

平成22年 4月23日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17023033

研究課題名（和文） 視覚野神経回路の経験依存的形態変化

研究課題名（英文） Experience-dependent remodeling of visual neural circuits.

研究代表者

畠 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

研究成果の概要（和文）： 発達期哺乳類の大脳皮質視覚野に見られる、視覚経験に依存した不
 用な神経投射の淘汰のメカニズムを研究した。視覚野に入力する神経軸索が視覚情報を伝達す
 るにもかかわらず、その標的となる視覚野ニューロンが反応しないことが、入力軸索の淘汰を
 引き起こすこと、さらにそのメカニズムは主としてシナプス前性すなわち入力軸索に存在する
 ことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）： In the developing visual cortex, inappropriate neural connections
 are eliminated in an experience-dependent manner. This study demonstrated that the
 input axons to the visual cortex are eliminated when cortical cells do not respond to input
 activities mainly based on presynaptic mechanisms.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	16,100,000	0	16,100,000
2006年度	13,300,000	0	13,300,000
2007年度	11,300,000	0	11,300,000
2008年度	11,400,000	0	11,400,000
2009年度	11,400,000	0	11,400,000
総計	63,500,000	0	63,500,000

研究分野：発達神経科学

科研費の分科・細目：該当なし

キーワード：眼優位可塑性、生後発達、大脳皮質視覚野、臨界期、ヘップ則

1. 研究開始当初の背景

脳の発達には、生後初期の個体の経験が大きく影響する。経験が脳発達に影響する仕組みを解明することは、児童の健全な発達や発達障害からの回復を目指すために不可欠である。

視覚系は、経験依存的脳発達を研究する強力なモデルとして、多くの研究がおこなわれ

てきた。発達期の哺乳類において一方の眼に視覚遮断を施すと、大脳皮質視覚野のニューロンは遮断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、視覚野への入力軸索の中で、遮断した眼の情報を運ぶもの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。同様の操作を成熟動物に施しても、発達期のような顕著な可塑的变化は見られない。このように、経験の影響が生後発達の一時期（臨界期）に限って皮質機能を修飾し、それが神経回路の変化となって脳に刻印される点が、発達期可塑性の重要な点である。

視覚野ニューロンの機能すなわち光反応性については、その経験依存的可塑性や関連分子についてこれまで多くの研究がなされてきた。しかし、機能変化から回路変化に至る仕組みについては未だほとんど不明である。

2. 研究の目的

本課題は、高等哺乳類の脳の特徴である大きく発達した大脳皮質に注目し、視覚経験が視覚系神経回路に与える影響とそのメカニズムを明らかにすることを目的とする。そのため、(1) どのような神経活動が神経回路の消長を決定するのだろうか？ (2) 視覚経験による機能変化は神経回路のどの部分にどのような変化として固定されるのだろうか？ さらに、(3) その過程にはどのような分子メカニズムが関わるのだろうか？ これらの疑問に答えることで神経回路の発達機構の理解を目指す。以下に、それぞれの疑問に対する本課題での取り組みの成果を述べる。

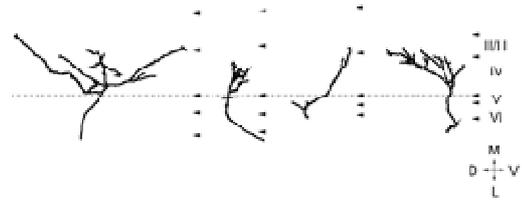
3、4. 研究の方法と成果

(1) 活動を抑制した視覚野に見られる入力軸索の退縮

発達期の哺乳類大脳皮質一次視覚野では、一時的な片眼遮蔽によって視覚野ニューロンは遮蔽眼への反応性を失い、外側膝状体からの入力線維のうち遮蔽眼の情報を伝える軸索が急速に退縮する。両眼を遮蔽した場合には軸索の退縮は見られないことから、これは両眼からの入力の不均衡を必要とする現象である。このことから、両眼入力間の競合メカニズムが想定されてきた。しかし、片眼遮蔽と両眼遮蔽では、入力の受け手である視覚野ニューロンの活動が大きく異なる可能性がある。すなわち、片眼遮蔽の場合は、視覚野ニューロンは健常眼からの視覚入力に駆動されるが、両眼遮蔽の場合には有効な入力がなく、活動が大きく低下すると考えられる。このため、入力軸索の退縮には入力間の競合が必要なのか、それとも入力-標的ニューロンの活動関係が重要なかが明らかでなかった。

一方、片眼遮蔽の際に皮質ニューロンの活動を GABA_A 受容体作動薬の muscimol で薬理的に抑制しておくと、通常と逆に、視覚野ニューロンは遮蔽眼により強く反応する

正常眼動物



両眼遮蔽動物

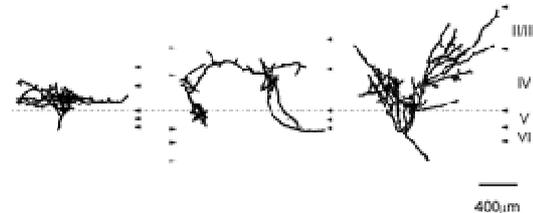


図1. 正常眼動物、両眼遮蔽動物の抑制視覚野における単一入力軸索の再構成例。図は前額断像を示し、矢尻は皮質の層の境界を示す。D, dorsal; V, ventral; M, medial; L, lateral。

ようになり、健常眼の情報を運ぶ入力軸索が退縮することが明らかになっている。抑制皮質の場合は、視覚遮断の有無に関わらず皮質活動は常に抑制されている。そこで抑制皮質に見られる健常眼軸索の退縮が、両眼入力との競合によるものかどうかを明らかにするため、正常眼動物、両眼遮蔽動物において、抑制皮質での入力軸索形態を解析した。その結果、正常眼動物の抑制皮質では入力軸索が顕著に退縮し、その程度は片眼遮蔽動物の抑制皮質での健常眼軸索と同程度であった（図1）。また両眼遮蔽動物では入力軸索の退縮は見られなかった。従って、抑制皮質に見られる健常眼軸索の退縮は、両眼入力の不均衡によるものではなく、入力軸索と皮質ニューロンの神経活動の関係に依存するものであると考えられる。この結果は、発達期視覚野において、視覚入力により駆動される homosynaptic な軸索退縮メカニズムが存在することを示唆している (Haruta & Hata, *Curr. Biol.*, 2007)。

この muscimol 投与による皮質抑制では、皮質ニューロンの電気活動は抑制されているが、入力軸索の電気活動や伝達物質放出は抑制されていない。したがって、代謝型グルタミン酸受容体などを介した局所的なシナプス伝達が軸索退縮に寄与している可能性がある。この可能性を検討するため、神経伝達物質の放出を薬理的に阻害し、入力軸索の退縮が起こるかどうかを観察した。ボツリヌス毒素 E 型は SNARE 蛋白の 1 つ SNAP-25 を切断し、神経伝達物質の放出を阻害することが知られている。この毒素を視覚野に投与すると、約 1 週間にわたって SNAP-25 の切断がウェスタンブロット法により確認できた。この時、投与部近傍の視覚

野では、自発的なもの、視覚刺激によるもの共に神経活動は記録されなかった。このように神経伝達物質の放出阻害により活動を抑制した皮質領域で、入力軸索の形態を解析したところ、視覚入力を阻害しない動物では、入力軸索は顕著な退縮を示した。一方、両眼遮蔽により視覚遮断を行った動物では、軸索退縮は観察されなかった。このことは、抑制視覚野に見られる、視覚経験に依存した軸索退縮は、シナプス伝達を必要とせず、シナプス前性のメカニズムによることを示唆している (Watanabe et al., PLoS ONE, 2009)。

次に、この抑制皮質での逆向きの眼優位可塑性と正常皮質での眼優位可塑性との関わりを明らかにする目的で、それぞれの可塑性の年齢依存性を比較した。通常の眼優位可塑性は生後発達の一時期 (臨界期) に強く観察されるが、成熟期にはあまり見られない。成熟期のネコ視覚野を muscimol 投与により抑制し、片眼遮蔽をおこなったところ、眼優位性の変化は認められなかった。従って、抑制皮質での眼優位可塑性もまた発達期の可塑性を反映すると考えられる。しかし、発達期の動物を用いた実験の中で、眼優位可塑性のピークとされる生後 24 日付近の動物では、顕著な逆向きの眼優位可塑性すなわち健常眼反応の減弱は観察されず、臨界期の終盤である生後 40 日付近で強く観察されることが明らかとなった。そこで、入力軸索の退縮について年齢依存性を確認した。生後 40 日付近で皮質を抑制した動物の健常眼からの入力軸索の形態を解析すると、前述の実験と同様、有意な退縮が観察された。一方、臨界期ピークの生後 24 日付近で皮質を抑制しても、顕著な軸索退縮は認められなかった。

これらのことから、抑制皮質に見られる軸索退縮を伴う眼優位可塑性は、発達期の後期にのみ発現する、視覚経験依存的な、シナプス前性の入力軸索の退縮メカニズムを反映するものと考えられる。この退縮は、入力軸索が視覚情報を運ぶにもかかわらず、標的ニューロンが反応しない場合、すなわち軸索活動が無効であった場合に、その軸索を淘汰する仕組みと考えられる。

(2) 皮質活動による皮質-視床フィードバックシナプスの制御

上記のように外側膝状体から一次視覚野への入力投射は、発達期に経験依存的な形態的可塑性を示す。しかし、皮質内神経回路や視覚野から外側膝状体へのフィードバック投射など、それ以外の神経回路がいかなる可塑性を示すかについてはほとんど不明である。そこで、外側膝状体へのフィードバック投射への神経活動の影響を検討した。外側膝状体においてフィードバック投射軸索のシナプス前部、後部にそれぞれ特異的に発現し

ている、小胞性グルタミン酸トランスポーター 1 (VGluT1) と代謝型グルタミン酸受容体 1 型 α (mGluR1 α) に注目し、皮質活動を抑制することで、これらの分子の発現が変化するかどうかを検討した。

発達期ラットの視覚野に muscimol を投与し、様々な期間 (2-28 日間) 薬理的に活動を抑制したところ、同側外側膝状体での mGluR1 α シグナルは抑制開始から 2 日後より有意に減少し、その減少は皮質抑制期間中持続した。一方、VGluT1 シグナルは、14 日以上 of 長期間抑制の後、有意に増加した。それに対して成熟ラットでは、長期間の皮質抑制後も VGluT1 には有意な変化は見られず、mGluR1 α は 7 日群でのみ一過性に減少した。

以上の結果より、視覚野から外側膝状体へのフィードバック投射シナプスが、発達期特異的に視覚野の神経活動によって制御されることが示された (Yoshida et al., Neurosci. Res., 2009)。このことから、入力軸索だけでなくフィードバック投射もまた発達期に活動依存的な調節を受けることがわかる。今後、フィードバック軸索が、入力軸索のような軸索再編成を伴う形態的可塑性を示すかどうかを検討する必要がある。

(3) 発達期片眼遮蔽による核内リン酸化 ERK の増加

眼優位可塑性は、リン酸化酵素 ERK の活性化を必要とすることが、その活性化阻害実験により示されている。しかし一方、ERK の活性化は神経活動に依存することが知られており、視覚遮断は ERK の活性を低下させると予想される。活性が低下する分子の活性化が必要であるとはどういうことなのだろうか。そこで ERK 活性が視覚遮断によってどのように変化し、さらにその変化は生後発達のいつ生じるのかを調べることとした。そのため、ラットの一次視覚野において、ERK の活性化型であるリン酸化 ERK の量や分布に対する片眼遮蔽の影響を、免疫染色法、ウェスタンブロット法により検討した。

視覚野では、主に II/III 層と VI 層に強いリン酸化 ERK 陽性細胞が観察され、これらのほとんどは興奮性ニューロンであった。短時間 (24 時間) 片眼遮蔽を施すと、リン酸化 ERK 陽性細胞の密度とタンパク量ともに、遮蔽眼から主に視覚入力を受けている対側視覚野で、正常動物に比べて有意に減少した。両眼遮蔽を施した場合は、両側視覚野で顕著な減少が認められた。眼優位可塑性は、片眼遮蔽により引き起こされるが、両眼遮蔽によっては誘発されない。したがって、ここで見られた ERK 活性の減少は、可塑性を反映するものではなく、視覚野での ERK 活性が視覚入力によって維持されているためと考えられる。実際、この効果は、眼優位可塑性が見ら

れない成熟動物でも観察された。

一方、リン酸化 ERK の細胞内分布に注目すると、片眼遮蔽によってリン酸化 ERK 陽性細胞は減少しているにもかかわらず、陽性核を持つ細胞は増加した。また細胞分画法により視覚野標本の核画分を調製したところ、片眼遮蔽動物でリン酸化 ERK タンパク量が増加していた (図 2)。すなわち、視覚野全体では ERK のリン酸化は減少するが、一部の細胞において、ERK のリン酸化と核への移行が昂進したものと考えられる。核内リン酸化 ERK の増加は、発達期の片眼遮蔽によってのみ引き起こされ、両眼遮蔽動物では見られなかった。さらに成熟期の片眼遮蔽でも観察されなかった。従って、眼優位可塑性の発現に関わる現象であると考えられる。この現象の時間経過を知るために、様々な長さの片眼遮蔽を行ったところ、核内リン酸化 ERK の増加は片眼遮蔽後 24 時間で最大となり、その後減少し、3 日後には観察されなかった。機能的な眼優位可塑性が片眼遮蔽後 3-4 日で完全に発現することから、核内リン酸化 ERK の一過性の増加は、その前に生じていることがわかる (Takamura et al., *Eur. J. Neurosci.*, 2007)。

これらの結果から、視覚野 ERK 活性の視覚入力による調節には、①発達期、成熟期ともに働く ERK リン酸化の調節、②発達期の片眼遮蔽直後にのみ起こる ERK の核へのシグナルの増強の 2 種類が存在すると考えられる。眼優位可塑性の発現に ERK 活性が必要であることと合わせて考えると、片眼遮蔽直後に起こる ERK の核シグナル増強が、その後の可塑性発現につながるものと考えられる。さらに、ERK 活性が神経活動により強く制御されていることから、片眼遮蔽によ

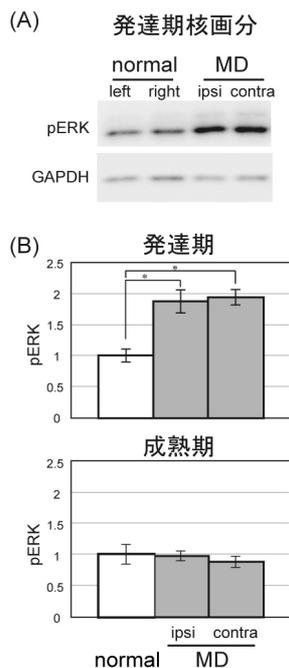


図2. 発達期視覚野では片眼遮蔽により核内リン酸化ERKが増加する。(A) 発達期視覚野から得た核画分を用いたリン酸化ERKのウェスタンプロットの例。normal, 正常動物; MD, 片眼遮蔽動物; ipsi, 同側; contra, 対側。(B) 発達期、成熟期での核画分リン酸化ERKの定量結果。いずれも正常動物の値を1として表示している。*: $p < 0.001$ 。

り、一部のニューロンでは活動が増大している可能性を示唆している。

(4) 電気刺激による視神経損傷後の視神経機能低下からの回復

どのような入力が可塑性を引き起こすかという研究の中で、電気刺激が視神経損傷による伝導路機能低下に対する保護効果を持つことに気づき、その効果を詳細に検証した。成熟ラット視神経に圧迫損傷を加え、直後にコンタクトレンズ電極による経角膜電気刺激 (6 時間) を与えた。同一動物の皮質から視覚誘発電位を繰り返し記録し、損傷と電気刺激の効果の評価した。その結果、視覚誘発電位は損傷直後に減弱したが、電気刺激直後にはすでに有意な回復が見られた。刺激後 1 週間たっても半数の動物で回復効果は持続していた。よって、経角膜電気刺激は視神経損傷に対する伝導路機能保護効果があると期待できる (Miyake et al., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2007)。

上記の研究により、発達期の視覚系神経回路が、標的に有効に情報を伝えない入力軸索を淘汰する仕組みを持つこと、視覚野への入力投射だけでなく視床へのフィードバック投射もまた神経活動依存的な制御を受けること、などを明らかにすることができた。大脳皮質は複雑なネットワークであり、それぞれの神経回路の制御機構を解き明かすことは容易ではない。今回明らかとなった抑制皮質における入力軸索の淘汰という現象は、視覚入力の有無により入力投射が変化する有様を、皮質内回路を抑制した状態で調べることができるため、経験から回路変化に至る経路を探る格好のモデルとなる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件、全て査読有)

①Yoshida M, Satoh T, Nakamura KC, Kaneko T, Hata Y, Cortical activity regulates corticothalamic synapses in dorsal lateral geniculate nucleus of rats. *Neurosci. Res.* 64, 118-127 (2009)

②Watanabe K, Morishima Y, Toigawa M, Hata Y, Experience-driven axon retraction in the pharmacologically inactivated visual cortex does not require synaptic transmission. *PLoS ONE* 4, e4193 (2009)

③Takamura H, Ichisaka S, Watanabe K, Toigawa M, Hata Y, Effects of anesthesia on immunohistochemical detection of phosphorylated extracellular signal-regulated kinase in cerebral cortex. *J. Neurosci. Meth.* 170, 300-304 (2008)

④Takamura H, Ichisaka S, Hayashi C, Maki H, Hata Y, Monocular deprivation enhances the nuclear signalling of extracellular signal-regulated kinase in the developing visual cortex. *Eur. J. Neurosci.* 26, 2884-2898 (2007)

⑤Miyake K, Yoshida M, Inoue Y, Hata Y, Neuroprotective effect of transcorneal electrical stimulation on the acute phase of optic nerve injury. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 2356-2361 (2007)

⑥Haruta M, Hata Y, Experience-driven axon retraction without binocular imbalance in developing visual cortex. *Curr. Biol.* 17, 37-42 (2007)

⑦Kameyama K, Hata Y, Tsumoto T, Recovery of binocular responses after brief monocular deprivation in kittens. *Neuroreport* 16, 1447-1450 (2005)

〔学会発表〕(計 15 件)

①嶋 義郎, 発達脳の可塑性とその臨界期—視覚系をモデルとして— 第51回日本小児神経学会総会, 2010.5.28, 米子.

②嶋 義郎, 視覚経験による視覚中枢神経回路の再編成 第113回日本眼科学会総会, 2010.4.16, 東京.

③Yoshio Hata, Experience-driven axon reorganization in the visual system 第32回日本神経科学大会 Symposium「中枢神経系のマップ形成とその再編成」, 2009.9.16, 名古屋.

④Kana Watanabe, Yu Morishima, Masahito Toigawa, Yoshio Hata, Experience-driven retraction of geniculocortical axons following cortical inactivation by preventing synaptic transmission 第36回国際生理学会世界大会, 2009.7.28, 京都.

⑤嶋 義郎, 視覚経験によって引き起こされる視床皮質投射軸索の退縮 第31回日本神経科学大会 Workshop「神経活動依存的な回路網形成の制御機構-プレかポストかどっちが大事」, 2008.7.10, 東京.

⑥田金裕一郎, 赤崎孝文, 久保悠介, 嶋 義郎, 自由行動下ラットの外側膝状体ニューロンの持続活動への視覚環境の効果 第85回日本生理学会大会, 2008.3.25, 東京.

⑦Yoshida, M., Satoh, T., Nakamura, K., Kaneko, T., Hata, Y., Activity-dependent regulation of mGluR1a and VGluT1 in the lateral geniculate nucleus of rat. 37th Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2007.11.3, San Diego, U.S.A..

⑧Takamura, H., Ichisaka, S., Hayashi, C., Maki, H., Hata, Y., Regulation of nuclear extracellular signal-regulated kinase activity in developing visual cortex. 37th Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2007.11.3, San Diego, U.S.A..

⑨吉田三穂, 佐藤武正, 中村公一, 金子武嗣, 嶋 義郎, 外側膝状体における代謝型グルタミン酸受容体の活動依存的調節の年齢依存性 第30回日本神経科学大会, 2007.9.10, 横浜.

⑩高村明孝, 一坂吏志, 林千尋, 牧廣利, 嶋 義郎, ラット視覚野における ERK 活性とその細胞内局在の視覚入力依存的制御 第30回日本神経科学大会, 2007.9.10, 横浜.

⑪嶋 義郎, 視神経損傷による機能低下に対する経角膜電気刺激の保護効果 シンポジウム「視覚機能の回復と代行」第84回日本生理学会, 2007.3.20, 大阪.

⑫嶋 義郎, 遺伝か環境か?—視覚経験に依存した脳発達— 第51回日本人類遺伝学会教育講演, 2006.10.18, 米子.

⑬森島 佑, 阪本広志, 赤崎孝文, 嶋 義郎, 薬理的に抑制された発達視覚野における逆向きの眼優位可塑性の初期変化 第29回日本神経科学大会, 2006.7.19, 京都.

⑭Takamura, H., Ichisaka, S., Hayashi, C., Maki, H., Hata, Y., Experience-dependent regulation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 activity and subcellular localization in rat visual cortex. 35th Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2005.11.12, Washington DC..

⑮Hata, Y., Haruta, M., Experience-dependent retraction of geniculocortical arbors in the pharmacologically inhibited visual cortex. 35th Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2005.11.12, Washington

DC..

[図書] (計 2 件)

①Hata Y, Springer-Verlag, "Synaptic elimination" in Encyclopedic Reference of Neuroscience, 2009.

②三宅賢一郎, 畠 義郎, メジカルビュー社, "視覚系の可塑性とその利用には何があるか?", 神経眼科をやさしく理解するための視覚と眼球運動のすべて, 2007.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

畠 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

(2)研究分担者

一坂 吏志 (ICHISAKA SATOSHI)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号: 50359874

(H17)

佐藤 武正 (SATO TAKEMASA)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号: 80346345

(H17)

赤崎 孝文 (AKASAKI TAKAFUMI)

鳥取大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 30335393

(H17)

(3)連携研究者

なし