

「脳神経回路の形成・動作と制御」研究領域 領域活動・評価報告書
－平成24年度終了研究課題－

研究総括 村上 富士夫

1. 研究領域の概要

本研究領域は、脳の統合的理解を目指し、新たな視点に立って脳を構成する神経回路の形成やその動作原理ならびにその制御機構の 解明に挑戦する研究を対象とします。

具体的には、神経回路や脳の機能単位である神経核・層構造の形成、領域や神経細胞の特異性の獲得、単一神経細胞における情報処理、神経細胞間の情報伝達やその可変性、神経細胞のネットワークとしての機能発現や可変性、さらには複雑なネットワークの集合体である 領域・領野等の形成機構および動作原理、ネットワークの制御機構の研究を対象とします。また、グリア細胞など神経細胞以外の神経系の 細胞の役割や、神経細胞数の維持の機構に関わる研究も含みます。さらに、神経回路形成や動作原理の解明の飛躍的発展につながるような、革新的な基盤技術の創出も対象とします。

2. 事後評価対象の研究課題・研究者名

件数： 10件

※研究課題名、研究者名は別紙一覧表参照

3. 事前評価の選考方針

選考の基本的な考えは下記の通り。

1) 選考は、「脳神経回路の形成・動作と制御」領域に設けた選考委員13名の協力を得て、研究総括が行う。

2) 選考方法は、書類選考、面接選考から得られた選考委員の意見参考に、総合的に判断する。

3) 選考に当たっては、選考方針検討会を開いて検討し、さきがけ共通の選考基準(URL:

<http://www.jst.go.jp/pr/info/info666/shiryou4.html>) の他、以下の点を重視した。

提案が独創性の高いもので有り、提案者自身の着想であることを特に重視し、

また分野・研究環境に関して採択課題に偏りがなく、多様性を持つよう配慮する。

さらに提案者の性別あるいは実施場所の国内外を問わない。

4. 事前評価の選考の経緯

一応募課題につき領域アドバイザー13名が書類審査し、書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。続いて、面接選考および総合選考により、採用候補課題を選定した。上記選考を経た課題の内、大挑戦型審査会(書類選考会議)へ2課題を推薦した。

選 考	書類選考	面接選考	採択数			
			16件	内 訳	3年型	11件(1件)
対象数	208件	33件			5年型	5件(1件)

()内は大挑戦型としての採択数。

備考:

1) 平成 21 年度採択課題のうち、以下は今年度事後評価対象としない。

・今井研究者、川内研究者、田淵研究者、筒井研究者、山口研究者

研究期間が 5 年で、今年度終了しないため。今年度は中間評価を実施する(中間評価結果:

<http://www.jst.go.jp..>)(後日、本部にてリンク先を追記)

・小早川研究者

大挑戦型として採択され、期間延長審査の結果、2年間延長することが決まったため。

2)他の年度採択課題で今年度の事後評価対象となるものは該当なし。

5. 研究実施期間

平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

6. 領域の活動状況

領域会議

領域会議は7回実施した。会議では各研究者の発表時間を越える時間を質疑討論に充てて十分な議論を行い、多様な研究者間の相互刺激とアドバイザーからの助言を期した。また研究成果報告会とも合わせ特別講演として外部より4名の著名な神経研究者、3名のアドバイザーと総括に、研究の進め方を含めて講演していただいた。

研究費の調整にあたっては、進捗と研究環境を把握のうえ柔軟に対応した。

研究総括(または技術参事)の研究実施場所訪問:

全員について総括と技術参事がサイトビジットを実施したほか、必要に応じて総括または技術参事が訪問・面談して研究環境と進捗の把握に努めた。

7. 事後評価の手続き

研究者の研究報告書を基に、評価会(研究報告会、領域会議等)での発表・質疑応答、領域アドバイザーの意見などを参考に、下記の流れで研究総括が評価を行った。

(事後評価の流れ)

平成 24 年 11 月 評価会開催

平成 25 年 3 月 研究総括による事後評価

平成 25 年 6 月 被評価者への結果通知

8. 事後評価項目

- (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
- (2)得られた研究成果の科学技術への貢献
- (3)研究終了時に論文発表に至っていない場合はその見込み

9. 事後評価

当領域は上記の概要にもあるように広大な神経科学分野の多様な研究を採択してきたことを反映して、本中間報告が対象とする 10 名の研究課題も方法論的には生理学的、遺伝学的、生理学的、から神経システム論的アプローチまで、問題設定も神経回路形成から回路解析、神経疾患など多彩な組み合わせとなっている。これらの研究者が領域会議や懇親会で他の領域研究者と議論しながら相互に知識と視野を広め、単独では望めなかった地平をそれぞれが切り開き、また相互に研究協力も発生してきた。ほぼすべての研究者で研究成果がすでに論文発表となっており、そうでない場合でも近く大きい成果が見込まれる。なお期間中に半数の研究者が昇格を果たし、うち2名は医学部教授に就任している。

1. 今吉研究者「成体脳ニューロン新生の機能的意義」

生後脳の神経幹細胞から新生するニューロンがどのように既存の神経回路に組み込まれどのような生理的機能に関わるのかが不明であった。本研究ではマウスの遺伝子改変技術を駆使して脳部位特異的に新生ニューロンに特異的な遺伝子操作を仕組むことにより、その解明にアプローチした。海馬歯状回では出生後すぐに新生ニューロンの機能を阻害すると、多数の行動テスト解析の結果、活動性と衝動性の亢進、作動記憶と注意集中持続の障害など、ADHD(注意欠陥多動性障害)に特徴的な症状が生じることを見出した。さらにダブルストップカセットを組み込んで嗅球新生ニューロンへの特異性を高めたマウス系統では、生後脳・成体脳の両方において、嗅覚関連学習の障害と嗅球神経回路の電気生理学的異常を見出した。新規なトランスジェニックマウスの作成によって得られたこれらの結果は新生ニューロンの既存神経回路への組み込みとその生理的意義の解明に近づいた重要な成果であり高く評価される。今後さらに解析を深めることで発達障害との関係の解明や、海馬と嗅球における神経回路の可塑性の細胞レベルでの仕組みの解明につながるこ

とが期待できる。

2. 小林研究者「中脳神経回路網による価値情報の形成機構の解明」

行動に対する報酬を予測しこれを最適化する強化学習においては中脳ドーパミン細胞が予測誤差を表現するとされているが、その誤差信号の計算メカニズムの実体は不明であった。本研究では眼球運動(サッケード)課題を学習してジュース報酬予測を行なうサルで多数の中脳ニューロンの活動を記録・解析して、予測誤差計算モデルに必要な3種のニューロンが中脳ドーパミン細胞へ興奮性入力を送る脚橋被蓋核に実際に存在することを示したこと、さらに注意深い解析により、課題文脈依存性および感覚情報取り込みを円滑にするサッケード抑制と関係するニューロンを発見したことが特に評価される。また背側縫線核が関与する嫌悪・時間割引なども包摂した報酬・嫌悪の強化学習モデルを共同研究により提唱し、実証研究を進めた。一方提案にはなかった研究ではあるが、サッケードの反応時間、注視中の固視微動には、運動の実行、経験に基づく適切な随意運動発現に必要な運動準備状態に関わる情報が含まれてことを発見した。今後はサルを用いた強化学習の神経生理学研究とヒトでの心理物理実験とが統合的に発展し、生物の行動の基本原理の解明につながることを期待される。

3. 惣谷研究者「抑制系による大脳皮質神経回路網の動作制御機構の解明ー機能イメージングと光刺激法の併用による解析ー」

大脳皮質神経回路において *in vivo* 二光子励起 Ca イメージングを用い多数の抑制性 GABA ニューロンの活動を時空間的に同時記録し解析することにより、GABA ニューロンの空間分布と特徴選択的情報処理や可塑性などにおける機能の解明を目指してきた。視覚野 2/3 層のニューロンの左右眼への反応応答比(眼優位性)に着目して、興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの眼優位特性を定量的に解析したところ、興奮性ニューロンに比べ抑制性ニューロンの方がより強い両眼反応性を有することを見出した。さらに眼優位性の可塑性に着目して片眼遮蔽後の眼優位性の変化を幼弱動物と成熟動物で比較し、興奮性ニューロンに比して抑制性ニューロンの方が長期に亘って可塑性を維持することを見出した。これまでの電気生理学的方法では区別できなかった興奮性ニューロンと抑制性ニューロンを区別することにより明らかになったこれらの成果は高く評価できる。さらにニューロンの空間分布の解析や抑制性ニューロンの活動を光制御できるマウスの作出と解析も進めており、今後それらの成果が期待されると同時に、測定法の技術的改良と相俟って抑制性回路の実体と機能がさらに明確になる可能性が考えられる。近い将来本研究者の独創性がより明確になる単独第一著者の論文の出版が期待される。

4. 千原研究者「脳神経地図の形成と認識を司る分子基盤解明」

神経回路を構成するシナプスの形成場はその神経組織の細胞群の遺伝子発現による規定を受ける。個々の神経細胞レベルでの遺伝子操作が容易なショウジョウバエの一次嗅覚中枢(触角葉)に着目して、先に見出した神経投射異常に関わる2個の分子 *Meigo* と *Dogi* の解析を行った。*meigo* 変異の原因遺伝子は、小胞体に存在する糖核酸トランスポーター様分子であるため、*Meigo* は、小胞体において神経突起ターゲティングに必要な膜分子の修飾に影響し、その結果として神経突起ターゲティング制御に関わっているとの仮説のもとに、*meigo* 変異と遺伝学的に相互作用する細胞膜表面分子として軸索ガイダンス因子のひとつである *Ephrin* を見出した。一方 *Dogi* についてはその結合相手が軸索輸送に関わる *Glued* であることを発見して、実際にモデル細胞で *Dogi* のノックダウンによる初期エンドソーム輸送の異常を観察することに成功した。これらは、正確な神経投射には初期エンドソームの輸送・成熟が必要であることを明らかにした最初の結果であり、高く評価される。また、世界的にも高く評価され、論文が受理された。今後これらの分子機構の解明が進むとともに、特異的シナプス形成との関連についても進展が期待される。

5. 橋本研究者「小脳のシナプス刈り込みと機能的神経回路形成の機構解明」

中枢神経系の回路形成においてはターゲット細胞に対して一旦過剰なシナプスが形成され、成熟にしたがって特定の入力を選択強化されること(刈り込み)が知られているが、その分子機構についてはよく分かっていない。本研究では、マウス小脳の登上線維-プルキンエ細胞間のシナプスで電位依存性カルシウムチャンネルに着目し、電気生理学的方法によって入力の数を変えて、カルシウムチャンネルサブユニット欠損系統と野生型を比較しながら生後発達を解析することにより、このチャンネルが入力の選択的強化とシナプス除去に必須であることを見出した。さらに、プルキンエ細胞特異的にこのカルシウムチャンネルを欠損させたマウス系統を作出して同様の症状を観察し、シナプス後部に発現するチャンネルがこの刈り込みに重要であることを証明した。発達に伴う神経回路再編成の分子機構の一端を精度の高い実験によって明らかにした優

れた研究である。今後細胞内カルシウム上昇の下流の分子機構の解析も進展し、また他の細胞が関わる刈り込みのメカニズムにも解析が展開することが期待される。

6. 足田研究者「運動・精神機能を司る大脳基底核神経回路の制御機構」

大脳基底核は運動制御のみならず欲動・認知などの高次機能を司り、その神経回路は古くより薬理学的に直接路と間接路からなることが知られていたが、各経路を区別して操作することはできなかった。本研究ではサブスタンス P プロモーターとエンケファリンプロモーターを巧みに用いてそれぞれ直接路あるいは間接路特異的に、かつドキシサイクリンにより可逆的に、シナプス伝達を阻止できるマウス系統を作出し、回轉運動症状などによりそれぞれの経路の特異的遮断を確認した。さらにこれらのマウスを用いた実験解析により、覚せい剤の慢性投与による依存形成に直接路が重要であり、また報酬学習には直接路が、忌避学習には間接路の神経伝達が必須であり、間接路が報酬行動の柔軟性に関与することを明らかにした。一方、両経路が収斂する黒質網様部の分子の変化を解析して、コカイン投与では直接路依存的に ephrinA5 の下流シグナルが増強することをつきとめた。これらはハンチントン病、薬物依存症などの疾患の本態に重要な手掛かりを与える大きな成果であり、論文発表にもつながった。今後巧みな工夫により、より広い意味での2つの回路の機能的役割の解明や、基底核が関与する他の神経疾患の病態との関係の解明につながることが期待できる。

7. 松田研究者「成体網膜におけるニューロン新生・新規回路形成の可視化と制御」

哺乳類の網膜は再生能力・修復能力がないと考えられてきたが、本研究では薬物投与や遺伝子導入によって成体網膜のミューラー細胞に増殖能を賦活させ、網膜再生技術に突破口を拓こうとするものである。まず薬物による損傷網膜のミューラー細胞では分裂には至らずとも PCNA などの増殖細胞特異的のマーカが発現することを見出し、薬物と増殖因子により網膜内でのミューラー細胞の限定的な増殖に成功した。さらにこのような変化を蛍光リポーターを利用して効率よく検出し解析するためのトランスジェニック系統を作出して検証し、他方で導入する遺伝子のライブラリー(150 ベクター)を構築して、in vivo スクリーニングによりそのなかの5つの因子にミューラー細胞増殖誘導促進活性を見出し、またミューラー細胞産生誘導因子を多数発見した。さきがけ研究開始時に着手したテーマでもあり、これまでマウス作出・ライブラリー構築やスクリーニングに膨大な労力を投入してきた。その努力と周到な準備によって非常に興味深い局面が開けたことが高く評価される。高い目標を設定したため、論文発表までにはまだ時間を要すると思われるが、今後の研究の進展により網膜の再生医療技術という目標達成は実現可能であるものと思われる。

8. 宮本研究者「脳回路網の再編成における睡眠の役割」

本課題は大脳皮質視覚系の可塑性における睡眠の役割の解明を目指したものである。マウス視覚野のマルチニューロン活動の慢性記録を解析して、睡眠中にはむしろ単シナプス性の神経細胞の結合強度が上昇していること、さらにこの現象には、抑制性神経伝達が減弱したトランスジェニックマウスの解析と薬理学的実験から、抑制性神経伝達が重要であることを明らかにした。一方、トリプトファン側鎖オキシダーゼ投与により脳内セロトニンを枯渇させると、サーカディアンリズムの主時計とされる視交叉上核(SCN)のリズムは残したまま、睡眠や行動量のサーカディアンリズムが可逆的に崩壊することを見出したことから、これを神経生理学的、薬理学的に解析して、前脳基底部・視索前野が SCN の生み出すリズム信号と睡眠・覚醒機能を統合し、睡眠・覚醒のサーカディアンリズムを作り出すことを示す証拠を得た。これらは何れも興味深い結果ではあるが、今後は当初の目標であった睡眠と視覚経験依存的な神経回路の再編成の解析が進むことが期待される。

9. 山中研究者「本能機能を司る視床下部神経回路操作と行動制御」

摂食・睡眠・性行動などの本能行動は個体レベルで見られる現象であり、その神経回路はスライス標本等の摘出標本では解明しきれない。視床下部には多様な神経ペプチドが特定の神経核に発現することに着目して、本課題ではオレキシン神経細胞特異的に光活性化タンパク質を発現するマウス系統を作出し、実際に自由行動下のマウス脳内に導入した光ファイバーにより両側性に光刺激をすると、ハロロドプシンマウスでは急性的可逆的にノンレム睡眠が誘導されること、逆にチャネルロドプシン2マウスでは睡眠状態のマウスを覚醒させることを明らかにした。こうして技術開発に成功する同時に GABA 系睡眠中枢とモノアミン系覚醒中枢を取り持つオレキシン神経が睡眠覚醒神経回路を制御していることを生理学的に立証したことは高く評価される。これらの成果は当初の提案課題を十分に達成したものであり、今後ここで実証した方法論を他の神経回路にも工夫・改良・適用することにより、さらなる発展が期待できる。

10. 和田研究者「機械刺激受容体と神経軸索組織の構築基盤」

一生成長が持続する魚類では神経回路の構築が繰り返されるため再生能力の仕組みの解析に適していることに着目し、遺伝子の機能操作実験にも適したゼブラフィッシュを用いて側線神経感覚器官(感丘)の増加と器官サイズ決定の仕組みを解析した。感丘の増加は細胞の移動と増殖によること、これに Wnt シグナルが関わっており、分化した感覚細胞が Wnt 阻害因子 dkk2 を分泌して周囲の細胞増殖を抑制する負のフィードバックにより、器官サイズが調節されまた支持細胞を介して器官の形態が正常に保たれることを見出した。さらに神経軸索が Wnt シグナルを介して感丘の細胞増殖を制御することを示した。これらの成果は感覚器のサイズの決定という形態形成における基本的な課題の理解に大きな前進をもたらし、国際的な総説も著わした。本研究では、魚類の感丘をモデルシステムとしてサイズ決定という形態制御に関わる細胞・分子機構の解明を行ったが、ここで明らかになった機構は脳のサイズの決定などにも当てはまる可能性があり、今後その普遍性が明らかになることが期待される。

10. 評価者

研究総括 村上 富士夫 大阪大学大学院生命科学研究科・教授

領域アドバイザー(五十音順。所属、役職は平成 25 年 3 月末現在)

上村 匡	京都大学 大学院生命科学研究科・教授
岡本 仁	(独)理化学研究所 脳科学総合研究センター・副センター長
貝淵 弘三	名古屋大学 大学院医学系研究科・教授
影山 龍一郎	京都大学 ウイルス研究所・教授
狩野 方伸	東京大学 大学院医学系研究科・教授
川口 泰雄	自然科学研究機構 構生理学研究所・教授
小坂 俊夫	九州大学 大学院医学研究院・教授
立花 政夫	東京大学 大学院人文社会系研究科・教授
能瀬 聡直	東京大学 大学院新領域創成科学研究科・複雑理工学専攻・教授
平田 たつみ	情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所・准教授
藤田 一郎	大阪大学 大学院生命機能研究科・教授
虫明 元	東北大学 大学院医学系研究科・教授
柚崎 通介	慶應義塾大学 医学部・生理学・教授

(参考)

件数はいずれも、平成25年3月末現在。

(1)外部発表件数

	国 内	国 際	計
論 文	4	43	47
口 頭	56	26	82
その他	19	0	19
合 計	79	69	148

(2)特許出願件数

国 内	国 際	計
1	1	2

(3)受賞等

- ・小林 康
日本神経回路学会 論文賞(H22..9.3)
- ・疋田 貴俊
包括脳ネットワーク 若手優秀発表賞(H22..7.10)

日本神経科学学会 奨励賞(H23.9.15)

日本生物学的神経医学会 若手研究者育成プログラム奨励賞(H24.9.27)

(4)招待講演

国際 11 件

国内 12 件

別紙

「脳神経回路の形成・動作と制御」領域 事後評価実施 研究課題名および研究者氏名

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職(平成25年3月末現在) (応募時所属)	研究費 (百万円)
今吉 格 (専任、兼任)	成体脳ニューロン新生の機能的意義 (京都大学)	京都大学 准教授 (JST CREST 研究員)	45
小林 康 (兼任)	中脳神経回路網による価値情報の形成 機構の解明 (大阪大学)	大阪大学 准教授 (同上)	39
惣谷 和広 (兼任)	抑制系による大脳皮質神経回路網の動作 制御機構の解明－機能イメージングと 光刺激法の併用による解析－ (理化学研究所)	理化学研究所 研究員 (同上)	40
千原 崇裕 (兼任)	脳神経地図の形成と認識を司る分子基 盤解明 (東京大学)	東京大学 講師 (東京大学 助教)	41
橋本 浩一 (兼任)	小脳のシナプス刈り込みと機能的神経回 路形成の機構解明 (東京大学、広島大学)	広島大学 教授 (東京大学 准教授)	39
疋田 貴俊 (兼任)	運動・精神機能を司る大脳基底核神経 回路の制御機構 (大阪バイオサイエンス研究所、 京都大学)	京都大学 准教授 (大阪バイオサイエンス研究所、 研究員)	37
松田 孝彦 (専任)	成体網膜におけるニューロン新生・新規 回路形成の可視化と制御 (京都大学)	JST さきがけ研究者 (同上)	38
宮本 浩行 (兼任、専任)	脳回路網の再編成における睡眠の役割 (理化学研究所)	JST さきがけ研究者 (理化学研究所 研究員)	33
山中 章弘 (兼任)	本能機能を司る視床下部神経回路操作 と行動制御 (自然科学研究機構、名古屋大学)	名古屋大学 教授 (自然科学研究機構 准教授)	42
和田 浩則 (専任)	機械刺激受容体と神経軸索組織の構築 基盤 (国立遺伝学研究所)	JST さきがけ研究者 (同上)	40

研究報告書

「成体脳ニューロン新生の機能的意義」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研究者: 今吉 格

1. 研究のねらい

従来、ニューロンの産生は発生期においてしか行われないと考えられていたが、ヒトを含めた哺乳類の生後脳・成体脳においても神経幹細胞が存在し、側脳室周囲の脳室下帯や海馬・歯状回といった特定の領域では、ニューロンの新生が一生継続している事が解ってきた。生後脳において新たに産出される多くの新生ニューロンは既存の神経回路に組み込まれるが、このようなニューロン新生が個体にとってどのような生理的意義を持っているのかはほとんど明らかになっていない。本研究プロジェクトでは、遺伝子改変マウス技術を駆使して新生ニューロンを特異的に遺伝子操作し、生後脳・成体脳ニューロン新生が、脳神経回路の形成・修飾や維持に果たす役割を解明する事を目標としている。

2. 研究成果

(1) 概要

本プロジェクト研究において、生後脳の海馬と嗅球における、ニューロン新生の機能的意義の一端が明らかになった。海馬の生後ニューロン新生の破綻が精神疾患や発達障害の病態に関与している可能性がある事や、嗅球の生後ニューロン新生が嗅覚神経回路可塑性に積極的に関与している事が明らかになった。今後は、ニューロン新生の発達障害や神経回路可塑性との関与について、神経回路レベルでのより詳細な理解に繋がたいと考えている。

(2) 詳細

これまで、マウス成体脳の海馬・歯状回と側脳室周囲・嗅球で起きているニューロン新生の全体像と機能的意義の解明を目指して研究を行ってきた(Imayoshi et al., Nature Neuroscience 2008)。成体脳の新生ニューロンだけに特異的に遺伝子操作を行うためには、非常に洗練された遺伝学技術と戦略が必要であり、これまでノックイン(KI)マウスやトランスジェニック(Tg)マウスなどの遺伝子改変マウス技術を駆使して、新生ニューロンの選択的操作を実現してきた(Imayoshi et al., Frontiers in Neuroscience 2011)。成体脳の新生ニューロンだけを選択的に蛍光たんぱく質で標識し、既存の神経回路への組み込み様式を解明した。また、新生ニューロンにジフテリア毒素を発現させて選択的に除去し、新生ニューロン除去マウスの行動学解析を行う事で、ニューロン新生の機能的意義の一端を解明した(Imayoshi et al., Nature Neuroscience 2008; Imayoshi et al., Development, Growth & Differentiation 2009)。しかし、これまでの遺伝子改変マウスモデルでは、海馬と嗅球の両方の新生ニューロンに影響を与えてしまうという技術的な問題があった。本研究プロジェクトにおいて、海馬・歯状回と嗅球の生後脳新生ニューロンを、それぞれ選択的に遺伝子操作

する事が可能になった。さらに、海馬・歯状回と嗅球のニューロン新生をそれぞれ阻害したマウスについて、行動学的解析・生理学的解析を行う事で、生後脳ニューロン新生の機能的意義の一端が明らかになった。

(1) 生後脳海馬ニューロン新生の破綻と発達障害・精神疾患

注意欠陥・多動性障害(ADHD: Attention-Deficit-Hyperactivity Disorder)は「不注意」、「多動性」、「衝動性」を症状の特徴とする発達障害の一種である。ADHDの原因は、注意や抑制・自制に関与する脳の神経回路が発達過程で損なわれているという点までは確からしいが、それらの脳部位や脳機能が損なわれるメカニズムは全く明らかになっていない。ADHDを含めて、発達障害や精神疾患は、遺伝的な要因に加えて、生育環境や妊娠中の母親の体内環境、出産前後に生じる様々な事情(周産期障害)によっても、その発症の有無や病態の深刻度合いが左右される。マウス新生児が強いストレスを受けると、海馬のニューロン新生が減少する事が知られているなど、先天的な遺伝子変異に加えて、周産期障害や後天的な環境要因の変化も海馬のニューロン新生に大きく影響する。この様な背景から、発達障害や精神疾患については、ニューロン新生の破綻がその病状の神経基盤の一端を担っている可能性があるが、上記のような疾患の臨床例や動物モデルにおいて、海馬のニューロン新生の破綻の有無について体系的に研究された例は極めて少数である。

海馬・歯状回の新成ニューロンは VGLUT1 を発現するグルタミン酸作動性ニューロンである。VGLUT1 の遺伝子座から、Cre による組み換え依存的に、シナプス放出を阻害するテタヌス毒素(TeNT)が発現するようなノックインマウスを作製した。これらのマウスと mGFAP-Cre マウスとのダブル Tg マウスを作製する事で、海馬・歯状回の新成ニューロンを選択的に阻害する事が可能になる。なぜなら、生後脳・成体脳での嗅球の新成ニューロンは GABA 作動性であり、VGLUT1 を発現していないからである。

このモデルマウスの行動学的解析を行い、マウスの出生後すぐから海馬・歯状回の新成ニューロンを特異的に機能阻害すると、

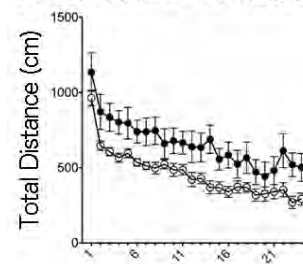
発達障害や精神疾患とニューロン新生の破綻の関係を示唆するような実験結果が得られた。例えば、自発活動性を評価するオープンフィールドテストやホームケージ観察において、生後脳ニューロン新生阻害マウスは、コントロールマウスに比べて、顕著に活動性の増加が観察された。行動テストバッテリーのほとんどのテストにおいて、ニューロン新生阻害マウスは活動性の亢進を示している。

また、Cliff-avoidance テストの結果から、ニューロン新生阻害マウスでは、衝動性が亢進している事が確認された。さらには、

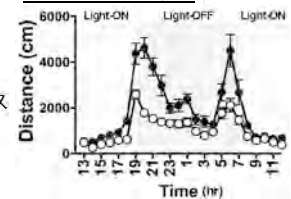
8方向放射状迷路を用いたテストにおいて、ワーキングメモリーの障害が確認された。興味深

オープンフィールド

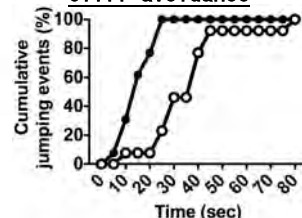
○: コントロールマウス
●: 海馬特異的ニューロン新生阻害マウス



ホームケージ観察

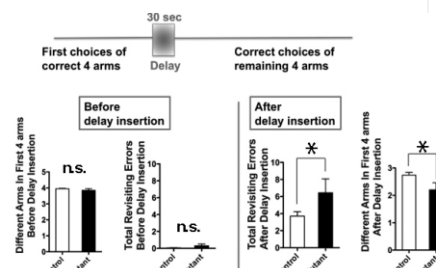


Cliff-avoidance



8方向放射状迷路テストにおいて、試行途中のdelay挿入特異的にスコアの低下が見られた。

い事に、試行途中で delay を挿入し、課題を強制的に一定時間中断させた後に、顕著なフェノタイプが見られた事から、注意や集中の持続に障害がある事が示唆された。これらの実験結果から、生後脳・海馬のニューロン新生を阻害したマウスは、ADHD 様の異常行動を示している事が明らかになった。

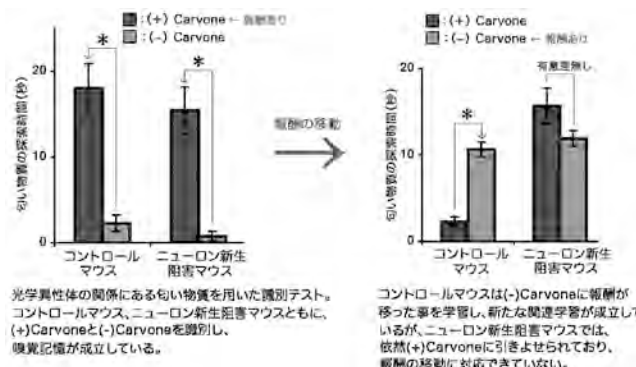
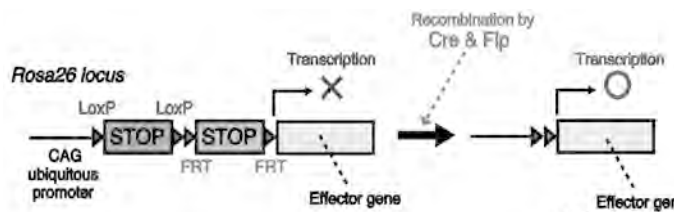


今後は、生後脳海馬ニューロン新生阻害マウスの行動学的・生理学的解析を継続し、ADHD の他のエンドフェノタイプについて解析を進めるとともに、ドーパミン作動系の発達との関与など、ADHD の発症の根本原因に生後脳海馬ニューロン新生がどのように関与しているのかについて、神経回路レベルでの詳細な解析が必要である。

(2) 生後脳の継続的なニューロン新生は、嗅球の機能的な神経回路の構築と維持に必須である

嗅球においても、生後脳・成体脳ニューロン新生が継続しているが、嗅球新生ニューロン特異的に遺伝子操作を行うために、Cre/LoxP と Flp/FRT システムを併用した intersectional genetics を採用した。

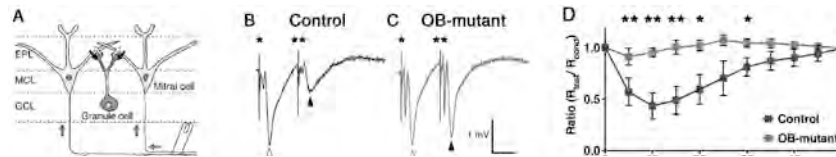
すでに、Cre/LoxP システムを利用し、Rosa26 遺伝子座などから様々なエフェクターたんぱく質を発現するマウスが広く利用されている。しかしながら、Cre/LoxP システムだけでは、細胞種特異性に限界があり、意図しない神経細胞集団でも組換えが起こり、エフェクターたんぱく質が発現してしまう。このため、本プロジェクトにおいて、Cre の組換えに加えて、Flp 組換え酵素の組換えを必要とする、ダブルストップカセットを持つ Rosa26 ノックインマウスを開発した (Imayoshi et al., Neuroscience Research 2012a; 2012b; 2012c)。



Intersectional genetics を適応して、嗅球の生後脳・新生ニューロンを特異的に阻害したマウスでは、柔軟な嗅覚関連学習が損なわれている事が明らかになった。コントロールマウスと嗅球ニューロン新生阻害マウスともに、光学異性体の関係にある匂い物質を識別し、学習する事ができる。しかしながら、初めに報酬(砂糖)と関連させて記憶させた匂い物質から、他方の匂い物質に報酬を変化させると、コントロールマウスでは初めとは違う匂い物質に報酬が移った事を学習し対応することができた

が、ニューロン新生阻害マウスでは、以前のすでに報酬のない匂い物質に引き寄せられ続けて、報酬の移動に対応できなかった。

また、嗅球の生後脳新生ニューロンを特異的に阻害したマウスでは、嗅球の主要な投射



ニューロンである、Mitral cell の反回／側方抑制が形成されていない事が明らかになった。さらに興味深い事に、成体脳のニューロン新生を阻害したマウスでも柔軟な嗅覚関連学習の障害や、Mitral cell の反回／側方抑制の減弱が観察された。成体脳において新生ニューロンが継続的に供給される事で、嗅球 GABA 抑制性の微小回路の維持・再編が可能になり、匂い情報処理や匂い情報の価値判断の至適化が可能になると考えられる。

3. 今後の展開

本プロジェクトにおいて、生後脳の海馬と嗅球における、ニューロン新生の機能的意義の一端が明らかになった。今後は、ニューロン新生の発達障害や神経回路可塑性との関与について、神経回路レベルでのより詳細な理解に繋がたいと考えている。ニューロン新生の理解を深めることで、脳血管障害などによる脳損傷や神経変性疾患に対する、新規創薬や細胞移植医療の実現に向けた重要な基礎知識が得られるものと期待される。

4. 自己評価

マウスの生後脳・成体脳のニューロン新生を、遺伝学技術を駆使する事で、選択的に操作する事や機能阻害する事に成功した。研究期間の前半に様々な遺伝学的手法を検討する事で、新生ニューロンを特異的に遺伝子操作するモデルマウスの開発に成功した。研究期間の後半には、これらのモデルマウスの行動学的解析や電気生理学的解析を行う事で、生後脳・成体脳ニューロン新生が、脳神経回路の形成・修飾や維持に果たす役割の一旦を解明する事に成功した。研究計画の骨子である新生ニューロン特異的な遺伝子操作法の開発と、行動学的解析については、予定通り遂行する事ができた。今後は、さがけ研究で見いだされた、ニューロン新生が関与する脳機能や神経回路可塑性について、神経回路レベルにてより詳細な解析を行う必要があると考えられる。また、生後発達期の海馬のニューロン新生が発達障害や神経疾患へ関与している事も示唆された。今後、ニューロン新生の修飾や活性化を利用した創薬研究や再生医療研究の発展が期待される。

5. 研究総括の見解

生後脳の神経幹細胞から新生するニューロンがどのように既存の神経回路に組み込まれどのような生理的機能に関わるのかが不明であった。本研究ではマウスの遺伝子改変技術を駆使して脳部位特異的に新生ニューロンに特異的な遺伝子操作を仕組むことにより、その解明にアプローチした。海馬歯状回では出生後すぐに新生ニューロンの機能を阻害すると、多数の行動テスト解析の結果、活動性と衝動性の亢進、作動記憶と注意集中持続の障害など、ADHD(注意欠陥多動性障害)に特徴的な症状が生じることを見出した。さらにダブルストップ

カセットを組み込んで嗅球新生ニューロンへの特異性を高めたマウス系統では、生後脳・成体脳の両方において、嗅覚関連学習の障害と嗅球神経回路の電気生理学的異常を見出した。新規なトランスジェニックマウスの作成によってえられたこれらの結果は新生ニューロンの既存神経回路への組み込みとその生理的意義の解明に近づいた重要な成果であり高く評価される。今後さらに解析を深めることで発達障害との関係の解明や、海馬と嗅球における神経回路の可塑性の細胞レベルでの仕組みの解明につながる事が期待できる。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

***Imayoshi, I.**, Tabuchi, S., Hirano, K., Sakamoto, M., Kitano, S., Miyachi, H., Yamanaka, A and Kageyama, R. (2012) Light-induced silencing of neural activity in Rosa26 knock-in mice conditionally expressing the microbial halorhodopsin eNpHR2.0. 75: 53-58.

***Imayoshi, I.**, Hirano, K., Kitano, S., Miyachi, H. and *Kageyama R. (2011) In vivo evaluation of PhiC31 recombinase activity in transgenic mice. *Neuroscience Research* 73: 106-114.

***Imayoshi, I.**, Hirano, K., Sakamoto, M., Miyoshi, G., Imura, T., Kitano, S., Miyachi, H and Kageyama, R. (2012) A multifunctional teal-fluorescent Rosa26 reporter mouse line for Cre- and Flp-mediated recombination. *Neuroscience Research* 73: 85-91.

***Imayoshi, I.**, Shimojo, H. (equal contribution), Sakamoto, M., Ohtsuka, T. and Kageyama, R. (2012) Genetic visualization of Notch signaling in mammalian neurogenesis. *Cell Mol Life Sci. in press*

Sakamoto, M., **Imayoshi, I.**, Ohtsuka, T., Yamaguchi, M., Mori, K. and *Kageyama, R. (2011) Continuous neurogenesis in the adult forebrain is required for innate olfactory responses. *PNAS* 108: 8479-8484.

***Imayoshi, I.**, Sakamoto, S. and *Kageyama, R. (2011) Genetic methods identify and manipulate newborn neurons in the adult brain. *Frontiers in Neuroscience* May 2;15:64.

*Kageyama, R., **Imayoshi, I.**, and Sakamoto, M. (2011) The role of neurogenesis in olfactory-dependent behaviors. *Behavioral Brain Research* 227:459-463.

***Imayoshi, I.** and *Kageyama, R. (2011) The role of Notch signaling in adult neurogenesis. *Molecular Neurobiology* 44: 7-12.

Imayoshi, I., Sakamoto, M., Yamaguchi, M., Mori, K. and *Kageyama, R. (2010) Essential roles of Notch signaling in maintenance of neural stem cells in the developing and adult brains. *The Journal of Neuroscience* 30: 3489-3498.

***Imayoshi, I.**, Sakamoto, M., Ohtsuka, T. and Kageyama, R. (2009) Continuous neurogenesis in the adult brain. *Development, Growth & Differentiation* 51: 379-386.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1:「神経幹細胞における bHLH 型転写因子の振動発現」

第 35 回日本分子生物学会年会シンポジウム

福岡国際会議場

2012 年 12 月 12 日

口頭発表

2:「生後脳・成体脳におけるニューロン新生」

第 52 回脳の医学・生物学会研究会

名城大学名駅サテライト会議室

2012 年 3 月 10 日

口頭発表

3:「Regulatory Mechanism of Adult Neural Stem Cell Activation」

第34回日本神経科学大会シンポジウム

パシフィコ横浜

2011 年 9 月 16 日

口頭発表

4:「Regulatory Mechanism of Adult Neural Stem Cell Activation」

Neurogenesis 2011

理研 CDB

2011 年 6 月 2 日

口頭発表

5: NHK 教育テレビ番組「サイエンス ZERO」<こころを動かす 嗅覚>(2010 年 6 月 26 日放送)

NHK ワールドにても放送。

研究報告書

「中脳神経回路網による価値情報の形成機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研究者: 小林 康

1. 研究のねらい

臨機応変に柔軟でかきこい制御、情報通信の技術基盤として、生物に模した「自律探索型の学習機械」の開発が必要とされている。生物らしい情報処理の基本原理である、個体個体の経験に基づく「内的動機付け(やるき)」、「未来予測(報酬、コストやリスクの見通し)」の自律探索的な学習機構を神経生理学的レベルからアルゴリズムレベルにわたって解明し、「生き物らしさ」を機械に組み込むことをねらいとした。「目は口ほどに物を言う」ということわざを裏付けるように、様々な精神・神経疾患によって眼球運動に障害が生じる。本研究では、この眼球運動を定量的に測定可能なバイオマーカーとして活用し、被験者が患う精神・神経疾患の病態を誰でも簡単に評価することを可能にする新しい診断法の開発を目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

サル、ヒトの神経生理学研究、ヒトの心理物理研究により、意志・行動決定の神経回路機構を解明した。

- a) 強化学習の神経機構: 生物の意志決定の基本原理は報酬獲得であり、その行動制御の根底となる報酬の予測学習(強化学習)の神経回路機構、計算メカニズムについて覚醒サルを用いた、神経生理学的研究によって明らかにした。
- b) 隠れた運動行動決定過程を目の動きから読み取る: 神経疾患によって生じるヒトの「こころの戸惑い、震え」を眼球運動から読み解くことを目指し、注意障害多動の児童、健常被験者を対象に眼球運動を計測するヒトの心理物理研究を行った。そして、視線移動に関わるサッケードの反応時間、注視中の固視微動の解析により、運動の実行、経験に基づく適切な随意運動発現に必要な運動準備状態(見た目にはわからない行動決定過程)が眼球運動より読み取れることがわかった。

(2) 詳細

a) 強化学習の神経機構:

強化学習は手がかり刺激に対して行動の報酬を予測し、予測と実際に得られた報酬との差、「報酬予測誤差」を最小化するように予測を随時更新して、最大報酬を得る行動を最適化することであり、学習アルゴリズムの理論研究のみならず、強化学習が実装されている生理学的ハードウェア研究が盛んに行われている。現在、中脳ドーパミンニューロン(DAcell)が報酬予測誤差を表現しているということがほぼ確立されているが、計算理論の重要な鍵となる誤差信号の計算メカニズムについてその実体が明らかにされていない。DAcell は大脳基底核などから抑制性、大脳皮質などから興奮性の入力を受けるが、中脳のアセチルコリン作動性の脚橋被蓋核(PPTN)が DAcell に対してもっとも強力な興奮性入力を送っている。このことから、PPTN が DAcell による報酬予測誤差計算の中心であることが示唆される。我々はモンキーチェアに座ったサルの眼球運動をサーチコイル法で計測し、複数の計算機を連動させ、課題制御、データ取り込みを行うシステムを構築し、ジュース報酬で眼球運動課題を訓練したサルに報酬予測サッケード課題を行わせ、PPTN からニューロン活動記録を行っている。その結果、1)サルに課題開始刺激を呈示すると活動が始まり、手がかり刺激による予測報酬量が多いと活動が大きくなるような報酬が与えられるまで持続するニューロン活動(参考文献 1,2,3) 自発レベルでは比較的高頻度で発火し、課題開始から活動が減少して多くの報酬量が予測される試行ではより活動が減少するという1)とはちょうど鏡像関係にあるニューロン活動(論文投稿中)、3)報酬予測とは無関係に実際にサルに報酬が与えられると活動の増加が起こり与えられた報酬量が多いとより活動を増加させるような一過性のニューロン活動(参考文献 1,3)がそれぞれ独立したニューロン群から得られた。以上の結果から計算モデルで予言された報酬予測誤差計算に必要な、「持続的な興奮性の記憶された予測報酬の情報」「持続的な抑制性の記憶された予測報酬の情報」と「短時間の興奮性の実際に得られた報酬の情報」というすべての要素が、それぞれ分離独立した形でサル中脳PPTNに表現され、報酬予測誤差が計算されているということが明らかになった。

これら報酬関連活動の他に、PPTN でサルのサッケード運動時や視覚刺激呈示に対して一過性の活動上昇がみられた。これらは、約半数のニューロンで課題の文脈に対する依存性があった。これらの活動は学習された行動を文脈に従って遂行するのに役立っているものと思われる(参考文献 2)。また、状況依存的に 10Hz 程度の低頻度で周期的に活動する PPTN のニューロン群(おそらくアセチルコリン作動性ニューロン、サルが課題を始めると活動が周期的になる)でサッケード運動に伴う活動停止がみられた。これらのニューロンではサッケードの方向・振幅・課題文脈によらず、サッケード運動の開始に先立って活動が停止し、その停止はサッケード終了後まで続いた。外側膝状体がPPTNのアセチルコリン作動性入力を受けることから、この活動はサッケード抑制(サッケード運動が起こる前に視覚情報を遮断し、予測的に視覚像のぶれを除去する)と関係していると思われる(論文投稿準備中)。このように、DAcell と関係の強い中脳 PPTN は報酬予測誤差計算のみならず、状況依存的な行動の実行や、円滑な感覚情報取り込みに関係していると思われる。

外部との研究交流:嫌悪と選好の脳内相互関係のモデル化:

中脳で主に報酬、覚醒、持続的注意に関係する、アセチルコリン作動性核「脚橋被蓋核」(我々が記録している)と嫌悪、衝動性、時間割引に関係するセロトニン作動性ニューロン核「背側縫線核」(関西医大中村加枝教授(さきがけ脳情報の解読と制御研究員)が記録している)のサル眼球運動課題中に得られたニューロン活動について、異なる研究室で得られた実験データを同じ解析方法で解析することを試み同じフォーマットの図を作ったうえでお互いのデータの比較検討を行い、報酬、嫌悪と強化学習に対する役割を明らかにするモデルを提唱した(参考文献3)。それぞれのニューロン活動の違いより、事象を予測する「タイムスケール」が脚橋被蓋核システム(選好)と背側縫線核システム(嫌悪)とでは異なる(いやなことの方が持続する(背側縫線核システムの方が情報の時間スケールが長い))ことが明らかになった(参考文献)。また、手がかり刺激によってジュース報酬を予期させる眼球運動課題をサルに行わせたところ、脚橋被蓋核と背側縫線核において、正負両方の符号で課題報酬の期待に関係する時間経過の類似したニューロン活動がみつかった。これらの結果は、アセチルコリン、セロトニンといった、いわゆるニューロモジュレーターによって、嫌悪と報酬といった「相反する」情報が中脳レベルにおいて様々なスケールで一元化されていることを示唆する(参考文献4)。

b) 隠れた行動決定過程を目の動きから読み取る:さまざまな神経疾患によって生じるヒトの「こころの戸惑い、震え」を眼球運動から読み解くことを研究目的とした。こどもの注意障害多動、高齢者のパーキンソン病はともに中脳、大脳基底核障害によって起きることが多いが、障害はそれぞれ異なる行動の異常として現れ、病態の神経メカニズムは未解明である。本研究では神経回路がよく研究されている眼球運動制御のシステム動態を手がかりにして神経疾患の早期発見、病状の進行度の生理学的理解、病態解明を目指した。具体的には視線移動に関わるサッケードの反応時間(標的が呈示されてから眼球が動き始めるまでの時間)を行動遂行の指標にし、運動を準備している注視中(見た目にはわからない行動決定過程)の固視微動から、適切な運動制御に必要な運動準備状態を読み取ることを試みた。

以下の心理物理課題を被験者に行わせた。被験者の眼球運動は、被験者の眼前のコンピューターディスプレイ画面に呈示された光点を一定時間注視させ、次々と現れる光点に向かって視線を移動させることで誘発させた。なお、被験者の頭部は顎台で固定され、眼球運動は非侵襲、高速度の眼球運動測定装置(阪大病院に設置)により測定した。

結果1) 注意障害多動患者では、注視に異常が見られ(光点をじっと注視するのが困難)、視線移動に関わるサッケードの反応時間に健常被験者と比べて遅れがみられた。さらに、サッケードの反応時間を短くする効果のあるギャップ課題(注視中に注視点を消灯させ、その後標的を呈示させるので運動の準備が可能)にしてもなお反応時間が短縮されない(ギャップ効果はみられるものの非常に弱い)ことが観察された。眼球を安定化させる注視システムには随意的なもの(随意的に起こさなければならないタイプの注視の解放)と自動的なもの(ギャップによって自動的に起きる注視の解放)があることが知られているが、この結果は注意障害多動患者がサッケードを遂行する際はむしろ、随意的な注視の解放が十分にできずに反応時間が長いことが示唆された。

結果2)たとえば、パーキンソン病などにより、様々な随意的な眼球運動[例:随意的なサッケード(呈示された光点への反射的な視線移動を抑制して光点の反対位置に視線を移動させるアンチサッケードなどに異常が見られる(反応時間が遅くなる、アンチサッケードを失敗する)、また、注視中の固視微動にも異常が生じることが知られている。注視中の固視微動は視覚情報処理に必須であることが最近明らかになっているが、サッケード遂行前の注視中の固視微動、ターゲットへのアンチサッケードから適切な随意サッケードの実行に必要な運動準備状態を読み取った。

健常被験者にアンチサッケードと通常のサッケード(プロサッケード課題)課題を行わせ、サッケード、あるいは注視中の固視微動を記録し、サッケードの反応時間、課題の成功失敗、固視微動の頻度、大きさ、瞬きの頻度、瞳孔径などを運動準備の度合い、衝動性の指標として定量解析を行った。テストを行った結果、あらかじめ運動準備が必要なアンチサッケード課題では、サッケードの反応時間が遅くなることが確認されさらに、アンチサッケードの準備状態の注視中は、プロサッケードの時と比べて、固視微動が減少していることがわかった。また、被験者がアンチサッケードを失敗する(意識には上らない)ときには、準備中の固視微動が異常に増加していることがわかった。

固視微動を随意的に押さえることが、「あっち向けほい」などの反射抑制を適切に行うときに必要なことがわかった(参考文献5)。

以上、固視微動を解析することによりこれからおこる運動の結果を実時間で予測できることがわかった。現在、固視中の固視微動、瞬き、瞳孔サイズ(ともに視覚認知に必須であり、注意など精神活動と深い関係がある)とサッケード制御、衝動性、脳内セロトニン濃度、発達の効果の関係、脳疾患患者(パーキンソン病、本態性振戦、注意障害多動、進行性核上性麻痺)を被験者にして、データを解析しているところである。

3. 今後の展開

強化学習の神経生理学研究の将来展望:

生物の「報酬・嫌悪刺激の価値評価をし、行動選択をする」神経機構を明らかにしたい。そのために、眼球運動課題を行う霊長類を動物モデルとして、視覚刺激—運動学習課題における、脳幹のセロトニン系の背側縫線核、アセチルコリン系の脚橋被蓋核、および中脳ドパミン系という異なる神経伝達物質を制御する領域の神経活動の変化を計測する。各領域が予測的価値・行動・報酬価値信号をどの様に計算し表現しているのか、その並列分散的かつ統合プロセスによりどのように行動決定、予測更新に至るのかを神経生理学的に明らかにする。三つの神経伝達物質の相互作用による価値情報にもとづく行動決定学習モデルは、従来のドパミン系に限局した報酬学習に加え、嫌悪情報や行動の種類も含めた幅広い予測学習モデルを構築することに寄与する。我々は、慢性サルを用いた神経生理学的研究により、脳幹脚橋被蓋核(PPTN)における報酬予測誤差計算機構を明らかにしてきた(参考文献)。この研究を進めることで脳の長期記憶(シナプス記憶)の書き込み、読み出し、短期記憶(ワーキングメモリ; 大脳、脳幹を含む反響回路循環による神経情報の短期的保持)、ニューロンによる(学習誤差)信号計算機構といった脳科学、情報科学の重要な問題にメスをいれるとともに、報酬嫌悪の予測(行動の動機付け、危険の事前回避)と報酬を獲得するまでずっと報酬予測をし

続ける時間との関係(価値の時間的割引効果;いつまでも予測した報酬がこないと予測報酬価値が低下する、せっかちさ)の脳内機構を神経生理学的に解明し、価値、予測と時間の情報が脳内でどのように表現されているのかといった、学習アルゴリズムレベルの研究に到達したい。最終的にはこれらの神経生理学的研究を進展させ、ミクロからマクロレベルでの社会行動経済学の発展(どうして人間はこんなにせっかちなのか、また様々な国民性の違いを説明する社会環境、脳内機構の解明)に寄与が期待されるレベルまで研究を進展させていきたいと思う。

ヒト心理物理実験の将来展望:

眼球運動は制御対象が単純であり、厳密かつ定量的な計測に特別な技術を必要としない。神経生理学研究に基づく分析から、眼球運動が疾患のバイオマーカーとして有効であることが今後確立されれば、この簡便で安価な技術を広く普及させ、様々な神経疾患の症状の発現を予防する方法の開発や、各患者の神経疾患症状の進行に合わせた治療法の計画など様々な応用分野で貢献できればと思う。

4. 自己評価

臨機応変に柔軟でかきこい制御の学習機構を神経生理学的レベルからアルゴリズムレベルにわたって解明することを目指した。さきがけ研究により、強化学習に関連した脳幹ニューロンで正と負の2方向性の(内的)動機付け、(外的情報による)報酬予測の情報表現が得られた。さらに、報酬予測情報は内的動機付け情報の上に重畳されていることがわかった。この結果は、「自分でやる気を起こさなければ学習がきちんと進まない」ことや「自分で嫌気を起こさなければ、いやなことは忘れられない」ことを示唆すると思われる。

将来的に、内的に生成させる正と負のやる気、嫌気、といった内的予測要素に外界の外的環境要素を組み込んだ学習理論を構築し、自発的で効率よい情報通信の適応的制御システム構築に生かしていきたい。

また、眼球運動を定量的に測定可能なバイオマーカーとして活用し、被験者が患う精神・神経疾患の病態を誰でも簡単に評価することを可能にする新しい診断法を開発を目指したが、さきがけ研究による「固視微動の計測」により、当初予測もしていなかった、「視線の非常に小さな揺らぎ」によって、オンラインで運動準備状態や脳の状態をモニターできる可能性を得ることができた。今後はこのような精密な眼球運動や各種計測により脳疾患の早期発見、病態解明につながる研究ができればと思う。

5. 研究総括の見解

行動に対する報酬を予測しこれを最適化する強化学習においては中脳ドーパミン細胞が予測誤差を表現するとされているが、その誤差信号の計算メカニズムの実体は不明であった。本研究では眼球運動(サッケード)課題を学習してジュース報酬予測を行なうサルで多数の中脳ニューロンの活動を記録・解析して、予測誤差計算モデルに必要な3種のニューロンが中脳ドーパミン細胞へ興奮性入力を送る脚橋被蓋核に実際に存在することを示したこと、さらに注



意深い解析により、課題文脈依存性および感覚情報取り込みを円滑にするサッケード抑制と関係するニューロンを発見したことが特に評価される。また背側縫線核が関与する嫌悪・時間割引なども包摂した報酬・嫌悪の強化学習モデルを共同研究により提唱し、実証研究を進めた。一方提案にはなかった研究ではあるが、サッケードの反応時間、注視中の固視微動には、運動の実行、経験に基づく適切な随意運動発現に必要な運動準備状態に関わる情報が含まれてことを発見した。今後はサルを用いた強化学習の神経生理学研究とヒトでの心理物理実験とが統合的に発展し、生物の行動の基本原理の解明につながることを期待される。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. 著者. 発表論文タイトル. 掲載誌名. 発行年, 巻号, 始頁-終頁, その他

1. Okada K and Kobayashi Y Characterization of oculomotor and visual activities in the primate pedunclopontine tegmental nucleus during visually guided saccade tasks. *European Journal of Neurosciences* 30: 2211-2223, 2009
2. Kobayashi Y Reward prediction error computation in the pedunclopontine tegmental nucleus neurons. *The 3rd International Symposium on Mobiligence*, Nov 19-21, Awaji 2009 pp 153-156
3. Okada K, Nakamura K, Kobayashi Y. A neural correlate of predicted and actual reward-value information in monkey pedunclopontine tegmental and dorsal raphe nucleus during saccade tasks. *Neural Plasticity* 2011:21, 2011.
4. Okada K, Kobayashi Y. Reward prediction-related increases and decreases in tonic neuronal activity of the pedunclopontine tegmental nucleus. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, 14 May 2013 | doi: 10.3389/fnint.2013.00036
5. Masayuki Watanabe, Yuka Matsuo, Ling Zha, Douglas P. Munoz, and Yasushi Kobayashi Fixational saccades reflect volitional action preparation. *Journal of Neurophysiology*, 2013 *in press*

(2) 特許出願 研究期間累積件数:0 件

(3)

その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

国際学会招待講演

Yasushi Kobayashi Neuronal recording from cholinergic nucleus in the brainstem of awake monkeys in relation to arousal, motivation, motor control, visual information processing and reinforcement learning, Bio-X 2012 International Symposium on Molecular Cognition and Translational Research of Neuropsychiatric Disorders, April 28-30, 2012 in Shanghai Jiao Tong University 上海交通大学, China



Yasushi Kobayashi Neural mechanism of reinforcement learning and motivation.
Shanghai Jiao Tong University BioX-project, July 24, 2011 in Shanghai Jiao Tong University, China

国内学会招待講演

小林康 北海道大学電子科学研究所 陰的制御研究会
運動誤差学習と強化学習、小脳と脳幹の神経振動 2011 6/28-29

Yasushi Kobayashi
Computation of reward signals in the pedunclopontine tegmental nucleus neurons. Satellite Symposium of the 32nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society The Basal Ganglia in Health & Disease (2009)

国際学会口頭発表

K.-I. OKADA, Y. KOBAYASHI
Sustained tonic excitation and suppression of activity on
pedunclopontine tegmental nucleus neurons in behaving monkeys
SfN 2012/10

K.-I. OKADA¹, Y. KOBAYASHI
Saccade-related modulation of rhythmic firing pattern on pedunclopontine tegmental
nucleus neurons in behaving monkeys.
699.16/QQ9 Neuroscience2011, Washington DC Nov 15, 2011

Ken-ichi Okada, Yasushi Kobayashi
Context dependent firing regularity of pedunclopontine tegmental nucleus of
behaving monkeys.
2010 Society for Neurosciences Abstract 591.5

Kazuko Hayashi, Kazuko Nakao, Ryuichi Matsuzaki, Ken-ichi Okada, Yasushi Kobayashi
and Kae Nakamura
Neural processing of appetitive and aversive stimuli in the primate raphe nucleus.
2010 Society for Neurosciences Abstract 511.26

K. Okada & Y. Kobayashi



Analyses of the time course of neuronal activity of the pedunculo pontine tegmental nucleus in monkeys for reward conditioned saccade task
Society for Neuroscience Meeting, 583.17, 2009

K. Nakao, R. Matsuzaki, A. Noritake, K. Okada, Y. Kobayashi and K. Nakamura
Positive and negative value coding in the primate dorsal raphe nucleus
Society for Neuroscience Meeting, 683.13, 2009

Yasushi Kobayashi

Reward prediction error computation in the pedunculo pontine tegmental nucleus neurons. The 3rd International Symposium on Mobiligence,
Nov 19-21, Awaji 2009

Yasushi Kobayashi and Ken-ichi Okada

The pedunculo pontine tegmental nucleus neurons relay predicted and actual rewarded information. The international symposium on Construction and Reconstruction of the brain, Oct 8-10, Awaji 2009 pp 55

国内学会口頭発表

平成23年度 生理学研究所研究会 2012/01

グローバルネットワークによる脳情報処理

「サル脚橋被蓋核における周期的活動とその変調」

岡田 研一 小林康

日本神経科学会 2012/09

サル脚橋被蓋核ニューロンにおけるサッカード抑制応答

Saccade-related pause and rebound of activity on pedunculo pontine tegmental nucleus neurons in behaving monkeys

岡田 研一、小林 康

第15回視覚科学フォーラム研究会

2011年8月29・30日

サル脚橋被蓋核におけるサッカードに伴う周期的活動の変調

岡田研一・小林康

第5回 Motor Control 研究会

2011年6月16～18日

サル脚橋被蓋核ニューロンの周期発火とサッカード抑制応答

岡田 研一、小林 康



Yasushi Kobayashi Ken-ichi Okada The pedunculo pontine tegmental nucleus neurons encode predicted reward signal by tonic regular firing and given reward signal phasically. Neuro 2011 Yokohama 9/16 03-E-1-4

Yasushi Kobayashi, Ken-ichi Okada
The pedunculo pontine tegmental nucleus neurons relay predicted and actual reward and context dependent visuomotor information.
Neuro2010 Meeting Sep 2-4, Kobe 01-8-1-1

Yuri Kitamura, Yuka Matsuo, Masako Taniike, Ikuko Mohri, Yasushi Kobayashi, Kanehisa Morimoto
Saccadic eye movements as a neural correlate measure of preparatory set in children with ADHD.
Neuro2010 Meeting Sep 2-4, Kobe 02-7-3-3

Ken-ichi Okada, Yasushi Kobayashi
Rhythmic firing of pedunculo pontine tegmental nucleus neurons in behaving monkeys.
Neuro2010 Meeting Sep 2-4, Kobe 02-9-4-1

Kazuko Hayashi, Kazuko Nakao, Ken-ichi Okada, Yasushi Kobayashi, Kae Nakamura
Neuronal coding of rewarding and aversive stimuli in the primate dorsal raphe nucleus.
Neuro2010 Meeting Sep 2-4, Kobe P3-113

Yasushi Kobayashi & Ken-ichi Okada
Computational mechanism of reward prediction error by the Pedunculo pontine tegmental nucleus neurons.
The 32nd annual Meeting the Japan Neuroscience Society 01-J1-4 S48 (2009)

Ken-ichi Okada & Yasushi Kobayashi
Relation of pedunculo pontine tegmental nucleus neurons in monkeys to reward prediction and behavior.
The 32nd annual Meeting the Japan Neuroscience Society P1-j08 S114 (2009)

Kazuko Nakao, Ryuichi Matsuzaki, Ken-ichi Okada, Yasushi Kobayashi, Kae Nakamura
Reward coding by the primate dorsal raphe neurons is context dependent
The 32nd annual Meeting the Japan Neuroscience Society P1-j03 S113-114 (2009)

受賞

2010 年 日本神経回路学会論文賞受賞

書籍

小林康 強化学習の神経機構 ブレインサイエンスレビュー2012 クバプロ ISBN:
978-4-87805-121-0

Yasushi Kobayashi and Ken-ichi Okada Book title: *Advances in Reinforcement Learning*
(2010) Open Access Publisher INTECH, ISBN: 978-953-307-369-9 Chapter Title: Reward
prediction error computation in the pedunculopontine tegmental nucleus neurons pp
157-180

研究報告書

「抑制系による大脳皮質神経回路網の動作制御機構の解明 ー機能イメージングと光刺激法の併用による解析ー」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研究者: 惣谷 和広

1. 研究のねらい

大脳皮質神経回路網における抑制性ニューロン(GABA ニューロン)の機能は、単に神経回路網の活動レベルを抑制するだけでなく、興奮性ニューロンの特徴選択的な情報処理や生後発達初期の感受性期における神経回路網の改変に重要な役割を果たすことが想定されている。しかし、これらの想定は、少数のニューロンの活動様式から神経回路網全体の活動を類推する方法や特定の興奮性或いは抑制性シナプス機能の観察に基づいたものであり、GABA ニューロンは神経回路の 3 次元空間でどのように配置され、その作用はどの程度の広がりを持つのかなど、重要な疑問は未だ解明されていない。

そこで本研究課題では、GABA ニューロン活動の特徴や興奮性ニューロンに対する作用および各々の細胞活動による可塑的な変化などを時空間的に同時に記録・解析し、大脳皮質神経回路機能における抑制系の役割の解明を目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

大脳皮質神経回路網は、主に末梢の感覚受容器によって受容された情報を興奮伝達する興奮性ニューロンと抑制作用によってその情報伝達を動作制御する抑制性ニューロン(GABA ニューロン)、大脳皮質内の恒常性維持を担っていると考えられているグリア細胞から成っている。

その中で、GABA ニューロンの機能は、単に神経回路網の活動レベルを抑制するだけでなく、興奮性ニューロンの特徴選択的な情報処理や生後発達初期の感受性期における神経回路網の改変に重要な役割を果たすことが想定されている。しかし、GABA ニューロンが3次元空間の神経回路網内にどのように分布し、その作用はどの程度の広がりを持つかなど、大脳皮質神経回路網動作原理における抑制系回路の構造と機能に関する重要な問題は、未だ解明されていない。そこで、本研究では、*in vivo* 二光子励起機能的 Ca^{2+} イメージング法を用いて、神経回路網の「構造と機能」という視点からマウス大脳皮質一次視覚野神経回路網内の GABA ニューロンの機能解析を行い、抑制系による大脳皮質神経回路網の動作制御機構に関する研究を行った。

(2) 詳細

(1) マウス大脳皮質一次視覚野両眼反応性領域における興奮性ニューロン群と GABA ニューロン群間に見出された眼優位性の違い

マウス大脳皮質一次視覚野には、同側と反対側の両眼に対する視覚刺激に応答するニュー

ーロンが存在する両眼反応性領域があることが知られており(Gordon JA and Stryker MP. 1996, J Neurosci.), その応答の割合は、眼優位性と呼ばれている。しかしながら、興奮性ニュー

ーロン GABA ニューロンの眼優位性の違いについては、今まで全く調べられてこなかった。その理由は、GABA ニューロンは比較的数が少なく(大脳皮質全体の約 20%)、従来の微小電極法では GABA ニューロンのような小型の細胞は捕捉しにくいという技術的な問題点が考えられる。

そこで、本研究では、GABA ニューロンに特異的に黄色蛍光タンパク質 Venus を発現する遺伝子改変マウスと *in vivo* 二光子励起機能的 Ca^{2+} イメージング法を利用して、マウス大脳皮質一次視覚野両眼反応性領域の 2/3 層内の神経回路網内における興奮性ニューロンと GABA ニューロンの眼優位性について解析を行った。その結果、従来の報告どおり、マウス大脳皮質一次視覚野両眼反応性領域の 2/3 層内の神経回路網内の興奮性ニューロンと GABA ニューロンは、どちらのニューロンもさまざまな眼優位性を示した(図 1a 参照)。

さらに、眼優位性を定量的に解析する目的で、興奮性ニューロンと GABA ニューロンの各々のニューロン群の眼優位性強度について、比較解析を行った(図 1b 参照)。その結果、興奮性ニューロンは、反対側の眼に強く視覚応答を示すニューロンが多く存在する分布を示すのに対して、GABA ニューロンは、両眼により均等に視覚応答を示すニューロンが多く存在する分布を示した。つまり、マウス大脳皮質一次視覚野両眼反応性領域の 2/3 層内の神経回路網において、GABA ニューロンは、興奮性ニューロンより強い両眼反応性を持つことがわかった。しかしながら、この眼優位性の分布の違いは、どのようなメカニズムによって形成され、なぜ違いがあるのかといった、マウス大脳皮質一次視覚野両眼反応性領域内の神経回路網における眼優位性形成における新たな疑問が提起された。

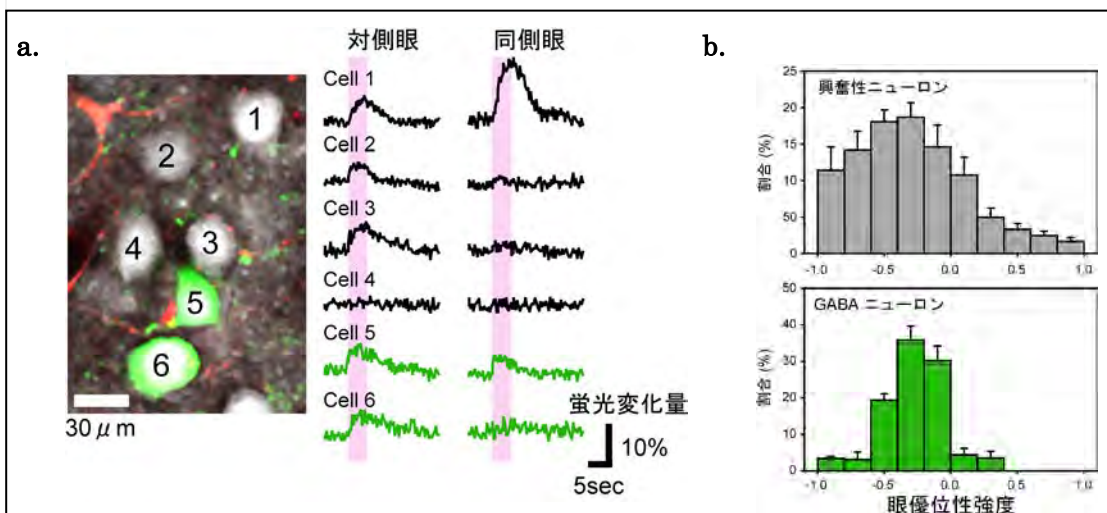


図1. マウス大脳皮質一次視覚野両眼反応性領域における眼優位性

a. *in vivo*二光子機能的 Ca^{2+} イメージング画像と実際のニューロンの活動
(白色細胞:興奮性ニューロン、緑色細胞:GABAニューロン)

b. マウス大脳皮質一次視覚野における興奮性およびGABAニューロンの眼優位性強度分布
グラフにおける横軸の数値は、-1に近づけば反対側の眼に優位に視覚応答を示し、1に近づけば同側の眼に優位に視覚応答することを意味する。また、0付近のニューロンは、両眼に対して均等に視覚応答することを意味する。

よって、GABAニューロンは、興奮性ニューロンによりも両眼により均等に視覚応答を示す。

(2) 幼弱脳(感受性期)および、成熟脳(感受性期後)マウス大脳皮質一次視覚野両眼反応性領域における興奮性ニューロン群と GABA ニューロン群間に見出された眼優位可塑性の違い

幼弱脳(感受性期)の大脳皮質一次視覚野で、片目遮蔽後にみられる眼優位可塑性は、発達脳可塑性の代表的な例として古くより研究されてきた(Hubel and Wiesel, 1963, J Neurophysiol.)。また、近年、GABAニューロンの成熟度が臨界期における眼優位可塑性の開始に重要な役割を果たすことが示された(Hensch, et al. 1998, Science.)。さらに最近になって、感受性期の終了した成熟脳でも眼優位可塑性を有していることが示された(Sawtell et al. 2003, Neuron.)。しかしながら、結果(1)で述べた事と同じく技術的な理由で、興奮性ニューロンと GABA ニューロンの眼優位可塑性の違いについては、今まで全く調べられてこなかった。

そこで、本研究では、結果(1)と同じく、GABA ニューロンに特異的に黄色蛍光タンパク質 Venus を発現する遺伝子改変マウスと *in vivo* 二光子励起機能的 Ca^{2+} イメージング法を利用して、幼弱脳(感受性期)および、成熟脳(感受性期後)のマウス大脳皮質一次視覚野両眼反応性領域の 2/3 層内の神経回路網内における興奮性ニューロンと GABA ニューロンの眼優位可塑性について解析を行った。その結果、幼弱脳(感受性期)の興奮性ニューロンと GABA ニューロンともに、どちらも同程度の眼優位可塑性を誘発した。一方、成熟脳(感受性期後)における眼優位可塑性であるが、GABA ニューロンは、幼弱脳(感受性期)と同程度の眼優位可塑性を保持するのに対し、興奮性ニューロンの眼優位可塑性は、非常に減弱していることが示された(図 2 参照)。

これによって、興奮性ニューロンと GABA ニューロンのこの眼優位可塑性の違いは、どのようなメカニズムによるものなのか、なぜ違いがあるのかといった、マウス大脳皮質一次視覚野両眼反応性領域内神経回路網における眼優位可塑性機序における新たな疑問が提起された。

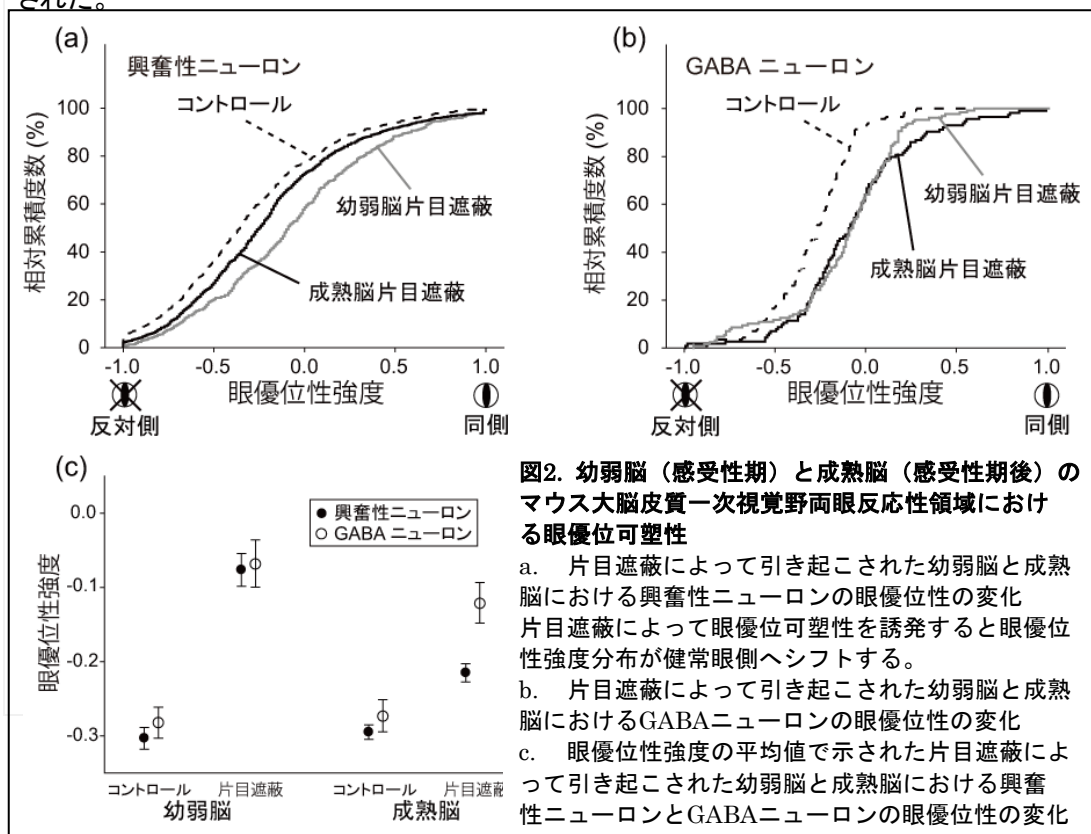


図2. 幼弱脳(感受性期)と成熟脳(感受性期後)のマウス大脳皮質一次視覚野両眼反応性領域における眼優位可塑性

- 片目遮蔽によって引き起こされた幼弱脳と成熟脳における興奮性ニューロンの眼優位性の変化
片目遮蔽によって眼優位可塑性を誘発すると眼優位性強度分布が健常眼側へシフトする。
- 片目遮蔽によって引き起こされた幼弱脳と成熟脳におけるGABAニューロンの眼優位性の変化
- 眼優位性強度の平均値で示された片目遮蔽によって引き起こされた幼弱脳と成熟脳における興奮性ニューロンとGABAニューロンの眼優位性の変化

3. 今後の展開

今後は、*in vivo* 二光子励起機能的 Ca^{2+} イメージング法をさらに改良し、三次元同時イメージング法を実現させる。具体的には、高速レーザー操作法とピエゾモーターを装着させて対物レンズを組み合わせる。これにより、三次元空間の神経回路網内に存在するニューロン活動の同時計測が可能となり、刻一刻と脳の内部状態が変化する覚醒脳の神経回路網動作制御機構などについても GABA ニューロンの機能探求を中心に研究を展開していこうと考えている。

4. 自己評価

本研究では、GABA ニューロンと興奮性ニューロンの視覚応答特性や眼優位可塑性の違いを見出すところから研究がスタートし、最終的には、神経回路網内のニューロンの三次元配置とニューロンの視覚応答特性から GABA ニューロンの機能を神経回路網のレベルの視点で解析する新しい方法の開発へと研究を展開した。

研究期間中、光を用いた脳神経回路刺激法のための遺伝子改変マウスを作成してきたが、ようやく研究機関終了間際にこのマウスを用いた実験が可能となる状況になった。今後は、この方法と *in vivo* 二光子励起機能的 Ca^{2+} イメージング法を併用することで、抑制系における神経回路網動作制御機構を解析していく。また、近年、覚醒脳を制御するニューロモジュレーター回路と抑制系回路との関係性が注目され始めているから、抑制系による覚醒脳の神経回路網動作制御機構解明にも研究を展開していこうと考えている。

5. 研究総括の見解

大脳皮質神経回路において *in vivo* 二光子励起 Ca^{2+} イメージングを用い多数の抑制性 GABA ニューロンの活動を時空間的に同時記録し解析することにより、GABA ニューロンの空間分布と特徴選択的情報処理や可塑性などにおける機能の解明を目指してきた。視覚野 2/3 層のニューロンの左右眼への反応応答比(眼優位性)に着目して、興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの眼優位特性を定量的に解析したところ、興奮性ニューロンに比べ抑制性ニューロンの方がより強い両眼反応性を有することを見出した。さらに眼優位性の可塑性に着目して片眼遮蔽後の眼優位性の変化を幼弱動物と成熟動物で比較し、興奮性ニューロンに比して抑制性ニューロンの方が長期に亘って可塑性を維持することを見出した。これまでの電気生理学的方法では区別できなかった興奮性ニューロンと抑制性ニューロンを区別することにより明らかになったこれらの成果は高く評価できる。さらにニューロンの空間分布の解析や抑制性ニューロンの活動を光制御できるマウスの作出と解析も進めており、今後それらの成果が期待されると同時に、測定法の技術的改良と相俟って抑制性回路の実体と機能がさらに明確になる可能性が考えられる。近い将来本研究者の独創性がより明確になる単独第一著者の論文の出版が期待される。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. 著者. 発表論文タイトル. 掲載誌名. 発行年, 巻号, 始頁-終頁, その他

1. Kameyama K*, Sohya K*, Ebina T, Fukuda A, Yanagawa Y, Tsumoto T. (*:These authors equally contributed to the work.) Difference in binocularity and ocular dominance plasticity between GABAergic and excitatory cortical neurons. *The Journal of Neuroscience*. 2010 Jan 27; 30(4): P1551-1559.

2. Akaneya Y, Sohya K, Kitamura A, Kimura F, Washburn C, Zhou R, Ninan I, Tsumoto T, Ziff EB. Ephrin-A5 and EphA5 interaction induces synaptogenesis during early hippocampal development. *PLoS One*. 2010 Aug 31; 5(8):e12486.

3. Jiang B, Sohya K, Sarihi A, Yanagawa Y, Tsumoto T. Laminar-specific maturation of GABAergic transmission and susceptibility to visual deprivation are related to endocannabinoid sensitivity in mouse visual cortex. *J Neurosci*. 2010 Oct 20; 30(42): P14261-14272.

4. Takahashi H, Katayama K, Sohya K, Miyamoto H, Prasad T, Matsumoto Y, Ota M, Yasuda H, Tsumoto T, Aruga J, Craig AM. Selective control of inhibitory synapse development by Slitrk3-PTPδ trans-synaptic interaction. *Nat Neurosci*. 2012 Jan 29; 15(3): P389-398, S1-2.

5. Sarihi A, Mirnajafi-Zadeh J, Jiang B, Sohya K, Safari MS, Arami MK, Yanagawa Y, Tsumoto T. Cell type-specific, presynaptic LTP of inhibitory synapses on fast-spiking GABAergic neurons in the mouse visual cortex. *J Neurosci*. 2012 Sep 19; 32(38): P13189-13199.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果

主要な学会発表

1. Kazuhiro Sohya, Katsuro Kameyama, Teppei Ebina, Yuchio Yanagawa, Tadaharu Tsumoto

Differences in binocular responsiveness and ocular dominance plasticity between excitatory

and GABAergic neurons in the mouse visual cortex. The 32th Annual Meeting of the Japan

Neuroscience Society, 2009, O2-J2-1, Nagoya, Japan

2. Bin Jiang, Kazuhiro Sohya, A Sarihi, Yuchio Yanagawa, Tadaharu Tsumoto

Maturation of perisomatic inhibition is laminar-specific in visual cortex. The 32th Annual

Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2009, O3-I2-4, Nagoya, Japan



3. 惣谷和広、亀山克郎、蝦名鉄平、柳川右千夫、津本忠治

二光子機能的カルシウムイメージング法で明らかとなったマウス大脳視覚野興奮性ニューロンとGABAニューロンの両眼反応性および眼優位可塑性の違い。包括脳夏のワークショップ、2010 年、札幌

4. Teppei Ebina, Kazuhiro Sohya, Yuchio Yanagawa, Tadaharu Tsumoto

Three-dimensional clusters of functional GABAergic neurons in the mouse visual cortex.

The 33th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2010, P1-h16, Kobe, Japan

5. Rie Kimura, Kazuhiro Sohya, Teppei Ebina, Yoshikazu Isomura, Yuchio Yanagawa, Hideyuki

Cateau, Tadaharu Tsumoto

Response properties of GABAergic and excitatory neurons in visual cortex of awake rats,

revealed by two-photon functional calcium imaging. The 33th Annual Meeting of the Japan

Neuroscience Society, 2010, P3-i01, Kobe, Japan

6. 惣谷和広

二光子励起機能的 Ca^{2+} イメージング法を用いた大脳皮質視覚野神経回路網の解析。第一回睡眠研究会、2011 年、岡崎

7. Masoumeh Kourosh Arami, Abdorahman Sarihi, Bin Jiang, Kazuhiro Sohya, Tadaharu

Tsumoto

Homosynaptic LTP and heterosynaptic LTD in layer VI of the mouse visual cortex induced by white matter or layer II/III stimulation. The 34th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2011, P2-a20, Yokohama, Japan

8. Teppei Ebina, Kazuhiro Sohya, Rui Kimura, Yin Shu-Ting, Hirofumi Ozeki, Yuchio Yanagawa ,

Hiroshi Kameda, Takeshi Kaneko, Tadaharu Tsumoto

Three-dimensional analysis of visually responsive Parvalbumin-positive neurons in the mouse

visual cortex. The 34th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2011, O3-I-4-3,

Yokohama, Japan

9. Abdolrahman Sarihi, Javad Mirnajafi-Zadeh, Bin Jiang, Kazuhiro Sohya, Yuchio Yanagawa,

Tadaharu Tsumoto

Mechanism underlying LTP of inhibitory synapses to GABAergic neurons in layer II/III of the

mouse visual cortex. The 34th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society,



2011,

P4-C14, Yokohama, Japan

10. 惣谷和広

二光子励起機能的カルシウムイメージング法を用いた大脳皮質視覚野神経回路網の解析。

第 37 回日本睡眠学会定期学術集会、2012 年、横浜

11. Rui Kimura, Kazuhiro Sohya, Hirofumi Ozeki, Teppei Ebina, Yuchio Yanagawa,
Tadaharu

Tsumoto

Comparison of neural activity in the visual cortex of rats between in awake and
anesthetized

conditions by two-photon functional imaging. The 35th Annual Meeting of the

Japan Neuroscience Society, 2012, P1-e29, Nagoya, Japan

12. Masoumeh kourosh Arami, Abdolrahman Sarihi, Bin Jiang, Kazuhiro Sohya,
Shu-Ting Yin,

Tadaharu Tsumoto

Long-term synaptic plasticity at cortico-geniculate projection neurons in layer VI of
the

mouse visual cortex. The 35th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society,
2012,

P4-b15, Nagoya, Japan

著作物

1. 惣谷和広、蝦名鉄平、津本忠治. *in vivo* 2 光子励起機能的カルシウムイメージング法によ
って見えてきた大脳皮質視覚野抑制性ニューロンと興奮性ニューロンの特徴選択性および可
塑性の違い. *生物物理*. 2012 June; 52(3): P126-131.

研究報告書

「脳神経地図の形成と認識を司る分子基盤解明」

研究タイプ： 通常型

研究期間： 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研究者： 千原 崇裕

1. 研究のねらい

神経細胞は「軸索」「樹状突起」、双方の突起を正確に配線し、シナプス結合を形成することにより機能的な神経回路を形成する。脳のように極度に複雑な神経回路も、1つ1つの神経細胞レベルで観察するとこのような単純な神経接続の集合にすぎない。しかし、脳は限られた数の神経細胞で莫大な量の神経情報を統合・処理・収納するために、シナプス形成領域の「脳内における空間的配置」をも巧みに利用しており、これによって更に情報処理能力を向上させている。このような個々の神経細胞が神経組織でとるシナプス形成場の脳内配置様式を「神経地図」と呼ぶ。機能的な神経回路網の基本原理解明には、「神経地図」の発生機構の理解が必須となる。しかし、これまでの神経地図、回路に関する研究は、「複数の神経が集団として軸索ガイダンスやシナプス形成を行う系」、あるいは「単一細胞を神経組織から解離した状態での現象に関するもの」であり、生体組織としての神経地図、回路形成研究は殆ど行われていない。このような状況を鑑み本研究では、ショウジョウバエの遺伝学的モザイク解析法を活用することにより、脳内1細胞レベルの解像度で「神経地図」発生の分子機構解明を目指す。脳内「神経地図」のモデル系としては「ショウジョウバエ嗅覚系一次中枢：触角葉」を採用する。ショウジョウバエのゲノム情報・遺伝学的手法を最大限に駆使することによって、発生過程におけるすべての触角葉構成神経（前シナプス神経、後シナプス神経、介在神経）の遺伝子型を時空間的に操作し、神経細胞それぞれの樹状突起と軸索が相互依存・相互作用しながら自己組織的に神経地図・神経回路を形成する過程の分子機構を明らかにする。

2. 研究成果

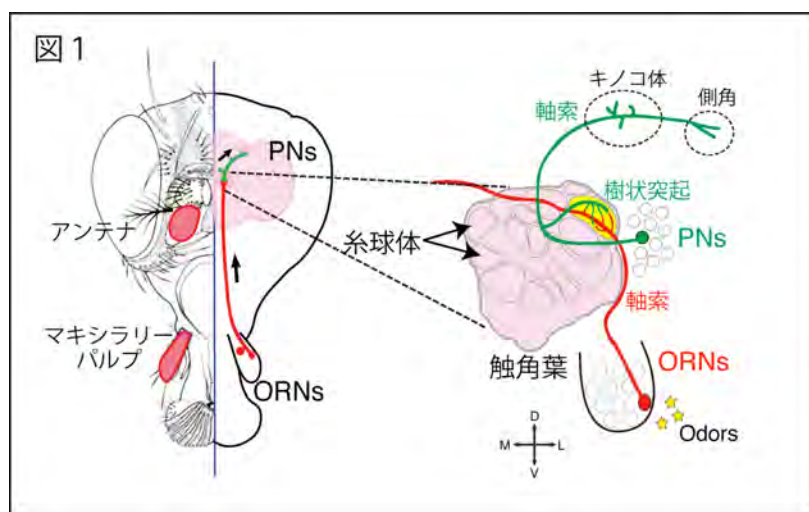
(1)概要

神経細胞は、軸索、樹状突起を伸長し、分岐させ、最終的にシナプスを形成する接続相手を探し出す（ターゲティング）。脳の中では何万、何億もの神経細胞のそれぞれがこのようなステップを介して神経回路を形成しているが、その分子機構に関しては未だ不明な点が多い。今回私は、ショウジョウバエ脳の嗅覚一次中枢：触角葉神経回路（嗅覚系一次神経と二次神経）をモデル系として、神経回路形成に関わる分子基盤の解明を試みた。進化的に保存された分子「Meigo」と「Dogi」の分子機能を明らかにする過程で、① 樹状突起ターゲティング・形態形成における「小胞体ストレスと糖鎖修飾」の重要性、② 軸索伸長過程における「細胞内初期エンドソームの成熟」の必要性を生体内で示すことに成功した。これらの研究成果は、個々の分子の機能特性を明らかにしたのみならず、脳内神経回路が形成される過程において各神経細胞内で起きている分子動態、及びその制御機構を理解するのに有用な知見を与える。以下に結果の詳細を記す。

(2) 詳細

1) 神経突起伸長・ターゲティング・神経形態形成を生体内で解析できるモデルシステムとしての「ショウジョウバエ嗅覚系一次中枢: 触角葉回路」

私は、脳神経回路を構成する軸索・樹状突起の伸長、分岐、ターゲティングの分子機構を解明する目的でショウジョウバエ嗅覚系一次中枢である「触角葉」神経回路を利用した。外界からの匂い情報は、まず嗅覚受容体神経 (Olfactory Receptor Neuron: ORN) で受容される。ORNはその軸索を触角葉内に約50個存在するシナプス構造「糸球体」へ投射し、そこで二次神経である投射神経 (Projection Neuron: PN) の樹状突起とシナプスを形成する。PNは更にその軸索を高次嗅覚中枢であるキノコ体や側角へ投射する。この神経回路の最も大きな特徴として、ORN軸索とPN樹状突起の間における「1対1」のシナプス接続が挙げられる。ORNは、発現する嗅覚受容体の種類によって約50種類に分けられ、それぞれ異なる種類のORNは触角葉内の異なる糸球体へと軸索を投射する。これに対応するように、PN樹状突起もそれぞれの糸球体に特異的に投射することが知られている。このようにORN軸索、PN樹状突起がそれぞれ特異的な糸球体へ投射しシナプスを形成することにより特徴的な「1(種類)対1(種類)」のシナプス結合を実現している(図1右)。更に、遺伝学的モザイク法(MARCM法)を適応することにより、生体内の1細胞をラベルし、更に「そのラベルされた細胞」のみを突然変異ホモ接合体にすることが可能になる。この方法により、脳内において1つの神経細胞の樹状突起・軸索の形態を詳細に解析する事が可能に



なる。このように定性・定量的な解析、及び脳内における単一細胞モザイク解析が可能なORN-PN神経回路は、神経回路形成を研究する上で非常に有用なモデル系となる。

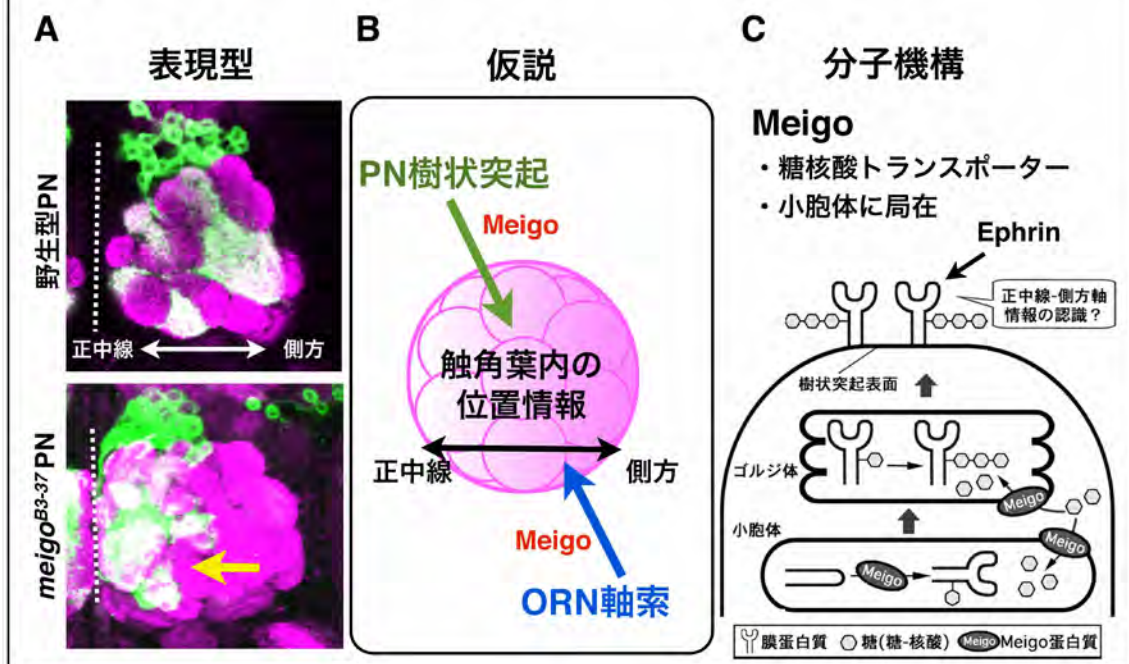
私は、遺伝学的モザイクスクリーニングを行い、樹状突起ターゲティングに異常を示す変異

体 *meigo* (*medial glomeruli*) 及び *dogi* (*doubled glomeruli*) の取得に成功していた。よって、これら変異体の解析を進めることによって触角葉神経回路を構成する神経突起の伸長、分岐、ターゲティングに関する分子機構解明を試みた。

2) 小胞体ストレス関連分子 Meigo は、Ephrin の糖鎖修飾を制御し、ORN 軸索、PN 樹状突起のターゲティングを制御する

MARCM 法により PN を *meigo* 変異ホモ接合体にした場合(*meigo*⁺ PN)、その樹状突起はすべて正中線側へシフトした(図 2A)。更に *meigo*⁺ ORN を作成した場合も、ORN 軸索は正中線側へシフトした。これらの結果から「触角葉内には正中線・側方軸方向の軸情報があり、ORN 軸索、PN 樹状突起はそれら位置情報を利用して最終的な糸球体を選び出していること」、及び

図2

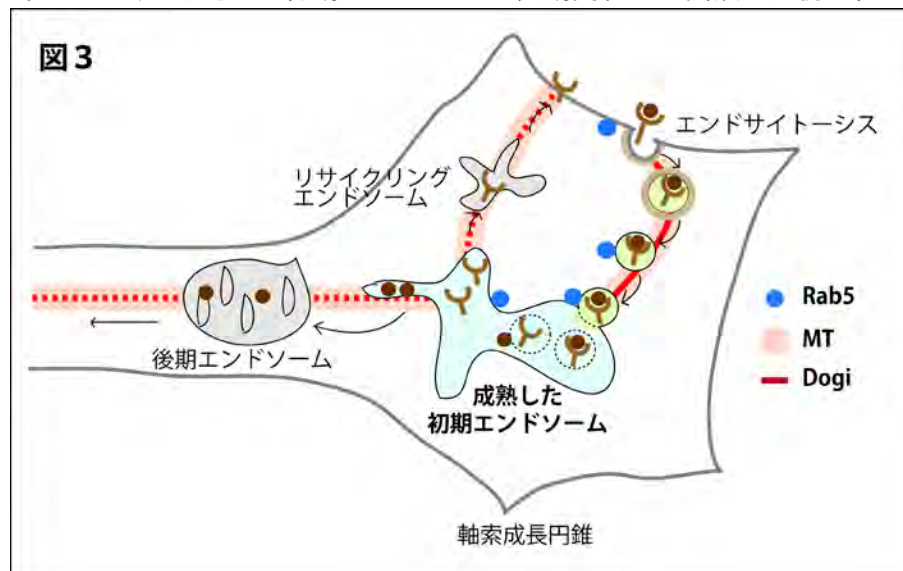


「*meigo*⁺神経細胞では、この位置情報認識に異常があること」が想定される(図 2B)。*meigo* 変異の原因遺伝子は、小胞体中存在する糖核酸トランスポーター様分子であり、小胞体ストレスによって発現誘導される。私は「Meigo は、小胞体において神経突起ターゲティングに必要な膜分子の修飾に影響し、その結果として神経突起ターゲティング制御に関わっている」と仮説を立て、*meigo* 変異と遺伝学的に相互作用する細胞膜表面分子を検索した。その結果、PN 樹状突起ターゲティングに関して *meigo* 変異と強く遺伝学的相互作用する因子として Ephrin を見出した。更に、遺伝学的・生化学的解析を進めた結果、① Ephrin は 4 カ所で N 型糖鎖修飾を受けること、② Ephrin 上の N 型糖鎖修飾は Ephrin の機能発揮に必要であること、③ Meigo の量に対応して、Ephrin N 型糖鎖修飾の程度が変化すること、を見出した。すなわち、小胞体膜上に存在する Meigo は、Ephrin の N 型糖鎖修飾を介して Ephrin の機能を調節し、神経回路形成に寄与していることが明らかになった(図 2C)。これまで Ephrin の糖鎖修飾に関してその可能性は示唆されていたものの、生化学的・遺伝学的検証を行われておらず、今回の研究結果は、Ephrin 機能に対する新たな制御機構を提示するものである(*Nat Neurosci*,2013)。

3) 軸索突起の伸長には、Dogi-Dynactin 複合体を介した初期エンドソームの輸送・成熟が必要である

dogi⁺ PN は、「樹状突起の過剰な分岐」、及び「軸索長の短縮」という表現型を示す。*dogi* 変異の責任遺伝子 *dogi* がコードする蛋白質は、進化的に高度に保存されているにも関わらず、既知の機能ドメインを持たないため蛋白質構造からの機能予測は困難であった。Dogi の分子機能を明らかにする目的で Dogi に対する Yeast Two-Hybrid スクリーニングを行ったところ、Glued を見出した。Glued は、p120^{Glued} のショウジョウバエオソログであり、Dynein モーター蛋白質を制御する Dynactin 複合体の重要なサブユニットの1つである。事実、*dogi*⁺ PN 内ではシナプトタグミンの輸送に異常が見られ、軸索中間部にシナプトタグミン蛋白質の異常蓄積が観察された。ま

た軸索突起伸長に関して、*dogi* 変異と *Glued* 変異は強く遺伝学的相互作用を示した。では、*dogi*⁺ PN 内では、どのような物質輸送が異常になった結果、軸索伸長異常が起きているのだろうか？私は以下に示す理由に基づいて、「初期エンドソームの輸送異常」が結果的に軸索突起伸長に影響を与えているとの仮説を立てた。まず、第一の理由として、軸索突起伸長に必要な膜受容体の活性化にはエンドサイトーシスによる膜受容体の取り込みが必要であることが知られている。第二に、初期エンドソームの適切な輸送は、樹状突起の形態形成に必要であるという報告もある。よって次に、*Dogi* が初期エンドソームに与える影響を解析する目的で、S2 細胞で *dogi* をノックダウンし、様々な初期エンドソームマーカーを調べた。その結果、*dogi* ノックダウン細胞では、エンドサイトーシス自体は起こるものの、その後の初期エンドソームの輸送異常、形態異常が検出された。一般に初期エンドソームは、細胞膜近傍に形成された後、Dynein 依存的な輸送により細胞核近傍まで輸送され、その過程で融合を繰り返し成熟初期エンドソームになる(図 3)。しかし、*dogi* ノックダウン細胞では、形成された初期エンドソームは長期間細胞形質膜の近傍に留まり、またそれらエンドソームのサイズは小さかった。すなわち、*dogi* ノックダウン細胞では、初期エンドソームの成熟過程が異常になっていることが明らかになった。次に、初期エンドソーム成熟異常が軸索伸長に影響している



かを調べる目的で、初期エンドソームの融合・成熟を制御する Rab5 の活性化型を *dogi*⁺ PN に発現させ軸索の長さを定量した。その結果、活性化型 Rab5 発現 *dogi*⁺ PN の軸索は、活性化型 Rab5 を発現していない *dogi*⁺ PN に比べて、顕著に伸長していた。以上の結果は、進化的に保存された機能未知蛋白質 *Dogi* による軸索伸長制御機構を提示すると同時に、軸索突起伸長における初期エンドソーム成熟の重要性を示す初めての結果である(図 3)(論文投稿中)。

3. 今後の展開

今回の研究により、ショウジョウバエ嗅覚一次中枢を構成する触角葉神経回路において、ORN 軸索と PN 樹状突起が触角葉内の適切な糸球体でシナプス接合するためには *Meigo* 依存的な *Ephrin* の機能調節が必要であることが明らかになった。しかし、*meigo* と *ephrin* の変異体表現型から、*Meigo* が機能調節する蛋白質は *Ephrin* だけではないことが予想される。今後は、*Ephrin* 以外のどのような蛋白質が *Meigo* によって機能調節されているか、そしてそれらがどのように神経突起ターゲティングに関わっているか解析を進めていく。

Dogi による軸索突起伸長の制御には、初期エンドソーム成熟が関わっていることが明らかになった。一方、Dogi による樹状突起分岐制御に関する分子機構は未だ不明である。今後は、樹状突起における Dogi の役割についても解析を進める。更に、Dogi の解析過程で Dogi はシナプス部位にも局在していることを見出している。よって、神経回路形成の後の「シナプス形成時における Dogi の役割」についても解析を進める。

本研究結果により、Ephrin/Eph システムが神経地図形成に重要な機能を担っている可能性を示唆された。その後の研究により、Ephrin/Eph システムが神経地図の発生、雌雄差、進化などにも関わっていることが分かってきている(研究者未発表)。今後は、Ephrin/Eph と神経地図の関係についても精力的に研究を進め、神経地図発生の理解を深めていく。

4. 自己評価

今回得られた研究結果は、神経地図の発生を理解する上で有用である。神経地図とは、神経樹状突起、軸索が脳内の特定の部位にシナプス領域を形成することによって生じる。神経地図形成のモデルシステムとして利用する「触角葉」において機能している分子 (Meigo, Dogi, Ephrin)を知り、その発生様式の素過程(触角葉内における軸情報の存在など)を理解することは、今後、神経地図発生の理解を進めていく上で避けては通れないステップである。よって本研究は、今後の神経地図発生研究において重要な礎を築いたと言える。なお、上記研究結果に関して論文1報(責任著者)の発表が確定し、更に論文2報を責任著者として国際科学雑誌に投稿済み・審査中である。

5. 研究総括の見解

神経回路を構成するシナプスの形成場はその神経組織の細胞群の遺伝子発現による規定を受ける。個々の神経細胞レベルでの遺伝子操作が容易なショウジョウバエの一次嗅覚中枢(触角葉)に着目して、先に見出した神経投射異常に関わる2個の分子 Meigo と Dogi の解析を行った。*meigo* 変異の原因遺伝子は、小胞体に存在する糖核酸トランスポーター様分子であるため、Meigo は、小胞体において神経突起ターゲティングに必要な膜分子の修飾に影響し、その結果として神経突起ターゲティング制御に関わっているとの仮説のもとに、*meigo* 変異と遺伝学的に相互作用する細胞膜表面分子として軸索ガイダンス因子のひとつである Ephrin を見出した。一方 Dogi についてはその結合相手が軸索輸送に関わる Glued であることを発見して、実際にモデル細胞で Dogi のノックダウンによる初期エンドソーム輸送の異常を観察することに成功した。これらは、正確な神経投射には初期エンドソームの輸送・成熟が必要であることを明らかにした最初の結果であり、高く評価される。また、世界的にも高く評価され、論文が受理された。今後これらの分子機構の解明が進むとともに、特異的シナプス形成との関連についても進展が期待される。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

Sayaka Sekine, Shuka Haraguchi, Chao Kinhong, Tomoko Kato, Liqun Luo, Masayuki Miura and Takahiro Chihara. Meigo governs dendrite targeting specificity by modulating Ephrin level and *N*-glycosylation. *Nat Neurosci* 16, 683-691 (2013)

(2) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

Takahiro Chihara “脳内単一脳細胞モザイク解析法を用いて神経回路形成を理解する”、Symposium on “Biological Sciences” at Kumamoto University, Oct 16th, 2009, Kumamoto, Japan(口頭発表)

Sayaka Sekine, Liqun Luo, Masayuki Miura and Takahiro Chihara, “Dendritic and axonal targeting along medial to lateral axis in the antennal lobe are regulated by Meigo, a putative UDP-sugar transporter”, The 51st Annual *Drosophila* Research Conference, April 7th-11th, 2010, Washington DC, USA(ポスター発表)

Chisako Ando, Liqun Luo, Masayuki Miura and Takahiro Chihara, “Neuronal wiring in the olfactory system requires a novel targeting molecule, Dogi”, The 13th European *Drosophila* neurobiology conference, Sep 1st-5th, 2010, Manchester, UK(ポスター発表)

Sayaka Sekine, Liang Liang, Miki Hino-Yamamoto, Satoshi Goto, Hideyuki Okano, Liqun Luo, Masayuki Miura and Takahiro Chihara, “Nucleotide sugar transporter Meigo regulates both dendrite and axon targeting of synaptic partners through Ephrin signaling in the olfactory system”, 53rd Annual *Drosophila* Research Conference, March 7th-11th, 2012 Chicago, USA(ポスター発表)

Takahiro Chihara “ER homeostasis and vesicle trafficking for the olfactory wiring specificity in *Drosophila*” 45rd Annual meeting for the Japanese society of developmental biologists & The 64th annual meeting of the Japan society for cell society, May 30th, 2012, Kobe (口頭発表)

Chisako Sakuma, Vladimir I. Gelfand, Liqun Luo, Masayuki Miura and Takahiro Chihara “Neurite branching and elongation are regulated by Dogi, a novel microtubule interacting protein”, 14th European *Drosophila* Neurobiology Conference, Sep 3rd-7th, 2012, Padua, Italy (ポスター発表)

研究報告書

「小脳のシナプス刈り込みと機能的神経回路形成の機構解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研究者: 橋本浩一

1. 研究のねらい

子供は大人に比べて、言語の習得やある種の運動技能の習得を容易に行うことができることはよく知られている。最近の研究から、生後発達期に起こるある種の感覚機能の成熟や運動機能の獲得に、神経回路の柔軟性が重要な働きをしていることが明らかになってきた。脳が正しく機能するためには、神経細胞が「適切な標的」に「適切な強度・適切な数」のシナプス結合を形成することが必要不可欠であるが、生まれた時すでに精緻、かつ機能的な神経回路が出来上がっている訳ではない。誕生直後の動物の神経回路には、成熟動物に比べて過剰なシナプス結合が存在し、機能的にも未成熟な状態にある。生後発達の過程でこれらの過剰な結合の中から、機能的に必要なものが強化され、不必要なものが除去されていくことにより、次第に機能的な神経回路が形成されていく(生後発達期シナプスの刈り込み)。シナプスの刈り込みが正常に起こるためには、神経細胞が周りの環境などの刺激を受けて、電気的に活動することが必須であることが知られている。しかし、神経細胞の電気活動が、どのような分子メカニズムを介してシナプスの刈り込みを制御しているのか、という点はほとんど明らかになっていない。

本研究では、生後発達期の小脳登上線維—プルキンエ細胞シナプスで見られる“刈り込み”をモデル実験系として用い、中枢神経系のシナプス刈り込みの機序の解明を目的として解析を行った。成熟げっ歯類のプルキンエ細胞は 1 本の登上線維によってのみ支配されている(図 1、“成熟時”)が、誕生直後のプルキンエ細胞は、比較的同等のシナプス強度を持った複数の登上線維により多重支配されている(図 1、“生後 3 日”)。その後、過剰なシナプスが刈り込まれて、マウス・ラットでは生後 3 週目までに 1 本支配に移行する。本研究では特に生後 1 週目に起こる、多数の候補シナプスの中から特定の 1 本が選択強化されるプロセス(登上線維の機能分化、図 1)に着目し、この過程の神経活動依存性や、関与する分子メカニズムの解析を行った。

2. 研究成果

(1) 概要

我々のこれまでの研究から、小脳登上線維—プルキンエ細胞シナプスの生後発達変化は以下のようなプロセスをたどることが分かっている。生後すぐのプルキンエ細胞の細胞体は、同じようなシナプス強度を持った複数の登上線維により多重支配されている。生後 7 日前後までに、その中から 1 本の登上線維が細胞体上で選択的に強化される(機能分化)。その後、強化された登上線維は、生後 9 日目前後からプルキンエ細胞の樹状突起に移行する(translocation)。それ以外の登上線維は細胞体に残存しており、メカニズムの異なる 2 つの

シナプス除去プロセス(前期除去過程・後期除去過程)を経て除去され、最終的に大人型の単一支配に移行する。

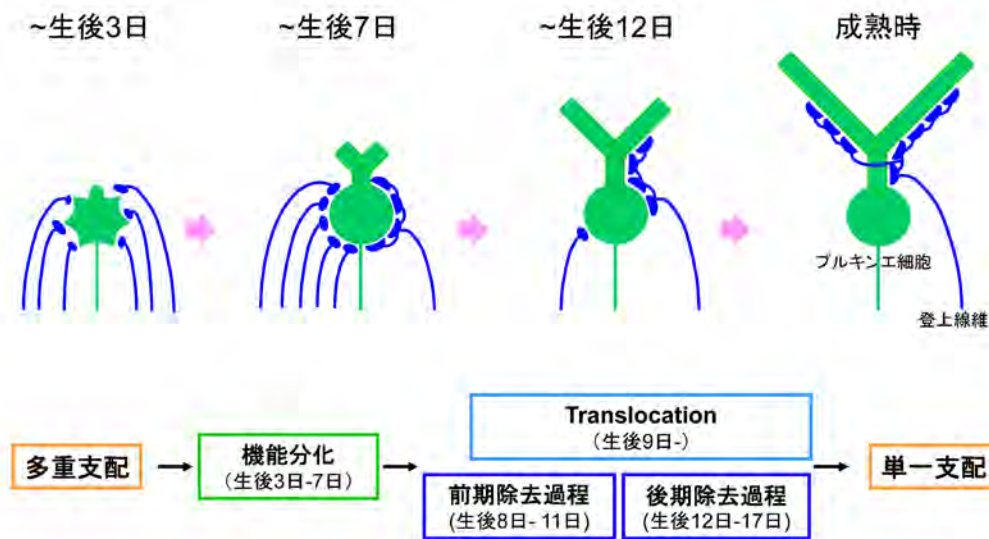


図 1、登上線維-プルキンエ細胞シナプスの生後発達

本実験において私達は、シナプスの刈り込みの際に必要な神経回路の選別・除去のプロセスに働く因子として、P/Q 型電位依存性カルシウムチャネル(以下、P/Q チャネル)に注目し、解析を行った。電位依存性カルシウムチャネルは細胞膜で神経細胞の電気活動を検知して開口し、細胞の中にカルシウムイオンの流入を引き起こす働きを持っている。よって神経活動をモニターし、その履歴を細胞内のシグナル伝達系に変換するメカニズムとして働くことが期待される。P/Q チャネルのノックアウトマウスにおいて、上記のどのプロセスの、どのような側面が障害されるかを解析した結果、登上線維の機能分化と、前期シナプス除去過程に強い障害が見られることが分かった。また、プルキンエ細胞選択的に Cav2.1 を欠損させたマウスにおいても上記と同様の結果が得られた。これらの結果は、シナプス後部に存在する P/Q チャネルが、最終的に残存する一本の登上線維の選別と、前期シナプス除去過程に必須であることを示している。

(2) 詳細

(1) Cav2.1 ノックアウトマウスの解析

P/Q チャネルのシナプス刈り込みにおける機序を明らかにするため、その主要なサブユニットである、Cav2.1 が全身の細胞から欠損したノックアウトマウス(KO)を解析した。この KO マウスは生後 4 週目までは生存しており、P/Q チャネルの機能が完全に消失していることがすでに確認されている。野生型、及び Cav2.1KO の小脳から急性スライスを作成し、スライス上のプルキンエ細胞からホールセル記録を行った。入力する登上線維を電気刺激して登上線維由来の興奮性シナプス後電流(EPSC)を記録した。登上線維 EPSC は通常のシナプス応答に比べて振幅が大きい為、電気刺激することにより登上線維を 1 本 1 本区別して数えることができる。この性質を利用して、刺激強度を徐々に変化させることにより投射している登上線維の本数を解析する実験を行った。

生後すぐの野生型マウスのプルキンエ細胞は、比較的同等なシナプス強度を持った複数の弱い登上線維により多重支配を受けている(図 2 左)。この生後発達初期の登上線維シナプス形成には、野生型マウスと Cav2.1 KO マウスの間に差は見られなかった。その後、野生型マウスでは、生後 7 日齢までの間に将来プルキンエ細胞を支配することになる 1 本の登上線維 EPSC の選択的強化が起こる(図 2 右上)。引き続き生後 8 日から生後 12 日にかけて、前期除去過程が起こって投射している登上線維の本数が減少する。一方、Cav2.1 KO マウスでは、生後 7 日目までに起こる 1 本の登上線維の選択的強化が正常に起こらず、複数の登上線維 EPSC が非選択的に強化されていた(図 2 右下)。また、引き続いて起こるはずの、前期シナプス除去過程も障害されていた。このことは、

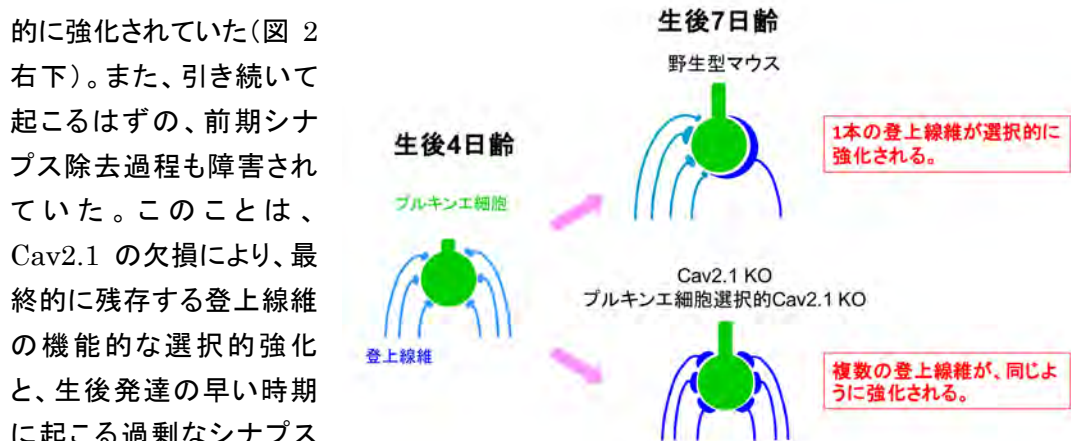


図 2、Cav2.1 遺伝子組み換えマウスの解析

(2)プルキンエ細胞選択的 Cav2.1 KO マウスの解析

P/Q チャネルはシナプス後部のプルキンエ細胞に多く存在することが分かっているが、シナプス前終末である登上線維や平行線維にも存在しており、シナプス伝達などに重要な働きをしている。よって、全身の遺伝子が欠損したマウスの解析からは、どの脳部位の P/Q チャネルがシナプス刈り込みに重要な働きをしているのか、を明らかにすることはできない。そこで、小脳のプルキンエ細胞でのみ Cav2.1 が欠損するマウスを作成し、シナプス後部の神経細胞に存在する P/Q チャネルが登上線維の生後発達に果たす役割を解析した。

プルキンエ細胞から Cav2.1 を選択的に欠損する為、Cre-lox システムを用いた。まず、Cav2.1 の 4 番目の exon が lox 配列ではさまれたマウスを作成した。その後、プルキンエ細胞で特異的な発現が見られるグルタミン酸受容体 $\delta 2$ サブユニットの遺伝子座に Cre が挿入されたマウスと掛け合わせて、プルキンエ細胞特異的な KO マウスを作成した。作成されたプルキンエ細胞選択的 Cav2.1 KO マウスは、成体まで成長し妊娠も可能であったが、強い運動失調を示した。このマウスにおいて、In situ hybridization および電気生理学的解析を行い、登上線維の機能分化が開始する前の生後 2 日目の段階ですでにプルキンエ細胞から Cav2.1 が欠損していることを確認した。一方、登上線維のシナプス伝達に関わる P/Q チャネルは正常であった。

プルキンエ細胞選択的 Cav2.1 KO マウスにおいて、Cav2.1 KO マウスで行われたものと同様の実験を行い、登上線維の発達過程の異常の有無を解析した。その結果、プルキンエ細胞選択的 Cav2.1 KO マウスにおいても、生後 1 週目までに起こる登上線維の選択的強化

と、前期シナプス除去過程に障害が見られることが分かった(図 2 右下)。この結果は、Cav2.1 KO マウスで見られた登上線維の生後発達の異常は、ほぼシナプス後部のプルキンエ細胞にある Cav2.1 の欠損によって引き起こされていることを示している(論文 1)。

(3) 考察

これら結果は、シナプス後部の神経細胞(プルキンエ細胞)に存在する P/Q チャネルが、生後発達初期の神経回路で起こる、機能的に必要なシナプスを選別して強化するプロセス、および不必要なシナプスを除去するプロセスに必須であることを示唆している。また本研究は、“シナプスを強化する機構”と、“その強化をあるシナプスに集中する機構”を司るメカニズムは異なっていることを示唆している。Cav2.1 の遺伝子組み換えマウスでは、登上線維 EPSC の発達が完全に止まっている訳ではなく、シナプス応答の強さは野生型並みに強化されていた。ただ、野生型マウスではその強化が 1 本の登上線維に集中していたのに対し、Cav2.1 組み換えマウスでは複数の登上線維が非選択的に強化されていた。このことは、P/Q チャネルの活動が、シナプスを強化する何らかのメカニズム(栄養因子?)を特定のシナプスに集中的に配分する機能を持っていることを示唆している。

3. 今後の展開

生後発達期に起こる神経回路の再編成は、神経活動に強く依存することはよく知られているが、神経活動がどのような機序により必要なシナプスとそうでないシナプスを選別しているのか、という点についてはほとんど明らかになっていない。

登上線維—プルキンエ細胞シナプスの再編成においてもこの点は不明であったが、本研究により、シナプス後部に存在する P/Q 型電位依存性カルシウムチャネルがその過程に重要な働きをすることが明らかになった。電位依存性カルシウムチャネルは神経活動により活性化して細胞内にカルシウム濃度の上昇を引き起こすため、“神経活動の履歴を細胞内のシグナル伝達系に変換する機構”として働いている可能性が考えられる。よって今後の展開としては、P/Q チャネル以降に、細胞内で活性化される因子の解明を進める必要がある。候補としては、細胞内カルシウム上昇によって活性化される細胞内因子の関与が予想されるが、現在の所詳細は不明である。また、P/Q チャネルなどの活動を指標に、最終的に形態学的に除去されるシナプスと残存するシナプスを標識する機構や、標識を基に強化や除去を進めるメカニズムの存在も予想される。これらの機構についても解明を進める必要があると思われる。

本研究から直ちにシナプス再編成の原理が明らかになったとはいえないが、今回の解析は、神経活動が回路の再編成に影響を与える機構について、重要な手がかりを提供してくれると考えている。今後は、さらに生後発達初期に働く因子の解明を推し進め、生後発達期神経回路の再編成に働く因子の全貌を明らかにしていきたいと考えている。

4. 自己評価

本研究領域では、脳を構成する神経回路の形成やその動作原理ならびにその制御機構の解明を進めることが主たる研究目的となっている。本研究成果は、これらのうち神経回路の形

成のメカニズムを明らかにするという点で貢献できたと考えている。

5. 研究総括の見解

中枢神経系の回路形成においてはターゲット細胞に対して一旦過剰なシナプスが形成され、成熟にしたがって特定の入力を選択強化されること(刈り込み)が知られているが、その分子機構についてはよく分かっていない。本研究では、マウス小脳の登上線維-プルキンエ細胞間のシナプスで電位依存性カルシウムチャンネルに着目し、電気生理学的方法によって入力の数数を数え上げて、カルシウムチャンネルサブユニット欠損系統と野生型を比較しながら生後発達を解析することにより、このチャンネルが入力の選択的強化とシナプス除去に必須であることを見出した。さらに、プルキンエ細胞特異的にこのカルシウムチャンネルを欠損させたマウス系統を作出して同様の症状を観察し、シナプス後部に発現するチャンネルがこの刈り込みに重要であることを証明した。発達に伴う神経回路再編成の分子機構の一端を精度の高い実験によって明らかにした優れた研究である。今後細胞内カルシウム上昇の下流の分子機構の解析も進展し、また他の細胞が関わる刈り込みのメカニズムにも解析が展開することが期待される。

6. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Hashimoto, K., Tsujita, M., Miyazaki, T., Kitamura, K., Yamazaki, M., Shin, H.S., Watanabe, M., Sakimura, K. & *Kano, M Postsynaptic P/Q-type Ca^{2+} channels in cerebellar Purkinje cells mediate synaptic competition among multiple climbing fiber inputs during postnatal development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 108, 9987-9992 (2011)
2. Nakayama, H., Miyazaki, T., Kitamura, K., Hashimoto, K., Yanagawa, Y., Obata, K., Sakimura, K., Watanabe, M. & Kano, M. GABAergic inhibition regulates developmental synapse elimination in the cerebellum. *Neuron* 74, 384-396 (2012)
3. Ichikawa, R., Yamasaki, M., Miyazaki, T., Konno, K., Hashimoto, K., Tatsumi, H., Inoue, Y., Kano, M. & Watanabe, M. Developmental switching of perisomatic innervation from climbing fibers to Basket cell fibers in cerebellar Purkinje cells. *J. Neurosci.* 31, 16916-16927 (2011)
4. Miyazaki, T., Yamasaki, M., Hashimoto, K., Yamazaki, M., Abe, M., Usui, H., Kano, M., Sakimura, K. & Watanabe, M. Cav2.1 in cerebellar Purkinje cells regulates competitive excitatory synaptic wiring, cell survival, and cerebellar biochemical compartmentalization. *J. Neurosci.* 32, 1311-1328 (2012)
5. Uesaka, N., Mikuni, T., Hashimoto, K., Hirai, H., Sakimura, K. & Kano, M. Organotypic coculture preparation for the study of developmental synapse

elimination in mammalian brain. *J. Neurosci.* 32, 11657-11670 (2012)

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

1. 橋本 浩一、辻田 実加、宮崎 太輔、山崎 真弥、喜多村 和郎、Hee-Sup Shin、渡辺 雅彦、崎村 建司、狩野 方伸:「小脳登上線維-プルキンエ細胞シナプスの生後発達における P/Q 型電位依存性カルシウムチャネルの役割」、第 87 回 日本生理学会大会、2010 年 5 月 21 日、盛岡
2. 橋本 浩一、辻田 実加、喜多村 和郎、宮崎 太輔、山崎 真弥、Hee-Sup Shin、渡辺 雅彦、崎村 建司、狩野 方伸:「登上線維の発達過程における P/Q 型電位依存性カルシウムチャネルの役割」、第 33 回 日本神経科学学会、2010 年 9 月 2 日～9 月 4 日、神戸
3. 橋本浩一:「生後発達期小脳における神経回路の再編成」、包括型脳科学研究推進支援ネットワーク 夏のワークショップ、2011 年 8 月 21 日(日)～24 日、神戸
4. 橋本浩一:「プルキンエ細胞選択的 Cav2.1(P/Q 型電位依存性カルシウムチャネル)ノックアウトマウスにおける登上線維-プルキンエ細胞シナプスの生後発達過程の異常」、包括型脳科学研究推進支援ネットワーク 夏のワークショップ、2011 年 8 月 21 日(日)～24 日、神戸
5. K. Hashimoto:「Postnatal refinement of the cerebellar climbing fiber to Purkinje cell synapse」、第 90 回 日本生理学会、2013 年 3 月 27 日～29 日、東京

プレスリリースに伴うメディア掲載

日本経済新聞 2011 年 5 月 31 日 「運動担う神経細胞に不可欠なたんぱく質を特定」

研究報告書

「運動・精神機能を司る大脳基底核神経回路の制御機構」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研究者: 疋田 貴俊

1. 研究のねらい

大脳基底核は運動機能のみならず、欲動、認知、社会・精神活動などの高次機能を司る。大脳基底核が障害を受けると、ハンチントン病、パーキンソン病といった運動障害を引き起こす神経難病を発症する。また、薬物依存症、統合失調症などの精神疾患や認知障害に深く関与している。大脳基底核内の主要な神経回路は線条体から黒質網様部につながる直接路と、線条体から淡蒼球を介して黒質網様部に至る間接路に大きく二分される。しかしながら、これらの回路を構成する線条体投射ニューロンは形態が同一で、混在しているために、二つの回路の制御機構の解明は遅れていた。そこで、生体において直接路と間接路を選択的に神経伝達のスイッチングを行う可逆的神経伝達阻止法を開発し、大脳基底核神経回路の制御機構とその破綻としての精神神経疾患病態を明らかにすることをねらいとした。

2. 研究成果

(1) 概要

生体において大脳基底核神経回路の直接路と間接路を選択的に神経伝達遮断/再開を行う可逆的神経伝達阻止法(RNB)を開発し、運動・精神機能を司る大脳基底核神経回路の制御機構とその破綻としての精神神経疾患病態の研究を行った。直接路遮断マウスと間接路遮断マウスの行動観察により、直接路神経伝達は報酬行動と薬物依存を支配し、一方間接路神経伝達は忌避行動と行動柔軟性に関与していることを示した。さらに、大脳基底核神経回路制御と情報統合の分子機構を解析した。

(2) 詳細

研究テーマ A 「大脳基底核神経回路の直接路と間接路のそれぞれに特異的な可逆的神経伝達阻止法の開発」

大脳基底核の直接路を構成する中型有棘細胞にはサブスタンス P (SP) が、間接路を構成する中型有棘細胞にはエンケファリン (Enk) がそれぞれ特異的に発現する。大脳基底核の2種類の神経回路に可逆的神経伝達阻止法を適応するために、それぞれのプロモーター下にテトラサイクリン反応性転写因子 tTA を挿入したリコンビナントアデノ随伴ウイルス AAV (V-S-tTA と V-E-tTA) を作製した(図 1 上)。このウイルスを、テトラサイクリン応答配列(TRE)の下流に破傷風菌毒素(TN)と GFP の融合遺伝子をつないだトランスジーンをもつ TN トランスジェニックマウスの線条体に注入した(図 1)。AAV 投与2週後より目的の神経細胞に特異的かつドキシサイクリン(DOX)依存的に破傷風菌毒素が発現するのを確認した。さらに、片側線条体にウイルスを感染させたトランスジェニックマウスの回転行動を観察した。DOX 非存在下では、直接路遮断ではウイルス投与と同側方向に、間接路遮断では反対側方向に異常回転

行動を示した。DOX を投与すると、DOX2週では異常回転行動は残るが、DOX4 週投与で消失した。これは破傷風菌毒素発現の時系列に一致した。これらの結果から RNB 法が直接路と間接路の神経伝達を特異的にかつ可逆的に遮断できていることを示した(論文 1)。

研究テーマ B「直接路と間接路の薬物依存形成での役割の解析」

直接路あるいは間接路に特異的な可逆的神経伝達遮断を行ったマウスに対して、覚せい剤あるいはコカインを全身投与し移所行動量を測定することによって、乱用薬物の急性投与による行動賦活作用における大脳基底核神経回路制御機構を解析した。線条体の直接路遮断と間接路遮断は共にメタンフェタミン投与による急性移所行動量増加を完全に抑制した。DOX 投与し神経伝達を再開するとメタンフェタミンによる移所行動量増加は再発した。側坐核の直接路遮断と間接路遮断は共にコカインによる移所行動量を抑制した。これらから乱用薬物の急性投与による行動賦活作用において、直接路と間接路は共に必須であることを示した。次にコカインを連日投与したところ、間接路遮断マウスでは野生型マウスと同様に行動感受性増加と条件付け場所嗜好性を示したのに対して、直接路遮断マウスではコカイン連日投与による行動量増感と条件付け場所嗜好性は抑制された。この結果は直接路の神経伝達が乱用薬物の慢性投与による依存形成に重要であることを示した(論文 1)。

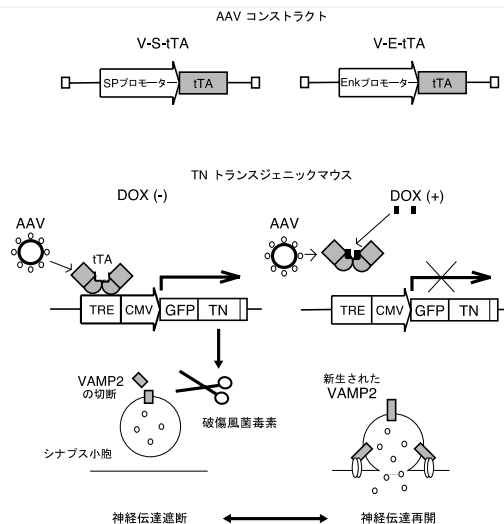


図 1. 可逆的神経伝達阻止法

研究テーマ C「報酬・忌避学習における直接路と間接路の制御機構の解析」

報酬・忌避学習における直接路あるいは間接路の神経伝達遮断の影響を調べた。チョコレートによる条件付け場所嗜好性試験では直接路遮断でのみ報酬学習が阻害されたのに対して、一試行による抑制回避試験では間接路遮断でのみ忌避学習が阻害された(図 2)。これらの結果から報酬学習には直接路の神経伝達が、忌避学習には間接路の神経伝達がそれぞれ必須であることが分かった(論文 1)。さらに、十字迷路を用いた学習課題を行うと、直接路遮断が報酬関連学習に影響を与えるのに対して、間接路遮断は逆転課題においてのみ成績が悪く、前課題の正解への固執が見られた。このことは間接路の神経伝達が、報酬行動の柔軟

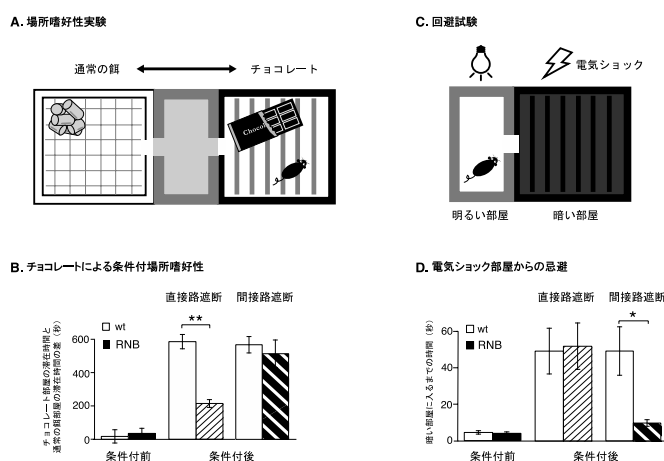


図 2. 報酬・忌避学習直接路/間接路遮断の影響

断が報酬関連学習に影響を与えるのに対して、間接路遮断は逆転課題においてのみ成績が悪く、前課題の正解への固執が見られた。このことは間接路の神経伝達が、報酬行動の柔軟

性に関与していることを示している(論文3)。これらの直接路と間接路の機能分離における制御機構を調べるために、可逆的神経伝達阻止法と薬理的処置を組み合わせる解析を進め、直接路の D1 受容体刺激が報酬学習と薬物依存形成に、間接路の D2 受容体不活化が忌避学習と学習柔軟性に関与していることを示した(論文3, 論文4)。

研究テーマ D「直接路と間接路の情報統合の分子機構の解析」

直接路と間接路の情報伝達は共に黒質網様部に入力するが、その統合された情報の処理に関わる分子メカニズムは明らかにされていない。そこで、直接路と間接路のそれぞれに特異的な可逆的神経伝達阻止法を用いて、黒質網様部における神経回路特異的な情報処理機構を解析した。コカイン連日投与による行動量増加は直接路遮断でのみ抑制され、間接路遮断では野生型マウスと同様に観察される(論文1)。そこで、直接路遮断あるいは間接路遮断を行ったマウスにコカインを投与し、黒質網様部での遺伝子発現の変化をマイクロアレイ及び定量的 PCR で解析したところ、コカインを投与した直接路遮断マウスでのみ黒質網様部での ephrinA5, EphA4, EphA5 遺伝子の発現上昇がみられた(図3)。これらの分子は黒質網様部の GABA 作動性抑制性神経細胞に共存しており、イムノアドヘジンによるこれらの分子の活性化はコカイン連日投与による行動量増加を抑制した。さらに直接路遮断時にのみコカイン投与による ephrinA5 下流シグナルの増強(黒質網様部でのリン酸化 Erk1/2 陽性細胞の増加)がみられた。以上の結果から黒質網様部の ephrinA5-EphA4/EphA5 シグナルが直接路依存的にコカインによる行動変化に関与していることを示し、薬物依存症における分子病態の一端を明らかにした(論文2)。

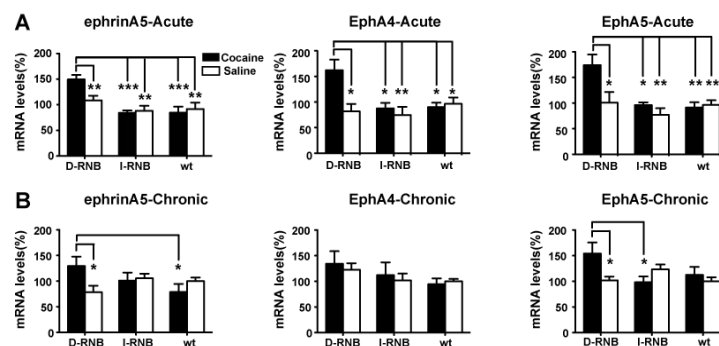


図3. (A) コカイン投与1時間後の黒質網様部における ephrinA5, EphA4, EphA5 の mRNA 量。D-RNB と I-RNB はそれぞれ直接路遮断と間接路遮断マウス群(各6匹)、wt は野生型マウス群(12匹)の平均値と標準誤差を示す。(B) コカインを5日間連日投与し、5日目のコカイン投与1時間後の黒質網様部における ephrinA5, EphA4, EphA5 の mRNA 量。各6匹の平均と標準誤差を示す。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

3. 今後の展開

大脳基底核における直接路と間接路に特異的な可逆的神経伝達阻止法を開発することによって、直接路神経伝達は報酬行動と薬物依存を支配し、一方間接路神経伝達は忌避行動と行動柔軟性に関与していることを示した。このことは、大脳基底核が関与する欲動、認知、社会・精神活動などの高次機能や、ハンチントン病、パーキンソン病、薬物依存症、統合失調

症、うつ病といった精神神経疾患の病態に直接路と間接路がそれぞれ異なる役割を担っている可能性を示唆している。さまざまな脳機能や病態における直接路と間接路の役割をさらに同定する。

薬物依存症モデルにおいて、直接路と間接路が統合される黒質網様部で神経回路特異的に ephrinA5, EphA4, EphA5 の分子変化を示したが、その分子変化がどのような神経回路特異的な機序によるものか、黒質網様部の神経細胞や局所神経回路にどのような変化を起こすことによって、コカイン誘発行動の抑制につながるのかは明らかではない。この分子機構を解析することによって薬物依存症の分子病態のさらなる解明を目指す。

4. 自己評価

直接路と間接路に特異的な可逆的神経伝達阻止法を開発することによって、特に報酬・忌避行動における大脳基底核神経回路制御機構を解明することができた。さらに薬物依存症における神経回路の役割と、神経回路依存的な分子機構の一端を明らかにすることができた。当初ねらいとしていた以上に、多くの行動や病態において直接路と間接路の機能分離を明確にすることができ、領域目標の一つである脳神経回路の動作原理の解明に一例として貢献できたのではと考える。

精神神経疾患の病態解明において、神経回路からのアプローチが重要になってきている。精神疾患モデル動物の大脳基底核神経回路の制御異常を解析することによって、精神神経疾患の病態解明と治療法開発へとつなげたい。

5. 研究総括の見解

大脳基底核は運動制御のみならず欲動・認知などの高次機能を司り、その神経回路は古くより薬理学的に直接路と間接路からなることが知られていたが、各経路を区別して操作することはできなかった。本研究ではサブスタンス P プロモーターとエンケファリンプロモーターを巧みに用いてそれぞれ直接路あるいは間接路特異的に、かつドキシサイクリンにより可逆的に、シナプス伝達を阻止できるマウス系統を作出し、回転運動症状などによりそれぞれの経路の特異的遮断を確認した。さらにこれらのマウスを用いた実験解析により、覚せい剤の慢性投与による依存形成に直接路が重要であり、また報酬学習には直接路が、忌避学習には間接路の神経伝達が必須であり、間接路が報酬行動の柔軟性に関与することを明らかにした。一方、両経路が収斂する黒質網様部の分子の変化を解析して、コカイン投与では直接路依存的に ephrinA5 の下流シグナルが増強することをつきとめた。これらはハンチントン病、薬物依存症などの疾患の本態に重要な手掛かりを与える大きな成果であり、論文発表にもつながった。今後巧妙な工夫により、より広い意味での2つの回路の機能的役割の解明や、基底核が関与する他の神経疾患の病態との関係の解明につながることが期待できる。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Hikida T, Kimura K, Wada N, Funabiki K, Nakanishi S. Distinct roles of synaptic transmission in direct and indirect striatal pathways to reward and aversive behavior. *Neuron* 66:896-907, 2010.
2. Kimura K, Hikida T, Yawata S, Yamaguchi T, Nakanishi S. Pathway-specific engagement of ephrinA5-EphA4/EphA5 system of the substantia nigra pars reticulata in cocaine-induced responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 108:9981-9986, 2011.
3. Yawata S, Yamaguchi T, Danjo T, Hikida T, Nakanishi S. Pathway-specific control of reward learning and its flexibility via selective dopamine receptor in the nucleus accumbens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 109:12764-12769, 2012.
4. Hikida T, Yawata S, Yamaguchi T, Danjo T, Sasaoka T, Wang Y, Nakanishi S. Pathway-specific modulation of nucleus accumbens in reward and aversive behavior via selective transmitter receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 110:342-347, 2013.
5. Niwa M, Jaaro-Peled H, Tankou S, Seshadri S, Hikida T, Matsumoto Y, Cascella NG, Kano S, Ozaki N, Nabeshima T, Sawa A. Adolescent stress-induced epigenetic control of dopaminergic neurons via glucocorticoids. *Science*, 339:335-339, 2013.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 1 件

1.

発 明 者: 疋田貴俊、中西重忠

発明の名称: 大脳基底核神経回路の神経伝達を解析する方法

出 願 人: 公益財団法人大阪バイオサイエンス研究所

出 願 日: 2010/4/30

出 願 番 号: PCT/JP2010/003089

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表

1. Hikida T, Kimura K, Wada N, Funabiki K, Nakanishi S. Distinct roles of striatonigral and striatopallidal transmission in reward and aversive behavior. Neuroscience 2010, the Society for Neuroscience's 40th Annual Meeting. 2010/11/15 San Diego, USA.
2. 疋田貴俊. 報酬・忌避行動の大脳基底核神経回路機構. 平成 23 年度包括脳ネットワーク夏のワークショップ JST セッション. 2011.8.22 神戸(招待講演)
3. 疋田貴俊、木村健介、和田教男、船曳和雄、中西重忠. 報酬・忌避行動における大脳基底核神経回路の制御機構. 第 34 回日本神経科学大会 2011/9/16 横浜

4. 疋田貴俊. 薬物依存と意思決定における大脳基底核神経回路の制御機構. 平成 23 年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会 2011/10/14 名古屋(招待講演)
5. 疋田貴俊. 運動・精神機能を司る大脳基底核神経回路の制御機構. 第 27 回日本大脳基底核研究会 2012.6.30 東京(招待講演)
6. Hikida T. Basal ganglia circuit regulation in reward and aversive behavior and drug addiction. 平成 24 年度包括脳ネットワーク夏のワークショップ「シナプス病態」「脳内環境」「自己制御精神」脳疾患関連 3 領域合同シンポジウム 2012.7.25 仙台(招待講演)
7. 疋田貴俊. 直接路と間接路の機能分離. 第 6 回パーキンソン病・運動障害疾患コンGRES 2012.10.12 京都(招待講演)
8. 疋田貴俊. 報酬・忌避行動における大脳基底核神経回路の制御機構. 第 35 回日本分子生物学会年会ワークショップ「動物の行動制御メカニズムの新展開」2012.12.11 福岡(ワークショップ座長)

受賞

- 2010 年 包括脳ネットワーク若手優秀発表賞
- 2011 年 日本神経科学学会奨励賞
- 2012 年 日本生物学的精神医学会若手研究者育成プログラム奨励賞

著作物等

1. 疋田貴俊、神谷篤. 精神疾患モデル動物の可能性 –遺伝子から神経回路へ. 実験医学 28:2205-2210, 2010.
2. 疋田貴俊. 精神疾患の分子遺伝学: 最近の知見. 脳神経外科速報、21:1250-1254, 2011.
3. 疋田貴俊、友田利文. 精神疾患モデル動物の作製と治療法スクリーニング. 実験医学増刊、30:2074-2079, 2012.
4. Hikida T, Gamo NJ, Sawa A. DISC1 as a therapeutic target for mental illnesses. *Expert Opin. Ther. Targets*, 16:1151-1160, 2012.
5. 疋田貴俊. 大脳基底核の直接路と間接路の機能分離. Annual Review 神経 2013、pp10-16, 2013.

研究報告書

「成体網膜におけるニューロン新生・新規回路形成の可視化と制御」

研究タイプ： 通常型

研究期間： 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研究者： 松田 孝彦

1. 研究のねらい

脊椎動物の中でも魚類や両生類は再生能力が高く、網膜が損傷を受けたとしても、成体網膜幹細胞であるミュラーグリア細胞（以下、ミュラー細胞と表記）が活発に分裂・増殖してニューロンを産生し、損傷部位を機能的に自己修復出来る。一方、ヒトを含む哺乳類にはそのような自己修復能力は無いと長年信じられてきたが、近年、マウスなどの哺乳動物の網膜ミュラー細胞にもニューロンを産生するポテンシャルが有ることが判ってきた。この事実は、ヒト網膜疾患に対する新しい治療方法開発の可能性を期待させるものである。しかしながら、哺乳類ミュラー細胞の分裂・増殖能力およびニューロン産生能は極めて低く、結果として自己修復までには至らない。そこで本研究では、哺乳類網膜を再生させる技術の開発を目指し、薬剤投与や遺伝子導入によって成体マウス網膜のミュラー細胞の増殖能を高めることを試みた。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、様々な薬剤の眼球内投与や、遺伝子導入によって成体マウス網膜のミュラー細胞の増殖能を高めることを試みた。このような研究の過程で、マウス網膜が薬剤で損傷を受けると、多くのミュラー細胞は活性化されて遺伝子発現レベルでは『増殖細胞』に似た状態になるものの、実際の分裂・増殖には至らないという興味深い現象を見出した。すなわち、成体マウス網膜においてミュラー細胞は損傷に応答して細胞分裂しようと試みるが、何らかのブレーキ機構が働いているために分裂・増殖には至らないというモデルが考えられた。そこで、この「ブレーキ機構」を解除する方法を検討した結果、薬剤と増殖因子を組み合わせることで、ミュラー細胞の増殖をある程度誘導出来るようになった。さらに、ミュラー細胞の増殖を促進する遺伝子も幾つか同定することが出来た。

また、「網膜ミュラー細胞の増殖を可視化できる遺伝子改変マウス」や「網膜ミュラー細胞特異的に組換え酵素 Cre を発現する遺伝子改変マウス」など、網膜再生に研究に有用なツールを幾つか開発した。

(2) 詳細

研究テーマ A「薬剤投与によってミュラー細胞の増殖を誘導する条件の確立」

哺乳類の網膜が損傷を受けると、ごくごく少数のミュラー細胞のみが増殖を開始する。この点が、網膜損傷に応答して多数のミュラー細胞の活発な増殖が誘発される魚類等との大きな違いである。つまり、このようなミュラー細胞の分裂・増殖能の低さが、変性した哺乳類網膜の自己修復を阻む最も大きな要因であると考えられる。そこで本研究では、様々な薬剤を成体マウスの眼球に投与することによってミュラー細胞の分裂・増殖を誘導することを試みた。

このような薬剤スクリーニングの過程で、「薬剤投与によって網膜が損傷を受けると、多くのミュラー細胞は実際に分裂・増殖しないにもかかわらず、PCNAを始めとする増殖細胞特異的マーカーを強く発現する」という現象を見出した(図1)。このことは、マウス網膜が損傷すると、多くのミュラー細胞は活性化されて遺伝子発現レベルでは『増殖細胞』に似た状態になるものの、実際の分裂・増殖には至らないことを示唆している。すなわち、マウス網膜が損傷を受けると、ミュラー細胞は細胞分裂しようと試みるが、何らかのブレーキ機構が働いているために分裂・増殖には至らないと考えられた。

この「ブレーキ機構」を効率よく解除出来れば、ミュラー細胞の増殖を誘発出来るのではないかと予想される。そこで、薬剤と増殖因子を組み合わせる用いたところ、細胞増殖をある程度誘導出来ることが判ってきた。現在のところ、網膜の全ミュラー細胞の10%程度を網膜内で分裂・増殖させることに成功している。FACSを用いて分裂・増殖しているミュラー細胞画分を分離する条件も確立しており、今後、遺伝子発現プロファイリング等によって網膜内で増殖するミュラー細胞の詳細な性状解析を行う計画である。

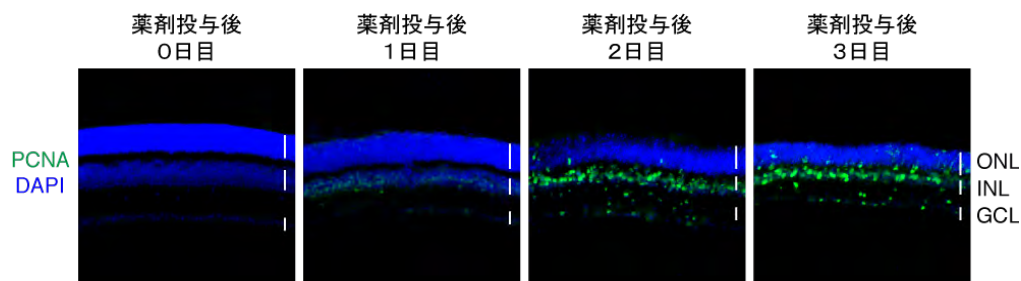


図1 薬剤で変性を誘発した網膜では、ほぼ全てのミュラー細胞がPCNA陽性になる。成体マウスの眼球に薬剤を投与して網膜変性を誘発すると、ほとんどのミュラー細胞で増殖細胞特異的なマーカーの発現が観察された。しかしながら、実際に分裂増殖した細胞はごく一部のみであった。

ONL : outer nuclear layer, INL : inner nuclear layer, GCL : ganglion cell layer

研究テーマ B「ミュラー細胞の増殖の可視化」

蛍光蛋白質を用いたミュラー細胞の増殖の可視化を試みた。この目的のためにまず、増殖細胞特異的に活性化されるプロモーターに蛍光蛋白質遺伝子を繋いだDNAコンストラクトや、増殖細胞でのみ機能する蛍光プローブを発現するDNAコンストラクトをいくつか作製した。これらを *in vivo* エレクトロポレーション法を用いて発生期のマウス網膜に導入し、機能評価を行った。その結果、細胞周期のG2/M期で特異的に活性化されるサイクリンB1(Ccnb1)プロモーター::GFPが最も忠実に、増殖状態にある網膜前駆細胞を標識した。この予備的知見に基づき、Ccnb1::GFPコンストラクトを用いてトランスジェニック(Tg)マウスを樹立した。期待通り、こ

の Tg マウスの網膜では、GFP の発現は発生期の網膜前駆細胞において観察され、発生の完了に伴って完全に消失した(図2A-D)。

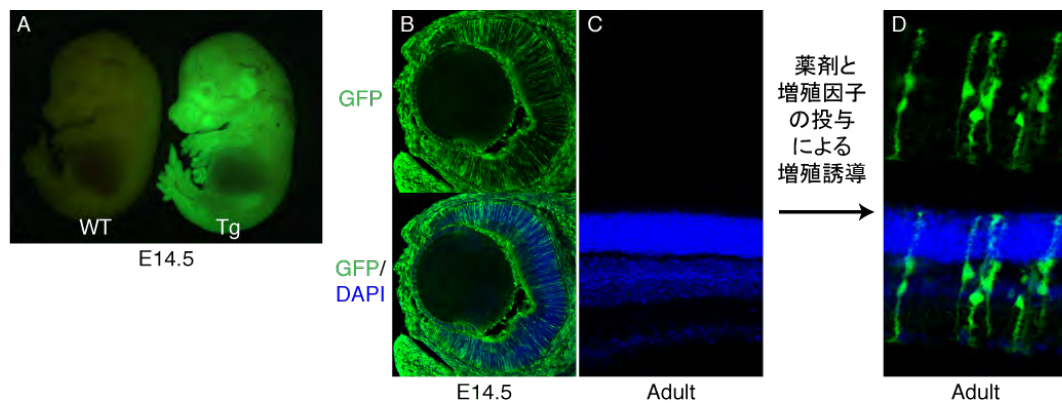


図3 Ccnb1プロモーターを用いたミュラー細胞の増殖の可視化

(A) 胎生14.5日目のCcnb1::GFP Tgマウス。GFPの発現は全身で観察される。

(B, C) Tgマウスの胎生14.5日目と成体網膜におけるGFPの発現。GFPの発現は発生期の網膜前駆細胞で観察されるが、発生期を過ぎると完全に消失する。

(D) 成体Tgマウスの眼球に薬剤投与して細胞増殖を誘導すると、一部のミュラー細胞がGFP陽性になった。

次に、成体 Tg マウスの眼球に薬剤と増殖因子を投与してミュラー細胞の増殖を誘導した。その結果、一部のミュラー細胞の集団を GFP で標識することに成功した(図2D)。今後、この系を活用して、増殖に伴うミュラー細胞の形態変化をライブイメージング等の手法で明らかにしていく予定である。

また、この Tg マウスを用いた解析から、網膜が損傷を受けた際には、ミュラー細胞に加えて、形態学的にミクログリアや血管内皮細胞と考えられる細胞も GFP で標識されることが判ってきた。これらの細胞はそれぞれ、死んだニューロンの除去や網膜損傷に伴う血管のリモデリングに関与していると推測される。これまでの網膜再生研究では、成体幹細胞であるミュラー細胞の増殖のみが注目され、その他の細胞種の役割は見過ごされてきた。内在性の幹細胞活性化によって損傷網膜の自己修復を実現させるためには、ミクログリアや血管細胞等の働きにも着目する必要があるのかもしれない。

研究テーマ C「ミュラー細胞の増殖を誘導する遺伝子のスクリーニング」

ミュラー細胞の分裂・増殖能を遺伝子操作によって高めることを目的とし、増殖因子受容体、シグナル伝達分子、転写因子、細胞周期制御因子、リプログラミング因子等をコードする約 150 種類の発現ベクターを構築した。このユニークなベクターセットには、EGF 系、FGF 系、Notch 系、Wnt 系、Shh 系、CNTF 系、G 蛋白質系、MAP キナーゼ系、TGFβ 系、BMP 系、PI3 キナーゼ/Akt 系を始めとする多種多様なシグナル伝達系を活性化あるいは阻害する発現ベクターが含まれる。これら約 150 種類の発現ベクターの全てを1種類ずつ、成体マウス網膜のミュラー細胞に選択的に *in vivo* で、あるいは網膜組織培養系に *ex vivo* で導入し、その効果を評価した。また、これと並行して、これら発現ベクターを生後1日目のマウス網膜に *in vivo* で導入し、網膜発生に及ぼす影響も調べた。

このようなスクリーニングの結果、5 つの因子にミュラー細胞の増殖を誘導、促進する活性

があることが明らかになった。また、発生期のマウス網膜を用いたスクリーニングにより、網膜細胞の発生や配置等に影響を及ぼす因子が多数同定された。特に、ミュラー細胞の産生を誘導する因子としては、既に知られている Notch-Hes 関連遺伝子以外に、新たに6遺伝子を同定することが出来た。

研究テーマ D「ミュラー細胞の機能を制御するトランスジェニックマウスの作製」

ミュラー細胞の機能を個体レベルで制御することを目的とし、ミュラー細胞特異的プロモーターに組換え酵素 CreER 融合蛋白質を繋いだ Tg マウスを樹立した。今後、この Tg マウスを用いて、網膜再生に重要と考えられる候補遺伝子をミュラー細胞特異的に欠損あるいは過剰発現させ、その機能を解析する計画である。また、ミュラー細胞の動態解析や運命追跡にも活用していきたい。

3. 今後の展開

これまで、ミュラー細胞を成体マウス網膜内で効率良く増殖させることは困難であったが、本研究により、ミュラー細胞の分裂・増殖をある程度誘導出来るようになってきた。しかし、本研究の最終目標である「哺乳類の損傷網膜の自己修復」を実現させるためには、更に効率の良いミュラー細胞の増殖誘導法の開発が必要と考えられる。また、増殖を誘導したミュラー細胞から目的のニューロンを効率よく産生させる技術開発も必要であろう。本研究では網膜再生研究に有用な幾つかのツールを開発することが出来た。今後、これらを活用して網膜再生の実現に向けた研究を推進していきたいと考えている。

4. 自己評価

私は「さがけ」で研究課題を採択して頂くまでは、米国でマウス網膜の発生を研究していました。「さがけ」研究を開始するにあたり、研究実施場所を日本に移し、また、研究対象も発生期の網膜から成体網膜に変え、色々な意味で全くのゼロからの出発でした。何かと思い通りにならないことも多く、この3年間、必ずしも当初の研究計画通りに進んだとは言い難いのですが、成体マウスの網膜内でミュラーグリア細胞の増殖を(ある程度)人為的に誘導出来るようになったので、最低限の目標は達成出来たのではないかと考えています。この点(細胞増殖の制御)がクリア出来たので、今後の様々な方向への研究の展開が可能になってきたと考えます。

残念ながら、「さがけ」で支援して頂いたこの3年の期間内に研究成果を論文として発表するまでには至らなかったのですが、今後、1、2年以内に「さがけ」の研究成果を論文にまとめて公表していきたいと考えています。また、「網膜ミュラー細胞の増殖を可視化できる Tg マウス」や「網膜ミュラー細胞特異的に組換え酵素 Cre を発現する Tg マウス」など、幾つかのツールを開発することが出来ました。今後、これらを最大限に活用し、哺乳類網膜の再生研究を押し進めていきたいと考えています。

5. 研究総括の見解

哺乳類の網膜は再生能力・修復能力がないと考えられてきたが、本研究では薬物投与や遺伝子導入によって成体網膜のミュラー細胞に増殖能を賦活させ、網膜再生技術に突破口

を拓こうとするものである。まず薬物による損傷網膜のミュラー細胞では分裂には至らずとも PCNA などの増殖細胞特異的マーカーが発現することを見出し、薬物と増殖因子により網膜内でのミュラー細胞の限定的な増殖に成功した。さらにこのような変化を蛍光リポーターを利用して効率よく検出し解析するためのトランスジェニック系統を作出して検証し、他方で導入する遺伝子のライブラリー(150 ベクター)を構築して、in vivo スクリーニングによりそのなかの5つの因子にミュラー細胞増殖誘導促進活性を見出し、またミュラー細胞産生誘導因子を多数発見した。さきがけ研究開始時に着手したテーマでもあり、これまでマウス作出・ライブラリー構築やスクリーニングに膨大な労力を投入してきた。その努力と周到的な準備によって非常に興味深い局面が開けたことが高く評価される。高い目標を設定したため、論文発表までにはまだ時間を要すると思われるが、今後の研究の進展により網膜の再生医療技術という目標達成は実現可能であると思われる。

6. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 松田孝彦,「網膜への遺伝子導入」, 実験医学別冊 遺伝子導入プロトコル (羊土社), 2012, 121-130.

研究報告書

「脳回路網の再編成における睡眠の役割」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研究者: 宮本 浩行

1. 研究のねらい

睡眠は私たちにとって基本的な生理活動であるが、その時間的な制御(研究Ⅰ)や「なぜ眠るのか」(研究Ⅱ)という理由については未だ謎が多い。睡眠は円滑な脳機能にも不可欠であり、例えば覚醒時の記憶は睡眠によって安定・最適化されると考えられている。本課題では視覚系の可塑性をモデルとして睡眠の働きを神経活動と神経回路に基づいて理解することを目的とした。

2. 研究成果

本研究課題の基礎となる睡眠と神経活動の時間的制御に関する知見(研究Ⅰ:論文発表)と並行して進めてきた視覚系における睡眠の働き(研究Ⅱ:投稿中)について概説する。

【研究Ⅰ】(1)概要

脳深部の視交叉上核(SCN)は睡眠・覚醒サーカディアンリズムの生物時計だが、SCNからの信号がどこに伝えられどのようにして睡眠・覚醒のサーカディアンリズムが形成されるのかという神経システムの理解は進んでいない。私たちは神経伝達物質セロトニンの急速・選択的な除去によってラット睡眠・覚醒のサーカディアンリズムが崩壊することを観察した(論文1)。数週間にわたりラット脳各領域の神経活動を解析した結果、睡眠・覚醒のサーカディアンリズムが無くなっているにもかかわらず、SCNの神経活動サーカディアンリズムは強固に保たれ、睡眠・覚醒機能そのものも維持されていることがわかった。しかし、睡眠・覚醒を直接的に実行する前脳基底部・視索前野(BF/POA)領域では神経活動のサーカディアンリズムが顕著に消失していた。さらにこの領域のセロトニン受容体を阻害すると徐波睡眠のサーカディアンリズムが減弱した。これらからSCNからのサーカディアンリズム信号は、セロトニンの作用を受けたBF/POA領域に伝えられそこで睡眠・覚醒機能と統合され24時間周期の睡眠・覚醒リズムが生み出されていると考えられた(論文2)。

【研究Ⅰ】(2_1)背景

単細胞生物から植物、動物、ヒトにいたるまで、生物はサーカディアンリズムと呼ばれる24時間周期のリズムを自律的に示している。このサーカディアンリズムは精神活動、体温、ホルモン分泌、神経活動、タンパク質・遺伝子発現など、広く生物現象に認められ、とくにヒトや動物の活動基盤をなす睡眠・覚醒も強いサーカディアンリズムの制御を受けている。これまでに、脳深部の小さな神経核である視交叉上核(SCN)がサーカディアンリズムの主時計であることが知られ、分子生物学的理解が積み重ねられている。しかし、SCNからの信号がど

こに伝えられ、睡眠・覚醒のサーカディアンリズムがどう形成されるのかというシステムに関する基本的な理解は未だ途上にある。SCN は小さな神経核のため、行動する個体からその神経活動を記録するのは容易ではなく、また出力先が広く多岐にわたり睡眠・覚醒制御に関与する脳領域が分散し、それらの相互作用が未解明であることなども研究を困難にしている。

私たちは、うつ病や情動、摂食、睡眠などとの関連を指摘されてきた神経伝達物質セロトニンを数時間で選択的に除去する手法を開発し、ラットの睡眠・覚醒のサーカディアンリズム維持にセロトニンの働きを必要としていることを報告した(論文2)。この手法を利用し睡眠・覚醒リズムが崩壊した脳各領域の神経活動パターンを調べ、サーカディアンリズムと睡眠を結ぶ神経メカニズム解明に取り組んだ。

【研究Ⅰ】(2_2)研究方法と結果

研究グループは、自由に行動しているラットの睡眠・覚醒を記録するとともに、脳の各領域の神経活動を数週間にわたって追跡した(狙った脳部位に細い金属線を埋め、そこでの神経細胞群が興奮するときに生じる電気信号を検出して、神経細胞の活動状態を調べた)。従来の知見通り、SCN や BF/POA をはじめ、脳の多くの領域で神経活動レベルが24時間周期で上昇・下降するサーカディアンリズムを観察し、睡眠・覚醒機能についても、睡眠時は神経細胞の活動が低下し、覚醒時は活性化することを確認した。

次に、セロトニン合成のもととなるアミノ酸の一種トリプトファンを選択的に分解する酵素(tryptophan side chain oxidase I: TSOI)の生体投与で、脳内のセロトニンを数時間以内に5分の1程度に急速、選択的かつ可逆的に減少させた。この結果ラットは昼夜を通して正常より短い周期で睡眠と覚醒を繰り返すようになり(断片化)、睡眠量や行動量のサーカディアンリズムが崩壊した(図1中、下)。しかし、このときの SCN の活動は通常通り強固なサーカディアンリズムを維持するとともに(図1上)、正常時の睡眠・覚醒に伴う変化(睡眠時の神経活動低下と覚醒時の活性化)も確認された。この傾向は、大脳皮質など他の脳領域でも同様だった。

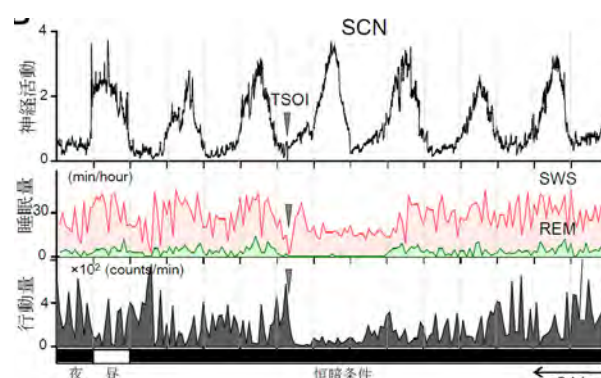


図1 セロトニン除去による SCN サーカディアンリズム、睡眠・行動量の変化

しかし、睡眠・覚醒を直接的な実行にかかわる前脳基底部・視索前野(BF/POA)領域の神経活動のサーカディアンリズムが顕著に減少していた。そこで、セロトニン受容体(5-HT₂)機能を阻害する薬物リタンセリンを、正常なマウスの BF/POA 領域に局所的に投与したところ、睡眠の大部分を占める徐波睡眠サーカディアンリズム選択的に阻害された。

以上をふまえ、セロトニンの働きを受けたBF/POA領域はSCNが生み出すサーカディアンリズム信号と睡眠・覚醒機能と時間的に統合し「睡眠・覚醒のサーカディアンリズム」を作りだすと結論した(図2)。

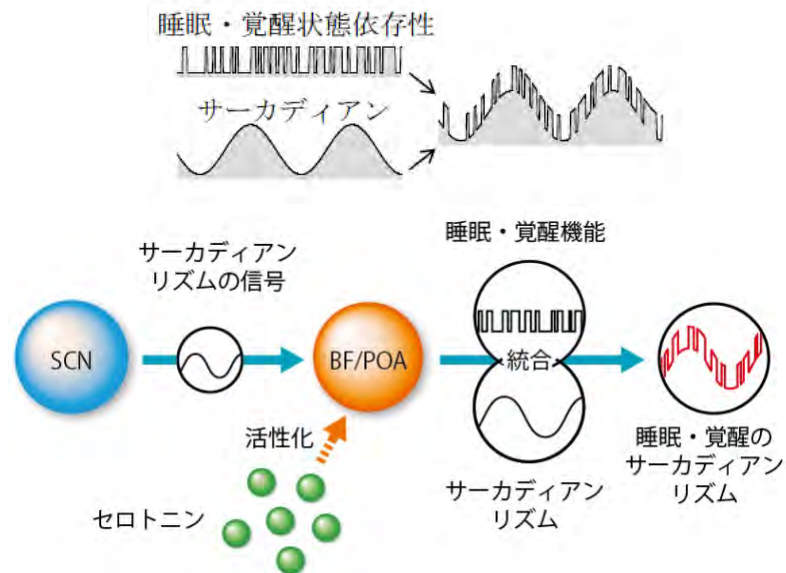


図2 神経活動による睡眠・覚醒とサーカディアンリズムの表現(上)と時間的統合モデル(下)

【研究Ⅱ】(1)概要

シナプス可塑性を通じて睡眠は記憶の固定化や脳の発達などに積極的に関与すると考えられているが、その神経回路メカニズムは未だ明らかではない。そこでマウス視覚野をモデルとして睡眠中の神経活動、情報処理、シナプス可塑性と神経回路網変化との関係を調べた。

行動するマウス視覚皮質から睡眠・覚醒時のマルチニューロン活動を記録した結果、睡眠中においても覚醒時とは異なる視覚応答が存在し、神経活動から推定された単シナプス性の機能的結合が徐波睡眠中に促進されていた。さらに抑制系が減弱した GAD65 ノックアウトマウスでは睡眠の機能的結合が阻害されている一方、抑制伝達を薬理的に強化すると機能的結合が回復した。視覚野の可塑性(眼優位性)を示さない GAD65 ノックアウトマウスは抑制系を強化することで可塑性が回復することから、抑制系によって制御される視覚入力と睡眠時の機能的結合の促進が可塑性の発現に寄与していることが示唆された。

【研究Ⅱ】(2_1)背景

私たちが日々経験する「眠り」は脳科学上の大きな謎のひとつである。脳は覚醒・睡眠を通じて活動状態を劇的に変化させている。心身の健康における睡眠の重要性は人々に広く受け入れられ、とりわけ睡眠は記憶・学習などの脳機能にも重要な役割を持つと考えられている。しかし記憶・学習システムの複雑さのため神経回路に基づいた統一的理解は容易ではない。

そのためにはまず「睡眠中に神経回路網が作り変えられていることの実験的証拠」を見出すことが重要と考えられる。睡眠の働きを神経回路レベルで調べるうえで可能な限り簡単なシステムを対象とすることが有利であり、眼優位可塑性とよばれる視覚野発達期の生体の可塑性に着目した。可塑性とは回路網の特性の変化を維持する性質のことでシナプス可塑

性をはじめ記憶・学習の基礎過程と考えられている。眼優位可塑性は解剖学的、生理学的知見が蓄積した視覚系の代表的な可塑性ひとつであり、生後の幼若期に単眼を一定期間閉じるとその眼に対する皮質細胞の応答性が極度に低下する神経活動依存的現象である。

さらにこの可塑性は睡眠を必要とすると考えられている一方、視覚野の睡眠徐波そのものが視覚経験により発達することを申請者は見出してきた (Miyamoto et al. Nat.Neurosci. 2003)。このように初期視覚系では視覚と睡眠は可塑性を通じて相互かつ直接的に作用を及ぼしていることが明らかになっている。

【研究Ⅱ】(2_2) 研究方法と結果

行動しているマウス大脳皮質視覚野から多数の神経細胞の活動を同時記録するマルチニューロン活動の慢性記録をワイヤーテトラード電極を用いて行った(図3)。睡眠・覚醒中の神経活動と視覚応答を解析するとともに、神経活動から神経細胞間の機能的結合を推定した。

これまで視覚応答は睡眠によって大きく低下するという主流の考え方に対して、睡眠中では一律の低下というよりもむしろ覚醒時とは異なる情報処理が行われていることが本研究から示唆された(図3)。

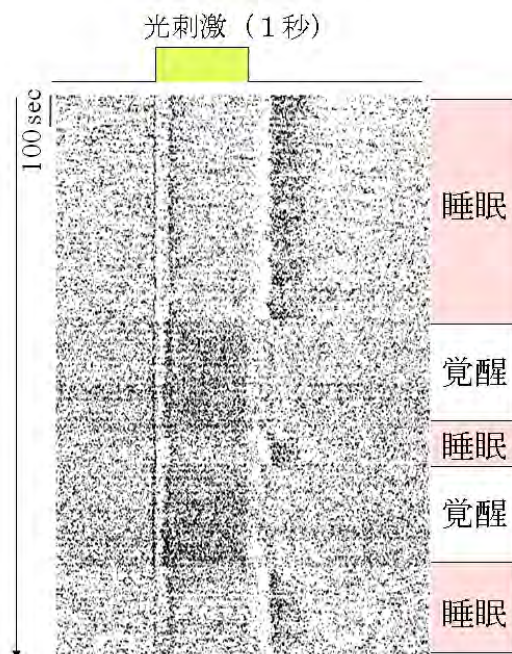


図3

睡眠中は脳の応答性が低下するという定説に反し、覚醒時とは異なる視覚情報処理がなされていることがわかった。図は光刺激(1秒)を繰り返し与えて視覚野の神経活動(ドット)を上から下へ時間順に並べて表示したもので、一回の刺激が横一列に相当する。脳状態が遷移すると処理様式も一変した。

さらに局所神経回路内の相互作用を推定するため睡眠中および覚醒中での神経細胞間の情報伝達の効率を神経活動から計算し比較すると、意外にも睡眠時で効率性が有意に高まっていることが明らかになった(図4)。

また抑制性伝達が減弱したマウス(GABA 合成酵素のひとつ GAD65 ノックアウト)は眼優位可塑性を示さないことが知られているが、このマウスでは睡眠時の伝達効率促進も阻害されていた。逆に抑制系伝達を薬物によって促進すると睡眠時の伝達効率は回復したことから抑制性神経伝達により制御されていると推定された。GAD65 マウスの抑制性伝達の強化することで眼優位可塑性も回復させられる事実をふまえると睡眠時伝達効率と可塑性発現との間に深いつながりがあることが示唆される。これらの知見は、記憶の定着や情報処理の最適化といった睡眠の脳機能への積極的な関与について神経回路レベルでの基礎を与えるもの

と考えられる。

なお GAD65 ノックアウトマウスではグルタミン酸興奮性伝達のNMDA受容体サブユニット NR2A が減少していることが知られるが、これと一致して NR2A ノックアウトマウスでも GAD65 同様に睡眠時の神経細胞間の情報伝達の効率が低下していた。抑制性伝達と興奮性伝達の両者が関与していることを示唆する。

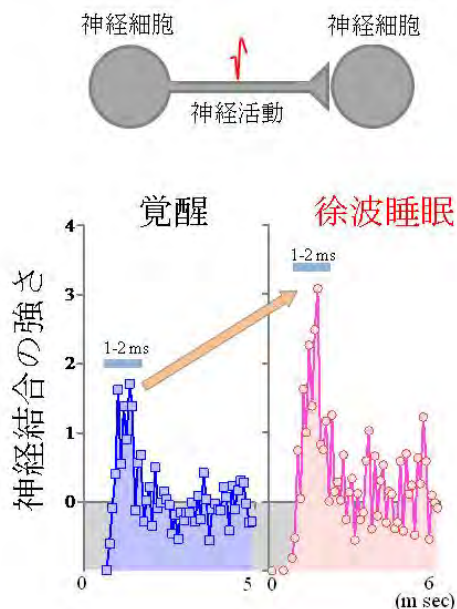


図4

図はシナプス前細胞の発火が、いつどれだけ後細胞を発火させているかを定量化したものの。とくに単シナプス性に結合している神経細胞間の結合強度(図中バー: 神経発火の伝達効率と解釈できる)は徐波睡眠中に上昇していた。

3. 今後の展開

【研究Ⅰ】脳や身体を機能的に維持するには各領域間の協調とともに、秒、分、時間、日の単位で刻々と変化する諸機能を時間的に協調させることも重要である。今回、サーカディアンリズムと睡眠・覚醒が神経活動として脳の各領域で時間的にどう結び付けられているのか、その一端を知ることができた。今後サーカディアンリズムと睡眠の階層的統合機構メカニズムを神経回路レベルで探索するとともに 12 時間あるいは 48 時間周期リズムを持つ動物や、脳の左右でリズム位相の異なる動物の機能設計・制御に挑戦する。これにより例えば視覚情報処理やシナプス可塑性、睡眠による情報処理の最適化などを対象として脳機能におけるリズムの役割解明を目指す。

セロトニン神経系は、不眠、睡眠リズム障害、うつ病や統合失調症などの精神疾患と複雑に関連することが示唆されている。またここで注目した前脳基底部は認知機能を含めアルツハイマー病との関わりも指摘されてきた。生活環境の変化や高齢化社会に伴う諸問題も睡眠やサーカディアンリズムと切り離すことはできない。本研究をさらに進めることで、現代社会において看過できないこれらの問題の体系的理解と解決につながればと考える。

【研究Ⅱ】なぜ睡眠時に神経細胞間の伝達効率が促進されるのか、その神経メカニズムをマルチニューロン記録に加え細胞内記録と単一細胞刺激等を組み合わせて解明していくとともに、どのように視覚をはじめ脳機能に影響を与えているのかを調べることによって睡眠の機能

を明らかにしていく。

これまで進めてきた睡眠と視覚経験依存的な神経回路の再編成についての研究と併せ、神経活動、神経回路の動作と機能と変化に関する基本特性を調べる。その上で神経活動や行動の出力をフィードバックさせるシステムやオペラント学習を基礎にした視覚皮質演算・機能の改変と設計に今後取り組んでいく。抑制系や睡眠はまたてんかん、自閉症スペクトラム、統合失調症、認知症などの各種神経疾患との関連も深く、今後病態理解につながる基礎研究を展開していく。

4. 自己評価

【研究Ⅰ】睡眠のメカニズムと機能を理解するうえで神経活動と神経回路の動作を知ることには不可欠である。そのためには脳各所の神経活動がどのように時間的に制御されているのかを調べる必要がある。神経活動は睡眠・覚醒状態と24時間リズムを基調としていることやセロトニン系による睡眠と24時間リズムの統合など、さきがけ研究期間で得られた研究成果は睡眠機能を神経活動・回路に基づいて理解するための基本的知見を提供すると考える。また生理学的理解に乏しかった睡眠のサーカディアンリズム制御についても新規のモデルを提供できたことやセロトニン系の睡眠リズムへの寄与なども従来の概念を広げることができたのではないだろうか。なお視交叉上核などからの長期的神経活動記録は技術的困難さと多くの時間を要するが、神経活動、神経回路、神経システムを理解する有力なアプローチのひとつであり、睡眠や時間生物学のみならず感覚、運動、脳可塑性の各研究に応用することが可能である。

【研究Ⅱ】今回我々が観察した「睡眠時の神経細胞間の機能的結合の促進」は、睡眠時に種々の神経活動が低下することを前提としたシナプスホメオスタシス仮説に代表されるような睡眠の受動的モデルとは対照をなし、睡眠の脳への積極的働きを神経回路レベルで示唆する点で新規かつ基本的であると評価している。今後、視覚情報処理、睡眠、可塑性の相互関係を突破口としてより本質的な「神経回路の動作と制御」の理解へと結び付けていくことができると考えている。

5. 研究総括の見解

本課題は大脳皮質視覚系の可塑性における睡眠の役割の解明を目指したものである。マウス視覚野のマルチニューロン活動の慢性記録を解析して、睡眠中にはむしろ単シナプス性の神経細胞の結合強度が上昇していること、さらにこの現象には、抑制性神経伝達が減弱したトランスジェニックマウスの解析と薬理学的実験から、抑制性神経伝達が重要であることを明らかにした。一方、トリプトファン側鎖オキシダーゼ投与により脳内セロトニンを枯渇させると、サーカディアンリズムの主時計とされる視交叉上核(SCN)のリズムは残したまま、睡眠や行動量のサーカディアンリズムが可逆的に崩壊することを見出したことから、これを神経生理学的、薬理学的に解析して、前脳基底部・視索前野がSCNの生み出すリズム信号と睡眠・覚醒機能を統合し、睡眠・覚醒のサーカディアンリズムを作り出すことを示す証拠を得た。これらは何れも興味深い結果ではあるが、今後は当初の目標であった睡眠と視覚経験依存的な神経回路の再編成の解析が進むことが期待される。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Nakamaru-Ogiso E, Miyamoto H, Hamada K, Tsukada K, Takai K.
Novel biochemical manipulation of brain serotonin reveals a role of serotonin in the circadian rhythm of sleep/wake cycles.
European Journal of Neuroscience 2012; 35: 1762-1770
2. Miyamoto H, Nakamaru-Ogiso E, Hamada K, Hensch TK.
Serotonergic integration of circadian clock and ultradian sleep-wake cycles.
The Journal of Neuroscience, 2012; 32:14794-14803
3. Takahashi H, Katayama K, Sohya K, Miyamoto H, Prasad T, Matsumoto Y, Ota M, Yasuda H, Tsumoto T, Aruga J, Craig AM. Selective control of inhibitory synapse development by Slitrk3-PTPδ trans-synaptic interaction.
Nature Neuroscience 15, 389-398, 2012
4. Ito S, Ogiwara I, Yamada K, Miyamoto H, Hensch TK, Osawa M, Yamakawa K.
Mouse with Nav1.1 haploinsufficiency, a model for Dravet syndrome, exhibits lowered sociability and learning impairment.
Neurobiology of Disease 49: 29-40, 2012

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

(主要な学会発表)

1. 宮本浩行, ヘンシュ貴雄:マウス視覚野における、睡眠・覚醒に依存した機能的結合の抑制系による制御,「包括脳ネットワーク」夏のワークショップ, 札幌, 2010. 7
2. 宮本浩行, ヘンシュ貴雄:マウス視覚野における睡眠・覚醒状態に依存した機能的神経結合の抑制系制御, 日本生体医工学会大会, 東京, 2011. 4
3. 宮本浩行, ヘンシュ貴雄:マウス視覚野における睡眠・覚醒状態に依存した機能的神経結合の抑制系制御, 第一回睡眠研究会, 岡崎, 2011. 7
4. 宮本浩行:セロトニン系によって統合されるサーカディアン振動体と睡眠・覚醒交替, 日本睡眠学会大 37 回定期学術集会, 横浜, 2012. 6

(和文総説)

1. 宮本浩行、ヘンシュ貴雄. 睡眠とシナプス可塑性を結ぶ神経活動.

ねむりと医療 4, 14-18, 2011

(プレスリリース他)

宮本浩行, 中丸映子, 濱田耕造, ヘンシュ貴雄.

1. 睡眠・覚醒機能と24時間リズムをセロトニンが束ねるー睡眠・覚醒のサーカディアンリズム形成機構を神経活動レベルで解明ー. 理化学研究所 2012 年 10 月

2. RIKEN NEWS No. 378 December 2012 SPOT NEWS

「セロトニンが睡眠・覚醒機能と24時間リズムを束ねる」

3. RIKEN RESEARCH 2 月号 Highlights “Workings of the body clock” 2013 年 3 月

研 究 報 告 書

「本能機能を司る視床下部神経回路操作と行動制御」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研 究 者: 山中 章弘

1. 研究のねらい

視床下部は摂食行動、性行動、睡眠覚醒などの本能行動の中枢である。視床下部には約 20 の神経核が知られており、古典的な脳の局所破壊実験からこれらの神経核が特異的な本能機能を担っていることが分かっている。それらの神経核にはペプチドを神経伝達物質として含有する神経が多く存在しており、そのペプチド性神経伝達物質が本能行動発現において中心的役割を担っている。このことは、そのペプチド遺伝子の発現調節領域(プロモーター)を用いて神経活動の光操作を可能にする光活性化タンパク質を特定神経のみに発現させると、その神経の活動を制御することが可能となり、ひいては本能行動発現を制御出来る可能性を示唆している。本能行動は個体の生存や生物種の維持に極めて重要な機能であるが、それを調節する神経機構については未だに十分解明されていない。その大きな原因の一つは、多くの神経回路研究がスライス標本などの摘出組織標本を用いて行われていることに起因する。本能行動は個体のみで生じる現象であるため、それを調節する神経回路の動作様式は、最終的に個体を用いて検討しなければ解明出来ない。しかし、これまで特定神経の活動のみを制御する手法が無く、神経活動と本能行動発現を繋げる研究を行うことが出来なかった。そこで、本研究提案では、本能行動の中でも特に睡眠覚醒に焦点を当て、覚醒維持に極めて重要な役割を担っている視床下部外側野のオレキシン神経細胞特異的に光活性化タンパク質(チャネルロドプシン 2(ChR2); ハロロドプシン(Halo))を発現する遺伝子改変マウスを作成し、個体において神経活動を光制御したときに表出する睡眠覚醒状態変化や投射先神経の調節様式などを明らかにする。それにより、睡眠覚醒調節に関わる神経回路とその動作原理を統合的に解明することを目的とする。

2. 研究成果

(1) 概要

視床下部は摂食行動、性行動、睡眠覚醒などの本能行動の中枢である。視床下部には約 20 の神経核が知られており、古典的な脳の局所破壊実験からこれらの神経核が特異的な本能機能を担っていることが分かっている。それらの神経核にはペプチドを神経伝達物質として含有する神経が多く存在しており、そのペプチド性神経伝達物質が本能行動発現において中心的役割を担っている。本能行動は個体の生存や生物種の維持に極めて重要な機能であるが、それを調節する神経機構については未だに十分解明されていない。本研究では、本能行動調節に重要な役割を担っている神経細胞特異的に光活性化タンパク質を発現する遺伝子改変マウスを作成し、その神経活動を人為的に制御することによって表出する行動および、

下流の神経活動変化を統合的に解析することによって、本能行動を調節する神経回路の仕組みの解明を試みた。

(2) 詳細

研究成果

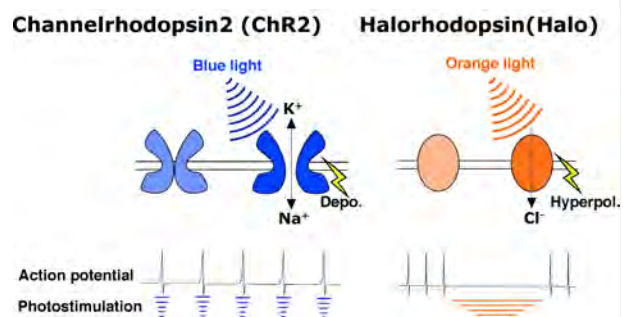
本能行動の中でも特に睡眠覚醒に焦点を当て、覚醒維持に極めて重要な役割を担っている視床下部外側野のオレキシン神経細胞¹に光活性化タンパク質(チャネルロドプシン2(ChR2); ハロロドプシン(Halo))を発現する遺伝子改変マウスを作成した。動物個体において神経活動を光制御したときに表出する睡眠覚醒状態変化や投射先神経の調節様式などを明らかにした。オレキシン神経は、視床下部外側野だけに少数が疎らに存在し、そこから脳内のほとんどの領域に軸索を投射している。中でも特に睡眠覚醒に重要とされるモノアミン神経起始核や、アセチルコリン神経起始核に密な投射が観察され、これらの神経核の神経細胞は、いずれもオレキシンによって活性化される。オレキシンやオレキシン神経を欠損させた動物の解析からオレキシン神経活動が睡眠覚醒調節に極めて重要であることが分かってきた。これらの動物は短時間に睡眠覚醒を繰り返し、頻回に脱力して数分間動けなくなる奇妙な発作(情動脱力発作)を起こした^{2,3}。これらの症状は、ナルコレプシー患者で見られる症状に非常に酷似しており、患者の脳においてオレキシン神経だけが脱落していた⁴。これらのことから、「ナルコレプシーはオレキシン神経の異常が原因」であり、オレキシンが睡眠覚醒調節において重要な役割を担っていることが分かってきた。

(1) 光操作を可能にする遺伝子改変マウスの作成

睡眠覚醒調節に重要な役割を担っている視床下部のオレキシン神経細胞に光活性化タンパク質(ChR2、Halo)を発現する遺伝子改変マウスを作成した。Halo は橙色光によって活性化され、細胞外から細胞内へクロライドイオンを輸送するイオンポンプであり、それによって細胞膜電位を過分極させるため、神経活動を抑制

する(図 1)。一方、ChR2 は、青色光によって活性化される非選択的陽イオンチャネルであり、それによって膜電位を脱分極させるため、神経活動を活性化させる(図 1)。免疫組織化学的解析解析によって、これらの遺伝子改変マウスの脳では、オレキシン神経細胞特異的に光活性化タンパク質が発現していることを確認した。さらに脳スライス標本を用いた電気生理学的解析によって、オレキシン神経活動が光によって興奮もしくは抑制されることを確認した。これらのマウスを用いたインビボ光刺激を開始し、睡眠覚醒を制御することに成功した。

図 1 光活性化タンパク質

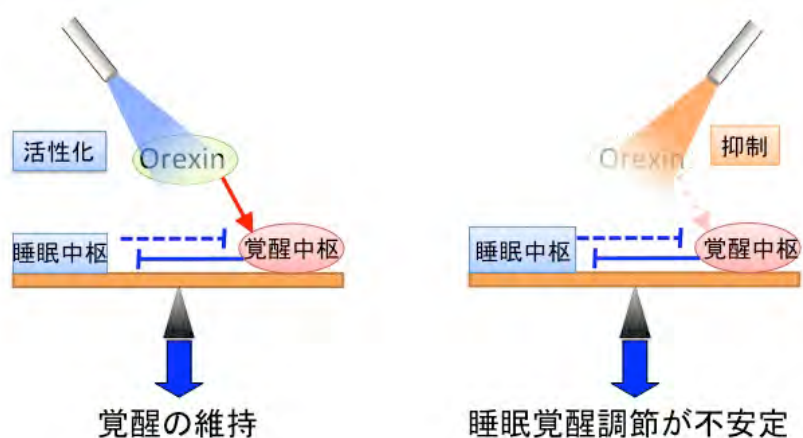


(2) 睡眠覚醒サイクル発現におけるオレキシン神経活動の役割の解明

In vivo におけるオレキシン神経活動と睡眠覚醒状態変化との関連を明らかにするために、意識下に睡眠覚醒を自由に繰り返すマウス個体において、オレキシン神経活動のみを光で制御し、その時の睡眠覚醒状態変化について、脳波・筋電図の同時記録による睡眠解析から明らかにした。視床下部のオレキシン神経細胞に光を照射するために、光ファイバー（直径 0.5 mm）をオレキシン神経が存在する視床下部外側野上方 1 mm まで両側性に刺入した。パルスジェネレーターによって光照射のタイミングと光強度を制御し、青色光（470 nm）もしくは、橙色光（593 nm）のレーザー光を視床下部に照射した。この時の睡眠覚醒状態変化を観察した。覚醒下において毛繕いをしているマウスの脳内に橙色光照射を行い、オレキシン神経活動を急性的に強制停止させた。オレキシン神経活動が抑制されてもマウスは数秒間毛繕いを続けたが、急に寝る準備をはじめて眠りについた。このときの脳波筋電図記録からマウスがノンレム睡眠に移行していることが分かった。光照射を止めて、オレキシン神経活動を再び元の状態に戻すと、マウスは直ちに覚醒し、先ほどと同様の毛繕いを再開した。このことから、オレキシン神経活動を抑制することによって、マウスにノンレム睡眠を誘導出来ることが明らかとなった。逆に ChR2 を用いてオレキシン神経を活性化させると、睡眠状態から覚醒状態に移行することを確認した。睡眠覚醒は、視床下部前方部の視索前野に存在する GABA 神経系の睡眠中枢と視床下部後部及び、中脳上部に存在するモノアミン神経系の覚醒中枢が互いに抑制し合

う相互抑制によって制御されていると考えられてきた。オレキシン神経は解剖学的に丁度その中間に存在し、覚醒中枢とされるモノアミン神経系に密に投射し、これらの神経系を活性化することで、睡眠覚醒調節を安定化する作用があることが明らかとなった(図 2)⁵。

図 2 睡眠覚醒中枢とオレキシン神経



参考文献

- 1 Sakurai, T. *et al.* Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* **92**:573-585, 1998.
- 2 Chemelli, R. M. *et al.* Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell* **98**:437-451, 1999.
- 3 Hara, J. *et al.* Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy,

- hypophagia, and obesity. *Neuron* **30**:345-354, 2001.
- 4 Peyron, C. *et al.* A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nat Med* **6**:991-997, 2000.
- 5 Tsunematsu, T. *et al.* Acute optogenetic silencing of orexin/hypocretin neurons induces slow-wave sleep in mice. *J Neurosci* **31**:10529-10539, 2011.

3. 今後の展開

光遺伝学を様々な神経に適用することによって、これまで不可能であった丸ごと個体を用いて、特定の神経活動だけを任意のタイミングで操作出来る実験が可能となった。本研究成果のひとつである、様々な細胞種においてチャンネルロドプシン 2 やアーキオロドプシン 3 などの光活性化分子を発現させることを可能にした遺伝子改変マウスを用いることで、標的とする細胞に容易に光遺伝学を適用することができるようになった。また、局所光照射装置の開発によって、自由行動するマウスの脳に任意のタイミングで光照射を行うことができるようになったほか、無線の光照射装置の開発も進めている。今後は本研究成果であるこれらのツールを拡充・活用して、睡眠覚醒を含めた多くの本能行動を調節するメカニズムの解明を続けていく予定である。特に光遺伝学をオレキシン神経細胞以外の様々な神経ペプチド産生神経に適用することによって、様々な本能行動を調節する神経回路の機能の解明に繋がることが期待される。

4. 自己評価

本研究提案では、主たる課題である「本能機能を司る視床下部神経回路操作と行動制御」を達成するために、以下に示す各項目について研究行ってきた。

- (1) 光操作を可能にする遺伝子改変マウスの作成
- (2) 睡眠覚醒サイクル発現におけるオレキシン神経活動の役割の解明
- (3) 睡眠と覚醒を作り出す脳の仕組みの解析
- (4) 新しい神経の光刺激方法開発とそれを用いた行動制御
- (5) 視床下部の他のペプチド作動性神経への応用

以下に個別の達成の状況について示す。

- (1) については、オレキシン神経細胞特異的にチャンネルロドプシン 2 やハロロドプシンなどの光活性化タンパク質を発現する遺伝子改変マウスを作成に成功している。また、様々な細胞種において光活性化タンパク質を発現可能な遺伝子改変マウスを作成し、中枢の神経細胞やグリア細胞のみならず、末梢の細胞においても光遺伝学を適用可能な遺伝子改変マウスの作出に成功している。(6.の原著論文番号 4. *Cell Reports* (2012) 2(2):397-406)
- (2) では、(1) で作出したマウスを用いて、オレキシン神経細胞の活動を個体マウスを用いて操作し、睡眠覚醒状態の変化を観察することによって、オレキシン神経活動が覚醒の維持に重要であることを示した。(6.の原著論文番号 3. *J Neurosci* (2011) 31:10529-10539)
- (3) では、オレキシン神経細胞においてセロトニン 1A 受容体の発現量を可逆的に変化させた時

の睡眠覚醒状態変化について明らかにした。縫線核のセロトニン神経からオレキシン神経への抑制性入力が活動期の覚醒の持続に重要であることを示した。(6.の原著論文番号 5. Sleep (2013) in press)

(4) では、網膜神経節細胞に発現する光感受性色素であるメラノプシンを異所性に発現させ、神経活動を光で制御可能であることを示した。メラノプシンを用いることでチャネルロドプシン 2 よりも高感度かつ持続的な光操作が可能となった。(Tsunematsu T et al., *Neurosci Res* (2012) in press)

(5) では、(1) で作出したマウスを用いて、視床下部の様々な神経細胞に光遺伝学を適用し、その機能を制御して本能行動を発現する神経回路の機能解明を現在進めている。(現在論文作成中)

上記に示すように、当初に計画した研究項目をほぼ達成できたと判断している。今後は(5)について進めて行く予定である。さががけ研究期間においては、潤沢な研究費にサポートされ、研究に集中することができた。また、他の刺激的なさががけ研究者との交流や、的確な意見を下さった研究統括の村上先生やアドバイザーの先生方のお陰で研究の進展に繋がったことを感謝すると共に、今後さらに「さががけ研究」が拡充・発展され、多くの若い研究者に対して継続的に支援を頂けますことを願っています。

5. 研究総括の見解

摂食・睡眠・性行動などの本能行動は個体レベルで見られる現象であり、その神経回路はスライス標本等の摘出標本では解明しきれない。視床下部には多様な神経ペプチドが特定の神経核に発現することに着目して、本課題ではオレキシン神経細胞特異的に光活性化タンパク質を発現するマウス系統を作出し、実際に自由行動下のマウス脳内に導入した光ファイバーにより両側性に光刺激をすると、ハロロドプシンマウスでは急性的可逆的にノンレム睡眠が誘導されること、逆にチャネルロドプシン2マウスでは睡眠状態のマウスを覚醒させることを明らかにした。こうして技術開発に成功する同時に GABA 系睡眠中枢とモノアミン系覚醒中枢を取り持つオレキシン神経が睡眠覚醒神経回路を制御していることを生理学的に立証したことは高く評価される。これらの成果は当初の提案課題を十分に達成したものであり、今後ここで実証した方法論を他の神経回路にも工夫・改良・適用することにより、さらなる発展が期待できる。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. **Yamanaka A**, Tabuchi S, Tsunematsu T, Fukazawa Y, Tominaga M
Orexin Directly Excites Orexin Neurons through Orexin 2 Receptor.
J Neurosci (2010) 30:12642-12652.
2. Hirashima N, Tsunematsu T, Ichiki K, Tanaka H, Kilduff TS, **Yamanaka A**

	Neuropeptide B induces slow wave sleep in mice. Sleep (2011) 34:31-37.
3.	Tsunematsu T, Kilduff TS, Boyden ES, Takahashi S, Tominaga M, <u>Yamanaka A</u> Acute optogenetic silencing of orexin/hypocretin neurons induces slow wave sleep in mice. J Neurosci (2011) 31:10529-10539.
4.	Tanaka K F, Matsui K, Sasaki T, Sano Hiromi, Sugio S, Fan K, Hen R, Nakai J, Yanagawa Y, Hasuwa H, Okabe M, Deisseroth K, Ikenaka K, <u>Yamanaka A</u> Expanding the repertoire of optogenetically targeted cells with an enhanced gene expression system. Cell Reports (2012) 2(2):397-406.
5.	Tabuchi S, Tsunematsu T, Kilduff TS, Sugio S, Xu M, Tanaka KF, Takahashi S, Tominaga M, <u>Yamanaka A</u> Physiological significance of inhibitory serotonergic inputs to orexin/hypocretin neurons for the regulation of sleep/wakefulness. Sleep (2013) in press.

(2)特許出願

研究期間累積件数:1 件

1.

発 明 者: 山中 章弘、田中 謙二

発明の名称: テトラサイクリン遺伝子発現誘導システムにおける発現量を増幅させる遺伝子座

出 願 人: 自然科学研究機構

出 願 日: 2011/9/6

出 願 番 号: 特願 2011-193680

(2)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

国内学会 招待講演

1. 山中章弘 第 63 回日本細胞生物学会大会 サテライトシンポジウム ST1 「オプトジェネティクスを用いた睡眠覚醒制御」札幌 2011 年 7 月
2. 山中章弘、常松友美 第 34 回日本分子生物学会年会 ワークショップ 「視床下部神経機能の光操作による本能行動制御」横浜 2011 年 12 月
3. 山中章弘 第 117 回 日本解剖学会総会・全国学術集会 シンポジウム 「オプトジェネティクスを用いた睡眠覚醒制御とリズム」甲府 2012 年 3 月
4. 山中章弘(オーガナイザー)、常松友美 日本薬学会第 132 回年会 企画シンポジウム 「オプトジェネティクスを用いた個体行動制御」札幌 2012 年 3 月

5. **山中章弘**、常松友美、田淵紗和子 日本睡眠学会第 37 回定期学術集会 シンポジウム 9:オレキシン研究の最近の話題「オレキシン神経の運命制御を用いた睡眠覚醒調節機構の解明」横浜 2012 年 6 月
6. **山中章弘** 2012 年包括型脳科学研究推進支援ネットワーク夏のワークショップ 新学術領域研究「大脳新皮質構築」「メゾ神経回路」合同ワークショップ
「様々な神経細胞の活動制御と行動発現」仙台 2012 年 7 月
7. **山中章弘** 第 20 回脳の世紀シンポジウム 若手研究者によるパネルディスカッション:脳科学研究これからの 20 年脳を育む:「睡眠覚醒の脳科学」東京 2012 年 9 月
8. **山中章弘** 日本遺伝学会第 84 回大会 ワークショップ:マウス遺伝学が支える生命科学 part 2
「光遺伝学を用いた視床下部神経による本能制御機構の解明」福岡 2012 年 9 月
9. **山中章弘** 2012 年日本神経化学会 公開シンポジウム:構造生物学から創薬まで;G 蛋白質共益型受容体研究がもたらすパラダイムシフト
「光遺伝学を用いた視床下部神経による本能制御機構の解明」神戸 2012 年 9 月
10. **Akihiro Yamanaka** and Tomomi Tsunematsu 第 35 回日本神経科学学会大会 シンポジウム:光操作で探る神経回路の作動原理
“Control of mice instinctive behaviors using optogenetics” 名古屋 2012 年 9 月
11. **Akihiro Yamanaka** 第 50 回日本生物物理学会年会 シンポジウム:レチナール蛋白質と光遺伝学
"Optogenetics reveals function of neural network involved in the regulation of sleep/wakefulness" 名古屋 2012 年 9 月
12. **山中章弘**、常松友美 「細胞を創る」研究会 5.0
「オプトジェネティクスを用いた神経活動操作と行動制御」横浜 2012 年 11 月

国際学会 招待講演

1. New approaches to studying orexin function
Akihiro Yamanaka and Tomomi Tsunematsu
International Congress of Neuroendocrinology 2010, Rouen, France (2010, 7)
2. Physiological importance of orexin/hypocretin neural activity in the regulation of sleep/wakefulness
Akihiro Yamanaka
SRI International Symposium, MenloPark, CA, USA (2010, 11)



3. An artificial control of sleep/wakefulness state using optogenetics in mice
Akihiro Yamanaka
 2nd International Symposium on Photonic Bioimaging, Niseko, Japan (2011, 2)
4. Optogenetical approach to study regulatory mechanisms of sleep/wakefulness using transgenic mice
Akihiro Yamanaka
 The 6th World Congress of the World Sleep Federation, AS-11, Kyoto, Japan (2011, 10)
5. Sleep/wakefulness control by manipulating the activity of orexin/hypocretin neurons
Akihiro Yamanaka
 The 6th World Congress of the World Sleep Federation Satellite Symposium, Kyoto, Japan (2011, 10)
6. Sleep/wakefulness control using optogenetics in mice
Akihiro Yamanaka
 23rd Annual meeting of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology, Seoul, Korea (2011, 10)
7. Optogenetics reveals regulatory mechanism of sleep/wakefulness
Akihiro Yamanaka
 8th Japanese-German Frontiers of Science Symposium (JGFoS), Tokyo, Japan (2011, 10)
8. Timing controlled ablation of orexin/hypocretin neurons reveals the
Akihiro Yamanaka
 Neuroscience 2012 Symposium "Dissection of CNS Circuitry Regulating Sleep and Arousal: Conditional Transgenics and Genetically Engineered Receptor-Channel Systems", New Orleans, LA, U.S.A. (2012, 10)
9. Timing controlled ablation of orexin/hypocretin neurons reveals the mechanism of narcolepsy
Akihiro Yamanaka
 SRI International Symposium, SRI International, Menlo Park, CA, U.S.A., (2012, 10)
10. Optogenetical approach to reveal the regulatory mechanism of instinctive

behaviors by the hypothalamic neurons

Akihiro Yamanaka and Tomomi Tsunematsu

Sydney 2012 Joint AuPS/PSNZ/ASB Meeting Symposia: Brain dysfunction and translational neurophysiology, Sydney, NSW, Australia (2012, 12)

11. Perturbation using optogenetics affects autonomic regulation of sleep/wakefulness cycle

Akihiro Yamanaka

The 13th RIES-Hokudai International Symposium "律" Joined with The 1st International Symposium of Nano-Macro Materials, Devices, and System Research Alliance Project, Sapporo, Japan (2012, 12)

著作物・総説

1. New approaches for the study of orexin function.
***Yamanaka A** and Tsunematsu T
J Neuroendocrinol 22: No.7, 818-824 (2010).
2. 覚醒を維持する神経ネットワーク
山中章弘 **遺伝** 65: No.5, 92-99 (2011).
3. オプトジェネティクス(光遺伝学)を用いたインビボにおける特定神経細胞活動制御法
山中章弘 **日薬理誌** 140: 280-284 (2012).
4. オレキシン神経による睡眠覚醒調節
山中章弘 **Clinical Neuroscience 月刊臨床神経科学** 31: No.2, 160-163 (2013).
5. オプトジェネティクスを用いた睡眠覚醒操作
山中章弘 **生体の科学[特集]神経回路の計測と操作** 64: No.1, 65-71 (2013).
6. 光による睡眠覚醒の制御と疾患研究
山中章弘 **レーザー研究「生命機能の創発を理解する光操作とイメージングの最前線」特集号** 41: No.2, 92-97 (2013).
7. Inutsuka A and ***Yamanaka A**
The physiological role of orexin/hypocretin neurons in the regulation of sleep/wakefulness and neuroendocrine functions.
Front in Neuroendocrine Sci (2013) (in press).

プレスリリース等

1. 光スイッチでマウスのノンレム睡眠誘導に成功



—脳のオレキシン神経細胞の活動を光スイッチ遺伝子改変技術で操作—
<http://www.nips.ac.jp/contents/release/entry/2011/07/post-183.html>

2. ノンレム睡眠を誘導する新しい神経タンパク質の働きを解明
—ニューロペプチドBの作用をマウスの脳波解析で解明—
<http://www.nips.ac.jp/contents/release/entry/2010/06/post-126.html>

3. 脳の"覚醒"レベルを上げる神経メカニズムを解明
<http://www.nips.ac.jp/contents/release/entry/2010/09/post-134.html>

研 究 報 告 書

「機械刺激受容体と神経軸索組織の構築基盤」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研 究 者: 和田 浩則

1. 研究のねらい

哺乳類の成体では、神経系の再生能力が乏しいため、外傷や老化にともなって様々な疾患が生じる。ところが、魚類では、一生にわたって成長を続けるため、成体においても新たな神経回路が形成し、かつ高い再生能力を維持している。本研究のねらいは、このような顕著な特徴をもつ魚類神経系をモデルに、「繰り返し構築される神経回路」と「再生能力」の仕組みを、細胞・分子レベルで解明し、「組織がいかにして構築され、決まった形態や大きさを獲得するのか」という生物学の基本的な問題に挑戦する。得られた知見を踏まえ、将来的に、再生医療への応用を目指す。

動物の体は、様々な器官から構成される。それぞれの器官は、決まった大きさを持っており、体全体が協調的に働くために重要である。とりわけ、感覚器官は、外界の情報を的確に受容し、中枢に伝える役目を担っており、体の特定の場所に、正しい大きさと数の器官が形成される。しかし、これらの形質がどのような発生メカニズムで生じるのか分かっていない。本研究では、魚類の側線神経の感覚器官(感丘)をモデルに、器官サイズ決定の仕組みの解明に取り組む。

魚類の側線神経系は、機械刺激受容体(側線感覚器・感丘)とそれを支配する神経軸索からなる。魚の成長に伴って、感覚器官は一定の大きさを保ちながら数を増し、それに応じて神経軸索も再構築される。これまで、私は、感覚器の増加が、一部の細胞の遊走と増殖によって起きることを明らかにした。さらに、側線感覚器は、著しい再生能力を持ち、感覚細胞(有毛細胞)は一定の頻度で死に、周囲の支持細胞の分裂によって再生されることから、感覚器の大きさを、発生・再生過程で常に一定に保つためのシステムがあると考えられた。

2. 研究成果

(1) 概要

感覚器官を正しいサイズに保つことは、体全体が協調的に働くために重要である。魚類の側線神経系は、機械刺激受容体(側線感覚器)とそれを支配する神経軸索からなる。側線感覚器は一生にわたり、同じサイズを維持する。本研究において、私は、Wnt シグナルが感覚器の細胞増殖を促進すること、一方、分化した感覚細胞が Wnt 阻害因子 Dkk を分泌して細胞増殖を抑制し、その結果、器官サイズを一定に保つことを示した。また、細胞増殖には、感覚器への軸索投射が必要であることを示した。さらに、器官の形態を維持するためには、Wnt シグナルを抑制する必要があることを示した。本研究により、感覚器の形と大きさを維持するための新しい調節機構が明らかになった。

(2) 詳細

(1) Wnt/Dkk の負のフィードバック・ループが器官サイズを制御する

魚類の側線神経感覚器(感丘, neuromast)は、感覚細胞(有毛細胞)とそれを取り囲む支持細胞からなる(図1A)。感丘細胞を GFP で標識するゼブラフィッシュ・トランスジェニック系統を用い、感丘が「出芽」し新たな感丘を形成する過程を調べ、「出芽」には細胞移動と細胞増殖が伴うことを見出した(文献1)。次に、感丘で特異的に発現する遺伝子を検索した結果、*dkk2* 遺伝子が分化した有毛細胞で強く発現することが分かった(図1D-F)。*Dkk* 遺伝子は、Wnt シグナルの阻害因子であることが知られている(図1B)。レポーター系統を用い、Wnt シグナル活性を調べたところ、増殖している出芽細胞でシグナル活性が高いことを見出した(図1C)。この結果は、Wnt シグナルが細胞増殖を促進し、逆に *Dkk2* がその活性を抑えることによって、増殖を止めていることを示唆している。

そこで、(1) *dkk2* とその受容体 *krm*(図1B)の機能阻害(2)特定組織での *dkk2* の過剰発現(3)Wnt パスウェイを活性化する恒常的活性型 $\square$ catenin の過剰発現、(4)Wnt パスウェイの恒常活性型変異体 *apc* の解析、(5)Wnt パスウェイの下流因子 *lef1* の機能阻害、(6)aphidicolin 薬剤処理による細胞分裂阻害、による検証実験を行った。その結果、Wnt シグナル活性を亢進させた場合は、分裂細胞が増え、感丘が大きくなり、有毛細胞の数も増えた(図1G,H)。逆に、Wnt シグナル活性を阻害した場合は、分裂細胞が減少し、感丘は小さくなり、有毛細胞の数も減少した(図1I)。有毛細胞の増減に伴って、*dkk2* 遺伝子の発現も増減した。つまり、Wnt シグナルは感丘の細胞増殖を促進し、一方、分化した感覚細胞は、Wnt 阻害因子 *Dkk2* を分泌して、周囲の細胞増殖を抑制している。Wnt/Dkk からなる「負のフィードバック」によって、器官サイズを一定に調節していることが示された。

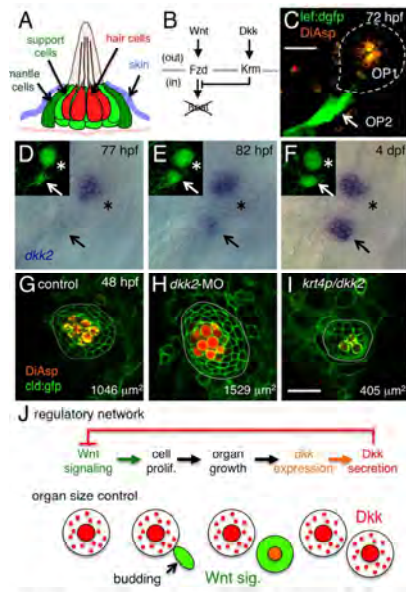


図1. Wnt/Dkkフィードバックが器官サイズを制御する
(A) 感丘の模式図 (B) Wntパスウェイ模式図。
(C) 出芽細胞におけるWntリポーター活性(*lef1:dgfp*)。
(D-E) 感丘の成熟に伴い有毛細胞で*dkk2*が発現する。
(G-I) *Dkk*は、細胞増殖を抑え器官サイズを調節する。
(J) 負のフィードバックによる器官サイズ調節機構。

(2) Wnt/Dkk のフィードバックは、器官サイズの恒常的維持に働く

感丘は高い再生能力を持つ。有毛細胞は、除去後24時間以内に、分裂を再開した支持細胞によって再生され、除去前と同じ数に戻る(図2A-C)。Wnt/Dkk フィードバック機構が、有毛細胞数(=器官サイズ)の一定性の制御に働くかどうかを調べるために、*dkk2* 遺伝子を過剰発現した胚において、再生過程を調べた。過剰な *Dkk2* の存在下では、細胞分裂が抑制され、有毛細胞は再生しなかった(図2D-F)。この結果

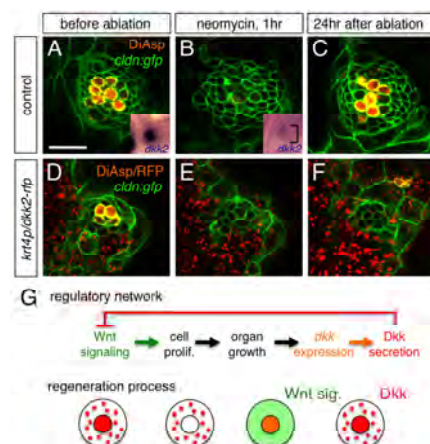


図2. フィードバックにより器官が一定サイズを維持する仕組み
(A-B) 感丘の再生過程。有毛細胞の除去により*dkk2*の発現が落ち、周囲の細胞のWntシグナルが上昇し増殖を引き起こす。
(D-F) *Dkk*の過剰発現は有毛細胞の再生を阻害する。
(G) 負のフィードバックが器官サイズを一定に保つ仕組み。

は、有毛細胞除去に伴い、*dkk2* 遺伝子の発現レベルが落ちることによって、周囲の支持細胞の分裂が再開し、再生した有毛細胞が一定数に達すると、再び発現した Dkk2 が支持細胞の分裂を阻害して、器官の成長を止めるというモデルを支持する(図2G)。すなわち、Wnt/Dkk による負のフィードバック機構は、器官サイズのホメオスタティックな維持に働いている。

(3) 感覚器に投射する神経軸索が、感覚器の細胞増殖に必要である

以上の研究から、Dkk2 は、細胞増殖過程において、Wnt シグナルの inhibitor として働くことが示された。次に、何が、Wnt シグナルの activator として働いているかを調べた。*Wnt* 遺伝子は感丘もしくはその周辺組織に特異的に発現しておらず、また *wnt3a* 遺伝子の過剰発現は、感丘の増殖に影響しないことから、Wnt リガンド自身は、activator ではない可能性が示唆された。感丘の出芽細胞(=増殖細胞)には、母感丘から分岐した神経軸索末端が分布している(図3A,B)。神経細胞(側線神経節感覚神経細胞)をレーザー照射により除去すると、感丘は出芽の際と同様に伸長するが、出芽細胞は増殖しないことがわかった(図3C,D)。つまり、神経軸索は、感丘の細胞増殖に必要である。次に、決まった出芽パターンを示す尾鰭の感丘(ter2,図3E)について調べたところ、出芽細胞(ter2')では Wnt シグナルの活性が高かった(図3F)。また、*hsp:dkk1* 系統を用いて、一過的に Dkk を過剰発現させ Wnt シグナルを阻害すると、神経軸索を除去した時と同様に、出芽細胞の増殖が抑えられた(図3G,H)。つまり、神経軸索は Wnt シグナルを亢進して、細胞増殖を制御していることが示唆された。神経細胞には Wnt 活性化因子である *rspo2* 遺伝子が発現しており(図3J,K)逆に、感丘細胞では、その受容体 *lgr6* 遺伝子が発現している(図3I)。神経軸索が分泌する Wnt 活性化因子が、細胞増殖の activator として働く可能性が考えられた(Montpellier 大学・Alain Ghysen 博士との共同研究)。

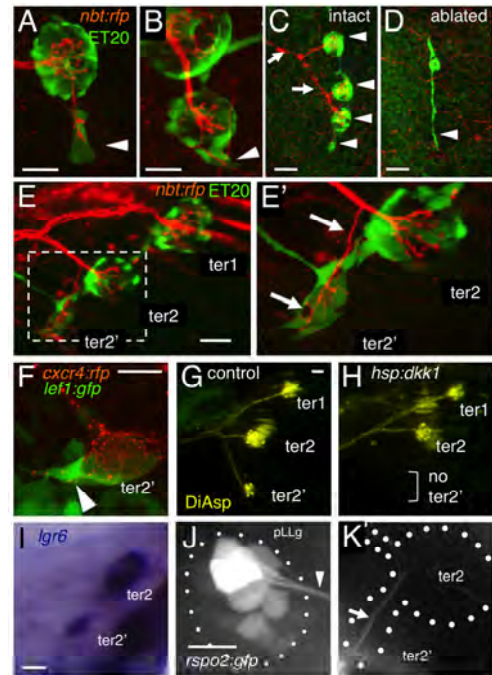


図3. 神経軸索投射が細胞増殖を促進する
(A,B) 出芽細胞に軸索が投射する。(C,D) 軸索を除去すると、出芽細胞の増殖が阻害され、娘感丘が形成されない。
(E,F) 出芽細胞におけるWntリポーター活性。
(G,H) Wntパスウェイの阻害は、細胞増殖を抑制する。
(I-K) 神経細胞では、Wnt活性化因子*rspo2*が発現し、逆に、感丘では受容体*lgr6*が発現する。

出芽細胞(ter2')では Wnt シグナルの活性が高かった(図3F)。また、*hsp:dkk1* 系統を用いて、一過的に Dkk を過剰発現させ Wnt シグナルを阻害すると、神経軸索を除去した時と同様に、出芽細胞の増殖が抑えられた(図3G,H)。つまり、神経軸索は Wnt シグナルを亢進して、細胞増殖を制御していることが示唆された。神経細胞には Wnt 活性化因子である *rspo2* 遺伝子が発現しており(図3J,K)逆に、感丘細胞では、その受容体 *lgr6* 遺伝子が発現している(図3I)。神経軸索が分泌する Wnt 活性化因子が、細胞増殖の activator として働く可能性が考えられた(Montpellier 大学・Alain Ghysen 博士との共同研究)。

(4) 感丘外縁を取り囲むマントル細胞が、器官の形態維持に必要である

器官サイズを調節するためには、器官の形態を正常に保つことが必要である。感丘は、上皮極性をもった細胞が同じ向き並んでおり、中央に感覚細胞が位置することにより、Wnt/Dkk のフィードバックが有効に働いていると考えられる(図4 A,B,E)。Wnt パスウェイが恒常的に活性化される *apc* 変異体では、細胞増殖が促進する以外に、器官が皮膚の外に出ず、vesicle 状の異常形態を示した(図4C-E)。有毛細胞は正常に分化するが、感覚毛を異所的に生じた内腔に伸ばした(図4D, inset)。さらに、*apc* 変異体では、感丘の最外層を一行に取り囲む支持細胞(マントル細胞)が欠損していることが分かった(図4D)。マントル細胞は、器官の最外縁を取り囲むことによって、器官形態を維持し、感覚毛を皮膚の外に伸ばす役割があると考えられた。感丘の形成過程において、Wnt シグナルの抑制は、細胞増殖を抑制するだけでなく、マントル細胞の分化を促進し、器官の形態を正常に保つ働きがある。

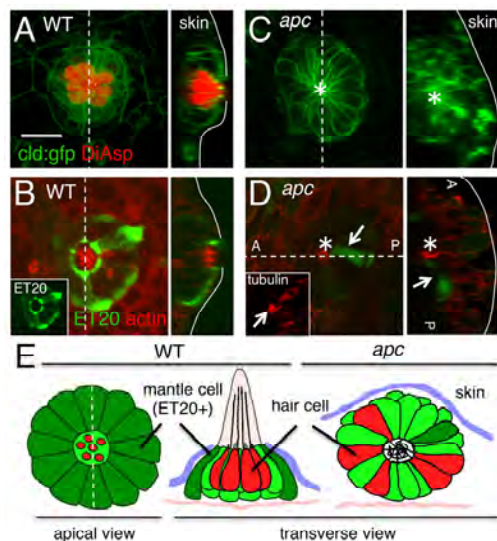


図4. マントル細胞が、感丘の形態を制御する
(A,B) 正常個体ではマントル細胞(ET20+)が感丘の周囲を取り囲み、有毛細胞は皮膚の外に感覚毛を伸ばす。
(C,D) *apc*変異体は、マントル細胞を欠失し、vesicle 状の形態を示す。有毛細胞は正常に分化するが(D, inset)、感覚毛は異所的に生じた内腔(*)に伸びる。(E) 模式図。

(5) まとめ: 器官の形態とサイズの制御における Wnt シグナルの役割

これまで、本研究で明らかになった、感覚器形成メカニズムの模式図を図5に示す。

1: Wnt シグナルは細胞増殖を促進させる。一方、感覚細胞の形成には関与せず、一定頻度で分化した感覚細胞が Dkk2 を分泌し、周囲の細胞増殖を抑制する。Wnt/Dkk からなる「負のフィードバック」によって、発生過程・再生過程における感覚器サイズを一定に保っている(図5A)。

2: 神経軸索が Wnt シグナルの亢進を介して細胞増殖を制御している。したがって、神経細胞で Wnt 活性化因子が発現している可能性がある。その候補として、Rspo/Lgr シグナルが考えられる(図5A)。

3: Wnt シグナルは、マントル細胞の分化を抑制する(図5A)。

マントル細胞は、感丘の最外層を取り囲み、すべての感丘細胞を

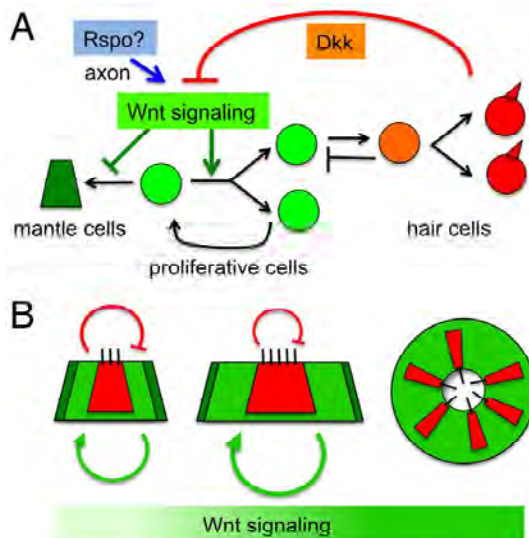


図5. 感覚器のサイズと形態を制御するメカニズム
(A) 感丘形成における細胞間制御ネットワーク。
(B) Wnt/Dkkのバランスが感覚器サイズを制御する。Wnt signalingがさらに過剰になると、マントル細胞(濃緑)が欠失し、vesicle 状の形態をとる。

apico-basal 方向に並べる働きがある。マントル細胞が欠失すると、感丘は正常の形態を保てず、vesicle 状の構造を取り、その結果、感覚毛を表皮の外に伸ばすことができなくなる(図5B)。つまり、マントル細胞は、物理的な力で器官形態を支える「ブック・エンド」として働いていると考えられる。

3. 今後の展開

(1) 器官サイズの調節メカニズム

器官を正しいサイズに保つことは、体全体を協調的に動かすために重要である。本研究では、感丘が負のフィードバック機構により、一定の大きさを保つことを見出した。さらに、神経軸索が、細胞増殖を制御していることを示した。今後、activator 分子とその作用機序を明らかにし、器官サイズ決定システムの全体像を解明したい。

頭部にある特殊な感丘(管器感丘 canal organ)は、魚の成長と共に大きくなる。管器感丘は、体表の感丘とは異なり、皮膚下に存在し、硬骨に取り囲まれており、環境の水に接していない。したがって、管器感丘は、水の流れではなく、加速度や餌の振動を感知すると考えられている。つまり、感丘は感覚機能に応じて、「一定サイズを保つ」戦略と、「プロポーションに成長する」戦略を使い分けている。また、感丘形態は魚種によって多様であることから、activator, inhibitor の他に、regulator が存在すると考えられる。今後、感覚器のサイズや形を制御する仕組みを調べることによって、生物が様々なプロポーションや形態を生み出す普遍的なメカニズムを明らかにしたい。

(2) 聴覚器官の再生医療への応用

哺乳類の聴覚器官(蝸牛管)は、魚類の感丘と同じく、有毛細胞とそれを取り囲む支持細胞からなる。我々の聴覚器の有毛細胞が外傷や老化に伴って失われ、二度と再生しないのに対し、感丘は、著しい再生能力を持っている。本研究で明らかにした細胞増殖制御メカニズムは、感丘をすみやかに再生し、恒常的に維持するためのシステムである。今後、感丘細胞における Wnt シグナルの役割を調べることによって、聴覚器の治療や再生医療に結びつくと考えられる。

4. 自己評価

当初の研究のねらいでは、「側線組織がいかにして構築され、決まった形態を獲得するのか」という漠然とした全体像を思い描いていた。研究を開始した時点で、分子については何も分かっていない状況であった。本研究によって、分子レベルで解明したことは、「感覚器の大きさを制御する仕組み」という限られた部分であるが、器官サイズ制御における負のフィードバック機構という新しいメカニズムを提唱できたと考えている。

つぎに、「器官構築における神経軸索の役割」として、細胞増殖に神経軸索が必要であることを明らかにした。実際に働いている分子はまだ分かっていないが、候補となる分子を同定しており、近い将来、実験的に検証できると考えている。さらに、「感覚器の形態を維持する仕組み」として、マントル細胞の役割を提唱した。その細胞・分子レベルでの役割は全く未知のものであり、今後の研究課題としたい。

もう一つ、当初の予定では、「多様性を生み出す仕組み」を考えていた。具体的には、「今後

の展開」で述べた、魚の成長と共に大きくなる特殊な感丘の発生機構を解析である。予備実験の結果、この感丘は、発生が非常に遅く、孵化後 1 ヶ月かかること、頭骨や皮骨に深くもぐり込み、遺伝子解析が容易でないこともあり、記載のみにとどまった。この感丘の発生には、骨形成(骨芽細胞と破骨細胞)が密接に関与していることが分ってきたので、今後の研究課題としたい。

5. 研究総括の見解

一生成長が持続する魚類では神経回路の構築が繰り返されるため再生能力の仕組みの解析に適していることに着目し、遺伝子の機能操作実験にも適したゼブラフィッシュを用いて側線神経感覚器官(感丘)の増加と器官サイズ決定の仕組みを解析した。感丘の増加は細胞の移動と増殖によること、これに Wnt シグナルが関わっており、分化した感覚細胞が Wnt 阻害因子 dkk2 を分泌して周囲の細胞増殖を抑制する負のフィードバックにより、器官サイズが調節されまた支持細胞を介して器官の形態が正常に保たれることを見出した。さらに神経軸索が Wnt シグナルを介して感丘の細胞増殖を制御することを示した。これらの成果は感覚器のサイズの決定という形態形成における基本的な課題の理解に大きな前進をもたらし、国際的な総説も著わした。本研究では、魚類の感丘をモデルシステムとしてサイズ決定という形態制御に関わる細胞・分子機構の解明を行ったが、ここで明らかになった機構は脳のサイズの決定などにも当てはまる可能性があり、今後その普遍性が明らかになることが期待される。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. **Wada H**, Dambly-Chaudiere C, Kawakami K, Ghysen A. Innervation is required for sense organ development in the lateral line system of adult fish. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2013), in press.
2. **Wada H**, Ghysen A, Satou C, Higashijima S, Kawakami K, Hamaguchi A, Sakaizumi M. Dermal morphogenesis controls lateral line patterning during postembryonic development of teleost fish. Dev. Biol.(2010),349, 583-594.

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

総説(本)

Ghysen A, **Wada H**, Dambly-Chaudiere C. Patterning the Lateral Line in Teleosts: Evolution of Development. in "Flow Sensing in Air and Water - Behavioural, Neural and Engineering Principles of Operation." ed. by Bleckmann H, Mogdans J, Coombs S, Springer-Verlag. in press.