

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2007 ~ 2008  
 課題番号：19700293  
 研究課題名(和文)BDNFによる抑制性細胞を介した体性感覚野臨界期可塑性の制御メカニズム  
 研究課題名(英文)Brain-derived neurotrophic factor is involved in maturation of inhibitory cells in developing somatosensory cortex.  
 研究代表者 伊丹 千晶(ITAMI CHIAKI)  
 埼玉医科大学・医学部・講師  
 研究者番号：90392430

## 研究成果の概要：

BDNF 欠損マウスにおいて、spike timing-dependent potentiation(STDP)誘導に対する BDNF による Ca 調節の効果を検討するため、まず、野生型マウス体性感覚野より作製した標本を用いて、バレル皮質第 4 層刺激により誘発される第 2 / 3 層の細胞からパッチ電極を用いて電流固定化に細胞内記録を行った。興奮特有の発火特性であることを確認し、STDP が誘導できるかどうかを確認し、生後 1 週間前後から 3 週間までの野生型マウスに対して STDP の出やすさを評価した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

## 研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：分子・細胞神経科学、神経可塑性

## 1. 研究開始当初の背景

脳の発達は臨界期における遺伝的な因子と経験的な因子の相互作用によって進行する。その時期、脳は一生涯のうち最も劇的に変化し、その後、成体における脳機能を規定することになる。

外的刺激に高感受性となる臨界期の大脳皮質第 1 体性感覚野バレル領域には、脳由来神経栄養因子BDNFならびにその受容体trkBの高

度な発現が認められる (Singh et al, *Neurochem Res.* 22, 791-7, 1997)。BDNFは臨界期の発現に関与していることが示唆されているが、皮質内神経回路に対してBDNFがどのような作用機序を持つかは未だに不明な点が多い。BDNFの作用について近年の我々の成果を総合すると、以下のようにまとめられる。

(1)グルタミン酸作動性興奮性ニューロンの発達初期に存在するサイレントシナプスが機

能的な活性型シナプスに変換されるためには BDNF が重要な役割を果たす。このような現象は、視床から皮質への投射ニューロンの臨界期に一致している (Itami et al, PNAS 100, 13069-74, 2003)。

(2) 視床から投射を受ける抑制性細胞は FS (Fast spiking cell) および RSNP (Regular spiking nonpyramidal cell) の 2 種類が同定されているが、FS 抑制性細胞の発現は視床-皮質ニューロンの臨界期後、生後 2 週以降に始まり、この発達には BDNF と感覚入力が必要である。このような FS の正常発達は 4 層から 2/3 層への投射における臨界期に關与している可能性を示す (Itami et al, revised for publication)。

このように、遺伝的な因子と経験的な因子が相互作用するような、分子機構について詳細な解析を行う。

## 2. 研究の目的

本実験は、体性感覚野における抑制回路の発達が臨界期の可塑性発現にどのように關与するのか、また、それに対する BDNF の作用機序を明らかにすることを目的としている。

(1) 発達期の抑制性細胞において BDNF により発現制御をうける遺伝子にはどのようなものがあるのか？

(2) そして、それらはどのような役割があるのか？

(3) BDNF は、抑制性局所回路の機能発達にどのような影響を与えているか？

を BDNF 欠損マウスを利用して明らかにする。これらの実験により、BDNF が抑制性細胞を介して発達期可塑性を制御するメカニズムが、さらに詳細に明らかになることが期待できる。

## 3. 研究の方法

### (1) 抑制性細胞を可視化した BDNF 欠損マウス

を用いた抑制性細胞に発現する遺伝子の同定 BDNF 欠損マウスと抑制性細胞のマーカーである GAD67 遺伝子部位に GFP をノックインしたマウス (GAD67-GFP) を交配し、BDNF ノックアウトマウスの抑制性細胞を可視化した。体性感覚野を 4 層と 2/3 層に切り分け、その中からセルソーターにより GFP 陽性抑制性細胞を分離する。DNA チップをもちいて発達期の抑制性細胞に発現する遺伝子を単離し、発現時期、発現部位の違いを、BDNF 欠損マウスと野生型と比較検討する。これにより、BDNF により誘導される遺伝子を明らかにする。同定した遺伝子群の中から有意に変化したものを定量的 RT-PCR で発現量を確認し、*in situ* ハイブリダイゼーションにより遺伝子発現の局在を観察する。

### (2) BDNF 欠損マウスを用いた 4 層 2/3 層への興奮性シナプス伝達に対する抑制の発達機構

実験は視床-皮質間の線維連絡を維持した体性感覚野の切片標本をマウスより作製して行う。刺激電極を視床に置き、バレル皮質第 4 層の細胞からパッチ電極を用いて電流及び、電圧固定下に細胞内記録を行う。

皮質第 4 層に刺激電極を置き、GABA<sub>A</sub> 受容体のアンタゴニストである Bicuculline 存在下および非存在下で、皮質 2/3 層の錐体細胞 (pyramidal cell) から記録を行い、4 層から 2/3 層への Feedforward 抑制の発達を調べる。これを BDNF 欠損マウスと比較検討する。

はじめに細胞内通電による発火特性を調べ、細胞の種類を興奮性か、抑制性か、抑制であれば、FS (Fast spiking) か RSNP (Regular spiking nonpyramidal cell) 同定し、4 層の GABA 細胞、2/3 層の興奮性細胞から 2 細胞同時記録を行い、4 層から 2/3 層への Feedforward 抑制を直接解析することを試みる。これを BDNF 欠損マウスと比較検討する。

#### 4. 研究成果

**(1)抑制性細胞を可視化したBDNF欠損マウスを用いた抑制性細胞に発現する遺伝子の同定**  
これまでに、BDNFノックアウトマウスをもちいた解析から抑制性細胞のサブタイプのひとつであるFast spiking抑制性細胞のfiring propertyが正常発達しないことを明らかにしてきた。この直接の原因を明らかにするため、BDNF欠損マウスと抑制性細胞のマーカーであるGAD67遺伝子部位にGFPをノックインしたマウス(GAD67-GFP)を交配し、BDNFノックアウトマウスの抑制性細胞を可視化した。体性感覚野を4層と2/3層に切り分け、その中からセルソーターによりGFP陽性抑制性細胞を分離する。DNAチップをもちいて発達期の抑制性細胞に発現する遺伝子を単離し、発現時期、発現部位の違いを、BDNF欠損マウスと野生型で比較検討した。同定した遺伝子群の中から有意に変化したものを抗体染色、ウエスタンブロッティングにより遺伝子発現の局在を観察した。これにより、BDNFにより誘導される遺伝子を明らかにした。

#### **(2) BDNF欠損マウスを用いた4層 2/3層への興奮性シナプス伝達に対する抑制の発達機構**

脳由来神経栄養因子(BDNF)は、体性感覚野の発達期可塑性に重要な役割をはたすことが示されており、我々はこれまでに、体性感覚野第4層に存在するGABA作動性抑制性細胞のサブタイプのひとつであるパルブアルブミン陽性fast spiking細胞の電気生理学的性質にはBDNFが必要であることをBDNF欠損マウスをもちいて示してきた。また、4層から2/3層錐体細胞への興奮性シナプス結合の可塑的变化は、大脳皮質の受容野マップ可塑性に重要であると考えられているが、4-2/3層間シナプス可塑性は、スパイクタイミング依存性であり、シナプス前細胞-シナプス

後細胞の順に発火するとシナプス増強(t-LTP)になるが、この順序が逆になるとシナプス抑制(t-LTD)になることが示されており、発火順序を制御するためにPV-FS細胞が重要な役割を果たしている可能性がある。さらに、4-2/3層におけるスパイクタイミング依存性可塑性(STDP)とPV-FSの機能発現の時期はほぼ一致している。本実験では、PV-FS細胞の発達前後でSTDPがどのように変化するかを検討した。実験は、野生型マウスから1次体性感覚野を含むスライス標本作製し、4-2/3層シナプス結合におけるt-LTP及びt-LTDの誘導条件を臨界期前後で比較した。その結果、臨界期(P13以降)以前では、スパイクタイミングに関係なくシナプス前-後でもシナプス後-前の順でもLTPが誘導された。臨界期後の4-2/3層シナプス結合におけるt-LTPには、NMDA受容体を介した細胞内Ca<sup>2+</sup>上昇が必要であることが示されている。そこで、臨界期以前に観察されたt-LTPのNMDA受容体依存性を検討する目的でNMDA受容体の阻害剤D-AP5を投与すると、15例中10例においてt-LTPは阻害され、NMDA受容体に依存することがわかった。次に、Ca<sup>2+</sup>キレート剤であるBAPTAを細胞内投与することにより細胞内Ca<sup>2+</sup>上昇を抑えると、13例中10例においてLTPは阻害され細胞内Ca<sup>2+</sup>上昇が必要であることが示唆された。次に、CaMKIIのinhibitorの投与したが、t-LTPを阻害することができず、P13以前のt-LTPはCaMKII-非依存性であることがわかった。以上より、臨界前には、GABA細胞により発火順序を制御される必要のないt-LTPが存在する可能性が示された。

#### 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1件)

Chiaki Itami, Fumitaka Kimura, Shun

Nakamura. Brain-Derived Neurotrophic Factor Regulates the Maturation of Layer 4 Fast-Spiking Cells after the Second Postnatal Week in the Developing Barrel Cortex. J. Neurosci. 2007 27: 2241-2252

〔学会発表〕(計8件)

2008/11/13-14 Ancillary and Satellite Events: Symposium Barrels XXI (Baltimore, MD, USA) Kimura, F., Itami, C., Ikezoe, K., Tamura, H., Fujita, I., Yanagawa, Y., Obata, K., Ohshima, M. Developmental changes in the fine temporal control of thalamic activation of cortical cells and associated changes in plasticity

2008/7/9-11 第31回日本神経科学大会 (東京国際フォーラム) フェンサイクリジンによる培養大脳皮質ニューロンの細胞内 BDNF 発現上昇は、その後のシナプス機能阻害の一因となっている (P1-s15) 安達直樹、沼川忠広、熊丸絵美、伊丹千晶、仙波りつ子、功刀浩

2008/5/17 神経組織の成長・再生・移植研究会第23回学術集会 安達直樹、沼川忠広、熊丸絵美、伊丹千晶、仙波りつ子、功刀浩 Phencyclidineによる大脳皮質ニューロンのシナプスの減少はBDNF放出阻害によって引き起こされる

2007/11/3-7 Neuroscience 2007 SfN 37<sup>th</sup> Annual Meeting (San Diego, California) C. Itami, H. Kumanogoh, S. Masuda, S. Takeda, K. Obata, Y. Yanagawa, S-I. Watanabe, S. Nakamura. Gene expression analysis of inhibitory cells derived from developing barrel cortex in BDNF knockout mice.

2007/11/3-7 Neuroscience 2007 SfN 37<sup>th</sup> Annual Meeting (San Diego, California)

F. Kimura, C. Itami, K. Ikezoe, H. Tamura, I. Fujita, K. Obata, Y. Yanagawa, M. Ohshima. Prior activation of GABAergic neurons to excitatory neurons by thalamic axons within a single barrel in the mouse thalamocortical system: relevance to the spike timing dependent plasticity

2007/9/11 Neuro 2007 第30回日本神経科学学会大会、第50回日本神経化学学会大会、第17回日本神経回路学会大会合同大会(横浜) 木村 文隆、伊丹 千晶、池添 貢司、田村 弘、藤田 一郎、小幡 邦彦、柳川 右千夫、大島 稔 「バレル皮質内 GABA 細胞への視床投射の特異性と可塑性との関与」

2007/7/12-17 IBRO World congress of Neuroscience (Melbourne, Australia)

F. Kimura, C. Itami, K. Obata, Y. Yanagawa, M. Ohshima

Thalamic activation of GABAergic neurons leads to that of excitatory neurons within a single barrel in the mouse thalamocortical system

2007/7/12-17 IBRO World congress of Neuroscience (Melbourne, Australia)

C. Itami, F. Kimura, S. Nakamura

BDNF regulates the maturation of layer 4 fast spiking cells after the 2<sup>nd</sup> postnatal week in the developing barrel cortex

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊丹 千晶 (ITAMI CHIAKI)  
埼玉医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 90392430

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし