

「脳の機能発達と学習メカニズムの解明」

平成 16 年度採択研究代表者

鍋倉 淳一

(自然科学研究機構生理学研究所 教授)

「発達期および障害回復期における神経回路の再編成機構」

## 1. 研究実施の概要

脳発達の最終段階において、神経回路の広汎な再編成が観察される。この現象は主に遺伝子に組み込まれた情報にガイドされて形成された未熟回路の再構築によって、学習や記憶などの高次脳機能を含めた脳機能を発現できる成熟回路を形成する過程と考えられる。この過程は既に脳として機能している回路の変化であるため、しばしば行動やリズムなどの個体としての脳機能の変化として表現される。この発達脳では、広汎に活性化される機能回路がまず形成され、その後、より細かな機能回路単位の絞込みが行われ、成熟した回路が完成する。これら多くの変化は、内外環境による神経回路活動に依存性のプロセスであり、高次脳機能においてはしばしば臨界期が存在する。さらに、成熟した脳の障害後の回復期に、障害および関連領域において活動領域および回路の再編成が観察される。また、動物モデルにおいて、種々の障害後早期に、多くの未熟期に特有な回路特性が再現することが明らかになってきている。このことから再生回路の再編成においても、発達期と同様のプロセスが再現されることが示唆される。そのため、発達期における回路再編成の抽出と制御機構を検討することは、内外環境に依存した脳機能発達のメカニズムの理解ばかりでなく、成熟した脳におこる障害後の回路再編成と比較することにより、機能回復を目的とした回路再構築に向けた方策にも大きな助言を与えることが可能となる。本研究によって、サルおよびヒトにおける脳虚血障害後の機能および活動領域の変化を観察し、障害後の機能回復と活動領域の変化の時期が密接に関連していることが明らかになってきた。更に、機能回復期におけるリハビリの有効性が脳イメージングにより明らかになりつつある。また、リハビリ有効性に対しその開始時期に臨界期が存在することがサルの研究から示唆される。これらの脳機能回復の回路基盤を捉えるため、生体での脳内回路の 2 光子励起法を用いた可視化技術の開発を行ない、脳障害モデルマウスの回復期における脳内回路の変化を捉えつつある。

また、神経回路の再編成の理解のため、発達・障害時の機能回路変化の主要基盤である GABA 機能とシナプス除去の制御メカニズムについて新たな見地が得られつつある。

## 2. 研究実施内容

本研究は、障害回復期に一旦形成された機能回路に起こる再編成の理解のため、1) 成熟した脳の障害後、機能回復に伴う大脳皮質活動領域の変化について、ヒトおよび障害モデル動物における非侵襲的計測法による観察と合わせて、背景にある活動回路の再編成の回路基盤を理解する。2) この回路再編の理解のために、発達期および再生期におこる活動神経回路再編成の基本原理の解明を進めることを目的とする。

ヒトの虚血脳梗塞後の活動領域の再編成を fMRI および近赤外線トポグラフィーを用いて検討した結果、運動領域の障害回復期早期は対

側および同側の広い関連領域の活動が観察され、回復後期には活動が主に正常領域に集約し、活動再編成が障害後数カ月で観察された。サル大脳皮質虚血/梗塞モデルではアップルテストによる pick-up 時間を指標とした運動機能回復過程および PET を用いたベンゾジアゼピン結合評価を用いた障害領域の変化を検討した結果、運動リハビリ群では対照群に対し活動領域の改善が観察された。さらに、リハビリ開始時期を遅延させると機能回復の程度が低下し、障害後 14 日目からの開始では、リハビリの効果が消失した (図 1)。更に、PET を用いて障害領域を検討した結果、早期リハビリ施行群では、軽度障害領域の減少と正常領域の増加が観察されたのに対し (軽度障害部位の回復)、リハビリ遅延群では、リハビリ施行による著明な変化は観察されなかった。これは、脳障害部位および機能の回復に対するリハビリ開始の臨界期が存在する可能性を示唆する。

また、これらの結果の背景にある機能回路再編を検討するため、昨年度に確立したクリプトンおよび YAG レーザーを用いた大脳皮質虚血・再還流/梗塞モデルマウスの大脳障害部位における回路再編の長期観察法の確立として、多光子顕微鏡観察技術の in vivo への応用技術の開発を行った。

図1: 脳虚血後の機能回復(ピックアップ時間)とリハビリ開始時期

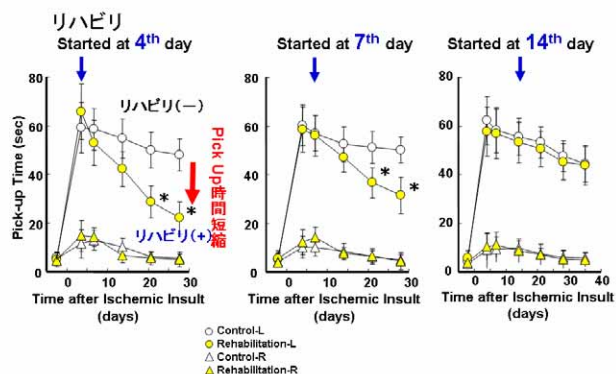


図2: 多光子励起顕微鏡による大脳皮質錐体細胞のin vivo イメージング

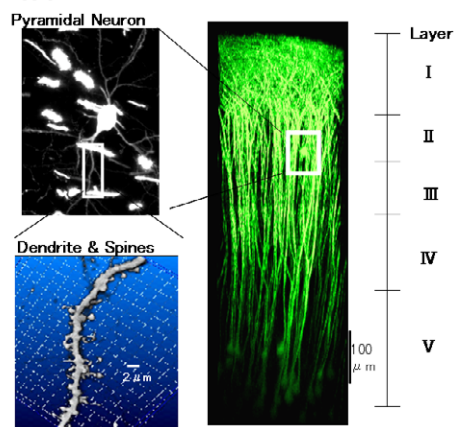
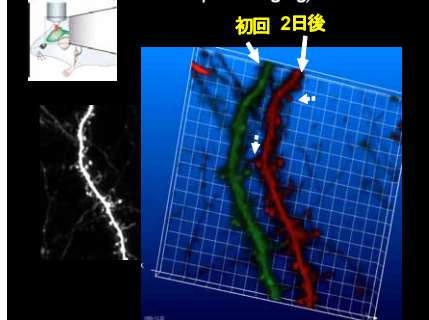


図3: 同一マウス、同じ細胞・突起の繰り返し観察 (Time lapse Imaging)

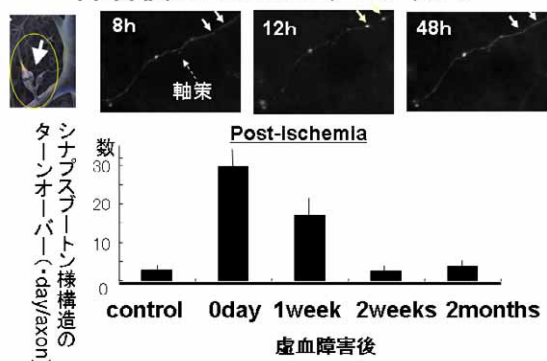


まず、観察技術の今年度の目標として、1) 深部微細構造の生体における安定したイメージング技術の確立、2) 同一動物脳内における同一微細構造の長期繰り返し観察技術の開発、を設定した。動物への特殊アダプターの開発、およびレーザー光学経路操作により、現在大脳皮質表面から約1 mmまでの微細構造をサブミクロンの解像度で観察することが可能となった(図2)。また、同一動物における同一微細構造を長期間繰り返し捉える技術を確立し、現在、2ヶ月に亘る同一微細構造の長期イメージングを確立した(図3)。この観察技術を上記手法で作成した脳梗塞モデル動物に適用し、脳内微細構造、特にシナプス前構造であるシナプスブートン構造、シナプス後構造である棘突起(スパイン)の長期変化を同一個体で観察している。現在、予備実験の段階であるが、脳障害後には、正常では非常に安定しているシナプスブートン様構造の形成・消失ター

ンオーバーが著しく更新する。さらにこのターンオーバーの亢進はマウスでは障害後1週間まで持続し、その後急速に低下することが判明した(図4)。スパインの変化の時間経過の比較を行うとともに、リハビリや神経活動による神経回路レベルの回復変化の制御について検討を加えることも考慮したい。

また、虚血・再還流時の障害因子である酸化ストレスによって、細胞内 $Cl^-$ くみ出し主要分子であるKCC2が障害1時間以内に脱リン酸化・内在化が起こり、その後数時間で蛋白自体の消失によって、障害細胞ではGABAは過分極から脱分極作用へスイッチすることが判明した。このGABA作用の変化が障害後の活動領域の拡大の原因の一つである可能性について今後検討を加える予定である。また、脱分極GABAが特徴的な幼若期においてGABAが大脳皮質細胞の移動を制御しており、幼若期において皮質損傷によってKCC2発現低下、NKCC1発現上昇により $[Cl^-]_i$ 上昇が起こり、その結果、異常な細胞移動が起こりmicrogyrusと呼ばれる皮質形成異常が形成されることを明らかにした。これは $Cl^-$ ホメオスタシスの未熟型への回帰と考えられたが、本来の移動終了完了前までが臨界期と考えられた。未熟脳に高発現し発達減少するNeuronal  $Ca^{2+}$  sensor 1分子が障害細胞では再発現するなど、障害後には未熟期神経細胞特性が再現することが判明した。また、回路レベルにおける特徴的再編である過剰シナプスの除去にはP/Q型 $Ca^{2+}$ チャネルやGABA伝達に関係している可能性が各々の遺伝子改変動物の小脳登上線維をモデルに明らかになりつつある。

図4: 障害後のBouton リモデリング



### 3. 研究実施体制

#### (1)「神経回路再編機構研究」グループ

##### ①研究者名

鍋倉 淳一(生理学研究所 教授)

##### ②研究項目

- ・ 障害モデル動物作成と発達期における回路再編成機構
- ・ 多光子顕微鏡を用いた同一個体脳内回路の回復期における長期観察
- ・ GABA 機能の発達および障害における可塑的变化と分子基盤の検討

#### (2)「ヒト脳機能回復計測」グループ

##### ①研究者名

加藤 宏之(国際医療福祉大学 教授)

##### ②研究項目

- ・ 脳血管障害患者の脳機能回復過程に関する光トポグラフィ・fMRI を用いた検討

#### (3)「サル脳活動回復測定」グループ

##### ①研究者名

塚田 秀夫(浜松ホトニクス(株)中央研究所 PET センター長)

##### ②研究項目

- ・ 障害モデル動物における活動領域の変化と再臨界期:活動領域の変化について、動物用 PET を用いた検討

#### (4)「細胞内クロール調節機構解析」グループ

##### ①研究者名

福田 敦夫(浜松医科大学 教授)

##### ②研究項目

- ・ 神経回路の発達・再編と再臨界期への Cl<sup>-</sup> transporter の関与の証明

#### (5)「小脳シナプス発達機構研究」グループ

##### ①研究者名

橋本 浩一(大阪大学 助手)

##### ②研究項目

- ・ 発達期・再生期の小脳における神経回路の機能的再編成の基本原理の解明

#### 4. 研究成果の発表等

##### (1) 論文発表(原著論文)

###### <鍋倉グループ>

- Nakamura T, Jeromin A, Smith G, Kurushima H, Koga H, Nakapeppu Y, Wakabayashi S, Nabekura J: Novel role of neuronal Ca<sup>2+</sup> sensor-1 as a survival factor up-regulated in injured neurons. *Journal of Cell Biology*, 172:1081-1091, 2006.
- Matsumoto N, Noda E, Nabekura J: Run down of GABAergic depolarization during metabolic inhibition of rat hippocampal CA1 neurons. *Life Science*, 79:1021-1026, 2006.
- Kanematsu T, Yasunaga A, Mizoguchi Y, Kuratani A, Kittler JT, Jovanovic JN, Takenaka K, Nakayama KI, Fukami K, Takenawa T, Moss SJ, Nabekura J, Hirata M: Modulation of GABAA Receptor Phosphorylation and Membrane Trafficking by Phospholipase C-related Inactive Protein/Protein Phosphatase 1 and 2A Signaling Complex Underlying Brain-derived Neurotrophic Factor-dependent Regulation of GABAergic Inhibition. *Journal of Biological Chemistry*; 281:22180-22189, 2006.
- Mizoguchi T, Kitamura A, Wake, H, Ishibashi H, Watanabe M, Nishimaki T, Nabekura J: BDNF Occludes GABA<sub>B</sub> Receptor-mediated Inhibition of GABA Release in Rat Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons. *European Journal of Neuroscience*, 24:2135-2144, 2006.
- Wake H, Watanabe M, Moorhouse AJ, Kanematsu T, Horibe S, Matsukawa N, Asai K, Ojika K, Hirata M, Nabekura J: Early changes in KCC2 phosphorylation in response to neuronal stress results in functional downregulation. *Journal of Neuroscience*, 27:1642-1650, 2007.
- Mizokami A, Kanematsu T, Ishibashi H, Yamaguchi T, Tanida I, Takenaka K, Nakayama K, Fukami K, Takenawa T, Kominami E, Moss S, Yamamoto T, Nabekura J, Hirata M: Phospholipase C-Related Inactive Protein is involved in Trafficking of gamma2 Subunit Containing GABAA Receptor to Cell Surface. *Journal of Neuroscience*, 27:1692-1701, 2007.
- Kanematsu T, Fujii M, Mizokami A, Kittler JT, Nabekura J, Moss SJ & Hirata M: Phospholipase C-related inactive protein is implicated in the constitutive internalization of GABA<sub>A</sub> receptors mediated by clathrin and AP2 adaptor complex. *J Neurochem* (in press).

###### <加藤グループ>

- 武田湖太郎, 五味幸寛, 今井樹, 下田信明, 加藤宏之: 慢性期脳卒中患者の麻痺手運動時における同側大脳半球の活性化, *脳科学とリハビリテーション* 7: 15-20, 2007.

<塚田グループ>

○Y. Cui, H. Takamatsu, T. Kakiuchi, H. Ohba, Y. Kataoka, C. Yokoyama, H. Onoe, Y. Watanabe, T. Hosoya, M. Suzuki, R. Noyori, H. Tsukada, Y. Watanabe. Neuroprotection by a CNS-type prostacyclin receptor ligand in middle cerebral artery occlusion and reperfusion model of monkeys: A positron emission tomography study. *Stroke* 37: 2830-2836, 2006.

<福田グループ>

- Nakanishi, K., Yamada, J., Takayama, C., Oohira, A., Fukuda, A. : NKCC1 activity modulates formation of functional inhibitory synapses in cultured neocortical neurons. *Synapse*, 61:138-49, 2007.
- Heck N, Kilb W, Reiprich P, Kubota H, Furukawa T, Fukuda A, Luhmann HJ. : GABA-A receptors regulate neocortical neuronal migration *in vitro* and *in vivo*. *Cereb. Cortex*, 17: 138-148, 2007
- Yamamoto S, Yamada J, Ueno S, Kubota H, Furukawa T, Yamamoto S, Fukuda A. : Insertion of  $\alpha 7$  Nicotinic Receptors at Neocortical Layer V GABAergic Synapses Is Induced by a Benzodiazepine, Midazolam. *Cereb. Cortex*, 17: 653-660, 2007.
- Yamada J., Furukawa T., Ueno S., Yamamoto S. and Fukuda A. : Molecular basis for the GABA<sub>A</sub> receptor-mediated tonic inhibition in rat somatosensory cortex. *Cereb. Cortex*, in press.

<橋本グループ>

- Miyazaki T, Hashimoto K, Uda A, Sakagami H, Nakamura Y, Saito SY, Nishi M, Kume H, Tohgo A, Kaneko I, Kondo H, Fukunaga K, Kano M, Watanabe M, Takeshima Disturbance of cerebellar synaptic maturation in mutant mice lacking BSRPs, a novel brain-specific receptor-like protein family. *FEBS Letter* 580: 4057-64, 2006.
- Narushima M, Uchigashima M, Hashimoto K, Watanabe M, Kano M. Depolarization-induced suppression of inhibition mediated by endocannabinoids at synapses from fast-spiking interneurons to medium spiny neurons in the striatum. *European Journal of Neuroscience* 24: 2246-52, 2006.
- Narushima M, Uchigashima M, Fukaya M, Matsui M, Manabe T, Hashimoto K, Watanabe M, Kano M. Tonic enhancement of endocannabinoid-mediated retrograde suppression of inhibition by cholinergic interneuron activity in the striatum. *Journal of Neuroscience* 27: 496-506, 2007.
- Takagishi Y, Hashimoto K, Kayahara T, Watanabe M, Otsuka H, Mizoguchi A, Kano

M, Murata Y. Diminished climbing fiber innervation of Purkinje cells in the cerebellum of myosin Va mutant mice and rats. *Developmental Neurobiology*, in press.

○Kakizawa S, Kishimoto Y, Hashimoto K, Miyazaki T, Furutani K, Shimizu H, Fukaya M, Nishi M, Sakagami H, Ikeda A, Kondo H, Kano M, Watanabe M, Iino M, Takeshima H. Junctophilin-mediated channel crosstalk essential for cerebellar synaptic plasticity. *EMBO Journal*, in press.