatyana Gudz, et al. 2006. "Mitochondrial Dysfunction as a Cause of Axonal Degeneration in Multiple Sclerosis Patients." *Annals of Neurology* 59, no. 3: 478–89.
<https://doi.org/10.1002/ana.20736>.

Emery, Ben, Holly S. Cate, Mark Marriott, Tobias Merson, Michele D. Binder, Cameron Snell, Pik Ying Soo, et al. 2006. "Suppressor of Cytokine Signaling 3 Limits Protection of Leukemia Inhibitory Factor Receptor Signaling against Central Demyelination." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, no. 20: 7859–64. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602574103>.

Fabri, Mara, and Gabriele Polonara. 2023. "Functional Topography of the Corpus Callosum as Revealed by fMRI and Behavioural Studies of Control Subjects and Patients with Callosal Resection." *Neuropsychologia* 183: 108533.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2023.108533>.

Fenlon, Laura R., and Linda J. Richards. 2015. "Contralateral Targeting of the Corpus Callosum in Normal and Pathological Brain Function." *Trends in Neurosciences* 38, no. 5: 264–72. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2015.02.007>.

Frank, Matthew G., Ruth M. Barrientos, Joseph C. Biedenkapp, Jerry W. Rudy, Linda R. Watkins, and Steven F. Maier. 2006. "mRNA Up-Regulation of MHC II and Pivotal pro-

Inflammatory Genes in Normal Brain Aging.” *Neurobiology of Aging* 27, no. 5: 717–22.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.03.013>.

Frischer, Josa M., Stephan Bramow, Assunta Dal-Bianco, Claudia F. Lucchinetti, Helmut Rauschka, Manfred Schmidbauer, Henning Laursen, Per Soelberg Sorensen, and Hans Lassmann. 2009. “The Relation between Inflammation and Neurodegeneration in Multiple Sclerosis Brains.” *Brain* 132, no. 5: 1175–89. <https://doi.org/10.1093/brain/awp070>.

Fuster, Joaquín M. 2001. “The Prefrontal Cortex—An Update Time Is of the Essence.” *Neuron* 30, no. 2: 319–33. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(01\)00285-9](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00285-9).

Gazzaniga, Michael S. 2005. “Forty-Five Years of Split-Brain Research and Still Going Strong.” *Nature Reviews. Neuroscience* 6, no. 8: 653–59. <https://doi.org/10.1038/nrn1723>.

Giansante, Giorgia, Antonella Marte, Alessandra Romei, Cosimo Prestigio, Franco Onofri, Fabio Benfenati, Pietro Baldelli, and Pierluigi Valente. 2020. “Presynaptic L-Type Ca²⁺ Channels Increase Glutamate Release Probability and Excitatory Strength in the Hippocampus during Chronic Neuroinflammation.” *The Journal of Neuroscience* 40, no. 36: 6825–41.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.2981-19.2020>.

Godbout, J. P., J. Chen, J. Abraham, A. F. Richwine, B. M. Berg, K. W. Kelley, and R. W. Johnson. 2005. “Exaggerated Neuroinflammation and Sickness Behavior in Aged Mice after Activation of the Peripheral Innate Immune System.” *The FASEB Journal* 19, no. 10: 1329–31.
<https://doi.org/10.1096/fj.05-3776fje>.

Gomez, Carlos D., Justin Read, Shaona Acharjee, and Quentin J. Pittman. 2019. “Early Life

Inflammation Increases CA1 Pyramidal Neuron Excitability in a Sex and Age Dependent Manner through a Chloride Homeostasis Disruption.” *The Journal of Neuroscience* 39, no. 37: 7244–59. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.2973-18.2019>.

Gudi, Viktoria, Stefan Gingele, Thomas Skripuletz, and Martin Stangel. 2014. “Glial Response during Cuprizone-Induced de- and Remyelination in the CNS: Lessons Learned.” *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8: 73. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00073>.

Gusain, Pooja, Makiko Taketoshi, Yoko Tominaga, and Takashi Tominaga. 2023. “Functional Dissection of Ipsilateral and Contralateral Neural Activity Propagation Using Voltage-Sensitive Dye Imaging in Mouse Prefrontal Cortex.” *eNeuro* 10, no. 12: ENEURO.0161-23.2023. <https://doi.org/10.1523/eneuro.0161-23.2023>.

Haberman, Rebecca P, Ming Teng Koh, and Michela Gallagher. 2017. “Heightened Cortical Excitability in Aged Rodents with Memory Impairment.” *Neurobiology of Aging* 54: 144–51. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.12.021>.

Hajieva, Parvana, Christoph Kuhlmann, Heiko J. Luhmann, and Christian Behl. 2009. “Impaired Calcium Homeostasis in Aged Hippocampal Neurons.” *Neuroscience Letters* 451, no. 2: 119–23. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.11.068>.

Hayakawa, Natsumi, Hiroyuki Kato, and Tsutomu Araki. 2007. “Age-Related Changes of Astrocytes, Oligodendrocytes and Microglia in the Mouse Hippocampal CA1 Sector.” *Mechanisms of Ageing and Development* 128, no. 4: 311–16. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2007.01.005>.

Höller-Wallscheid, Melanie S., Peter Thier, Jörn K. Pomper, and Axel Lindner. 2017. “Bilateral Recruitment of Prefrontal Cortex in Working Memory Is Associated with Task Demand but Not with Age.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, no. 5: E830–39. <https://doi.org/10.1073/pnas.1601983114>.

Huang, Xiaoqin, Xiangnan Du, Haiqing Song, Qian Zhang, Jianping Jia, Tianyi Xiao, and Jian Wu. 2015. “Cognitive Impairments Associated with Corpus Callosum Infarction: A Ten Cases Study.” *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 8, no. 11: 21991–98.

Imai, Yoshinori, and Shinichi Kohsaka. 2002. “Intracellular Signaling in M - CSF - induced Microglia Activation: Role of Iba1.” *Glia* 40, no. 2: 164–74. <https://doi.org/10.1002/glia.10149>.

Inagaki, Hidehiko K, Lorenzo Fontolan, Sandro Romani, and Karel Svoboda. 2019. “Discrete Attractor Dynamics Underlies Persistent Activity in the Frontal Cortex.” *Nature* 566, no. 7743: 212–17. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0919-7>.

Jang, I.-S., Y. Ito, and N. Akaike. 2005. “Feed-Forward Facilitation of Glutamate Release by Presynaptic GABAA Receptors.” *Neuroscience* 135, no. 3: 737–48. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.06.030>.

Juliandi, Berry, Kentaro Tanemura, Katsuhide Igarashi, Takashi Tominaga, Yusuke Furukawa, Maky Otsuka, Noriko Moriyama, et al. 2015. “Reduced Adult Hippocampal Neurogenesis and Cognitive Impairments Following Prenatal Treatment of the Antiepileptic Drug Valproic Acid.” *Stem Cell Reports* 5, no. 6: 996–1009. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.10.012>.

Kanda, Hirosato, Jennifer Ling, Sotatsu Tonomura, Koichi Noguchi, Sadis Matalon, and

Jianguo G Gu. 2019. “TREK-1 and TRAAK Are Principal K⁺ Channels at the Nodes of Ranvier for Rapid Action Potential Conduction on Mammalian Myelinated Afferent Nerves.” *Neuron* 104, no. 5: 960-971.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.08.042>.

Kaunzner, Ulrike W., Melinda M. Miller, Andres Gottfried-Blackmore, Judit Gal-Toth, Jennifer C. Felger, Bruce S. McEwen, and Karen Bulloch. 2012. “Accumulation of Resident and Peripheral Dendritic Cells in the Aging CNS.” *Neurobiology of Aging* 33, no. 4: 681-693.e1. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.06.007>.

Kim, Jae-Hong, Nakamura Michiko, In-Sun Choi, Yujung Kim, Ji-Young Jeong, Maan-Gee Lee, Il-Sung Jang, and Kyoungso Suk. 2024. “Aberrant Activation of Hippocampal Astrocytes Causes Neuroinflammation and Cognitive Decline in Mice.” *PLOS Biology* 22, no. 7: e3002687. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002687>.

Koga, Keisuke, Kenta Kobayashi, Makoto Tsuda, Anthony E. Pickering, and Hidemasa Furue. 2024. “Anterior Cingulate Cross-Hemispheric Inhibition via the Claustrum Resolves Painful Sensory Conflict.” *Communications Biology* 7, no. 1: 330. <https://doi.org/10.1038/s42003-024-06008-9>.

Kurki, Samu N., Rakenduvadhana Srinivasan, Jens Laine, Mari A. Virtanen, Tommi Ala-Kurikka, Juha Voipio, and Kai Kaila. 2023. “Acute Neuroinflammation Leads to Disruption of Neuronal Chloride Regulation and Consequent Hyperexcitability in the Dentate Gyrus.” *Cell Reports* 42, no. 11: 113379. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.113379>.

Kwiecien, Jacek M. 2010. “Cellular Compensatory Mechanisms in the CNS of Dysmyelinated Rats.” *Comparative Medicine* 60, no. 3: 205–17.

Lai, Helen C, and Lily Y Jan. 2006. “The Distribution and Targeting of Neuronal Voltage-Gated Ion Channels.” *Nature Reviews. Neuroscience* 7, no. 7: 548–62.

<https://doi.org/10.1038/nrn1938>.

Lakin, Lynsey, Bryan E. Davis, Cherie C. Binns, Keisha M. Currie, and Mary R. Rensel. 2021. “Comprehensive Approach to Management of Multiple Sclerosis: Addressing Invisible Symptoms—A Narrative Review.” *Neurology and Therapy* 10, no. 1: 75–98.

<https://doi.org/10.1007/s40120-021-00239-2>.

Landfield, Philip W., and Thomas A. Pitler. 1984. “Prolonged Ca²⁺-Dependent Afterhyperpolarizations in Hippocampal Neurons of Aged Rats.” *Science* 226, no. 4678: 1089–92. <https://doi.org/10.1126/science.6494926>.

Li, Nuo, Kayvon Daie, Karel Svoboda, and Shaul Druckmann. 2016. “Robust Neuronal Dynamics in Premotor Cortex during Motor Planning.” *Nature* 532, no. 7600: 459–64.

<https://doi.org/10.1038/nature17643>.

Li, Xu-Hui, Wantong Shi, Qi-Yu Chen, Shun Hao, Hui-Hui Miao, Zhuang Miao, Fang Xu, Guo-Qiang Bi, and Min Zhuo. 2023. “Activation of the Glutamatergic Cingulate Cortical-Cortical Connection Facilitates Pain in Adult Mice.” *Communications Biology* 6, no. 1: 1247.

<https://doi.org/10.1038/s42003-023-05589-1>.

Lindner, M., S. Heine, K. Haastert, N. Garde, J. Fokuhl, F. Linsmeier, C. Grothe, W. Baumgärtner, and M. Stangel. 2008. “Sequential Myelin Protein Expression during Remyelination Reveals Fast and Efficient Repair after Central Nervous System Demyelination.” *Neuropathology and Applied Neurobiology* 34, no. 1: 105–14. <https://doi.org/10.1111/j.1365->

2990.2007.00879.x.

Liu, LiPing, Abdelmadjid Belkadi, Lindsey Darnall, Taofang Hu, Caitlin Drescher, Anne C Cotleur, Dolly Padovani-Claudio, et al. 2010. “CXCR2-Positive Neutrophils Are Essential for Cuprizone-Induced Demyelination: Relevance to Multiple Sclerosis.” *Nature Neuroscience* 13, no. 3: 319–26. <https://doi.org/10.1038/nn.2491>.

Loew, Leslie M., Lawrence B. Cohen, James Dix, Eric N. Fluhler, Valerie Montana, Guy Salama, and Wu Jian-young. 1992. “A Naphthyl Analog of the Aminostyryl Pyridinium Class of Potentiometric Membrane Dyes Shows Consistent Sensitivity in a Variety of Tissue, Cell, and Model Membrane Preparations.” *The Journal of Membrane Biology* 130, no. 1: 1–10. <https://doi.org/10.1007/bf00233734>.

Lubetzki, Catherine, and Bruno Stankoff. 2014. “Chapter 4 Demyelination in Multiple Sclerosis.” *Handbook of Clinical Neurology* 122: 89–99. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-52001-2.00004-2>.

Lubetzki, Catherine, Nathalie Sol-Foulon, and Anne Desmazières. 2020. “Nodes of Ranvier during Development and Repair in the CNS.” *Nature Reviews Neurology* 16, no. 8: 426–39. <https://doi.org/10.1038/s41582-020-0375-x>.

Lucchinetti, Claudia, Wolfgang Brück, Joseph Parisi, Bernd Scheithauer, Moses Rodriguez, and Hans Lassmann. 1999. “A Quantitative Analysis of Oligodendrocytes in Multiple Sclerosis Lesions.” *Brain* 122, no. 12: 2279–95. <https://doi.org/10.1093/brain/122.12.2279>.

Lucchinetti, Claudia, Wolfgang Brück, Joseph Parisi, Bernd Scheithauer, Moses Rodriguez,

and Hans Lassmann. 2000. “Heterogeneity of Multiple Sclerosis Lesions: Implications for the Pathogenesis of Demyelination.” *Annals of Neurology* 47, no. 6: 707–17.

[https://doi.org/10.1002/1531-8249\(200006\)47:6<707::aid-ana3>3.0.co;2-q](https://doi.org/10.1002/1531-8249(200006)47:6<707::aid-ana3>3.0.co;2-q).

Luo, Liqun, Edward M Callaway, and Karel Svoboda. 2018. “Genetic Dissection of Neural Circuits: A Decade of Progress.” *Neuron* 98, no. 4: 865.

<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.05.004>.

Marrie, Ruth Ann, Stephen Reingold, Jeffrey Cohen, Olaf Stuve, Maria Trojano, Per Soelberg Sorensen, Gary Cutter, and Nadia Reider. 2014. “The Incidence and Prevalence of Psychiatric Disorders in Multiple Sclerosis: A Systematic Review.” *Multiple Sclerosis Journal* 21, no. 3: 305–17. <https://doi.org/10.1177/1352458514564487>.

Matsushima, Glenn K., and Pierre Morell. 2001. “The Neurotoxicant, Cuprizone, as a Model to Study Demyelination and Remyelination in the Central Nervous System.” *Brain Pathology* 11, no. 1: 107–16. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2001.tb00385.x>.

Merre, Pierre Le, Sofie Ährlund-Richter, and Marie Carlén. 2021. “The Mouse Prefrontal Cortex: Unity in Diversity.” *Neuron* 109, no. 12: 1925–44.

<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.03.035>.

Milicevic, Katarina D, Mei Hong Zhu, Brianna L Barbeau, Ozge Baser, Zehra Y Erol, Lan Xiang Liu, Michael Z Lin, and Srdjan D Antic. 2023. “Imaging of Evoked Cortical Depolarizations Using Either ASAP2s, or Chi-VSFP, or Di-4-Anepps, or Autofluorescence Optical Signals.” *Journal of Integrative Neuroscience* 22, no. 6: 160.

<https://doi.org/10.31083/j.jin2206160>.

Mohammed, Eiman M.A. 2016. "Multiple Sclerosis Is Prominent in the Gulf States: Review." *Pathogenesis* 3, no. 2: 19–38. <https://doi.org/10.1016/j.pathog.2016.04.001>.

Moore, A.H., M. Wu, S.S. Shaftel, K.A. Graham, and M.K. O'Banion. 2009. "Sustained Expression of Interleukin-1 β in Mouse Hippocampus Impairs Spatial Memory." *Neuroscience* 164, no. 4: 1484–95. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.08.073>.

Moyer, J. R., L. T. Thompson, J. P. Black, and J. F. Disterhoft. 1992. "Nimodipine Increases Excitability of Rabbit CA1 Pyramidal Neurons in an Age- and Concentration-Dependent Manner." *Journal of Neurophysiology* 68, no. 6: 2100–2109. <https://doi.org/10.1152/jn.1992.68.6.2100>.

Murphy, Ruth, Stefani O'Donoghue, Timothy Counihan, Colm McDonald, Peter A Calabresi, Mohammed AS Ahmed, Adam Kaplin, and Brian Hallahan. 2017. "Neuropsychiatric Syndromes of Multiple Sclerosis." *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 88, no. 8: 697. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2016-315367>.

Nichols, Nancy R., Jonathan R. Day, Nicholas J. Laping, Steven A. Johnson, and Caleb E. Finch. 1993. "GFAP mRNA Increases with Age in Rat and Human Brain." *Neurobiology of Aging* 14, no. 5: 421–29. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(93\)90100-p](https://doi.org/10.1016/0197-4580(93)90100-p).

Nilsson, Gustav. 1950. "A New Color Reaction of Copper and Certain Carbonyl Compounds," *Acta Chemica Scandinavica* 4:205–205. <http://actachemscand.org/doi/10.3891/acta.chem.scand.04-0205>.

Oh, M. Matthew, Dina Simkin, and John F. Disterhoft. 2016. "Intrinsic Hippocampal

Excitability Changes of Opposite Signs and Different Origins in CA1 and CA3 Pyramidal Neurons Underlie Aging-Related Cognitive Deficits.” *Frontiers in Systems Neuroscience* 10: 52. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2016.00052>.

Ojima, Daiki, Yoko Tominaga, Takashi Kubota, Atsushi Tada, Hiroo Takahashi, Yasushi Kishimoto, Takashi Tominaga, and Tohru Yamamoto. 2024. “Impaired Hippocampal Long-Term Potentiation and Memory Deficits upon Haploinsufficiency of MDGA1 Can Be Rescued by Acute Administration of D-Cycloserine.” *International Journal of Molecular Sciences* 25, no. 17: 9674. <https://doi.org/10.3390/ijms25179674>.

Oset, Magdalena, Mariusz Stasiolek, and Mariola Matysiak. 2020. “Cognitive Dysfunction in the Early Stages of Multiple Sclerosis—How Much and How Important?” *Current Neurology and Neuroscience Reports* 20, no. 7: 22. <https://doi.org/10.1007/s11910-020-01045-3>.

Oveland, Eystein, Intakhar Ahmad, Ragnhild Reehorst Lereim, Ann Cathrine Kroksveen, Harald Barsnes, Astrid Guldbrandsen, Kjell-Morten Myhr, Lars Bø, Frode S. Berven, and Stig Wergeland. 2021. “Cuprizone and EAE Mouse Frontal Cortex Proteomics Revealed Proteins Altered in Multiple Sclerosis.” *Scientific Reports* 11, no. 1: 7174. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86191-5>.

Pascual, Olivier, Sarrah Ben Achour, Philippe Rostaing, Antoine Triller, and Alain Bessis. 2011. “Microglia Activation Triggers Astrocyte-Mediated Modulation of Excitatory Neurotransmission.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, no. 4: E197–205. <https://doi.org/10.1073/pnas.1111098109>.

Petreau, Leopoldo, Daniel Huber, Aleksander Sobczyk, and Karel Svoboda. 2006.

“Channelrhodopsin-2-Assisted Circuit Mapping of Long-Range Callosal Projections.” *Nature Neuroscience* 10, no. 5: 663–68. <https://doi.org/10.1038/nn1891>.

Phokeo, Vinay, Jacek M. Kwiecien, and Alexander K. Ball. 2002. “Characterization of the Optic Nerve and Retinal Ganglion Cell Layer in the Dysmyelinated Adult Long Evans Shaker Rat: Evidence for Axonal Sprouting.” *Journal of Comparative Neurology* 451, no. 3: 213–24. <https://doi.org/10.1002/cne.10330>.

Plant, Sheila R., Heather A. Arnett, and Jenny P - y. Ting. 2005. “Astroglial - derived Lymphotoxin - α Exacerbates Inflammation and Demyelination, but Not Remyelination.” *Glia* 49, no. 1: 1–14. <https://doi.org/10.1002/glia.20089>.

Porchet, Raymonde, Alphonse Probst, Constantin Bouras, Eduarda Dráberová, Pavel Dráber, and Beat M. Riederer. 2003. “Analysis of Gial Acidic Fibrillary Protein in the Human Entorhinal Cortex during Aging and in Alzheimer’s Disease.” *PROTEOMICS* 3, no. 8: 1476–85. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300456>.

Praet, Jelle, Caroline Guglielmetti, Zwi Berneman, Annemie Van der Linden, and Peter Ponsaerts. 2014. “Cellular and Molecular Neuropathology of the Cuprizone Mouse Model: Clinical Relevance for Multiple Sclerosis.” *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 47: 485–505. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.10.004>.

Reilly, John F., Pamela A. Maher, and Vijaya G. Kumari. 1998. “Regulation of Astrocyte GFAP Expression by TGF-B1 and FGF-2.” *Glia*, 22 (2) :202-10. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-1136\(199802\)22:2<202::aid-glia11>3.0.co;2-1](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-1136(199802)22:2<202::aid-glia11>3.0.co;2-1).

Rolls, Edmund T, Gustavo Deco, Chu-Chung Huang, and Jianfeng Feng. 2022. “The Human Orbitofrontal Cortex, VmPFC, and Anterior Cingulate Cortex Effective Connectome: Emotion, Memory, and Action.” *Cerebral Cortex* 33, no. 2: 330–56.
<https://doi.org/10.1093/cercor/bhac070>.

Rovira, Víctor, and Emilio Geijo-Barrientos. 2016. “Intra- and Interhemispheric Propagation of Electrophysiological Synchronous Activity and Its Modulation by Serotonin in the Cingulate Cortex of Juvenile Mice.” *PLOS ONE* 11, no. 3: e0150092.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150092>.

Russo, Andrew W, Kirsten E Stockel, Sean M Tobyne, Chanon Ngamsombat, Kristina Brewer, Aapo Nummenmaa, Susie Y Huang, and Eric C Klawiter. 2022. “Associations between Corpus Callosum Damage, Clinical Disability, and Surface-Based Homologous Inter-Hemispheric Connectivity in Multiple Sclerosis.” *Brain Structure and Function* 227, no. 9: 2909–22.
<https://doi.org/10.1007/s00429-022-02498-7>.

Salzberg, B M, H V Davila, and L B Cohen. 1973. “Optical Recording of Impulses in Individual Neurones of an Invertebrate Central Nervous System.” *Nature* 246, no. 5434: 508–9.
<https://doi.org/10.1038/246508a0>.

Steelman, Andrew J., Jeffrey P. Thompson, and Jianrong Li. 2012. “Demyelination and Remyelination in Anatomically Distinct Regions of the Corpus Callosum Following Cuprizone Intoxication.” *Neuroscience Research* 72, no. 1: 32–42.
<https://doi.org/10.1016/j.neures.2011.10.002>.

Storch, Maria K, Andreas Stefferl, Uschi Brehm, Robert Weissert, Erik Wallström, Martin

Kerschensteiner, Tomas Olsson, Chris Linington, and Hans Lassmann. 1998. “Autoimmunity to Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein in Rats Mimics the Spectrum of Multiple Sclerosis Pathology.” *Brain Pathology* 8, no. 4: 681–94. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1998.tb00194.x>.

Suh, Junghyup, Alexander J. Rivest, Toshiaki Nakashiba, Takashi Tominaga, and Susumu Tonegawa. 2011. “Entorhinal Cortex Layer III Input to the Hippocampus Is Crucial for Temporal Association Memory.” *Science* 334, no. 6061: 1415–20. <https://doi.org/10.1126/science.1210125>.

Tok, Sean, Abdallah Ahnaou, and Wilhelmus Drinkenburg. 2022. “Functional Neurophysiological Biomarkers of Early-Stage Alzheimer’s Disease: A Perspective of Network Hyperexcitability in Disease Progression.” *Journal of Alzheimer’s Disease* 88, no. 3: 809–36. <https://doi.org/10.3233/jad-210397>.

Tominaga, Takashi, Riichi Kajiwara, and Yoko Tominaga. 2023. “Stable Wide-Field Voltage Imaging for Observing Neuronal Plasticity at the Neuronal Network Level.” *Biophysics and Physicobiology* 20, no. 1: n/a. <https://doi.org/10.2142/biophysico.bppb-v20.0015>.

Tominaga, Takashi, Yoko Tominaga, and Michinori Ichikawa. 2002. “Optical Imaging of Long-Lasting Depolarization on Burst Stimulation in Area CA1 of Rat Hippocampal Slices.” *Journal of Neurophysiology* 88, no. 3: 1523–32. <https://doi.org/10.1152/jn.2002.88.3.1523>.

Tominaga, Yoko, Michinori Ichikawa, and Takashi Tominaga. 2009. “Membrane Potential Response Profiles of CA1 Pyramidal Cells Probed with Voltage-Sensitive Dye Optical Imaging in Rat Hippocampal Slices Reveal the Impact of GABAA-Mediated Feed-Forward Inhibition in

Signal Propagation.” *Neuroscience Research* 64, no. 2: 152–61.

<https://doi.org/10.1016/j.neures.2009.02.007>.

Tominaga, Yoko, Makiko Taketoshi, Naoko Maeda, and Takashi Tominaga. 2019. “Wide-Field Single-Photon Optical Recording in Brain Slices Using Voltage-Sensitive Dye.” *Journal of Visualized Experiments*, no. 148. <https://doi.org/10.3791/59692>.

Tovar-Moll, F, J Moll, R de Oliveira-Souza, I Bramati, P A Andreiuolo, and R Lent. 2006. “Neuroplasticity in Human Callosal Dysgenesis: A Diffusion Tensor Imaging Study.” *Cerebral Cortex* 17, no. 3: 531–41. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhj178>.

Utsumi, Yuichi, Makiko Taketoshi, Michiko Miwa, Yoko Tominaga, and Takashi Tominaga. 2023. “Assessing Seizure Liability in Vitro with Voltage-Sensitive Dye Imaging in Mouse Hippocampal Slices.” *Frontiers in Cellular Neuroscience* 17: 1217368. <https://doi.org/10.3389/fncel.2023.1217368>.

Veng, Lone M, and Michael D Browning. 2002. “Regionally Selective Alterations in Expression of the A1D Subunit (Cav1.3) of L-Type Calcium Channels in the Hippocampus of Aged Rats.” *Molecular Brain Research* 107, no. 2: 120–27. [https://doi.org/10.1016/s0169-328x\(02\)00453-9](https://doi.org/10.1016/s0169-328x(02)00453-9).

Vercellino, Marco, Silvia Masera, Marcella Lorenzatti, Cecilia Condello, Aristide Merola, Alessandra Mattioda, Antonella Tribolo, et al. 2009. “Demyelination, Inflammation, and Neurodegeneration in Multiple Sclerosis Deep Gray Matter.” *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 68, no. 5: 489–502. <https://doi.org/10.1097/nen.0b013e3181a19a5a>.

Werneburg, Sebastian, Jonathan Jung, Rejani B Kunjamma, Seung-Kwon Ha, Nicholas J Luciano, Cory M Willis, Guangping Gao, et al. 2019. “Targeted Complement Inhibition at Synapses Prevents Microglial Synaptic Engulfment and Synapse Loss in Demyelinating Disease.” *Immunity* 52, no. 1: 167-182.e7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.12.004>.

Xu, Haiyun, Hong-Ju Yang, Bryan McConomy, Ronald Browning, and Xin-Min Li. 2010. “Behavioral and Neurobiological Changes in C57BL/6 Mouse Exposed to Cuprizone: Effects of Antipsychotics.” *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 4: 8. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2010.00008>.

Xu, Haiyun, Hong-Ju Yang, Gregory M. Rose, and Xin-Min Li. 2011. “Recovery of Behavioral Changes and Compromised White Matter in C57BL/6 Mice Exposed to Cuprizone: Effects of Antipsychotic Drugs.” *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 5: 31. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2011.00031>.

Yassa, Michael A., Joyce W. Lacy, Shauna M. Stark, Marilyn S. Albert, Michela Gallagher, and Craig E.L. Stark. 2011. “Pattern Separation Deficits Associated with Increased Hippocampal CA3 and Dentate Gyrus Activity in Nondemented Older Adults.” *Hippocampus* 21, no. 9: 968–79. <https://doi.org/10.1002/hipo.20808>.

Zendedel, Adib, Cordian Beyer, and Markus Kipp. 2013. “Cuprizone-Induced Demyelination as a Tool to Study Remyelination and Axonal Protection.” *Journal of Molecular Neuroscience* 51, no. 2: 567–72. <https://doi.org/10.1007/s12031-013-0026-4>.

Zhang, Jing, Benjamin A. Buller, Zheng Gang Zhang, Yi Zhang, Mei Lu, Douglas L. Rosene, Maria Medalla, Tara L. Moore, and Michael Chopp. 2022. “Exosomes Derived from Bone

Marrow Mesenchymal Stromal Cells Promote Remyelination and Reduce Neuroinflammation in the Demyelinating Central Nervous System.” *Experimental Neurology* 347: 113895.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2021.113895>.

Zirngibl, Martin, Peggy Assinck, Anastasia Sizov, Andrew V. Caprariello, and Jason R. Plemel. 2022. “Oligodendrocyte Death and Myelin Loss in the Cuprizone Model: An Updated Overview of the Intrinsic and Extrinsic Causes of Cuprizone Demyelination.” *Molecular Neurodegeneration* 17, no. 1: 34. <https://doi.org/10.1186/s13024-022-00538-8>.

業績リスト

【主論文】

1. Tsukuda, K., Tominaga, Y., Taketoshi, M., Miwa, M., Nakashima, K., & Tominaga, T. (2025) . Optical Assay of the Functional Impact of Cuprizone-Induced Demyelination and Remyelination on Interhemispheric Neural Communication in the Anterior Cingulate Cortex via the Corpus Callosum. *eNeuro*. 12 (1) ENEURO.0511-24.2024. doi: 10.1523/ENEURO.0511-24.2024.

【その他の発表業績】

学会発表

国際会議

1. Tsukuda, K., Kubota, T., Chiba, A., Tominaga, T., Kishimoto, Y. & Nakashima, K. Behavioral disorders and expression changes of the tyrosine hydroxylase in Cuprizone-induced neuroinflammation mouse model with schizophrenia-like symptoms. (2022) Society for Neuroscience, 2022 (Nov. 12-16, 2022)
2. Tsukuda, K., Miwa, M., Taketoshi, M., Tominaga, Y., Nakashima, K., & Tominaga, T. Voltage-sensitive dye imaging reveals disrupted interhemispheric communication in a cuprizone-induced demyelination mouse model of multiple sclerosis. (2023) Society for Neuroscience, 2023 (Nov. 11-15, 2023)
3. Tsukuda, K., Kubota, T., Chiba, A., Tominaga, T., Kishimoto, Y. & Nakashima, K. Acute neuroinflammation induced by short-term treatment with Cuprizone leads to behavioral disorders similar to schizophrenia. The 80th Fujihara seminar (Aug. 30-31, 2021)
4. Tsukuda, K., Miwa, M., Taketoshi, M., Tominaga, Y., Nakashima, K., & Tominaga, T. Visualizing demyelination effects on interhemispheric communication with voltage-sensitive dye imaging in cuprizone-induced multiple sclerosis model mice. (2024) The 21th Annual Meeting of the International Union for Pure and Applied Biophysics (Jun. 24-28, 2024)

国内会議

1. 中島 健太郎、佃 京華、千葉 葵、永松 卓、窪田 剛志、宋 時榮、岸本 泰司、
Cuprizone 短期投与マウスへのアオサノリ摂取による脳内炎症予防効果、第 42 回日
本分子生物学会年会 (2019.12.3-6)
2. Tsukuda, K., Kubota, T., Chiba, A., Tominaga, T., Kishimoto, Y. & Nakashima, K. A mouse
model of neuroinflammation induced by short-term exposure to Cuprizone show behavioral
symptoms similar to schizophrenia. (2021) The 12th Annual Meeting of the Biophysical
Society of Japan -Chugoku/shikoku branch- (May 22, 2021)
3. Tsukuda, K., Kubota, T., Chiba, A., Kishimoto, Y. & Nakashima, K. (2021) A mouse
model of acute neuroinflammation induced by short-term exposure to Cuprizone show
psychobehavioral disorders similar to schizophrenia. The 44th Annual Meeting of the Japan
Neuroscience Society (Jul. 28-31, 2021)
4. Nakashima, K., Tsukuda, K., Kohara, R., Fukui, H., Saito, M., Takahashi, C., Kawada, R. &
Song, SY. (2021) Highly expression of Lanosterol 14 alpha-demethylase (LDM, CYP51)
in oligodendrocyte enhances remyelination following demyelination induced by cuprizone.
The 44th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (Dec. 1-3, 2021)
5. Kubota, T., Matsuzaki, S., Harada, K., Nakashima, K., Tsukuda, K., Nakazawa, S., Hagi, K.,
Kubo, M., Fukuyama, Y., Yamada, M., Kishimoto, Y. (2022) The effect of trans-banglene,
the active component of Indonesian ginger (bangle) , on memory impairment in tauopathy

- mouse model. The 95th Annual Meeting of the Japan Pharmacological Society (Mar. 7-9, 2022)
6. Tsukuda, K., Yoshimaru, Y., Onishi, K., Taketoshi, M., Tominaga, Y., Nakashima, K., & Tominaga, T. 老齢および若齢マウス脳の海馬における膜電位感受性色素イメージング法を用いた神経回路研究と免疫組織化学的解析 (2022) The 13th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan -Chugoku/shikoku branch- (May 28, 2022)
 7. Miwa, M., Tsukuda, K., Taketoshi, M., Tominaga, Y., Nakashima, K., & Tominaga, T. 膜電位感受性色素を用いた多発性硬化症モデルマウスでの神経回路解析 (2022) The 13th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan -Chugoku/shikoku branch- (May 28, 2022)
 8. Tsukuda, K., Kubota, T., Chiba, A., Tominaga, T., Kishimoto, Y. & Nakashima, K. Immunohistochemical analyses for molecules relating to schizophrenia in short-term treated mice by cuprizone with impairment of prepulse inhibition. (2022) The 45th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Jun. 30-Jul. 3, 2022)
 9. Tsukuda, K., Kubota, T., Chiba, A., Kishimoto, Y., Nakashima, K. & Tominaga, T. A Cuprizone-induced neuroinflammation mouse model with prepulse inhibition deficit exhibited a complementary tyrosine hydroxylase abundance ratio in the prefrontal cortex and midbrain. (2022) The 45th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (Nov. 30-Dec. 2, 2022)

10. Nakashima, K., Tsukuda, K., Kohara, R., Fukui, H., Saito, M., Kawada, R. & Song, SY. Remyelination following demyelination induced by cuprizone is accelerated by oligodendrocyte-specific up-regulation of Lanosterol 14 alpha-demethylase (LDM, CYP51) . (2022) The 45th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (Nov. 30-Dec. 2, 2022)
11. Tsukuda, K., Taketoshi, M., Tominaga, Y., Nakashima, K., & Tominaga, T. Age-related hippocampal circuit abnormalities and increased neuroinflammation in response to electrical stimulation in aged mice: VSD study. (2023) The 46th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Aug. 1-4, 2023)
12. Iwashita, S., Suzuki, T., Onishi, A., Tsukuda, K., Kiriya, Y. & Nakashima, K. Intracellular molecular behavior of Bcnt/Cfdp1, an intrinsically disordered, transient component of the Srcapchromatin remodeling complex. (2023) The 96th Annual Meeting of the Japan Biochemical Society (Oct. 31-Nov. 2, 2023)
13. Tsukuda, K., Miwa, M., Taketoshi, M., Tominaga, Y., Nakashima, K., & Tominaga, T. Visualization of impaired interhemispheric communication in Cuprizone-induced multiple sclerosis (MS) model using voltage-sensitive dye. (2023) The 46th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (Dec. 6-8, 2023)
14. Tsukuda, K., Onishi, A., Chiba, A., Nagamatsu, T., Kubota, T., Kishimoto, Y. & Nakashima, K. Preventive effect on neuroinflammation through brain-gut interaction by Monostroma nitidum ingestion in Cuprizone short-term treated mice. (2023) The 46th Annual Meeting

of the Molecular Biology Society of Japan (Dec. 6-8, 2023)

15. Nakashima, K., Tsukuda, K., Onishi, A., Kohara, R., Fukui, H., Saito, M., Kawada, R. & Song, SY. Remyelination requires coordinated regulation of cholesterol metabolism among glial cells after acute demyelination induced by Cuprizone. (2023) The 46th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (Dec. 6-8, 2023)

16. 佃京華、三輪倫子、竹歳麻紀子、冨永洋子、中島健太郎、冨永貴志、VSD imaging によって明らかになった Cuprizone 誘発性多発性硬化症モデルマウスにおける脳梁を介した半球間連絡の障害、第 15 回日本生物物理学会 中国四国支部大会 (2024.5.25-26)

17. Tsukuda, K., Miwa, M., Taketoshi, M., Tominaga, Y., Nakashima, K., & Tominaga, T. Imaging analysis of impaired interhemispheric communication caused by demyelination in cuprizone-induced multiple sclerosis mouse model using voltage-sensitive dye. (2024) The 47th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Jul. 24-27, 2024)

18. 中島 健太郎、佃 京華、大西 礼華、千葉 葵、永松 卓、窪田 剛志、岸本 泰司、Cuprizone 短期投与マウスにおけるアオサノリ摂取による脳腸相関を介した脳内炎症の抑制、第 47 回日本分子生物学会年会 (2024.11.27-29)

謝辞

本学位論文の執筆および研究の遂行に際し、これまでご指導、ご鞭撻とご支援をいただきました本学神経科学研究所教授 富永貴志先生に心より御礼申し上げます。また、本学位論文の申請にあたり、お忙しい中急な申し出にもかかわらず快く主査をお引き受けくださった本学香川薬学部衛生薬学講座教授 野地裕美先生、ならびに副査をお引き受け下さった本学香川薬学部薬理学講座教授 山田麻紀先生と本学神経科学研究所講師 小林卓先生、学力確認をお引き受けくださった本学香川薬学部生体防御学講座教授 大岡嘉治先生と本学香川薬学部病態生理学講座教授 得丸博史先生に心より御礼申し上げます。

研究や大学院生活では苦しい面も多々ありましたが、大勢の先生方やスタッフの皆さんに助けをいただき乗り越えることができました。VSDI における実験データ解析や画像作成に協力していただいた本学神経科学研究所博士研究員 富永洋子さん、ならびに実験手技をご指導いただいた研究補助員 竹歳麻紀子さん、共に楽しく実験した三輪倫子さん、動物舎にて施設の使用ルールの指導や飼育動物・餌の管理・購入に対していつも気にかけてくださった株式会社エーテック派遣社員 安西弘見さんと株式会社エーテック派遣社員兼本学神経科学研究所研究補助員 谷口愛さんに心より御礼申し上げます。また、実験データ取得に伴い犠牲になり、命の儚さや尊さを学ぶ機会を与えてくれたマウスたちに心から感謝いたします。そして、本研究におけるモデルマウス作製法のご鞭撻だけでなく、学部生時代の卒業研究指導や研究の面白さ・大変さの共有、マウスの系統維持のノウハウの伝授、国内外の学会参加の支援、大学業務やイベントのあれこれ、私の未熟な文章の添削、研究用品の上手な買い物の仕方、日々のメンタ

ルケアなど、研究していく上で大切な非常に多くのことをご鞭撻くださった本学神経科学研究所助教 中島健太郎先生、これまでの研究や就職活動、各種相談に快く応じていただいた帝京大学薬学部物理化学研究室教授 岸本泰司先生、特に行動解析についてのご指導や大学院生活での悩み相談・気分転換をさせていただいた帝京平成大学薬学部薬学科薬学教育研究センター薬学基礎教育ユニット講師 窪田剛志先生、研究者として大先輩のいつでもポジティブな思考を与えてくださった岩下新太郎博士、いつも体調や研究について気にかけてくださった早稲田大学理工学術院総合研究所招聘研究員 宋時榮博士、ここには書ききれない先生方にも深謝申し上げます。

大学院生活では多くの事務職員の方々の支えも必要でした。学会や物品購入の申請の際に書類の修正をしてくださった総務部 半田加奈さん、RA の出勤簿を確認してくださった就職支援部 近藤陽子さんと香川薬学部事務 三宅幸さん、奨学金関連の事務手続きについてお世話になった学生部 藏本賀織さん、いつも私のことを気にかけてくださった教務部 長谷川典子さんと島村淑子さん、より良い環境を整えてくださったその他事務職員の方々に御礼申し上げます。

研究ではなんとも光栄な経済的支援を受けることがきました。統合失調症の治療中に亡くなった娘様のお気持ちに寄り添い、統合失調症関連の研究や学生指導に役立ててほしいという思いを乗せ、「浅田佳栄子研究寄付金」をご寄付くださり、大学院生の間に国際学会への参加を叶えてくださった浅田佳栄子（故人）様とお母様である浅田共子様へ深謝申し上げます。

他にも、学会や共同研究で知り合い、大学院生活での悩みや研究・就職活動についてのアドバイス、ワシントンD.C.で開催された SfN2024 において支援をいただいた方々、研究仲間を探すために始めた日本神経科学学会公認第二期ニューロナビゲータの X（旧 Twitter）アカウント設立により出会い、研究生生活のさまざまな情報の共有や希望

を与えてくださったフォロワーの方々、就職活動や進路相談に快く応じていただいた近畿大学薬学部医療薬学科薬物治療学研究室教授 竹内雄一先生、いつも明るく話しかけてくださり尊敬できる大学院の同期である富田淳子さん、いつでも悩みを聞いてくれた友人たち、大学院生活での資金を稼ぐために新卒でありながら快くアルバイトとして採用していただき薬剤師としての経験と心地よい職場を提供してくださった株式会社 SMS QLAS（旧 有限会社四国メディカルサポート）と従業員の皆様に感謝いたします。

最後に、学部生時代に引き続き大学院生活も私を献身的・経済的に支えてくれた家族や、おんちゃんとおばちゃん、どんな時も心を癒してくれたモカとメル、本当に、本当にありがとう。