

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： 回路網形成における神経活動の関与メカニズム

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名

研究代表者： 津本 忠治（大阪大学大学院医学系研究科 教授）

主たる研究参加者： 小島正己（大阪工業技術研究所 研究員）

T.Hensch（理化学研究所 グループリーダー）

仙波りつ子（愛知県心身障害者コロニー 研究室長）

鳥光慶一（NTT 基礎研究所 グループリーダー）

3. 研究内容及び成果：

この研究では、標本、手法の異なる多角的な実験を実施した。以下、8種類の異なったアプローチにおける成果を記載する。

（1）ニューロン間における BDNF の移行： 視覚領野の可塑的变化はニューロンの活動性に依存するだけでなく、BDNF にも依存する。ニューロンにおける BDNF の動態を培養系において解析した。BDNF に GFP を連結した遺伝子をラット大脳視覚野培養神経細胞の核内に注入して、約 24 時間後に発現した可視化 BDNF を観察した。BDNF は培養ニューロンの軸索内を順向性に輸送され、その終末端から放出されて、シナプス後ニューロンに移行する像が観察された。この BDNF の輸送は神経細胞の電気的活動性を必要とした。蛍光色素のみを発現させても、色素タンパク質の細胞間移行は見られなかった。

（2）BDNF による樹状突起発達の促進： ニューロン間の移行は GFP を連結した BDNF だけでなく、内因性 BDNF においても見られた。内因性 BDNF の移行により、GABA 性ニューロンの樹状突起は突起の伸展、分枝の増加、シナプス数の増加を示した。しかし、興奮性ニューロンではこれらの効果は見られなかった。これは、興奮性ニューロンは BDNF を産生するが、抑制性ニューロンは BDNF を産生しないため、後者のみが移行した BDNF の影響を表示すると示唆された。

（3）BDNF による silent synapse から成熟シナプスへの変換： 視床から大脳皮質 IV 層への経路において、野生型マウスでは大脳シナプスの silent synapse の数は生後 7-8 日から急速に減少し、AMPA 型 Glu レセプターを含む成熟型興奮性シナプスに移行するが、BDNF ノックアウトマウスでは、この減少が見られなかった。しかし、ノックアウトマウスでも外部から BDNF を投与すると silent synapse の数は減少した。この結果は、silent synapse から成熟型への変換に BDNF が関与することを示唆する。

（4）BDNF の急性効果： 視覚領野のスライス標本で錐体細胞から記録した興奮性シナプス電位は BDNF 投与後数分以内に増強されることが知られている。孤立培養神経細胞標本で解析した結果、この BDNF によるシナプス増強はシナプス前機構（伝達物質の放出亢進）を介すると推測された。BDNF による急性シナプス増強効果は in vivo でも観察され、この効果は約 4 時間で最大に達し、8~12 時間ほど持続した。しかし、この増強効果は幼弱ラッ

トでは見られたが、成熟ラットでは観察されず、age-dependent であった。

(5) BDNF による長期抑圧阻止効果： 幼弱ラットの視覚野スライス標本で、1 Hz の頻回刺激を 15 分与えると、シナプス応答の減弱が見られ、これは長期抑圧と呼ばれる。しかし、BDNF を投与しておくところの現象は観察されない。この機構を興奮性孤立培養標本において解析した結果、長期抑圧は miniature EPSCs の頻度の低下を伴い、その amplitude は変化しなかった。したがって、この現象はシナプス前機構に依存していることが示唆された。この長期抑圧は BDNF の投与によりブロックされる。長期抑圧は in vivo 標本においては観察されなかった。しかし、in vivo 標本においても、trk receptor tyrosine kinase 阻害剤(K252a) あるいは trkB-IgG によって BDNF システムをブロックしておく、長期抑圧が観察された。したがって、in vivo では BDNF システム活性度が高いために長期抑圧が観察されにくいと推測される。事実、スライス標本では、リン酸化 trk の量、あるいは trkB の量は時間と共に低下することが観察された。

(6) 視覚コラム構造に対する神経活動性と BDNF の関与： 大脳視覚野の眼優位コラム構造の形成には眼からの入力活動性が関与する。今回、大脳皮質ニューロンの活動性自身が関与するかを検討した。大脳皮質に GABA agonist (ムシモール) を持続投与して、ニューロンの活動性を慢性的ブロックすると、開眼側の入力線維終末端分枝分布が縮小することが観察された。この変化はシナプス前と後の同期活動が神経可塑性に必要であるという Hebb の仮説によって説明できる可能性はあるが、そのメカニズムは現在不明である。さらに、片眼を遮蔽した仔猫の視覚野に BDNF を持続的に投与すると、遮蔽眼からの入力を受けるコラムも受けないコラムも共に拡大した。しかし、この現象は成熟猫では見られなかった。したがって、臨界期のコラム構造の形成には BDNF が関与すると示唆された。

(7) BDNF 発現量の生後発達と入力依存性： フェレットの中枢神経の異なった領域のニューロトロフィンのタンパク質量を定量した。両眼球に tetrodotoxin を注入して神経活動性をブロックすると、視覚領の BDNF の発現量のみが低下した。また、ムシモールにより大脳皮質の活動性をブロックすると、皮質の BDNF 発現量が低下した。したがって、中枢神経系の BDNF の発現量は神経活動性に依存すると考えられる。

(8) 視床一皮質投射線維の髄鞘化の機能的意義： スライス標本を用い、視床、barrel cortex の皮質間の線維伝導速度を測定し、髄鞘化の程度を形態的に定量し、発達に伴う変化を観察した。視床一皮質間の伝導距離は中枢の部位により著しく異なるが、その情報伝導のタイミング(潜時)は、ほぼ、一定であった。大脳皮質へ到達する種々の入力のタイミングを合わせるという求心線維髄鞘化の新しい機能を示唆する結果が得られた。

#### 4. 事後評価結果

##### 4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

この研究は視覚領野の神経活動依存性可塑的变化を解析したもので、全般的に当初計画に沿って順調に成果を挙げた。研究計画は極めて論理的で、かつ、多角的アプローチを用いて解析し、異なった標本の特徴を生かし、個体・局所神経回路・シナプス・細胞・

分子レベルで統合的に結果をまとめあげ、神経可塑的变化の研究に新しい局面を開いた。独創的解析を用いたこの研究の着実な成果は高く評価できる。特に、BDNF と GFP 連結遺伝子のニューロン核内注入による、BDNF の動態観察とニューロン・シナプス機能の発達に対する BDNF の影響の観察は神経栄養因子の機能に関する研究にインパクトを与えた。

回路網形成に対する神経活動の影響に関するメカニズムの研究が殆ど BDNF を介する現象だけに集中している点、また、コラム構造の形成に対する神経活動の関与が現象的段階に留まっている点については批判もあり得るかと思われる。しかし、この5年間に得られた研究成果の質と量から考慮して、本プロジェクトは高い成功を示した優れた研究と判断できる。

#### 4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

本研究は神経回路網形成に新たな解析手法を導入し、脳機能の新たな側面の理解を提供した。本来の研究目標は神経回路網の神経活動に依存した可塑的变化であったが、この過程に神経栄養因子(BDNF) が関与することを新たに見いだした。これに基づいて、神経栄養因子遺伝子の欠損マウスから得た神経細胞と、神経栄養因子遺伝子を核内に注入した神経細胞の共培養による神経回路網の形成を解析するという独創的な研究アプローチを実施した。その結果、研究成果は予想以上に進展し、脳を知る領域に新規の研究方向を導入した。

#### 4-3. その他の特記事項（受賞歴など）

なし