

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 16 日現在

機関番号：15101

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22115010

研究課題名（和文）大脳皮質視覚野の経験依存的可塑性を誘発する神経活動の解明

研究課題名（英文）Neural activity for the experience-dependent plasticity in the visual cortex

研究代表者

畠 義郎（Hata, Yoshio）

鳥取大学・医学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：40212146

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 59,900,000 円

研究成果の概要（和文）：本課題は、視覚遮断による大脳皮質視覚野の眼優位可塑性と視床 - 皮質投射の再編成に着目し、それらが起こる生後時期と関連分子を検討した。その結果、眼優位可塑性が観察される生後発達の臨界期の中でも、その後期にのみ入力軸索の再編が起きることを見出した。また、内因性カンナビノイド2-AGの合成酵素であるdiacylglycerol lipase- α を阻害したりノックアウトすると眼優位可塑性が阻害されることから、内因性カンナビノイド系が眼優位可塑性に関与することを明らかにした。さらに様々な動物種で神経回路再編のメカニズム探索のため、生後動物の特定の脳部位の少数ニューロンへの遺伝子導入技術を開発した。

研究成果の概要（英文）：I determined when during the critical period of postnatal life monocular visual deprivation induces rearrangement of thalamocortical axons and whether endocannabinoid system contributes to the ocular dominance plasticity in the visual system. The rearrangement of thalamocortical axons was observed at the late phase of the critical period but not at the peak of it. Also, I found that a pharmacological inhibition of diacylglycerol lipase- α , which is a synthetic enzyme of an endocannabinoid 2-AG, or knockout of the enzyme disturbs ocular dominance plasticity, suggesting a pivotal role of endocannabinoid system in the ocular dominance plasticity. Furthermore, I developed a novel gene transfer technique to a few neurons in the identified brain region of postnatal animals, which enables to explore mechanisms of neural circuit plasticity in various animal species.

研究分野：発達神経科学

キーワード：視覚系 可塑性 神経回路 臨界期

1. 研究開始当初の背景

発達期の哺乳類に片眼視覚遮断を施すと、大脳皮質視覚野のニューロンは遮蔽眼への反応性を失い、健常眼にのみ反応するようになる(眼優位可塑性)。また、視覚情報は網膜から視床の外側膝状体を経て視覚野へ伝達されるが、遮蔽した眼の情報を運ぶ入力軸索が退縮するという形態学的な変化、さらにその皮質上の投射領域(眼優位コラム)が縮小するというマクロレベルの変化を示す。これらの変化は成熟動物では見られず、視覚系は経験依存的な脳機能と神経回路の発達研究の良いモデルとして、精力的に研究がつけられている。これまでに眼優位可塑性に関与する分子は種々報告されているが、神経回路変化のメカニズムについてはほとんど報告が無い。また視覚野の各種ニューロンの機能変化や神経回路変化といった様々な現象が発達に伴って一体となって生じるのか、それとも逐次、特定の時期に段階的に生じるものかといった基本的な点も不明である。

経験に依存した脳の発達機構を理解するには、以上のような視覚反応や神経回路の変化が、どのような神経活動により、発達のどの段階で、どのような分子メカニズムによって生じるのかを明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

本課題では視覚反応や神経回路の変化が、発達のどの段階で、どのような分子メカニズムによって生じるのかを明らかにするため、視覚野への入力軸索の経験依存的反縮に注目した。

片眼を遮蔽すると、遮蔽眼情報を運ぶ入力軸索が退縮する。この時、視覚野ニューロンは健常眼入力により活動しており、入力軸索が視覚情報を運ばないにもかかわらず皮質ニューロンが活動する場合に働く軸索淘汰メカニズムの存在を強く示唆する。一方、代表者は、視覚野の活動を薬理的に抑制した状態で片眼を遮蔽すると、通常とは逆に健常眼機能が低下し、健常眼情報を運ぶ視床からの入力軸索が退縮することを見出している(Hata et al. Neuron 1999)。すなわち、入力軸索が視覚情報を運ぶにもかかわらず皮質ニューロンが反応しない場合に軸索を淘汰する仕組みが働いている。以上いずれの場合でも、「視覚情報の伝達に寄与しないこと」が軸索退縮の誘発を決定しており、視覚経験の変化が回路書き換えにつながる仕組みを明らかにする格好のモデルとなる。ただし、抑制視覚野での可塑性が成熟脳では生じないかどうかは検討されていないため、この可塑性が脳発達を反映するかどうかは不明である。

そこでまず、抑制視覚野での可塑性が発達期にのみ生じるかどうか、そうであれば臨界期のどの段階で生じるかを、ニューロンの視覚反応および視床-皮質投射軸索の変化について検討した。次に正常視覚野の可塑性につ

いても、視床-皮質軸索の変化が臨界期のいつ生じるかを検討した。視床-皮質投射軸索の変化はこれまでネコを用いて調べられてきた。げっ歯類ではこの神経回路変化が顕著ではないため、本課題でもネコを用いる。

さらに入力軸索退縮の分子メカニズムを明らかにする目的で、内因性カンナビノイドの関与をマウスを用いて検討した。この分子はシナプス後細胞からシナプス前終末に働きシナプス伝達を修飾する逆行性のメッセンジャーであり、入力軸索の退縮を誘導するシグナルとして有力な候補である。

最後に、生後動物の特定の脳部位への新規遺伝子導入方について述べる。神経回路変化のメカニズムの理解には、様々な分子操作が必須となるが、上記のようにげっ歯類では視床-皮質投射軸索の変化は顕著ではないため、ネコなど他の動物種にも適用可能な方法が必要である。さらに、個々の軸索形態などを詳細に観察するには、少数の細胞にのみ分子操作を施す必要がある。そこで、電気穿孔法による遺伝子導入を応用し、げっ歯類以外にも適用可能な、生後動物の特定の脳部位の少数ニューロンにのみ遺伝子を導入する方法を開発した。

3. 研究の方法

(1)視床-皮質投射軸索の経験依存的反縮の年齢依存性

発達期(臨界期のピークである生後 25 日付近あるいは後期である生後 40 日付近)、成熟期のネコの一次視覚野に、muscimol が入ったポンプに接続したカニューレを埋め込み、視覚野の活動を持続的に抑制した。また同時に、反対側の眼からの投射を受けている外側膝状体の A 層に順行性のトレーサーであるピオチン化デキストランアミンを注入し、さらに対側眼を眼瞼縫合により遮蔽した。6 日間の片眼遮蔽の後、神経活動が抑制されていた皮質領域の広さを電気生理学的に調べてから、muscimol 投与を中止し、視覚野ニューロンの眼優位性を調べた。

その後、脳をパラホルムアルデヒドで固定し、ABC 法で軸索を可視化した。コンピュータ上で軸索分枝を 3 次元的に再構築し(Neurolucida system, Microbrightfield 社)その形態を定量的に評価した。

同様の実験を、皮質を抑制しない動物についても行った。

(2)眼優位可塑性への内因性カンナビノイド系の関与

片眼遮蔽後の眼優位可塑性と入力軸索の変化に内因性カンナビノイド系が関与する可能性を検討するため、マウス視覚野での内因性カンナビノイド合成酵素 DGL と受容体 CB1 の発現と分布をウェスタンブロット法と免疫組織化学法により検討した。

また、片眼遮蔽動物に DGL 阻害薬を投与する、あるいは DGL 欠損動物を用いて、眼

優位可塑性への寄与を検討した。

(3) 生後動物の特定脳部位への新規遺伝子導入法

エレクトロポレーションは、遺伝子発現が早い、導入する遺伝子サイズが制限されない、ウイルスベクターを用いた遺伝子導入と比較して安全など多くの利点を持つ。今回、局所エレクトロポレーションにより、生理学的に位置を同定した脳の深部領域への遺伝子導入を試みた。

生後の発達期以降のマウスを用いて、CAGプロモーター下でGFPを発現するDNAプラスミドを充填したガラス管電極を、視床外側膝状体に刺入した。ガラス管電極より神経活動を記録し、視覚反応の観察によって外側膝状体の位置を確認した後、記録した部位にプラスミド溶液を圧注入し、記録に用いたガラス管電極を通して電圧パルスを与えてエレクトロポレーションを行った。

4. 研究成果

(1) 抑制視覚野での視床-皮質投射軸索の経験依存的退縮の年齢依存性 (Morishima et al. *Cerebral Cortex* 2013)

成熟したネコの一次視覚野では、通常の眼優位可塑性も逆向きの眼優位可塑性も観察されず、逆向きの眼優位可塑性は通常の可塑性と同じく、発達期特有の現象であるということが明らかとなった。しかし、発達期においては、通常の眼優位可塑性が最も顕著である臨界期のピーク時期(生後 24-28 日)には逆向きの眼優位可塑性は観察されなかった。一方、臨界期の後期(生後 40 日以降)の動物では、通常の眼優位可塑性と抑制視覚野での逆向きの眼優位可塑性がともに観察された。

また、形態学的にも、臨界期後期の動物の健常眼由来の入力軸索では、その全長と分岐点の数が、同年齢にあたる生後 50 日齢の正常動物のもの比べて有意に減少していたのに対して、臨界期ピークの動物のものは正常動物と比べて有意な差は見られなかった。

以上より、抑制視覚野での逆向きの眼優位可塑性と、健常眼由来の入力軸索の刈り込みは、従来報告されている臨界期の後期にのみ発現することが明らかとなった。

(2) 正常視覚野での視床-皮質投射軸索の経験依存的退縮の年齢依存性 (樋川ら 第 89 回日本生理学会大会 2012)

上記の結果から、抑制視覚野では入力軸索の退縮が臨界期後期にのみ見られることがわかった。一方、正常視覚野では、機能的可塑性は臨界期全般に見られるが、遮蔽眼由来入力軸索の退縮がいつ起きるかは明らかでない。そこで臨界期ピークと後期の動物を用いて片眼遮蔽が入力軸索形態に与える影響を調べた。

その結果、抑制視覚野と同様に、遮蔽眼由来の軸索は、臨界期後期にのみ退縮を示した。

このことから、片眼遮蔽に伴う可塑性のうち、入力軸索の再編は臨界期後期に生じ、それまでに起こった機能的变化を固定するものと考えられる。

(3) 眼優位可塑性への内因性カンナビノイド系の関与 (Yoneda et al. *PLoS ONE* 2013, 亀山ら第 37 回日本神経科学大会 2014)

カンナビノイド受容体 CB1 は主として視覚野の I 層と II 層に分布していた。またその発現は生後 20 日ごろより顕著となり、発達に伴って増加した。その局在を詳細に観察すると、CB1 は神経終末に多く分布しており、その多くは小胞性 GABA 輸送体 (VGAT) 陽性の終末であった。したがって、CB1 は視覚野では主に抑制性ニューロンの終末に分布していると考えられる。当初、視床からの入力軸索へのシグナル分子の候補として検討を始めたが、視床軸索終末のマーカーである小胞性グルタミン酸輸送体 2 型 (VGLUT2) との共存はあまり観察されなかった。

一方、その受容体に作用する内因性カンナビノイドについては、いまだ特定されていない。中枢神経系では 2-arachidonoylglycerol が主たるリガンドではないかと考えられていることから、その合成酵素 DGLα について視覚野での発現と分布を調べた。DGLα は皮質 I 層下部と II 層に分布しており、興味深いことに CB1 の分布とは相補的であった。発現の生後発達を調べたところ、DGLα は発達に伴い増加し、臨界期である生後 40 日付近で最大となり、その後は成熟期に向かって漸減した。

視覚野に DGL 阻害薬である tetrahydropipstatin (THL) を投与した状態で片眼遮蔽を施すと、眼優位可塑性は阻害された。DGL には DGLα と DGLβ の 2 種類があるが、THL その両方を阻害する。そこで DGLα、-β それぞれの欠損マウスを用いて眼優位可塑性を調べたところ、DGLα 欠損動物でのみ眼優位可塑性が阻害されていた。これらの結果は DGLα を介する内因性カンナビノイドシグナルが、眼優位可塑性の発現に必要であることを示している。

(4) 生後動物の特定脳部位への新規遺伝子導入法 (Ohmura et al. *Brain Struct. and Funct.* 2015)

エレクトロポレーションから数日後に脳を固定標本として観察したところ、視床でいくつかの細胞体や樹状突起に GFP の発現が認められた。さらに数週間後には、皮質で視床からの投射軸索が標識されていた。遺伝子導入の成功率は約 35% であった。さらに、核膜孔を拡大する作用を持つ薬剤 TCHD をプラスミド溶液中に混合することで、発現強度が増大した。GFP の発現は多くの場合組織を観察するだけで確認できるが、GFP の免疫染色を行うことで軸索形態の詳細まで観察することができた。

今回の実験では生後 60 日齢以上のマウスでも GFP 発現が認められたことから、成熟脳への遺伝子導入法としても有望である。加えて、この技術はげっ歯類だけでなく、ネコにも適用できることを確認しており、様々な動物種に応用できると考えられる。この方法は、生理学的に確認した脳領域の中の少数の細胞に、様々な遺伝子導入をすることで、神経回路の詳細な解析や、それら細胞での分子操作を可能にすると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 9 件)

Ohmura, N., Kawasaki, K., Satoh, T. & Hata, Y. "In vivo electroporation to physiologically identified deep brain regions in postnatal mammals." *Brain Struct. and Funct.* **220**, 1307-16 (2015) doi: 10.1007/s00429-014-0724-x. 査読有

Hayano, Y., Sasaki, K., Ohmura, N., Takemoto, M., Maeda, Y., Yamashita, T., Hata, Y., Kitada, K. & *Yamamoto, N. "Netrin-4 regulates thalamocortical axon branching in an activity-dependent fashion." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 15226-31 (2014) doi: 10.1073/pnas.1402095111. 査読有

Yoneda, T., Kameyama, K., Esumi, K., Daimyo, Y., Watanabe, M. & Hata, Y. "Developmental and visual input-dependent regulation of the CB1 cannabinoid receptor in the mouse visual cortex." *PLoS ONE* **8(1)**, e53082 (2013) doi: 10.1371/journal.pone.0053082. 査読有

Morishima, Y., Toigawa, M., Ohmura, N., Yoneda, T., Tagane, Y. & Hata, Y. "Critical period of experience-driven axon retraction in the pharmacologically inhibited visual cortex." *Cerebral Cortex* **23**, 2423-28 (2013) doi: 10.1093/cercor/bhs235. 査読有

梶 義郎「弱視と視覚系神経回路の経験依存的再編成」特集「弱視」*神経眼科* **29**, 379-88 (2012).

[学会発表](計 23 件)

大村菜美「マウス外側膝状体ニューロンの視覚野における軸索投射パターン」第 92 回日本生理学会大会、2015/03/23、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

梶 義郎「弱視と視覚系神経回路の再編

成」招待講演、第 55 回日本視能矯正学会、2014/11/29、京都国際会議場(京都府・京都市)

梶山克朗「マウス一次視覚野における Diacylglycerol lipase- α の発達期可塑性への寄与」第 37 回日本神経科学大会、2014/09/11、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Ohmura, N. "Gene transfer using electroporation in the deep brain regions of postnatal mammals" 43th Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2013/11/11, San Diego (米国)

Ohmura, N. "Experience-dependent regulation of geniculocortical axons and synapses in the pharmacologically inhibited visual cortex of mice" 42th Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2012/10/16, New Orleans(米国)

梶 義郎「薬理的に抑制した大脳皮質視覚野における経験依存的な視床-皮質シナプスの変化」第 35 回日本神経科学大会、シンポジウム「発達脳における神経活動依存的なリモデリング」、2012/09/19、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

樋川正仁「ネコ視覚野における臨界期後期での片眼遮蔽による視床-皮質軸索退縮」第 89 回日本生理学会大会、2012/03/31、松本文化会館(長野県・松本市)

[その他]
ホームページ：
<http://www.meso-neurocircuitry.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶 義郎 (HATA, Yoshio)
鳥取大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：40212146