

「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出来あがるプロセスは、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、ひいては発達脳の可塑性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視覚野の眼優位コラムが縮小することは従来から知られていたが、大脳皮質の活動がその変化に関与しているかどうかは不明であった。検討の結果、単に末梢からの入力の多少のみならず皮質ニューロン自体の活動も大脳皮質の構造と機能の可塑的な変化の方向を決めるのに重要だということが明らかになった。2) 脳由来神経栄養因子(BDNF)はシナプス長期増強に関与していることは海馬で報告されていた。しかし、長期抑圧に BDNF が関与しているかどうかは全く不明であった。本研究では新たに、BDNF が長期抑圧を阻止し、その作用は主にシナプス前部におけるものであることを見出した。この結果から、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。3) 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かどうかを直接調べるため、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た。その後、この仔ネコの視覚野ニューロンの光反応性は、高頻度刺激を与えた側の眼

により強く反応するようになっていた。この結果は、電気刺激によって生じた長期増強が光反応性という視覚野ニューロンの生理的性質の変化に関与していることを実証したものである。

今後は、BDNF や他の神経栄養因子のノックアウトマウスの利用が最近可能となった事、及びウイルスベクターを使って栄養因子を大脳皮質に強制発現させる方法がほぼ確立した事から、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課題の主要なテーマの一つである。眼優位コラム構造の変化に眼からの入力に関与していることは従来から知られていたが、本実験では大脳皮質ニューロン自体の活動に関与しているかどうかを調べた。そのため、片眼を遮蔽した仔ネコにおいて遮蔽眼からの入力を中継する外側膝状体の層、あるいは他の層にトレーサーである PHA-L を注入して、皮質内におけるシナプス前終末の拡がりや形態を調べた。また、視覚野ニューロンの活動を抑えるため皮質内に抑制性伝達物質受容体の作動薬を持続的に注入した。その結果、皮質ニューロンの活動を抑制しておくと同眼側からの求心性線維終末がかえって縮小してしまうことを発見した。この結果は、単に末梢からの入力の多少のみならず皮質ニューロン自体の活動も大脳皮質の構造と機能の可塑的な変化の方向を決めるのに重要だということを示唆しており、発達脳の可塑性研究に重要なインパクトを与えた。

(2) 神経栄養因子、特に脳由来神経栄養因子(BDNF)はシナプス長期増強に関与していることが、海馬や発達脳視覚野で報告されていた。しかし、長期増強と同様に発達脳の可塑性の基礎にあると考えられてきたシナプス長期抑圧に BDNF が関与しているかどうかは全く不明であった。そこで、幼若ラットの視覚野スライス標本を使用し、シナプス長期抑圧に BDNF が関与しているかどうかを調べた。その結果、長期増強を起こすよりも低い濃度（約 1/10）で BDNF が長期抑圧を阻止すること、及びこの阻止効果は主にシナプス前部における作用のためであることを見出した。この結果から、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。

(3) 前記の 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作製した。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、及び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 はシナプス前部における伝達物質放出の長期持続的減少を阻止する作用を持つことを見出した。

(4) 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機能と構造の変化に実際に関与しているかどうかを直接調べるため、可塑性の高い時期（生後4～6週）の仔ネコの視神経に慢性刺激電極を設置し、片方にのみ長期増強を起こす高頻度（ $\theta$ バースト）刺激を2日間、間欠的に与えた。その後この仔ネコを麻酔非動化し、視覚野ニューロンがどちらの眼に強く反応するようになったかを光刺激に対する皮質ニューロンのスパイク応答記録法によって調べた。その結果、ほとんどの例で皮質ニューロンは高頻度刺激を与えた側の眼により強く反応するようになっていた。この結果は、電気刺激という人工的刺激によって生じた長期増強が光反応性という視覚野ニューロンの生理的性質の変化に関与していることを初めて明らかにしたものである。

(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、フェレットにおいて神経栄養因子蛋白質の定量を行った。その結果、発達にともなって BDNF 量は有意に変化しなかったが、Neurotrophin-3 (NT-3)は減少した。視覚入力を遮断するため、両眼球に Tetrodotoxin (TTX)を注入したところ幼若期注入群では視覚野において BDNF 量の有意な減少が見られた。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。一方、NT-3 はどの領域においても有意な変化はみられなかった。この結果は、BDNF の発現が神経活動に依存していることを示している。

(6) 大脳皮質視覚野における経験依存的可塑性は主にネコで調べられてきたが、その分子機能をさらに解明するためにわれわれは *in vivo* マウスで電気生理学的実験法を確立した。遺伝子欠損マウスを用いることにより、*in vitro* 法との直接比較が可能となった。そこで、活動依存的可塑性のモデルとされてきた長期増強 (LTP) や長期抑圧 (LTD) 現象が *in vivo* でみられる眼優位的可塑性とは簡単に結びつかない事がわかった。さらに、視皮質内の抑制ニューロンを介した局所神経回路が眼優位的可塑性に重要な役割を果たしている事が明かになった。

### 3. 主な研究成果の発表（論文発表）

○Hata, Y., Tsumoto, T. and Stryker, M.P. (1999) Selective pruning of more active afferents when cat visual cortex is pharmacologically inhibited. *Neuron*, 22, 375-381.

- Kinoshita, S., Yasuda, H., Taniguchi, N., Katoh-Semba, R., Hatanaka, H. and Tsumoto, T. (1999) Brain-derived neurotrophic factor prevents low-frequency inputs from inducing long-term depression in the developing visual cortex. *J. Neurosci.*, 19, 2122-2130.
- Yoshimura, Y., Kimura, F. and Tsumoto, T. (1999) Estimation of single channel conductance underlying synaptic transmission between pyramidal cells in the visual cortex. *Neuroscience*, 88, 347-352.