

「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報告された。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) 仔ネコの視覚野において、脳由来神経栄養因子(BDNF)は眼優位コラムを拡大する作用があること、及びその作用は発達期にみられるが、成熟ネコ視覚野では見られないこと、2) BDNF はシナプス伝達を急速に増強すること、この作用はシナプス前からの伝達物質放出増加作用によること、及び神経細胞の成熟につれてそのような作用は消失すること、3) 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を示すこと、を見出した。さらに、4) BDNF 遺伝子と蛍光タンパク質遺伝子の連結遺伝子を神経細胞の核内に直接注入する方法によって、BDNF は神経活動に応じてシナプス前から後細胞へ移動することを発見した。また、5) *in vivo* ラット標本において、外側膝状体刺激で誘発される視覚野の反応に対する BDNF の増強作用の持続時間を調べたところ、その作用は投与直後から約8時間ほど持続するが約 16 時間で元にもどることを見出した。さらに、6) シナプス伝達増強という急性作用と視覚野眼優位コラム拡大という慢性作用の関係を明らかにするために、培養神経細胞に対する BDNF の慢性投与の効果調べた結果、シナプス増強がシナプス前終末の拡大やシナプス数の増加といった長期的な変化に移行することを示唆する知見を得た。

平成 13 年度はこれらに加えて以下の知見を得た。1) 従来の研究で調べられてきた外来性 BDNF ではなく、内在性 BDNF の動態を、2種類のトランスジェニックマウスから調製した大脳皮質神経細胞の共培養標本を作製して、解析した。その結果、内在性 BDNF はシナプス後部の抑制性細胞に移行し、その樹状突起の伸展と分岐点増加作用を示すことを見出した。2) 脳切片標本ではシナプス長期抑圧を起こす刺激が、より生理的な状態にある *in vivo* の大脳視覚野では長期抑圧を起こさないことを見出した。さらに、これは *in vivo* で存在する内在性 BDNF の作用によることを見出した結果を得た。3) 大脳皮質視覚野における神経栄養因子タンパク質の発現が生後発達或いは入力や神経活動によって変化するかを調べた。その結果、4種のニューロトロフィンのうち、BDNF だけが入力や皮質神経細胞の活動によって変化することを見出した。4) 視床からの投射線維と皮質細胞間シナプスの機能発達を体性感覚野の髭の領域の切片標本で調べた。その結果、生後 4-8 日には伝達物質放出確立の高いシナプスが存在するが、それらは生後 10 日以後は見られなくなることを見出した。

上述したように、異なったトランスジェニックマウス由来の細胞の共培養標本を作製することが可能となったので、今後は、BDNF ノックアウトマウスや GFP マウスに加えて、赤い蛍光タンパク質 DsRed を発現するマウスからの大脳皮質細胞の共培養標本を使用して本研究をさらに進展させ得るものと期待している。さらに、*in vivo* 標本を使用し、内在性 BDNF の生理的な状態での機能をさらに明らかにできるものと考えている。

2. 研究実施内容

- 1) 内在性 BDNF の動きを目で見えるようにするため、緑色蛍光蛋白質 (Green Fluorescence Protein, GFP) をすべての細胞に発現する GFP トランスジェニックマウスから調製した大脳皮質神経細胞と BDNF ノックアウトマウスから調製した大脳皮質神経細胞の共培養標本を作製した。この標本では、GFP で緑色の蛍光を発する細胞は内在性 BDNF を持っているが、蛍光を発しない細胞はノックアウトマウス由来で BDNF を持っていない。さらに、対象とする神経細胞が抑制性細胞か興奮性細胞かを区別するため抑制性伝達物質 GABA の合成酵素 GAD の抗体で共培養標本を免疫組織化学的に染色した。その結果、内在性の BDNF はシナプス後部の GABA 細胞に移行すること、さらに、この BDNF は GABA 細胞の樹状突起を伸展させ、分岐点を増加させる作用を持つことを見出した。
- 2) シナプス長期抑圧は神経回路の形成や精緻化に一定の役割を担っていると想定されているが、その誘発は従来ほとんど脳切片標本で観察された。より生理的な状態にある *in vivo* の大脳皮質に長期抑圧が生じるかどうかを調べるため、麻酔したラットで外側膝状体電気刺激に対する大脳視覚野の誘発電位反応を記録した。切片標本ではほとんど常に長期抑圧を起こす 1Hz, 15 分の低頻度連続刺激を外側膝状体に与えたが長期抑圧を起こすことが出来なかった。この結果は、*in vivo* では自発的に活動している網膜細胞からの入力が長期抑圧を阻止しているためである可能性が考えられた。そこで、麻酔下で両眼球を摘出して網膜からの入力を皆無にしたが、長期抑圧を起こすことが出来ず、この可能性は否定された。次に、*in vivo* 標本では内在

性の BDNF が働いているので長期抑圧が生じない可能性が考えられた。そこで、BDNF 受容体 (TrkB)活性を阻害する薬物を投与したところ、長期抑圧が生じた。また、機能阻止抗体で TrkB の機能を阻害したところ、同様に長期抑圧を起こすことが出来た。ただし、このような長期抑圧の誘発は幼若ラットでのみ見られ成熟ラットではみられなかった。以上の結果から、発達期の大脳皮質では内在性 BDNF がシナプス抑圧を阻止している可能性が示された。

- 3) 大脳皮質視覚野における神経栄養因子タンパク質の発現が発達や神経活動によって変化するかを明らかにするため、BDNF, Nerve growth factor (NGF)、Neurotrophin-3 (NT-3)、Neurotrophin-4 (NT-4)と4種のニューロトロフィンタンパク質を2部位酵素免疫測定法を用いて、幼若期及び成熟期フェレットの視覚野、体性感覚野、海馬、小脳において測定した。視覚入力を遮断するため両眼球内にテトロドトキシン (TTX)を注入したところ、24 時間後に BDNF 量は、体性感覚野、海馬、小脳では有意な変化がみられないのに対し、視覚野では幼若期、成熟期共に有意に減少した。また、片眼からの視覚入力のみを遮断したところ、BDNF の減少量は両眼からの視覚入力遮断時の約半分であった。一方、NGF、NT-3、NT-4 はどの領域においても視覚入力遮断による有意な変化を示さなかった。次に、BDNF 発現に及ぼす皮質ニューロン活動の影響を調べるため、主にシナプス後で神経活動を抑制することが知られている GABA_A 受容体の agonist である muscimol を浸透圧ミニポンプで視覚野内に 48 時間注入したところ、BDNF 量が著しく減少した。この結果は、BDNF の発現には末梢からの入力のみならず神経細胞自体の活動が関与していることを示している。
- 4) 大脳皮質の発達には、主な入力源である視床からの投射線維と皮質ニューロンの作るシナプスの機能発達が重要である。シナプス機能発達を正確に調べるには脳切片標本が有用であるが、視覚野では主な入力源である外側膝状体からの投射線維を含む切片標本の作製は困難である。したがって、視床を同時に含む脳切片標本の作製可能な体性感覚野の髭の領域 (barrel cortex と呼ばれる)を対象とした。今年度は特に、伝達物質放出確立の変化を、主に NMDA 受容体の open channel blocker である MK801 を使用して解析した。その結果、生後 4-8 日ごろには放出確立の高いシナプスが存在するが、それらは生後 10 日以後は見られなくなることを見出した。シナプスの生後発達においては、存在していても機能していない、いわゆるサイレントシナプスが生後 4-8 日ごろに多く、その後激減することが知られているので、この知見は、放出確立の高いシナプスはサイレントシナプスに存在する可能性を示唆するものと考えられた。

3. 研究実施体制

(1) 津本グループ(大阪大学大学院医学系研究科)

- ① 研究者名: 津本忠治 (教授)
- ② 研究項目: 眼優位コラム観察実験及び脳標本を使用した電気生理学的・形態学的実験

(2) 畠中グループ(大阪大学蛋白質研究所及び独立行政法人産業技術総合研究所)

- ① 研究者名: 畠中 寛 (大阪大学教授)(平成 13 年 5 月 25 日死去)
- ② 研究項目: プラスミッドベクターの作製及び各種 transgenic mouse の genotyping の実施

- (3) Hensch グループ (理化学研究所脳科学総合センター)
 - ① 研究者名: Takao Hensch (チームリーダー)
 - ② 研究項目: BDNF ノックアウトマウスを使った実験
- (4) 仙波グループ (愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所)
 - ① 研究者名: 仙波りつ子 (研究室長)
 - ② 研究項目: 各種神経栄養因子抗体の作製及び各種神経栄養因子タンパク質量の測定
- (5) 鳥光グループ (NTT 基礎研究所)
 - ① 研究者名: 鳥光慶一 (グループリーダー)
 - ② 研究項目: 石英ガラス基盤における神経細胞培養標本の作製

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

- Jiang, B., Akaneya, Y., Ohshima, M., Ichisaka, S., Hata, Y. and Tsumoto, T. (2001) Brain-derived neurotrophic factor induces long-lasting potentiation of synaptic transmission in visual cortex in vivo in young rats, but not in the adult. *Europ. J. Neurosci.*, 14, 1219-1228.
- Kojima, M., Takei, N., Numakawa, T, Ishikawa, Y., Suzuki, S., Matsumoto, T., Katoh-Semba, R., Nawa, H., Hatanaka, H. (2001) Biological characterization and optical imaging of brain-derived neurotrophic factor-green fluorescent protein suggest an activity-dependent local release of brain-derived neurotrophic factor in neurites of cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci. Res.*, 64, 1-10.
- Kasai, N., Jimbo, Y., Niwa, O., Matsue, T. and Torimitsu, K. (2001) Real-time observation of evoked glutamate distribution in a rat hippocampal slices, *Neurosci. Lett.*, 304, 107-111, 2001

(2) 特許出願

なし