

平成 21 年 6 月 24 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19791301  
 研究課題名 (和文) 眼瞼縫合時における発達脳視覚野への BDNF 投与による視床-皮質軸索形態変化への検討  
 研究課題名 (英文) Effects of BDNF on morphology of geniculocortical axons by eye lid suture in the developing visual cortex  
 研究代表者 大島 稔 (OHSHIMA MINORU)  
 関西医療大学 保健医療学部 講師  
 研究者番号：20342230

## 研究成果の概要：

ヒトやサル、ネコなどの一次視覚野には、左右の眼からの入力に対応する眼球優位カラムがあることが知られている。このカラム形成に視覚体験が重要である。また、脳内での神経の成長に脳由来神経栄養因子 (BDNF) が関与することが報告されている。本研究課題において、視覚野に BDNF を持続的に投与し、眼から視覚野への中継核である外側膝状体に軸索を染めるトレーサーを注入し、その形態を調べた結果、軸索が退縮することを明らかにした。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19 年度	1,900,000	0	1,900,000
20 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	270,000	3,070,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：神経眼科学

## 1. 研究開始当初の背景

これまでの研究により、ネコの一次視覚野の眼球優位カラム形成や可塑的变化が、ヒトやサルに似ていることが明らかになっている。また、その形成の時期や変化の時期についても、他の動物よりも詳しくわかっているため、BDNF を投与したときに起こると考えられる変化と、これまでのデータと比較しやす

いことがネコを用いた理由である。

脳由来神経栄養因子 (BDNF) は *in vitro* 標本において活動依存的に放出され、軸索などの成長に関与することが報告されていた。*in vivo* 標本において、報告者が関与したネコの一次視覚野に BDNF を投与し、眼球優位カラムの変化を調べた研究では、カラムが拡大することを報告した。しかしながら、この

研究では、視覚入力の中継核である外側膝状体からの軸索形態がどのように変化しているか不明であった。このことを明らかにすることは、脳内での BDNF の役割を考える上で重要であり、それを検討した報告はなかった。

## 2. 研究の目的

ヒトやサル、ネコの一次視覚野には左右の眼からの入力に対応する眼球優位カラムが存在することが知られている。このカラム形成に視覚体験が重要である。例えば、生後発達期に片側の眼瞼縫合を行うと、閉眼側に対応するカラムが退縮し、開眼側に対応するカラムが拡大することが知られている。また、この結果に対応して、外側膝状体から視覚野に投射する軸索も、開眼側のカラムに分布する軸索は伸長し、閉眼側のカラムに分布する軸索は退縮する関係が明らかになっている。

これまでに、脳内で神経ネットワークの形成に関係するいくつかの神経栄養因子が発見されており、そのうち活動依存的に放出されるものに BDNF がある。報告者がこれまでに関与した研究において、ネコの一次視覚野に BDNF を投与し、眼球優位カラムの変化を検討した結果、カラムが拡大することを報告した。しかしながら、この研究では外側膝状体からの軸索が伸長したことによるのか、退縮したことによるのかを明らかにできなかった。このことを検討するためには軸索形態を直接調べる必要がある。

## 3. 研究の方法

実験動物には生後 5 週の子ネコを用いた。これは、この週齢で眼球優位カラムが明瞭になっていること、外側膝状体からの軸索が、大人のネコと同様に投射していること、これまでに報告者が関与した研究においてこの週齢のネコを用いていたことである。

麻酔下で、片側の視覚野に BDNF を持続的に投与できる浸透圧ポンプを埋め込む手術を行った。もう片側にはコントロール溶液を投与できるようにした。外側膝状体から視覚野に投射する軸索を染色するために BDA というトレーサーを電気泳動で注入した。ネコの外側膝状体は 3 層に分かれており、上から A 層は反対側の眼に対応しており、A1 層は同側、C 層は反対側に対応している。この研究課題では電気生理学的に A 層を確認して投与を行った。また、実験終了後、A 層に投与されているか解剖学的に確認を行った。すべての投与が終了後、麻酔から覚醒させ、2 週間、自由行動下で飼育を行った。

2 週間後、深麻酔下で灌流固定を行い、脳

を取り出し、免疫組織化学法で BDNF と BDA の染色を行った。

軸索の形態は、ニューロロシーダを用いて、コンピュータで軸索の再構成を行った。そして、BDNF とコントロール群の軸索の長さや分岐点数の比較を行った。

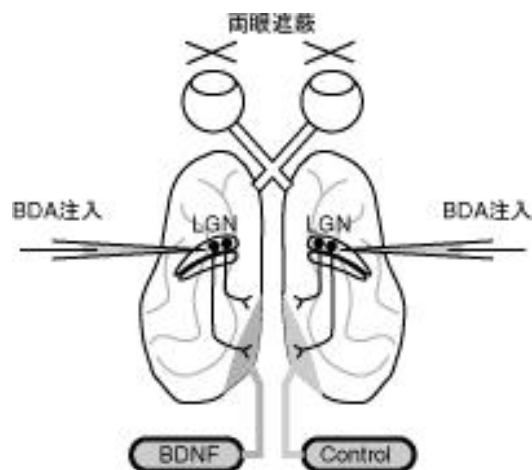


図 1

## 4. 研究成果

### (1) BDNF により軸索は退縮する

軸索の再構成は、白質から灰白質に入ったところから行った。解析は、4 層内の軸索のみを行い、5-6 層内にある軸索は除外した。

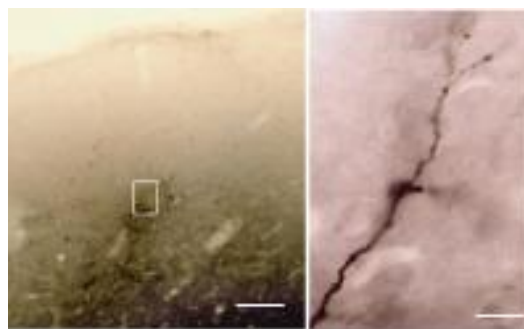


図 2 (この図は BDNF が広がっている領域に分布している軸索の例である。拡大しているのは 4 層内での例である。)

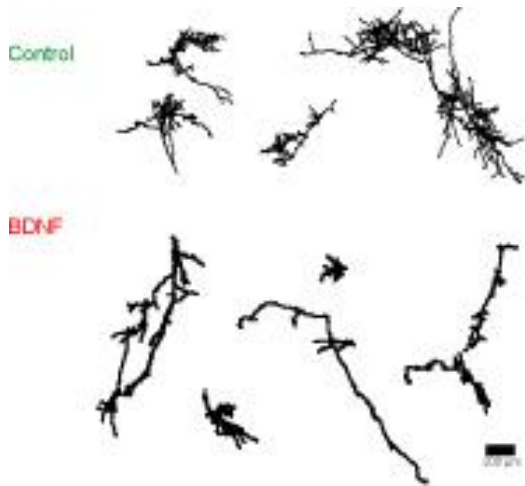


図 3

図 3 は再構成をした軸索を脳表から見た方向へコンピュータで回転している。この図にみられるように、BDNF が投与されている領域の軸索は、分岐点数が減少し、軸索の分布密度が下がっているように見える。それに対して、コントロールの軸索は、分岐点数が多く、小さな領域に密に分布しているように見える。図 2 の例にもあるように、BDNF 領域の軸索は、分岐が明らかに少ない。しかし、コントロール領域にある軸索は、分岐点がたくさんある。このことを定量解析したのが図 4 である。

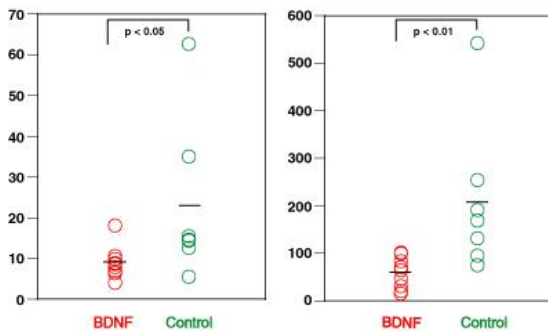


図 4

図 4 の左のグラフは軸索の長さで、右のグラフは分岐点数である。この図にみられるように、BDNF により軸索は退縮し、分岐点数も減少している。この結果は、報告者がこれまでに関与した研究において、BDNF 投与により眼球優位カラムが拡大したことから軸索が伸長すると予測していたことと反対の結果となった。このことから、報告者は軸索が退縮することにより、カラムの境界が不明瞭になることで、カラムが拡大して見えるのではないかと考え、次の解析を行った。

(2) BDNF により軸索の分布は密ではなくなる

BDNF により軸索の分岐点数減少と長さが短くなっていることと、軸索が広範囲に投射しているかと密度が低下しているかの対応を検討するために図 5 のような解析を行った。

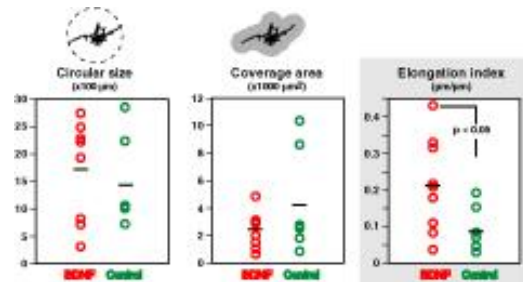


図 5

図 5 の左のグラフは図 3 のように軸索を脳表から見た方向に回転させて、その軸索を含む最小の円を描き、その直径の値をプロットしている。もしも、BDNF により軸索の投射領域が拡大しているのであれば、直径は長くなる。しかしながら、コントロールと変わらないことから、投射領域が広がっていないことを示す。中央のグラフは、外側膝状体からの軸索はその 50 μm 以内にある細胞とシナプス結合している可能性が高いと考え（通常、樹状突起は 50 μm は広がっている）、その面積を計算した。その結果、BDNF とコントロール群では違いはなかった。このことも、BDNF により軸索が視覚野の細胞に、より広範囲に影響を与えるようになっているわけではないことを示す。右側のグラフは、左のグラフの直径を軸索の全長（図 4 左）で割った値である。この値が小さいということは、軸索の拡がりに対して密に分布していることを示している。BDNF 領域の軸索は、値がコントロール群より大きくなっており、このことは軸索が密に分布していないことを示している。このことから、軸索の退縮によりカラムの境界が不明瞭になり、拡大しているように見えると考えられる。

(3) 考察

これまでの研究により、眼球優位カラムは左右それぞれの眼に対応する外側膝状体からの軸索の投射を受けており、そのコントラストによりカラムが見えることが報告されている。本研究課題の結果では、BDNF により軸索が短くなり分岐点数も減少した。また、分布密度も低下することを示した。このことは、報告者が以前に関与した研究において、BDNF によりカラムが拡大する結果との対応

を考えると、軸索の分布密度が低下し、カラムの境界が不明瞭になり、一様にラベルされることで拡大しているように見えると考える。

これまで、BDNF は軸索を伸長する作用を持つことが報告されている。本研究課題で軸索が退縮したことに関して、BDNF は大脳皮質で抑制性ニューロンの働きを高めることが報告されている。眼球優位カラムの形成には、シナプス後細胞である4層の細胞の活動と、外側膝状体からの軸索（シナプス前ニューロン）の活動が同期することが重要であると考えられている。シナプス前ニューロンの活動は正常で、シナプス後細胞の活動が BDNF により抑制されることで、同期が形成できなくなり、退縮が起こると考えている。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

大島 稔 (OHSHIMA MINORU)

関西医療大学・保健医療学部・講師

研究者番号 : 20342230

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :