

令和元年5月30日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07012

研究課題名(和文)片眼遮蔽により視覚野のシナプスに誘発される可塑的变化

研究課題名(英文)Synaptic modifications induced by monocular deprivation in visual cortex

研究代表者

小松 由紀夫 (Komatsu, Yukio)

生理学研究所・基盤神経科学研究領域・特別協力研究員

研究者番号：90135343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：感受性期の片眼遮蔽により視覚野2/3層錐体細胞へのシナプス入力に生じる可塑的变化を片眼遮蔽した動物から視覚野スライス標本を作製して調べた。活動依存的に蛍光蛋白を発現させる方法を用いて非遮蔽眼優位細胞と遮蔽眼優位細胞を識別して、ケージド・グルタミン酸を用いるレーザー・スキャン局所刺激法により単一興奮性シナプス後電流(uEPSC)を解析した。その結果、遮蔽3日で遮蔽眼優位細胞へのuEPSCの数の減少が、遮蔽6日で非遮蔽眼優位細胞へのuEPSCの数と振幅の増加が見出された。TNF α 欠損マウスを用いた実験はT型Ca $^{2+}$ チャンネル依存性長期増強が非遮蔽眼優位細胞で見られたuEPSCの増強を担うことを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シナプス可塑性は発達期の経験依存的機能発達の基盤と考えられている。眼優位可塑性はこの発達の神経機構の解析に適したモデルと考えられ、多くの研究に用いられてきた。しかし、眼優位性は麻酔下の動物での視覚実験で調べられ、シナプス可塑性はスライス標本で調べられてきたので、眼優位可塑性の基盤をなすシナプス可塑性が視覚野内のどのシナプスで起こり、どのタイプのものであるかは不明であった。本研究結果はこの問題の解明に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：I investigated monocular deprivation (MD)-induced modifications of synaptic inputs on layer 2/3 pyramidal cells of visual cortex during the critical period, using visual cortical slices prepared following monocular deprivation. I conducted whole-cell recording experiments and analyzed unitary excitatory postsynaptic currents (uEPSCs) evoked in these cells by focal glutamate uncaging with laser scanning photostimulation. Non-deprived eye dominant cells were discriminated from deprived eye dominant cells, based on the level of GFP expressed by monocular visual stimulation. The uEPSCs decreased in number in deprived eye-dominant cells after 3 days of MD, and increased in number and amplitude in non-deprived eye dominant cells after 6 days of MD. The changes in the latter cells did not occur in TNF α -deficient mice, which lacks T-type Ca $^{2+}$ -channel dependent long-term potentiation (T-LTP), suggesting that T-LTP mediates the potentiation of visual responses to non-deprived eye stimulation.

研究分野：神経科学

キーワード：経験依存的発達 眼優位可塑性 シナプス可塑性 視覚野

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) シナプス可塑性の機能的役割は多くの脳領域で研究されてきた。その研究において長期増強 (LTP) あるいは長期抑圧 (LTD) が起きるシナプスを特定することは重要であるが、大脳皮質における研究ではほとんど不明のままである。大脳皮質視覚野では、感受性期の視覚体験に基づいて神経回路が精緻化され、生まれ育った環境に適した機能が獲得される。神経回路の精緻化は、神経細胞の活動パターンに応じて、あるシナプスには LTP が、他のシナプスには LTD が生じることにより実現されると考えられる。感受性期に片方の眼の視覚入力を遮蔽すると視覚野細胞の遮蔽眼刺激に対する反応は減弱し、非遮蔽眼刺激に対する反応は増強する。シナプス後細胞の活動電位発生に寄与する興奮性シナプスに LTP が、その発生に寄与しない興奮性シナプスに LTD が生じれば、片眼遮蔽による眼優位性のシフトは説明できる。

(2) 視覚野スライス標本を用いた研究により、この領域で多数を占める錐体細胞 (興奮性細胞) に NMDA 受容体依存性の LTP と LTD だけでなく、T 型 Ca^{2+} チャンネル依存性 LTP (T-LTP) 等、NMDA 受容体に依存しない可塑性も見出された (Komatsu & Iwakiri, 1992)。さらに、抑制性シナプスの LTP と LTD も発見され (Komatsu & Iwakiri, 1993)、視覚野において多種類のシナプス可塑性が存在することが明らかとなった。

(3) 眼優位可塑性の神経機構の解明には、片眼遮蔽によりどのシナプスに可塑的変化

が起きるかを明らかにすることが重要である。この研究で困難な点は、両眼視領域の多くの神経細胞が両眼からのシナプス入力を受けており、片眼遮蔽により同一の細胞へのシナプス入力に LTP と LTD の両者が起こりうることである (図 1)。左右それぞれの眼の視覚刺激により視覚野の両眼視領域に誘発される視覚誘発電位の解析から、マウス・ラットでは片眼遮蔽開始から 2-3 日後には遮蔽眼刺激に対する視覚野細胞の反応に減弱が生じ、4-6 日後には非遮蔽眼刺激に対する反応に増強が生じることが分かった (Frenkel & Bear, 2004, 図 1)。また、その一方のみの変化を薬理的あるいは遺伝子改変により阻害することが可能になった (Yoshimura et al.; Kaneko et al., 2008; Cho et al., 2009)。その結果、興奮性シナプスの NMDA 受容体依存性 LTD (Heynen et al., 2003; Yoon et al., 2009) と T-LTP (Yoshimura et al., 2008) の眼優位可塑性への関与を示唆する実験結果が報告された。しかし、この問題に関しては未だ見解の一致が見られない。

(4) 片眼遮蔽による視覚野細胞の視覚反応の変化は、まず高次視覚野へ出力を送る 2/3 層の錐体細胞において生じる (Trachtenberg et al., 2000)。これは、2/3 層錐体細胞への主たるシナプス入力である近傍の皮質細胞からの入力に可塑的変化が生じる可能性が強いことを示唆する。スライス標本上で ケージド・グルタミン酸を用いてレーザー照射により皮質細胞を局所的に刺激することにより (図 2) 皮質細胞の単一の活動電位により生じる単一興奮性シナプス後電流 (uEPSC) を解析できる (Yoshimura et al., 2005; Ishikawa et al., 2014)。この電流の比較により LTP あるいは LTD が片眼遮蔽に伴い起きるかを推測できると考えられる。しかし、この解析では同一細胞において LTP と LTD の両者が同程度起き、相殺されたために変化が見られない可能性も考えられる。片眼遮蔽後に、非遮蔽眼優位な細胞では LTP が起きた可能性が高く、遮蔽眼優位な細胞では LTP が起きた可能性は非常に低い。従って、非遮蔽眼優位細胞と遮蔽眼優位細胞を識別することにより解析が可能となる。最近、活動レベルに依存して蛍光タンパクを発現させる方法によりスライス標本上で神経細胞の眼優位性を推測することが可能となった。スライス作製前に一方の眼に刺激を 1 時間程度与えて、その刺激に対する反応の強さに応じて蛍光タンパクを皮質細胞に発現させることができる (Kawashima et al., 2013)。この方法を用いて、非遮蔽眼優位細胞と遮蔽眼優位細胞においてシナプス伝達を別々に解析することにより、片眼遮蔽により可塑的に変化するシナプスを特定することが可能な状況になった。

2. 研究の目的

(1) 感受性期の片眼遮蔽により視覚野のシナプスに誘発される可塑的変化を明らかにすることを目指す。片眼遮蔽後 3 日、6 日に遮蔽眼と非遮蔽眼からの信号を 2/3 層、4 層、5 層細胞を介して 2/3 層錐体細胞に伝える興奮性シナプスに生じる可塑的変化とそれに関与するシナプス可塑性の種類を特定する。

3. 研究の方法

(1) 遮蔽眼反応の減弱が起きる遮蔽 3 日、非遮蔽眼反応の増強も起きる遮蔽 6 日、及び片眼遮蔽なしの 3 群の生後 30-32 日齢のラットあるいはマウスの左 (遮蔽眼の対側) 半球より作製した

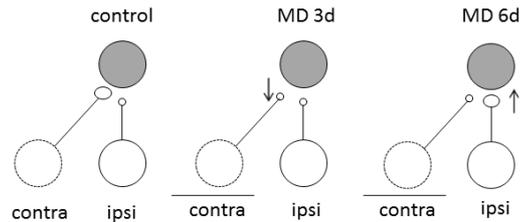


図 1. 片眼遮蔽 3 日後 (MD3d)、6 日後 (MD6d) に 2/3 層錐体細胞が遮蔽眼 (contra) と非遮蔽眼 (ipsi) からの入力を受けるシナプスに生じる変化

視覚野スライス標本の両眼視領域において電気生理学的実験を行った。

(2) シナプス伝達の可塑的变化は、片眼遮蔽後に非遮蔽眼刺激に選択的に反応する皮質細胞と遮蔽眼刺激に選択的に反応する皮質細胞では異なると考えられるので、両細胞群を分離して解析した。その目的で、活動依存的に GFP を発現させる E-SARE -driven dGFP と感染マーカー (蛍光タンパク RFP) のベクターをアデノ随伴ウイルス (AAV) を利用して記録実験の 10 日程度前に視覚野に導入した。スライス実験を行う前の 12-15 時間、動物を暗室で飼育し、視覚野細胞の GFP 発現レベルをいったん低下させた後、非遮蔽眼 (左眼) を 1 時間視覚刺激して、その刺激に反応する細胞に GFP を発現させた。この直後に視覚野切片標本を作製し、GFP/RFP 蛍光比率の大きな細胞を同側眼優位細胞、小さな細胞を対側眼優位細胞として解析を行った。

(3) 2/3 層錐体細胞からバイオサイチンを含むパッチ内液を用いてホール・セル記録を行った (図 2)。ケージド・グルタミン酸を含む液で切片標本を灌流し、記録細胞を中心に 150 から 200 ヶ所に青色レーザー光をスポット照射するレーザー・スキャン局所刺激法を用いて局所的にケージ解除を行い、そこに位置する細胞を局所的に刺激した。この刺激によって誘発される単一シナプス前細胞の活動に由来するユニタリー EPSC (uEPSC) を 2/3 層錐体細胞から記録した。2/3 層、4 層、5 層由来の uEPSC の平均振幅及びシナプス入力を送る細胞数を主に反映する uEPSC の数を 3 群間で比較した。

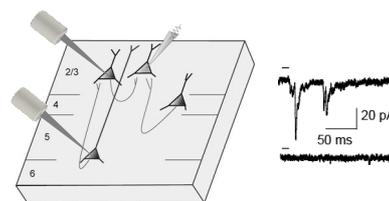


図 2. ケージド・グルタミン酸を用いた EPSC の解析

(4) uEPSC の変化が量子振幅の変化によるかを調べるために、細胞外液の Ca^{2+} を Sr^{2+} に置換して記録する実験を行った。この条件下では、光刺激により量子振幅の大きさの EPSC が非同期的に誘発されるので、その量子 EPSC を記録・解析した。また、伝達物質の放出確率が変化するかを調べるためにペアード・パルス刺激を用いた。

4. 研究成果

(1) 片眼遮蔽により生ずるシナプス伝達の変化を、ラットを用いて解析した。遮蔽 3 日で遮蔽眼優位細胞に変化が出現し、2/3 層及び 4 層細胞刺激により誘発される uEPSC の数が減少した。遮蔽 6 日では、遮蔽眼優位細胞における 4 層由来の uEPSC の数の減少は持続していたが、2/3 層由来の uEPSC の数は元に戻った。非遮蔽眼優位細胞においては遮蔽 3 日では uEPSC に変化は見られなかった。遮蔽 6 日では、2/3 層と 5 層細胞刺激により誘発される uEPSC の数と振幅が増加が見られた。

(2) 細胞外液の Ca^{2+} を Sr^{2+} に置換して EPSC の量子振幅の変化を検討したところ、遮蔽 3 日でその振幅は 2/3、4、5 層細胞から遮蔽眼優位細胞への結合で増大し、4 層細胞から非遮蔽眼優位細胞への結合で減少した。しかし、両者とも遮蔽 6 日で元の大きさに戻った。

(3) 伝達物質の放出確率に変化が生じた可能性をペアード・パルス刺激を用いて検討したところ、EPSC のペアード・パルス比率に片眼遮蔽に伴う明確な変化は認められなかった。

(4) 以上の (1) - (3) のラットを用いて得られた実験結果は、片眼遮蔽の間に視覚入力を強く受けた細胞とほとんど受けなかった細胞のシナプスに異なる可塑的变化が生じることを示す。片眼遮蔽により 2/3 層錐体細胞への興奮性シナプス伝達に生じる可塑的变化は量子振幅や伝達物質の放出確率の変化ではなく、主にシナプスの数の変化によるものと考えられる。

(5) 遮蔽 3 日で非遮蔽眼優位細胞の uEPSC に増大が見られないにもかかわらず、1 時間の同側眼 (非遮蔽眼) 刺激により蛍光標識される細胞の数が増加した。2/3 層錐体細胞の発火閾値の低下がその標識細胞数の増加の一因であることを示唆する結果を得た。

(6) 片眼遮蔽後の非遮蔽眼優位細胞での uEPSC の増大に T-LTP が寄与するかを検討した。実験には、T-LTP が起こらず、非遮蔽眼刺激に対する視覚野細胞の反応に増強が起きないことが分かっている TNF 欠損マウスを用いた。野生型マウスにおいて 6 日間の片眼遮蔽後に非遮蔽眼優位細胞から記録した uEPSC を解析したところ、uEPSC の数と振幅の増大がラットの場合と同様に見出されたが、その変化は 2/3 層錐体細胞に由来する uEPSC にのみ生じた。この uEPSC の増大は TNF 欠損マウスでは見られなかった。これらの結果は、T-LTP が片眼遮蔽後に生じる非遮蔽眼刺激に対する視覚反応の増大を担うことを強く示唆する。

< 引用文献 >

Cho et al., The ratio of NR2A/B NMDA receptor subunits determines the qualities of ocular dominance plasticity in visual cortex. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106: 5377-5382, 2009.

Frenkel & Bear, How monocular deprivation shifts ocular dominance in visual cortex of young mice. Neuron 44: 917-923, 2004.

Heynen et al., Molecular mechanism for loss of visual cortical responsiveness following brief monocular deprivation. Nat. Neurosci. 6: 854-862, 2003.

Ishikawa et al., Experience-dependent emergence of fine-scale networks in visual cortex. J. Neurosci., 34: 12576-12586, 2014.

Kaneko et al., Tumor necrosis factor- α mediates one component of competitive experience-dependent plasticity in developing visual cortex. Neuron 58: 673-680, 2008.

Kawashima et al., Functional labeling of neurons and their projections using the synthetic activity-dependent promoter E-SARE. Nat. Methods 10: 889-895, 2013.

Komatsu & Iwakiri, Low-threshold Ca^{2+} channels mediate induction of long-term potentiation in kitten visual cortex. J. Neurophysiol., 67: 401-410, 1992.

Komatsu & Iwakiri, Long-term modification of inhibitory synaptic transmission in developing visual cortex. Neuroreport, 4: 907-910, 1993.

Trachtenberg et al., Rapid extragranular plasticity in the absence of thalamocortical plasticity in the developing primary visual cortex. Science 287: 2029-2032, 2000.

Yoshimura et al., Involvement of T-type Ca^{2+} channels in the potentiation of synaptic and visual responses during the critical period in rat visual cortex. Eur. J. Neurosci. 28: 730-743, 2008.

Yoon et al., Essential role for a long-term depression mechanism in ocular dominance plasticity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106: 9860-9865, 2009.

Yoshimura et al., Excitatory cortical neurons form fine-scale functional networks. Nature 433: 868-873, 2005.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Sugimura T, Yamamoto M, Yamada K, Komatsu Y & Yoshimura Y, Visual experience regulates the development of long-term synaptic modifications induced by low-frequency stimulation in mouse visual cortex. Neuroscience Research 120: 36-44, 2017.

DOI: 10.1016/j.neures.2017.02.006

〔学会発表〕(計 1 件)

Sugimura T, Kim R, Bito H, Yoshimura Y & Komatsu Y, Monocular deprivation-induced changes in excitatory synaptic transmission in layer 2/3 pyramidal neurons of rat visual cortex. 第40回日本神経科学大会、2017年

〔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:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。