

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06760

研究課題名(和文)脳虚血時神経血管カップリングへのマイクログリアの関与の検討

研究課題名(英文)A role of microglia in neurovascular coupling during cerebral ischemia

研究代表者

富田 裕 (Tomita, Yutaka)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師(非常勤)

研究者番号：60276251

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：マイクログリアにGFPを発現させたマウスに慢性閉鎖頭窓を作成し、二光子顕微鏡を用いてマイクログリアと血管網の形状を反復観察したところ、細胞体断面積や密度は一定であり、突起本数は深さによる差異はなく、経日的に有意な変化はなかった。観察期間内に遊走した細胞体、新たな細胞の出現を確認した。8%の慢性低酸素暴露マウスにおいて、マイクログリアが血管新生に深く関与している可能性が示された。

アストロサイトまたはニューロンだけに光感受性蛋白チャネルロドプシン2を発現したマウスに光刺激を加えたところ、いずれも強度依存的に脳血流が増大した。薬理学的実験から、それぞれ独立した血流調節機序を有していることが示された。

研究成果の概要(英文)：In genetically-modified mice (CX3CR1-GFP mice) expressing the cortical microglia with green fluorescence protein (GFP), microglia and cortical microvessels were imaged through a closed-cranial window by using a Tomita-Seylaz method with two-photon laser scanning fluorescence microscopy repeatedly up to 3 weeks. There were no detectable differences in the soma area, number density, and number of processes of the GFP-positive microglia, whereas migrated and newborn microglia could be detected. Furthermore, appearance and/or migration of microglia adjacent to neovascular capillary under chronic hypoxia (8% oxygen) was exhibited.

A stimulation with a blue light in mice genetically expressing a light-sensitive cation channel, channelrhodopsin-2 in cortical astrocytes or neurons elicited intensity-dependent increase of cerebral blood flow. Pharmacological study exhibited independent mechanism of CBF control.

研究分野：神経内科

キーワード：マイクログリア neurovascular unit 脳梗塞 二光子顕微鏡 微小循環 低酸素負荷 血管新生

### 1. 研究開始当初の背景

脳虚血時・後の病態生理学的変化としては、フリーラジカルの産生、神経細胞脱分極、アシドーシス、細胞内  $Ca^{2+}$  の増加、ミトコンドリア機能障害、細胞シグナル経路の活性化、血管内皮・アストロサイトマトリックス接着因子発現の低下、アストロサイト終足の血管基底膜からの剥離、マトリックスプロテアーゼの発現、微小血管透過性の亢進、アストロサイト・神経細胞の腫大、神経細胞からのグルタミン酸の放出、サイトカインの発現、血小板活性因子の産生、炎症反応の活性化、マイクログリアの活性化・形態変化・移動などの急性細胞反応、浮腫、細胞腫大、漏出を伴う微小血管透過性の亢進、虚血部位での“no-reflow”現象、毛細血管レベルでの血管新生、細胞死、出血性転帰、液化現象といった組織障害などさまざまな報告がなされている。マイクログリアは、神経組織が炎症や変性などの障害を受けると病変の修復に関与すると言われているが、アストロサイトとともに、脳虚血、神経変性疾患などでより重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。

近年 Neurovascular coupling という概念が提唱されており、ニューロン・グリア細胞・血管は相互に連絡を取り合っている。ニューロンの活性化に共役してアストロサイトは活動が亢進し、血管平滑筋に接する軸索終末を介して血流調節に関与していると考えられている。しかし、微小血管、ニューロン、アストロサイトとの間の関連の方向性の詳細、マイクログリア細胞の脳虚血後の血管新生への関与の詳細などについてはその実態はいまだ不明である。

### 2. 研究の目的

(1) 慢性頭窓を通して大脳皮質微小循環をリアルタイムで *in vivo* 反復観察可能な laser scanning confocal 蛍光顕微鏡、さらに微小血管、神経細胞、グリア細胞などの形態変化を同時に脳深部まで *in vivo* 反復観察可能な二光子顕微鏡を用いた独自の方法で、マウス病態モデルにおける Neurovascular coupling の病態生理におけるマイクログリアの関与の解明を目指す。

(2) さらに、光感受性タンパクの一種チャンネルロドプシン 2 (ChR2) をアストロサイトあるいはニューロンのみに発現させたマウスを用い、光照射によって細胞種特異的に活性化することによって脳微小血流に対する作用を検討する。

### 3. 研究の方法

(1) マイクログリアのケモカイン受容体に緑色蛍光タンパク質 (green fluorescence protein: GFP) を発現した遺伝子組み換えマウス (CX3CR1-GFP) を使用した。マウス大脳を長期反復観察するために、左頭

頂骨上に Tomita-Seylaz 法による慢性頭窓を作製し、腹腔にスルホローダミン 101 (SR 101) を投与して血管を可視化した上で、頭窓を通して CX3CR1-GFP 陽性のマイクログリアを *in vivo* 二光子顕微鏡法で撮像した。得られた画像から画像解析ソフト Matlab を用いて単一のマイクログリア細胞を抽出し、撮像平面上における最大値投影画像上においてマイクログリアの細胞体断面積および細胞体中心から半径  $10\mu\text{m}$  の円周上における足突起の数および脳血管との相対的な位置からマイクログリアの遊走距離、遊走数(率)について評価した。さらに、8%の低酸素灌流装置内で2週間飼育した慢性低酸素暴露マウスにおいて、同様の観察を行った。

(2) アストロサイト (ChR2-A) あるいはニューロン (ChR2-N) に ChR2 を発現したマウスをウレタンで麻酔し、固定装置に頭部を固定した。正中線で頭皮を切開して頭頂骨を露出し、レーザースペックル血流計を用いて左頭頂部全域の大脳皮質血流を測定しながら直径約  $0.5\text{mm}$  に集光した青色光 (波長  $488\text{nm}$ ) を左頭頂骨中央付近に照射し、直ちに励起したチャンネルの不活性化のため黄色光 (波長  $590\text{nm}$ ) を照射した。得られた画像を解析ソフト Matlab を用いて空間的・経時的変化を解析した。次に頭頂骨を除去して脳表を露出させ、各種阻害剤を脳表に滴下することによって局所的に作用させ、上記で得られた血流反応が変化するか否かを計測した。

### 4. 研究成果

(1) 頭窓作成から21日目まで、細胞体断面積は頭窓作成後の日数に関係なく平均  $33\mu\text{m}^2$  と一定であり、細胞体密度に有意な変化はなく、突起本数は1細胞あたり平均10.3本で深さによる差異はなく、頭窓作成後も有意な変化は認められなかった。観察期間内に  $6\mu\text{m}$  以上移動(遊走)した細胞体が一定数認められ、新たな細胞の出現を確認した。以上のことから、マウス脳内において同一のマイクログリア細胞を長期間にわたって *in vivo* 反復観察することが可能であることを明らかにした (図1,2)(雑誌論文3)。

さらに、8%の低酸素灌流装置内で2週間飼育した慢性低酸素暴露マウスにおいて、血管新生過程でその周辺にマイクログリアの新生、遊走を認め、レーザー照射によってマイクログリア細胞体を焼灼すると血管新生が停止、あるいは新生過程の血管が消失することから、マイクログリアが血管新生に深く関与している可能性が示唆された。

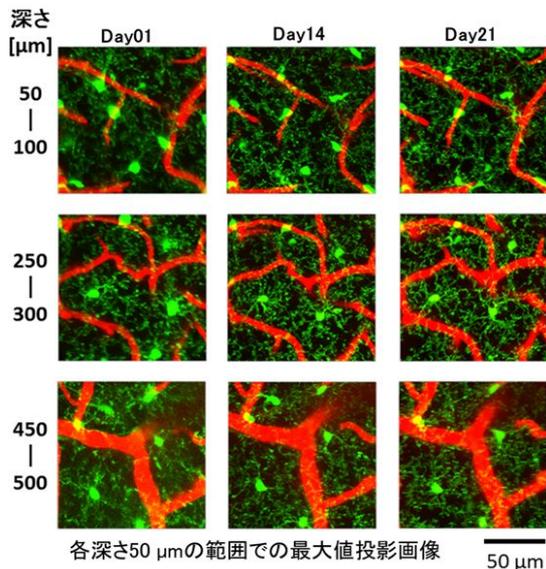


図1 血管およびマイクログリアの経日的変化

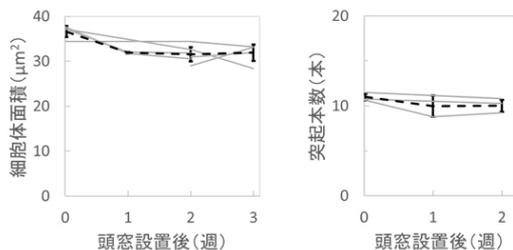


図2 マイクログリア(細胞体・突起)の経日的変化

(2) C57BL/6J マウスに青色光を照射しても血流は変化しなかったのに対し、ChR2-A では著しい脳血流増加を示した(雑誌論文 9)。ChR2-A、ChR2-N ともに照射直後から著しく脳血流が強度依存的に増加した。ChR2-Nの方が顕著な反応が認められたが、閾値はほぼ同程度であった(図 3)。

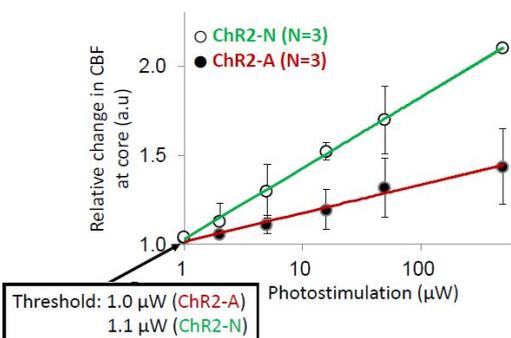


図3 光照射刺激による脳血流増加反応(強度依存的)

ChR2-N では光照射部位中心からの距離に応じて反応強度が減衰したのに対し、ChR2-A では減衰率が低く、広範囲にわたって脳血流が増大した。各種阻害剤投与前後の光刺激反応性を比較したところ、ChR2-A では BaCl<sub>2</sub>、carbenoxolone、2-methyl-6-(phenyl ethynyl)pyridine (MPEP) によって抑制されたことからカリウムチャンネル、ギャップジャンクション、代謝性グルタミン酸受容体が

関与し、ChR2-N では 6-cyano-7-nitro quinoxaline-2,3-dion (CNQX)、tetrodotoxin (TTX)、L-N<sup>G</sup>-nitro- arginine methyl ester (L-NAME) によって抑制されたことから非 NMDA 型グルタミン酸受容体、ナトリウムチャンネル、一酸化窒素の関与が示された(図 4)(学会発表 4 等)。このように、ニューロン、アストロサイトはそれぞれ独立した血流調節機序を有していることが示唆された。

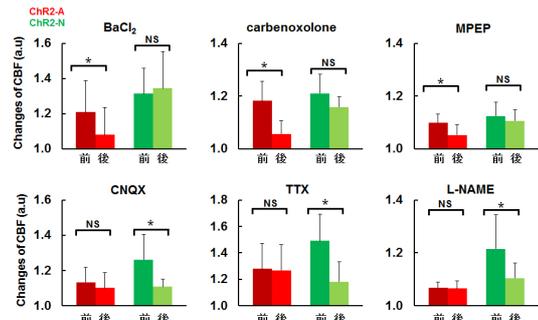


図4 各種阻害剤投与前後における光照射刺激による脳血流増加反応

## 5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 10 件)

- 1 Uekawa M., Tomita Y., Masamoto K., Toriumi H., Osada T., Kanno I., Suzuki N. Dynamic diameter response of intraparenchymal penetrating arteries during cortical spreading depression and elimination of vasoreactivity to hypercapnia in anesthetized mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2017;37:657-670. 査読有
- 2 Uekawa M., Ikeda K., Tomita Y., Kawakami K., Suzuki N. Enhanced susceptibility to cortical spreading depression in two types of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase α2 subunit-deficient mice as a model of familial hemiplegic migraine 2. *Cephalalgia.* 2017:DOI:333102417738249. 査読有
- 3 結城浩弥, 正本和人, 畝川美悠紀, 富田裕, 菅野巖, 鈴木則宏. Tomita-Seylaz 法による慢性頭窓作製後のマウス大脳皮質マイクログリアの長期反復 *in vivo* リアルタイム解析 脳循環代謝. 2017:28:249-256. 査読有
- 4 正本和人, 畝川美悠紀, 富田裕, 菅野巖, 鈴木則宏. アストロサイトによる脳血流調節. *分子精神医学.* 2016;16:17-24. 査読有
- 5 Uekawa M., Tomita Y., Toriumi H., Osada T., Masamoto K., Kawaguchi H., Itoh Y., Kanno I., Suzuki N. Hyperperfusion counteracted by transient rapid vasoconstriction followed by long-lasting oligemia induced by cortical spreading

- depression in anesthetized mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2015;35:689-98. 査読有
- 6 Sudo H., Tsuji A. B., Sugyo A., Takuwa H., Masamoto K., Tomita Y., Suzuki N., Imamura T., Koizumi M., Saga T. Establishment and evaluation of a new highly metastatic tumor cell line 5a-D-Luc-ZsGreen expressing both luciferase and green fluorescent protein. *Int. J. Oncol.* 2016;48:525-32. 査読有
  - 7 Nishino A., Tajima Y., Takuwa H., Masamoto K., Taniguchi J., Wakizaka H., Kokuryo D., Urushihata T., Aoki I., Kanno I., Tomita Y., Suzuki N., Ikoma Y., Ito H. Long-term effects of cerebral hypoperfusion on neural density and function using misery perfusion animal model. *Scientific reports.* 2016;6:25072. 査読有
  - 8 Hoshikawa R., Kawaguchi H., Takuwa H., Ikoma Y., Tomita Y., Unekawa M., Suzuki N., Kanno I., Masamoto K. Dynamic flow velocity mapping from fluorescent dye transit times in the brain surface microcirculation of anesthetized rats and mice. *Microcirculation.* 2016;23:416-25. 査読有
  - 9 Masamoto K., Unekawa M., Watanabe T., Toriumi H., Takuwa H., Kawaguchi H., Kanno I., Matsui K., Tanaka K., Tomita Y., Suzuki N. Unveiling astrocytic control of cerebral blood flow with optogenetics. *Scientific reports.* 2015: DOI: 10.1038/srep11455. 査読有
  - 10 Unekawa M., Tomita Y., Toriumi H., Osada T., Masamoto K., Kawaguchi H., Itoh Y., Kanno I., Suzuki N. Hyperperfusion counteracted by transient rapid vasoconstriction followed by long-lasting oligemia induced by cortical spreading depression in anesthetized mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2015;35:689-98. 査読有
- [学会発表](計 36件)
- 1 畝川美悠紀, 冨田裕, 鈴木則宏. 大脳皮質拡延性抑制/脱分極が結ぶ片頭痛と脳卒中. 第43回日本脳卒中学会学術集会(2018).
  - 2 渡部真子, 須貸拓馬, 蜂谷亮太, 安部貴人, 畝川美悠紀, 鳥海春樹, 冨田裕, 鈴木則宏, 田桑弘之, 菅野巖, 正本和人. 脳虚血後のグリア細胞の形状変化における in vivo 長期解析. 日本機械学会 第30回バイオエンジニアリング講演会(2017).
  - 3 畝川美悠紀, 池田啓子, 冨田裕, 川上潔, 鈴木則宏. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase α2 サブユニット遺伝子欠損マウスにおける皮質拡延性抑制に対する感受性と脳内 c-Fos 発現分布. 第60回日本脳循環代謝学会学術集会(2017).
  - 4 畠山菜緒, 正本和人, 畝川美悠紀, 田桑弘之, 菅野巖, 松井広, 田中謙二, 冨田裕, 鈴木則宏. Hemodynamic response to optogenetic activation of ChR2-expressing neurons or astrocytes in the mouse cortex. 第9回光操作研究会(2017).
  - 5 曾我直人, 結城浩弥, 須貸拓馬, 畝川美悠紀, 冨田裕, 菅野巖, 鈴木則宏, 正本和人. 低酸素誘発性脳微小血管リモデリングにおけるミクログリアの関与. 酸素ダイナミクス研究会(2017).
  - 6 Unekawa M., Ikeda K., Tomita Y., Kawakami K., Suzuki N. Widespread c-Fos expression after cortical spreading depression; possible differences between two types of animal models of familial hemiplegic migraine 2. The XXIII World Congress of Neurology (2017).
  - 7 Hatakeyama N., Masamoto K., Unekawa M., Takuwa H., Kanno I., Matsui K., Tanaka K., Tomita Y., Suzuki N. Cerebral blood flow responses to photostimulation in the transgenic mice expressing channelrhodopsin-2 in the cortical neurons or astrocytes. The XXIII World Congress of Neurology (2017).
  - 8 Unekawa M., Ikeda K., Tomita Y., Kawakami K., Suzuki N. Enhanced susceptibility to cortical spreading depression and different degree in two-types of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase α2 subunit-deficient mice as a model of familial hemiplegic migraine 2. 18th Congress of the International Headache Society (2017).
  - 9 Unekawa M., Tomita Y., Toriumi H., Osada T., Masamoto K., Kanno I., Suzuki N. Effect of spreading depolarization on cerebral blood flow and development of infarction under experimental ischemia in anesthetized mice. 28th International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism & Function (2017).
  - 10 Hatakeyama N., Masamoto K., Unekawa M., Takuwa H., Kanno I., Matsui K., Tanaka K., Tomita Y., Suzuki N. Spatiotemporal changes in cerebral blood flow induced by transcranial photostimulation to cortical neurons or astrocytes in the

- transgenic mice expressing channelrhodopsin-2. 28th International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism & Function (2017).
- 11 Kanno I., Masamoto K., Yuki H., Sugashi T., Unekawa M., Tomita Y., Suzuki N. Repeated longitudinal in vivo imaging of cortical microglia under chronic hypoxia in the mice using twophoton microscopy with a closed cranial window technique. 28th International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism & Function (2017).
  - 12 畷川美悠紀, 冨田裕, 鳥海春樹, 長田高志, 正本和人, 菅野巖, 鈴木則宏. 中大脳動脈閉塞時に発生する拡張性脱分極が脳血流と梗塞形成に及ぼす影響. 第 42 回日本脳卒中学会学術集会(2017).
  - 13 畷山菜緒, 正本和人, 畷川美悠紀, 田桑弘之, 菅野巖, 松井広, 田中謙二, 冨田裕, 鈴木則宏. 神経賦活とグリア賦活による脳血流反応の比較: オプトジェネティクスによる検討. 第 42 回日本脳卒中学会学術集会(2017).
  - 14 漆畑拓弥, 田桑弘之, 高堂裕平, 正本和人, 菅野巖, 冨田裕, 鈴木則宏, 生駒洋子, 小畷隆行, 伊藤浩. 慢性低灌流モデルマウスにおける安静時及び賦活時の脳神経機能評価. 第 42 回日本脳卒中学会学術集会(2017).
  - 15 結城浩弥, 正本和人, 畷川美悠紀, 須賀拓馬, 冨田裕, 菅野巖, 鈴木則宏. Longitudinal two-photon imaging of microvascular remodeling and microglial response to chronic hypoxia in in vivo mouse cortex. 第 42 回日本微小循環学会総会 (2017).
  - 16 畷山菜緒, 正本和人, 畷川美悠紀, 田桑弘之, 菅野巖, 松井広, 田中謙二, 冨田裕, 鈴木則宏. オプトジェネティクスを用いたアストロサイト・ニューロン賦活による脳血流空間伝播の比較. 第 59 回日本脳循環代謝学会学術集会(2016).
  - 17 畷川美悠紀, 冨田裕, 鳥海春樹, 長田高志, 正本和人, 菅野巖, 鈴木則宏. 一時的脳虚血時に発生する拡張性脱分極に伴う血流変化と梗塞形成に対する影響. 第 59 回日本脳循環代謝学会学術集会(2016).
  - 18 結城浩弥, 正本和人, 畷川美悠紀, 冨田裕, 菅野巖, 鈴木則宏. Tomita-Seylaz 法による慢性頭窓作成後のマウス大脳皮質ミクログリアの in vivo 長期反復解析. 第 59 回日本脳循環代謝学会学術集会(2016).
  - 19 田桑弘之, 漆畑拓弥, 田島洋佑, 西野明日香, 正本和人, 菅野巖, 冨田裕, 鈴木則宏, 生駒洋子, 伊藤浩. 貧困灌流モデルマウスにおける神経細胞分布密度および脳血管・神経機能評価. 第 59 回日本脳循環代謝学会学術集会(2016).
  - 20 畷川美悠紀, 冨田裕, 鳥海春樹, 長田高志, 正本和人, 菅野巖, 鈴木則宏. Heterogeneous response of microcirculation to spreading depolarization evoked during middle cerebral artery occlusion in anesthetized mice. 第 41 回日本微小循環学会総会 (2016).
  - 21 冨田裕, 畷川美悠紀, 鳥海春樹, 長田高志, 正本和人, 川口拓之, 伊藤義彰, 菅野巖, 鈴木則宏. Acceleration of red blood cells in intraparenchymal capillaries and dilation of arterial diameter in response to hypercapnia were diminished after passage of cortical spreading depression in anesthetized mice. 第 41 回日本微小循環学会総会 (2016).
  - 22 武田寛史, 鈴木秀明, 村田澁, 田桑弘之, 菅野巖, 冨田裕, 鈴木則宏, 山田勝也, 鈴木則宏. In vivo imaging and quantification of glucose transfer using 2-NBDG in the mouse cortex with two-photon microscopy. 第 41 回日本微小循環学会総会 (2016).
  - 23 正本和人, 菅野巖, 冨田裕, 鈴木則宏. Cerebral microvascular restructuring and microglial adaptation to chronic hypoxia in the animal models. 第 41 回日本微小循環学会総会 (2016).
  - 24 新夕雅啓, 中原智美, 星川椋, 結城浩弥, 田桑弘之, 冨田裕, 鈴木則宏, 菅野巖, 正本和人. 生体二光子顕微鏡法を用いたグリア脳血管の長期相互作用の解析. 第 25 回日本神経科学大会(2016).
  - 25 武田寛史, 田桑弘之, 季斌, 佐原成彦, 冨田裕, 鈴木則宏, 菅野巖, 須原哲也, 樋口真人, 鈴木則宏. マウス大脳における神経細胞の空間分布と機能活動に関する定量解析. 第 25 回日本バイオイメージング学会学術集会(2016).
  - 26 冨田裕, 渡部竜志, 正本和人, 畷川美悠紀, 鳥海春樹, 田桑弘之, 菅野巖, 松井広, 田中謙二, 鈴木則宏. Response of cerebral blood flow to optogenetic photostimulation of cortical neurons and astrocytes. 第 57 回日本神経学会学術大会(2016).
  - 27 正本和人, 畷川美悠紀, 菅野巖, 田中謙二, 冨田裕, 鈴木則宏. オプトジェネティクスによる脳血流操作と光イメージング. レーザー学会学術講演会第 36 回年次大会(2016).
  - 28 畷川美悠紀, 池田啓子, 冨田裕, 鳥海春樹, 海老根妙子, 川上潔, 鈴木則宏. 家族性片麻痺性片頭痛 2 型モデルマウスにおける皮質拡張性抑制感受性および反応

- 性. 第 43 回日本頭痛学会総会 (2015).
- 29 渡部 竜志, 正本和人, 畝川美悠紀, 冨田裕, 田桑弘之, 菅野巖, 松井広, 田中謙二, 鈴木則宏. オプトジェネティクスを用いた脳賦活による脳血流反応の空間伝播解析. 第 4 回ニューロフォトニクス研究会 (2015).
- 30 結城浩弥, 正本和人, 畝川美悠紀, 冨田裕, 鳥海春樹, 海老根妙子, 菅野巖, 鈴木則宏. 二光子顕微鏡を用いた生体マウス脳内ミクログリアの三次元長期イメージングと定量解析. 第 4 回ニューロフォトニクス研究会 (2015).
- 31 畝川美悠紀, 冨田裕, 鳥海春樹, 長田高志, 正本和人, 菅野巖, 鈴木則宏. 大脳皮質性拡張性抑制が実質内穿通動脈口径と局所脳血流および二酸化炭素負荷に対する反応性に及ぼす影響. 第 27 回日本脳循環代謝学会総会 (2015).
- 32 Unekawa M., Tomita Y., Toriumi H., Osada T., Masamoto K., Kanno I., Suzuki N. Vasoreactivity of intracortical penetrating arteries of the cerebral cortex in response to cortical spreading depression and hypercapnia in anesthetized mice. 10th World Congress for Microcirculation (2015).
- 33 Watanabe T., Masamoto K., Unekawa M., Toriumi H., Takuwa H., Kanno I., Matsui K., Tanaka K., Tomita Y., Suzuki N. Spatiotemporal dynamics of cerebral blood flow during focal activation with optogenetic photostimulation to the cortical neurons and astrocytes. 10th World Congress for Microcirculation (2015).
- 34 Tomita Y., Unekawa M., Toriumi H., Osada T., Masamoto K., Kawaguchi H., Itoh Y., Kanno I., Suzuki N. Dynamics of red blood cells in intraparenchymal capillaries and arterial diameter during cortical spreading depression observed with high-speed camera confocal fluorescence microscope in anesthetized mice. 10th World Congress for Microcirculation (2015).
- 35 Masamoto K., Unekawa M., Watanabe T., Toriumi H., Takuwa H., Kawaguchi H., Kanno I., Matsui K., Tanaka K., Tomita Y., Suzuki N. Astrocytic depolarization induced rapid and broad increase in CBF in in vivo mouse cortex. 27th International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism & Function (2015).
- 36 冨田裕, 正本和人, 畝川美悠紀, 渡部 竜志, 鳥海春樹, 田桑弘之, 川口拓之, 菅野巖, 松井広, 田中謙二, 鈴木則宏. Optogenetic activation of astrocyte-blood flow signaling in the

anesthetized mouse cortex. 第 56 回日本神経学会学術大会 (2015).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

冨田 裕 (TOMITA, Yutaka)  
慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・講師 (非常勤)

研究者番号: 60276251

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

### (4) 研究協力者

鈴木 則宏 (SUZUKI, Norihiro)  
菅野 巖 (KANNO, Iwao)  
畝川 美悠紀 (UNEKAWA, Miyuki)  
正本 和人 (MASAMOTO, Kazuto)  
結城 浩弥 (YUKI, Hiroya)  
曾我 直人 (SOGA, Naoto)  
渡部 竜志 (WATANABE, Tatsushi)  
畠山 菜緒 (HATAKEYAMA, Nao)