

平成21年 6月16日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19700357

研究課題名（和文） 発達期視覚野可塑性における皮質神経回路変化

研究課題名（英文） Experience-dependent plasticity of local intracortical connections in visual cortex

研究代表者

佐藤 武正（SATO TAKEMASA）

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：80346345

研究成果の概要：

臨界期での経験依存的可塑性の固定化プロセスにおいて、皮質神経回路レベルでどの部分の神経結合がどのように変化するのは明らかではない。緑色蛍光蛋白質（EGFP）と NMDA 受容体サブユニットを共発現するプラスミドを作成し、マウス胎児脳に電気穿孔法による遺伝子導入を行った。EGFP 発現による層特異的神経回路標識とともに NMDA 受容体の過剰発現を免疫染色法で確認した。このような層特異的な可塑性関連分子・受容体の操作手法を用いることで皮質神経回路レベルでの可塑性固定化プロセスの解明につながると考えられる。

交付額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 1,100,000 | 0 | 1,100,000 |
| 2008年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 1,900,000 | 240,000 | 2,140,000 |

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：局所回路、可塑性

1. 研究開始当初の背景

大脳皮質一次視覚野では臨界期と呼ばれる発達期の一時期に片眼の視覚遮断により両眼入力の競合が起こり遮蔽眼からの反応性を失う眼優位可塑性が生じる。この発達期視覚野の経験依存的可塑性は両眼競合により引き起こされる可塑性の固定化や機能回復のプロセスを研究する上で良いモデル系である。過去の報告から短期間の片眼視覚遮断による変化は一時的・可逆的であり、遮蔽眼の開眼手術やレム睡眠の阻害などにより一度失った遮蔽眼からの反応性が回復する

ことが知られている。一方、長期間の片眼視覚遮断を施すとその変化は固定的となり視力は回復せずに弱視となる。これらの知見から可塑的变化は初期の可逆性が高い段階から可塑性が固定化された段階へと次第に移行すると考えられる。この可塑性の固定化プロセスには神経回路の変化として局所神経回路レベルでの再編成とシステムレベルでの再編成が重要であると考えられる。

しかし、これまでの研究からは眼優位可塑性で見られる機能回復や固定化が一次視覚野での局所神経回路レベルでの再編成を反

映しているのか、高次視覚領野を含めたシステムレベルの変化を反映しているのか明らかにされていない。

2. 研究の目的

大脳皮質の層特異的な神経回路標識とともに層特異的な可塑性関連分子・受容体の過剰発現あるいは RNA 干渉による機能低下を施すことにより、大脳皮質局所回路レベルでの可塑性固定化プロセスを解明することを目的とし研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 一次視覚野における層特異的脳梁投射
実験動物としては Long Evans ラットを用いた。一次視覚野両眼領域に逆行性トレーサーとして FluoroGold またはコレラトキシン B サブユニットを、順行性トレーサーとしてビオチン化デキストランアミン(BDA)を使用し、皮質の上層 (2/3 層) あるいは深層 (5・6 層) に投与し対側一次視覚野への脳梁投射の層特異性を検討した。

(2) 層特異的遺伝子導入による神経標識
層特異的神経標識を行うために ICR マウス (E13.5~E14.5) に In utero electroporation を用い、EGFP 発現プラスミド (pCAGGS-EGFP vector) を遺伝子導入した。また眼優位可塑性に関与していると考えられている NMDA 受容体サブユニット (NR2B) と EGFP の共発現ベクター (pCAGGS NR2B-IRES-EGFP) を作成した。NR2B フラグメントは東京大学・三品昌美教授より提供していただいた pBKSA_ε2 ベクターより取得した。作成したベクターによる NR2B の過剰発現は、培養細胞 (COS7) にリポフェクション法により遺伝子導入を行い、NR2B に対する蛍光免疫染色 (図 1) とウエスタンブロットにより確認した。

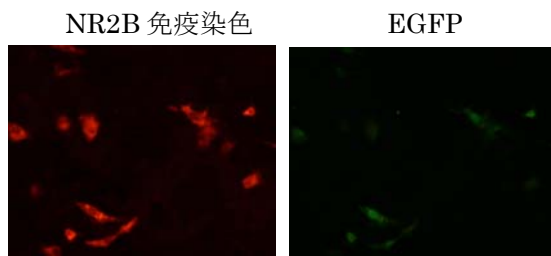


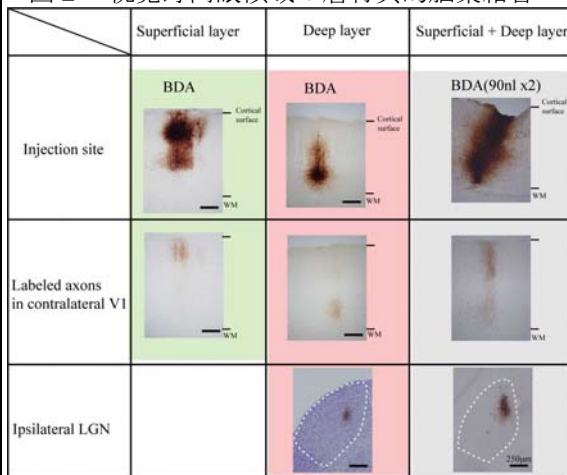
図 1 培養細胞での NR2B、EGFP 共発現

4. 研究成果

(1) 一次視覚野での層特異的脳梁結合
これまでの研究でげっ歯類 (ラット・マウス) の一次視覚野両眼領域の脳梁投射ニューロンは皮質上層、深層に、単眼領域の脳梁投射ニューロンは深層に分布することが知られている (Olavarria et al., 1985)。しかし、

上層、深層ニューロンの脳梁投射の層プロファイルについては明らかではなかった。本研究において、ラット一次視覚野両眼領域の上層あるいは深層に順行性トレーサー (BDA) を投与し、対側視覚野への脳梁投射の層特異性を調べた (図 2)。上層に BDA を投与した場合には対側視覚野両眼領域の上層に強い投射があった。深層に BDA を投与した場合には対側視覚野両眼領域の深層に強い投射が観察された。ラット一次視覚野両眼領域において、両側視覚野の上層同士、深層同士をつなぐ層特異的な相互脳梁投射が示唆された。

図 2 視覚野両眼領域の層特異的脳梁結合



(2) 層特異的遺伝子導入による神経標識
層特異的な遺伝子導入により、GFP 発現による神経標識とともに可塑性関連分子・受容体の過剰発現あるいは機能低下を引き起こすことによって皮質神経回路レベルでの可塑性固定化プロセスを明らかにすることを計画し、研究を進めた。

胎児マウス (ICR マウス (E13.5~E14.5)) に In utero electroporation 法を用いて、EGFP 発現ベクター (pCAGGS EGFP) あるいは、本研究で作成した NR2B-EGFP 共発現ベクター (pCAGGS NR2B-IRES-EGFP) を遺伝子導入した。遺伝子導入したマウスは P20~P30 まで飼育し、灌流固定して切片標本とした。

図 3 は皮質上層への遺伝子導入 (pCAGGS EGFP) による GFP 発現を観察した図である。GFP 発現ニューロンはエレクトロポレーション側皮質 2/3 層に分布し、対側皮質への脳梁投射軸索も可視化することができた (図 3 右)。ラット視覚野両眼領域上層への順行性トレーサー (BDA) 投与による結果 (図 1) と同様に上層ニューロンからの対側皮質への脳梁投射は上層部に強い投射が観察された。深層ニューロンへの遺伝子導入による脳

梁投射の可視化は成功していないが、今後研究を進める中で実現するよう計画しております。

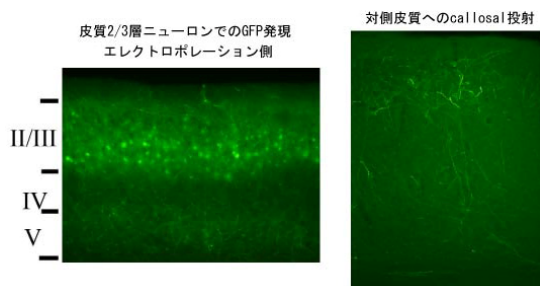
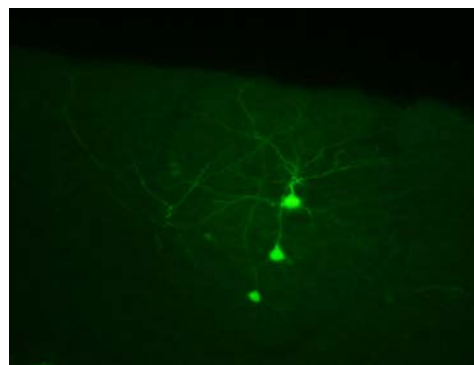


図3 皮質上層ニューロンでの GFP 発現

図4は NR2B-EGFP 共発現ベクター (pCAGGS NR2B-IRES-EGFP) を皮質ニューロンに遺伝子導入した結果である。図4Aは EGFP の蛍光写真である。NR2B の免疫組織化学染色を行い、NR2B の過剰発現を確認できた (図4B)。しかしながら、本研究で作成したベクターを遺伝子導入した場合には樹状突起形態は明確に可視化できた (図3A) が、Golgi-Cox 染色を施したような場合のような明瞭にスパイン形態を可視化するレベルには至っておらず、NR2B 過剰発現のスパイン形態に与える影響を検討することは困難であった。この点については、EGFP ではなく、他のいくつかの研究で用いられているような細胞膜結合型 GFP (mGFP) を発現させるなどの改良を行うことで克服していく必要がある。また、NR2B の発現低下を引き起こすことができると考えられる shRNA ベクターを作成したが、皮質ニューロンに遺伝子導入し NR2B の発現低下効果を確認する段階には達していない。

直近の他研究室の論文で、マウスバレル皮質ニューロンで NR2B のノックアウトによる機能低下を引き起こし、樹状突起形態に与える影響を調べた報告があった (Espinosa et al., 2009)。今後、研究を続ける中で、一次視覚野ニューロンでの NR2B の過剰発現や発現低下により生じる樹状突起形態やスパイン形態の変化を明らかにした上で、臨界期での片眼視覚遮断による眼優位可塑性の固定化プロセスの皮質局所回路レベルでの解明に繋げていきたい。



A) EGFP 発現
B) NR2B 免疫染色 (DAB 発色)

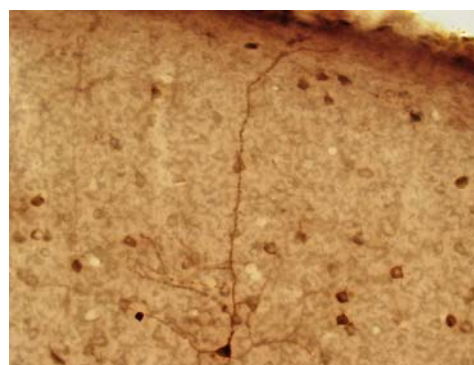


図4 皮質ニューロンへの EGFP・NR2B 共発現ベクターの遺伝子導入

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3件)

① 村田 奈保子、損傷視覚野の回復における視覚入力の影響、第85回 日本生理学会大会、2008年3月26日、東京

② 吉田 三穂、Activity-dependent regulation of mGluR1a and VGluT1 in the lateral geniculate nucleus of rat、The 37th annual meeting of the Society for Neuroscience、2007年11月5日、San Diego, USA

③ 佐藤 武正、ラット一次視覚野における層特異的脳梁結合、第30回 日本神経科学大会、2007年9月10日、横浜

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 武正 (SATOH TAKEMASA)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：80346345

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：