

「脳を知る」
平成10年度採択研究代表者

津本 忠治

(大阪大学大学院医学系研究科 教授)

「回路網形成における神経活動の関与メカニズム」

1. 研究実施の概要

複雑な脳内神経回路網が一個の受精卵からできあがるプロセスは、1) 発生初期から中期にかけて遺伝情報によって発現する分子に基づいて形成されるプロセスと、2) 中期から後期の外部からの入力や神経細胞自身の活動によって修正あるいは精緻化されるプロセスに分けられる。本研究は、後者のプロセス、つまり神経活動依存性プロセスに焦点を当てそのメカニズム解明を目指している。

この後者のプロセスは入力操作が比較的容易なことから視覚系で多くの研究がなされてきた。例えば、仔ネコの片眼を一時的に遮蔽すると大脳皮質視覚野ニューロンがその眼に対する反応性を消失することや視覚野のコラム構造も変化することが見いだされた。また、このような変化には、入力によって伝達効率が良くなったり悪くなったりするシナプス長期増強や長期抑圧が関与しているという仮説が提唱され、さらに、そのような変化の物質メカニズムとして神経栄養因子の関与が示唆された。本研究はこのような視覚野の可塑性に関する仮説や示唆を検証し、ひいては発達脳神経回路の神経活動依存的変化のメカニズムを解明しようとするものである。

これまでの研究成果として1) 仔ネコの片眼遮蔽後に生じる変化に大脳皮質の活動が関与していること、すなわち大脳皮質の構造と機能の可塑的な変化の方向を決めるには、単に末梢からの入力のみならず皮質ニューロン自体の活動も重要だということ、及び2) 脳由来神経栄養因子 (BDNF) は、高濃度ではシナプス増強を起こすが、低濃度ではシナプス抑圧を阻止すること、を見出した。また、3) 仔ネコの片方の視神経にのみ長期増強を起こす高頻度刺激を与えると、視覚野ニューロンの光反応性が刺激を与えた側の眼により強く反応するようになることも見出した。この結果は、シナプス長期増強や長期抑圧が片目遮蔽後に生ずる視覚野の変化に実際に関与しているという仮説を支持するものと考えられた。

平成11年度はこれらの結果の上に立って、さらに以下の成果を得た。1) 仔ネコの視覚野において、BDNFは大脳視覚野の眼優位コラムを拡大する作用があること、及びその作用は臨界期にみられるが、成熟期には消失すること、また、2) 視覚野培養神

経細胞において、高濃度のBDNFはシナプス前部からの伝達物質放出を増加させる作用があるが、この作用は神経細胞の成熟につれて消失することを見出した。さらに、3)低濃度BDNFは発達脳において未熟なシナプス前部に働き、連続入力によって伝達物質の放出が減ることを防ぐ作用があることも見出した。

今後は、BDNFノックアウトマウスの使用に加えて、その受容体が大脳皮質で生後一定の時期から欠損する部位・時期限定的遺伝子改変マウスが利用可能となったこと、及び2光子レーザー走査蛍光顕微鏡を使ってBDNFの動態を解析する方法がほぼ確立したことから、従来の方法との併用によって本研究をさらに進展させ得るものと期待している。

2. 研究実施内容

- 1) 仔ネコの片眼遮閉後に生ずる大脳皮質視覚野の眼優位コラムの変化は発達脳の可塑性の代表的な例であり、そのメカニズム解明は本研究の主要なテーマの一つである。眼優位コラム構造の形成に脳由来神経栄養因子(BDNF)が関与していることは従来から示唆されていたが、本実験では片目遮蔽によって縮小したコラムをBDNFが再び拡大できるか、できるとすれば視覚野の可塑性の臨界期にのみ見られる現象かどうかを調べた。そのため、片眼を遮蔽した仔ネコにおいて遮蔽眼あるいは非遮蔽眼にトリチウムで標識したプロリンを注入して、皮質内における眼優位コラムをオートラジオグラフで可視化した。また、視覚野にBDNFを浸透圧ミニポンプを使って持続的に注入した。BDNFの浸透領域はBDNF抗体を使った免疫組織化学法によって確認した。その結果、BDNFは遮蔽眼から入力を受けるコラムも、受けないコラムも共に拡大することを見出した。ただし、このような変化は臨界期を過ぎた成熟ネコでは見られなかった。この結果は、臨界期の視覚野コラムの可塑性な変化にBDNFが関与していることを示唆しており、発達脳神経回路の可塑性のメカニズム解明に重要な手掛かりを与えた。
- 2) 高濃度(200 ng/ml, 7.14 nMに相当)のBDNFがシナプス伝達を長期持続的に増強することは我々の数年前の研究や他のグループの研究によって明らかとなっていた。平成11年度は新生仔ラット視覚野から培養した孤立神経細胞培養標本を使ってこの増強作用がシナプス前からの伝達物質放出増加作用によるのか、シナプス後部への作用によるのかを明かにしようとした。その結果、前者の作用によることを確認するとともに、神経細胞の成熟につれてそのような作用が消失することを発見した。この結果は、上記視覚野コラムへの作用が臨界期をすぎると消失するメカニズム解明に手掛かりを与えるものとして注目された。
- 3) BDNFがシナプス長期抑圧を防いでいることを前年に見出したが、このBDNFのシナプス抑圧阻止作用がシナプス前部への作用であること及び抑制性ニューロンを介さない直接的作用であることを確認するため、孤立神経細胞培養標本を利用

して実験を行った。興奮性細胞であることが確認された培養標本において活動電位と細胞体の持続的脱分極を対にしたペアリング刺激を1 Hzで5分間続けるとシナプス反応の長期抑圧が生じることを見出した。また、この時、自発性シナプス活動の頻度は減少したが振幅には有意な変化が見られなかったことからこの長期抑圧はシナプス前で生じていることが確認された。さらに、BDNFはシナプス増強を起こすよりも低い濃度(1/10の濃度)でシナプス抑圧を阻止することを見出した。これらの結果から、内因性のBDNFは発達脳において未熟なシナプス前部に働き、連続入力によって伝達物質の放出が減ることを防ぐ作用があると考えられた。

- 4) BDNFのシナプス抑圧阻止作用を確認するためBDNFノックアウトマウスから視覚野スライス標本を作製し、IV層の1 Hz連続刺激によって長期抑圧が生じ易くなっているかどうかを調べた。その結果、コントロールでは長期抑圧を生じない刺激条件(II/III層の記録細胞の膜電位を-70 mVに固定したままでIV層に1 Hz連続刺激を与える)でも長期抑圧が生じることを見出した。この結果は、内因性BDNFがシナプス長期抑圧を防いでいるという前年度の発見をさらに支持する結果である。
- 5) 大脳視覚野における神経栄養因子の発現が、発達や神経活動に依存して変化するかどうかを明らかにするため、フェレットを使用して神経栄養因子蛋白質の定量を行った。両眼球に活動電位を止めるTetrodotoxin (TTX)を注入し両眼からの入力を遮断したところ、視覚野においてBDNF量の有意な減少が認められた。しかし、視覚と直接関係しない体性感覚野、海馬、小脳ではそのような減少は見られなかった。また、TTXを片眼にのみ注入する実験を行ったところ、BDNF量は減少したが、その程度は両眼への注入実験における減少量の約半分に留まった。この結果は、BDNFの発現が入力活動に依存していることを示している。
- 6) BDNFの視覚野スライス標本や培養神経細胞に対する急性作用と視覚野眼優位コラムに対する慢性作用の関係を明らかにするために、無血清培養神経細胞に対するBDNFの慢性投与の効果調べた。そのため、対にした孤立培養神経細胞の一方にBDNFを8-12日間投与し投与しないコントロールの細胞との比較を行った。その結果、BDNF投与群では、電気生理学的にシナプス反応の増大が認められた。また、活動依存的にシナプス前部に取り込まれる蛍光色素(FM1-43)を使う方法によって活動的なシナプス数の増加を見出した。この結果は、シナプス抑圧の阻止やシナプス増強の誘発という急性作用がシナプス前終末部の拡大やその部におけるシナプス増加といったより長期的な形態変化に移行することを示唆するものと考えられた。

3 . 主な研究成果の発表（論文発表）

Hata, Y., Ohshima, M., Ichisaka, S., Wakita, M., Fukuda, M. and Tsumoto, T. (2000) Brain-derived neurotrophic factor prevents expands ocular dominance columns in visual cortex in monocularly deprived and non-deprived kittens, but does not in adult cats. *J. Neurosci.*, 20 RC57, 1-5.

Kumura, E., Kimura, F., Taniguchi, N. and Tsumoto, T. (2000) Brain-derived neurotrophic factor blocks long-term depression in solitary neurones cultured from rat visual cortex. *J. Physiol. (Lond.)* 524, 195-204.

Sato, H., Hata, Y. and Tsumoto, T. (1999) Effects of blocking non-NMDA receptors on visual responses of neurons in the cat visual cortex. *Neuroscience*, 94, 697-703.