

「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。この後者のプロセス、つまり神経活動依存性プロセスには、入力によって伝達効率が持続的に変化するシナプス長期増強や長期抑圧が関与している可能性が示唆され、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想定されている。本研究はこのような仮説を検証し、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) 脳由来神経栄養因子(BDNF)は、仔ネコの視覚野において、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、成熟期には見られないこと、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) 蛍光タンパク質で標識されたBDNF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) シナプス増強という急性作用と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の慢性投与の効果を調べた結果、シナプス増強が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14年度はさらに以下の知見を得た。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、*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、これは内在性BDNFの作用によることを示す結果を得た。3) 4種のニューロトロフィンのうち、従来注目されていなかったNeurotrophin-4の量と

脳における局在を調べた。その結果、脳幹の一部には比較的多く存在するが大脳皮質ではBDNF量の10分の1以下にしか存在しないことを見出した。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、特定の部位に特定の蛋白質を欠損あるいは発現している培養神経回路網を作製し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

### A. 培養大脳皮質神経細胞を使った実験

- 1) Green fluorescence protein (GFP) とBDNF の融合遺伝子plasmid cDNAを直接細胞核に注入する方法によってBDNFが軸索内を順向性に移動し、さらにシナプス後細胞に移行することを発見し、すでに報告した。しかし、このBDNFはGFPと結合した人工的な蛋白質であるため、内因性のBDNFが同じ動態を示すかは不明であった。この内因性BDNFの移行の有無を検証するためBDNFノックアウトマウスと全ての体細胞にGFPを発現するGFPマウスから調製した大脳皮質細胞の共培養標本を作製した。この標本では、緑色蛍光を発するGFPマウスからの細胞は内因性BDNFを持っているが、無色の細胞はノックアウトマウス由来でBDNFを発現できない細胞である。したがって、この無色の細胞にBDNFを検出したとすると、それはGFP細胞から移行したものである。この論理に基づいて解析したところ、内因性BDNFはGFP-BDNFと同じようにシナプス後細胞に移行することを見出した。この結果は下記2の結果とともにJ. Neuroscienceに受理され現在印刷中である。
- 2) シナプス後細胞に移行した内因性BDNFがどのような作用を示すかを調べるためシナプス後細胞の樹状突起を定量的に解析した。また、BDNFの作用が抑制性細胞と興奮性細胞で異なるかを見るため、抑制性伝達物質GABAの合成酵素 glutamic acid decarboxylase (GAD)65の抗体を使用し免疫組織化学的にそれぞれの細胞を同定した。その結果、シナプス前から移行した内因性BDNFはGAD65陽性細胞（抑制性細胞）の樹状突起の分枝と伸張を促進するが、GAD65陰性細胞（興奮性細胞）にはそのような作用を示さないことを見出した。この結果は、興奮性細胞はBDNF mRNAを発現し自らBDNFを合成できるが、抑制性細胞は自ら合成できないので、その発達は他の細胞からのBDNFに依存していることを示唆している。さらに、BDNFの細胞間移行は神経活動に依存するので、この結果から、従来報告されてきた抑制性細胞の発達の神経活動依存性はBDNF細胞間移行の活動依存性に一因があることが明らかとなった。
- 3) BDNF の抑制性シナプス伝達に対する慢性作用を明らかにするためBDNF長期投与の効果を実験ラット大脳皮質から調製した孤立神経細胞培養標本を用いて調べた。孤立神経細胞培養標本では、1種類の神経細胞しかないため、灌流液より投与したBDNFの抑制性

細胞に対する作用を興奮性細胞に対する作用の混入なしで調べることができる。このような標本においてBDNFを慢性投与したところ、誘発性Inhibitory Postsynaptic Currents (IPSCs)の振幅の増大がみられた。また、2連発刺激に対する反応の比には有意な変化は見られなかった。一方、自発的に発生するminiature IPSCsは頻度の増加がみられたが振幅の増大はみられなかった。さらに、突起発達の形態学的解析を行ったところ樹状突起数とシナプス数の増加が認められた。これらの結果からBDNFは抑制性細胞の機能的、形態的発達を促進することが明らかとなった(論文投稿中)。

4) 上記1で報告したようにGFP-BDNFが神経細胞の軸索や樹状突起の中を移動する様子を可視化できるようになり、細胞間の移行が神経活動に依存していることが明らかとなった。しかし、神経突起内の移動が神経活動と関係しているのかどうかは不明であった。この点を明らかにするため、上記1と同じ方法で培養皮質神経細胞にGFP-BDNFを発現させその突起内の動きを解析した。次に、細胞を興奮させるため、グルタミン酸を投与したところGFP-BDNFの動きが、多くの場合、停止することが観察された。さらにこの作用はtetrodotoxinで活動電位発生をブロックしたり、イオン透過型グルタミン酸受容体阻害薬の投与によって興奮性シナプス伝達を阻止するとみられなくなった。これらの結果は、BDNFの細胞内移動は神経活動により制御されていることを示唆している(投稿準備中)。

#### B. スライス標本を使った実験

5) 昨年度は、マウス大脳皮質のひげの領域であるbarrel cortexとその入力源である視床をともに含んだスライス標本において、視床-皮質シナプスの中で、NMDA受容体のみシナプス(所謂silent synapse)が新生仔期に約47%の細胞で存在するが、生後8-11日にはほとんど消失することを見出した。今年度は、BDNFノックアウトマウスでは生後8-11日でもsilent synapseが約50%の細胞に残っているが、BDNFを投与するとそのようなシナプスが減少することを発見した。この結果は、silent synapseが発達に伴ってAMPA受容体の共存するactive synapseに変わる過程にBDNFが関与している可能性を示している(論文投稿中)。

6) 上記5では視床-皮質シナプスのシナプス後受容体機能の発達を解析したが、シナプス前部の機能発達は未解明であった。そこで、上記と同じスライス標本を作製し、生理学的方法により視床-皮質シナプスにおける伝達物質放出確率(Pr)の生後発達を調べた。その結果、可塑性の高い時期の視床-皮質シナプスにはその後には見られない高いPrのシナプスが存在すること、及び視床-皮質シナプスではactive synapseよりsilent synapseの方が高いPrを持つことが示された。このことから、視床-皮質シナプスの可塑性とそのPrに関係のあることが示唆された(論文改訂中)。

#### C. *in vivo*標本を使った動物実験

7) 視覚野のスライス標本では、1 Hz、15分間の低頻度連続刺激によってシナプス長期抑圧を起こすことができる。本実験では、*in vivo*で、同じ条件の刺激が長期抑圧を起こせるかどうかを調べた。そのため、麻酔した幼若ラットで、大脳視覚野II/III層

からフィールド電位を記録し、求心路にある外側膝状核、白質及び皮質IV層に1 Hz、15分の低頻度連続刺激を与えた。ところが、いずれの部位の刺激でも長期抑圧は惹起されなかった。次に、スライス標本におけるBDNF受容体, TrkB, の蛋白質量及びリン酸化活性を調べたところスライス作製後60分で既に有意に低下し、その後時間とともにさらに低下することが判明した。この結果は、スライス標本ではBDNF-TrkBのシステムが時間とともに活性を失うため、シナプス長期抑圧が生じることを示唆している。また、*in vivo* 標本で視覚野にTrkBの機能阻止抗体を注入したところ、低頻度連続刺激によって長期抑圧が惹起されるようになった。この結果は、*in vivo*では内因性BDNFが低頻度連続入力によるシナプス抑圧の発生を阻止していることを示している (J. Neurosci. 23, 3761-3770, 2003に発表)。

8) 一昨年度は、片眼遮閉によるコラムの縮小をBDNFが阻止できるかどうか、及びその作用は臨界期に限られるかどうかを調べた。その結果、BDNFはコラムを拡大する作用があること及びそのような作用は成熟ネコでは見られないことを見出した。昨年从今年にかけては、BDNFの軸索形態に対する効果を直接検証する目的で、仔ネコの視覚野にBDNFを持続的に投与すると同時に、外側膝状核に順向性トレーサーを注入し、入力線維を可視化した。BDNF投与領域内にある可視化された単一軸索の形態を3次元的に再構成した結果、BDNF投与領域の軸索は、対照に比べて分岐点数が少なく、軸索密度が低い傾向にあった。これらのことから、BDNF投与による眼優位コラムの拡大は、非特異的な軸索伸長の促進によるものではなく、入力線維軸索が皮質内で特定の領域に局在せず広い領域に散在するようになったためであると考えられた (2002年の北米神経科学学会で発表)。

9) 昨年度は、脳内におけるBDNF蛋白質量を計測し、その発達や入力遮断にともなう変化を解析した。今年度は従来あまり注目されてこなかったNeurotrophin-4 (NT-4) に着目しその計測を行った。その結果、NT-4は脳幹の一部の核には比較的多いが大脳皮質ではその量はBDNFの1/10以下であることが判明した。NT-4は、BDNFと受容体を共有するためその生理作用が注目されていたが、その量の少なさから考えて大脳皮質ではBDNFほど重要な作用を持たないことが推測された (J. Neurochemistryに受理され印刷中)。

### 3. 研究実施体制

#### (1) 津本グループ

- ① 研究分担グループ長： 津本忠治 (大阪大学大学院医学系研究科、教授)
- ② 研究項目： ラット及びマウスの*in vivo*標本、スライス標本、培養神経細胞標本を使用した電気生理学的、形態学的実験

#### (2) 畠グループ

- ① 研究分担グループ長： 畠義郎 (鳥取大学大学院医学系研究科、教授)
- ② 研究項目： 大脳視覚野におけるコラム形成メカニズムの解明実験

(3) Henschグループ

- ① 研究分担グループ長： Takao Hensch (理化学研究所脳科学総合研究センター、グループディレクター)
- ② 研究項目：トランスジェニックマウスを使った視覚野可塑性解明実験

(4) 仙波グループ

- ① 研究分担グループ長： 仙波りつ子 (愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所、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栄養因子タンパク質量の測定

(5) 鳥光グループ

- ① 研究分担グループ長： 鳥光慶一 (NTT基礎研究所、グループリーダー)
- ② 研究項目：電極基盤上における神経細胞培養標本の作製

4. 主な研究成果の発表 (論文発表および特許出願)

(1) 論文発表

- Ohshima, M., Hata, Y., Ichisaka, S., Wakita, M., Fukuda, M., Kameyama, K. and Tsumoto, T. (2002) Chronic, electrical stimulation of afferents from one eye changes ocular dominance of visual cortical neurones in kittens. *J. Neurophysiol.*, 88, 2147-2151.
- Yasuda, H., Higashi, H., Kudo, Y., Inoue, T., Hata, Y., Mikoshiba, K. and Tsumoto, T. (2003) Imaging of calcineurin activated by long-term depression-inducing synaptic inputs in living neurons of rat visual cortex. *Eur. J. Neurosci.*, 17, 287-297.3)
- Akaneya, Y., Altinbaev, R. S., Bayazitov, L.T., Kinoshita, S., Voronin, L.L. and Tsumoto, T. (2003) Low-frequency depression of synaptic responses recorded from rat visual cortex. *Neuroscience*, 117, 305-320.
- Ichisaka, S., Katoh-Semba, R., Hata, Y., Ohshima, M., Kameyama, K. and Tsumoto, T. (2003) Activity-dependent changes in the protein level of brain-derived neurotrophic factor but no change in other neurotrophins in the visual cortex of young and adult ferrets. *Neuroscience*, 117, 361-371.
- Fagiolini, M., Katagiri, H., Miyamoto, H., Mori, H., Grant, S.G.N., Mishina, M. and Hensch, T.K. (2003) Separable features of visual cortical plasticity revealed by *N*-methyl-D-aspartate receptor 2A signaling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 2854-2859.
- Kasai, N., Jimbo Y. and Torimitsu, K. (2002) Electrochemical monitoring of glutamate release at multiple positions in a rat hippocampal slice. *Analytical Science*, 18, 1325-1327.
- Nakanishi, T., Okamoto, H., Nagai, Y., Takeda, K., Obataya, I., Mihara, H.,

- Azehara, H., Mizutani, W., Furukawa, K. and Torimitsu, K. (2002) Synthesis and atomic force microscopy observations of the single peptide nanotubes and their micro-order assemblies, *Phys. Rev. B*, 66, 165417-1-8.
- Jimbo, Y., Kasai, N., Torimitsu, K., Tateno, T. and Robinson, H.P.C. (2003) MEA-based multi-site stimulation system, *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, 50, 241-248.
- Katoh-Semba, R., Asano, T., Ueda, H., Morishita, R., Takeuchi, I.K., Inaguma, Y. and Kato, K. (2002) Riluzole enhances expression of a brain-derived neurotrophic factor with consequent proliferation of granule precursors in the rat hippocampus. *FASEB J.* 16, 1328-1330.
- Egan, M.F., Kojima, M., Callicott, J.H., Goldberg, T.E., Kolachana, B.S., Bertolino, A., Zaitsev, E., Gold, B., Goldman, D., Dean, M., Lu, B. and Weinberger, D.R. (2003) The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell*, 112, 257-269.
- Kojima, M., Klein, R.L. and Hatanaka, H. (2002) Pre and postsynaptic modification by neurotrophins. *Neurosci. Res.*, 43, 193-199.
- Suzuki, S., Mizutani, M., Suzuki, K., Yamada, M., Kojima, M., Hatanaka, H. and Koizumi, S. (2002) Brain-derived neurotrophic factor promotes interaction of the Nck2 adaptor protein with the TrkB tyrosine kinase receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 294, 1087-1092.

(2) 特許出願

平成14年度出願件数： なし (研究期間累積件数： 1件)