

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月10日現在

機関番号：22303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500311

研究課題名（和文） 眼優位可逆性におけるドレブリンの役割

研究課題名（英文） Role of Drebrin in the regulation of ocular dominance plasticity

研究代表者

今村 一之（IMAMURA KAZUYUKI）

前橋工科大学・工学部・教授

研究者番号：30203326

研究成果の概要（和文）：マウスにおける眼優位可塑性を c-fos 遺伝子のタンパク産物を免疫組織化学的に染色することによって評価するシステム（c-fos activity mapping 法, cFAMM）を確立した。cFAMM を適用することで中枢アミン系が、それぞれ異なる様式で眼優位可塑性の調節に関与していることを確認することができた。ドレブリン遺伝子の欠損マウスでは、視覚刺激による c-fos 遺伝子の発現誘導そのものが抑制され、ノルアドレナリン系破壊直後と同様であることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：An unique activity-mapping method (cFAMM) was established to evaluate mouse ocular dominance (OD) plasticity. cFAMM was applied first to examine the effect of destruction of central aminergic system. It was found that noradrenaline (NA) and serotonergic (5HT) system differentially regulate OD plasticity. In drebrin-knockout mouse, the visual evoked expression of c-fos was suppressed as in the mice with NA-depletion, suggesting drebrin plays crucial role in the regulation of OD plasticity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：眼優位可塑性、視覚野、ドレブリン、中枢アミン系、免疫組織化学

1. 研究開始当初の背景

生後発達初期の臨界期に適切な両眼入力を与えられないと弱視の原因になることは古くから知られており（視性刺激遮断弱視）、神経眼科学的には、臨界期を過ぎ治療時期を逸すると回復困難であると考えられてきた。近年マウスを用いた眼優位可塑性の研究から、成熟したマウスの視覚野でも単眼遮蔽の効果が認められることが報告されてきてい

る。成熟した視覚野での可塑性と臨界期の可塑性の細胞・分子機構の相違については、これまで十分に検討されていない。1992年に申請者らは、当時眼優位可塑性を研究する為の最適モデルと考えられていたネコの視覚野を用いて、誕生直後からの暗室飼育によって通常臨界期を過ぎて1歳になった動物で可塑性レベルが高く維持されていること、同時にドレブリンの発現が増強していること

を発見し、この分子の眼優位可塑性への関与を示唆した。

2. 研究の目的

本研究では、発達期に発現が切り替わるドレブリンが眼優位可塑性に重要な働きをしているとの仮説の基に、臨界期可塑性と成熟視覚野での可塑性の分子メカニズムの相違を明らかにすることを目的とする。今回の申請研究では、分担者が開発したドレブリンAノックアウトマウスを用いて、この研究を飛躍的に発展させることを目標とした。

3. 研究の方法

生後4週齢のC57BL6Jマウスの一側眼瞼をガス麻酔下に縫合遮蔽する。動物を2群に分け、A群は、遮蔽眼をB群は正常眼の単眼視覚刺激グループとする。単眼遮蔽1週間後に再度ガス麻酔下にそれぞれ刺激眼と対側の眼球硝子体腔に5 mM テトロドトキシン溶液1 μ l を注入する。麻酔からの回復を待って、抗生物質注入後、ケージごと暗室へ置き、24時間暗順応させる。その後、実験室内の明環境で一時間単眼視覚刺激を与え、致死量のバルビツレート系麻酔薬の腹腔内注射の後、経心灌流固定する。抜脳後、30% シュークローズ液中で凍結保護し、クライオシユタットを用いて、後頭極から20 μ m厚の連続切片を作製する。抗 c-Fos 抗体 (Ab-5, Oncogene Science) を用いて免疫染色する。隣接切片をチトクローム酸化酵素組織化学で染色し、第1次視覚野両眼性領域 (Oc1B) を大脳皮質の層毎に決定する。Oc1B 領域内の免疫陽性細胞数を統計学的に推定する。

4. 研究成果

(1) c-Fos Activity Mapping Method (cFAMM) の確立

生後発達初期の感受性期内の単眼遮蔽の効果を視覚刺激による最初期遺伝子 c-fos の発現で評価する方法をラットを用いて確立した。感受性期内に2週間片眼瞼縫合により単眼剥奪し、その後単眼視覚刺激を与えた際、視覚野に誘導される c-Fos 陽性細胞数を計測した (図1)。刺激眼と同側の第一次視覚野両眼視領域 Oc1B の第4層における c-Fos 免疫陽性細胞数をカウントすることで眼優位可塑性を評価する事ができる。すなわち、感受性期内に遮蔽されていた眼の刺激による c-Fos 陽性細胞数は、コントロールラットの単眼視覚刺激により誘導されるその数より有意に少なく、逆に正常に視体験した眼の刺激により誘導される c-Fos 陽性細胞数は、コントロールの値に比べて有意に増加する (Nakadate et al. 2012) ことが明らかになりマウスにおいても確認された (図2~3)。

(2) 中枢アミン系の破壊と眼優位可塑性

(1)の cFAMM をドレブリンノックアウトマウスに適用する前に中枢アミン系を薬理的に破壊したラットにおける眼優位可塑性について検討した。

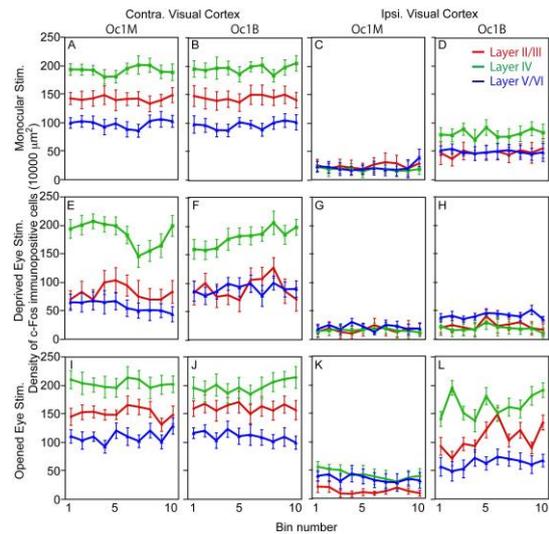


図1 感受性期に2週間単眼遮蔽を施されたラットの第一次視覚野における単眼視覚刺激により誘導される c-Fos 免疫陽性細胞数の層別分布

大脳皮質層に対し垂直な幅 200 μ m の直方体 (Bin) 内の免疫陽性細胞数を2~3層 (赤)、4層 (緑)、5~6層 (青) で示す。ラットは対側投射が有意であるため、視覚刺激眼に対して対側の第一次視覚野4層での c-FOS 発現が最も顕著である。刺激眼と同側の視覚野では両眼視領域 (Oc1B) でのみ発現が認められ、単眼視領域 (Oc1M) では発現が極めて低いことがわかる。

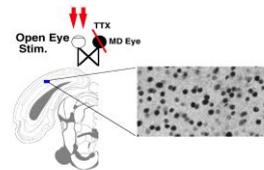


図2 正常に視体験をした眼の刺激 (Open Eye Stim.) により刺激眼と同側の第一次視覚野 Oc1B 領域に発現誘導される c-Fos 免疫陽性細胞数は正常マウスの単眼視覚刺激により発現する細胞数に比べ有意に増大する。

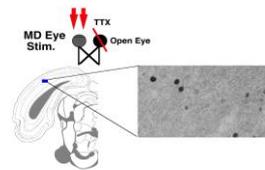


図3 視覚を剥奪された眼の刺激 (MD Eye Stim.) により刺激眼と同側の第一次視覚野 Oc1B 領域に発現誘導される c-Fos 免疫陽性細胞数は正常マウスの単眼視覚刺激により発現する細胞数に比べ有意に減少する。

これまで、眼優位可塑性の調節に重要な働きをしていると報告されている中枢ノルアドレナリン、セロトニン投射系を選択的に破壊するために、それぞれ N-(2-chloreethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine (DSP-4)、p-chlorophenylalanine (pCPA) の末梢投与を行い、それぞれ dopamine beta hydroxylase (DBH)、セロトニン(5HT)に対する特異抗体を用いて視覚野における両システムの選択的破壊を惹起する条件を明らかにした(図4)。

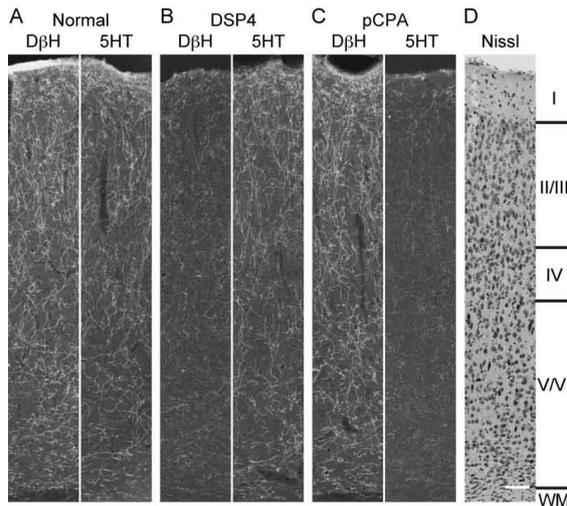


図4 選択的神経毒を用いて薬理的に中枢ノルアドレナリン系、セロトニン系を破壊したマウスモデルを作成した。第一次視覚野 Oc1B 領域でのノルアドレナリン(DBH)、セロトニン(5HT)繊維の免疫染色像を示す。DSP-4の投与によりノルアドレナリン繊維が pCPA の投与によりセロトニン繊維が選択的に消失していることがわかる。D. ニッスル染色像におけるスケールは 100 μ m で共通。

感受性期にそれぞれの薬理的処置と並行して2週間の単眼遮蔽を施し、遮蔽眼と正常眼の単眼視覚刺激を実施し、刺激眼と同側第4層の c-Fos 陽性細胞を調べた(図5)。薬理的処置を受けた動物では、明らかに発現のパターンが修飾されていることがわかったので、免疫陽性細胞数を計測し、統計処理を行った(図6)。

ノルアドレナリン系を破壊した動物では、遮蔽された眼の単眼視覚刺激により誘導される c-Fos 陽性細胞数は、正常視覚野で見られるように減少するが、正常眼単眼刺激では、感受性期の単眼遮蔽による増加が認められず、抑制されている。興味深いことにセロトニン系を破壊した動物では、逆に正常眼の単眼視覚刺激による増大は認められるものの、遮蔽眼の刺激で通常認められる減少が見られないことが分かった(図6)。

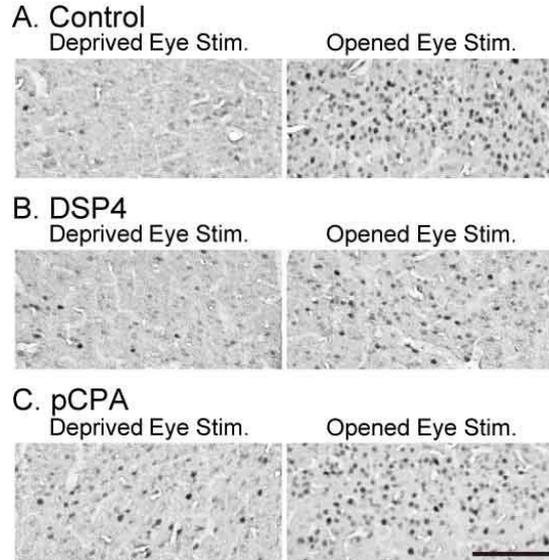


図5 中枢ノルアドレナリン系、セロトニン系を破壊したマウスモデルにおける単眼視覚刺激により Oc1B 領域第4層に誘導された c-Fos

無処置動物では、正常眼刺激により多くの c-Fos 陽性細胞が認められるのに対し、遮蔽眼のスケールは 200 μ m で共通。

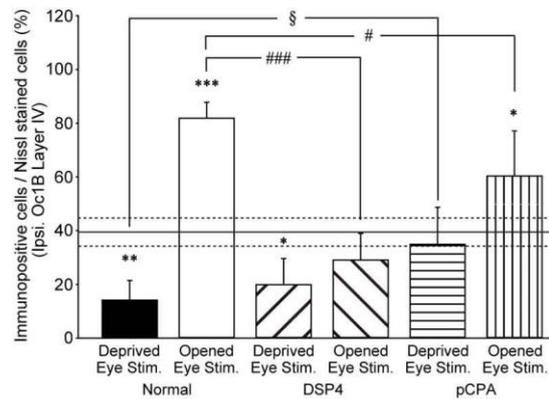


図6 中枢ノルアドレナリン系、セロトニン系を破壊したマウスモデルにおける単眼視覚刺激により Oc1B 領域第4層に誘導された c-Fos 免疫陽性細胞数の比較

*、#、\$はそれぞれ、単眼刺激群の比較、遮蔽眼刺激群間の比較、正常眼刺激群間の比較を表しており、マークの数は、1~3でそれぞれ、 $p < 0.05$, 0.01 , 0.001 を意味している。

これらの結果は、感受性期の単眼剥奪による遮蔽眼刺激に反応する c-Fos 陽性細胞数の減少は中枢セロトニン系の働きによるものであり、正常眼刺激に反応する c-Fos 陽性細胞数の増大は、中枢ノルアドレナリン系の機能により担われていることが明らかになった。

また、これらの結果は、これまで仔猫を用いて電気生理学的手法を用いて実施されてきた眼優位可塑性研究の成果を支持するものである。今回、cFAMM という新たな手法を適用してラット一次視覚野における眼優位可塑性に中枢ノルアドレナリン系、セロトニン系がことなる可塑的变化に協調して重要な役割を担っていることを証明したものである。

(3) ドレブリンE及びAのノックアウトマウス(DXマウス)を用いた検討

DXマウスは、発達初期に主として発現するドレブリンEと生後発現が切り替わり成熟期に発現するドレブリンAの両遺伝子のノックアウトマウスである。海馬のLTDの異常や嗅覚行動の異常が認められているが、視覚系の異常については十分検討されていない。今回cFAMMを用いて単眼視覚刺激の効果を調べて見たところ、野生型のマウスと比べて免疫陽性細胞数が著しく減少していることが明らかになった(図7)。

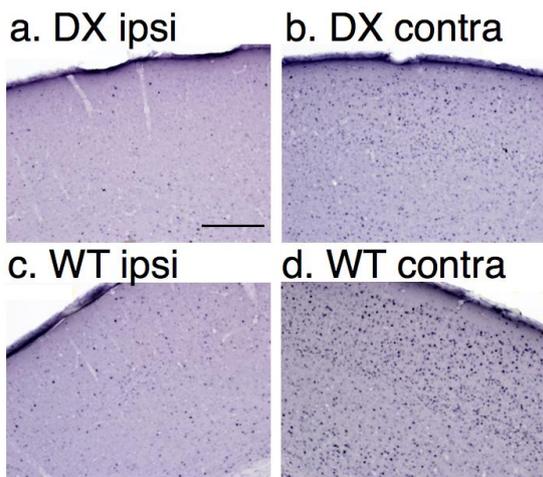


図7 ドレブリンノックアウト(DX)マウス(a, b)と野生型(WT)マウス(c, d)それぞれの単眼視覚刺激により0c1B領域に誘導されたc-Fos免疫陽性細胞の比較

単眼刺激時に刺激眼に対して同側(ipsi, a and c)と対側(contra, b and d)における染色の様子。aのスケールバーは200 μ mを示しており、すべてのパネルに共通。

この結果は、研究代表者らが以前報告した中枢ノルアドレナリン系に選択性を持つ神経毒DSP4を投与した後に生じるc-fos遺伝子の発現抑制(Yamada et al., 1999)と同様であり、ドレブリンは中枢ノルアドレナリンと同様な眼優位可塑性調節に関与している可能性が考えられた。その際、c-Fos遺伝子発現抑制の程度はDSP4投与動物より大きいものと推測されることから単眼遮蔽による正常眼の刺激による陽性細胞数の増大は、より抑えられると想像できる。また、DXマウス

は、麻酔に対して脆弱性を示し(イソフルランによるガス麻酔)、単眼遮蔽術施行時に死亡する例が多数見られたことから、今後さらに検討を継続する必要があると思われる。

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6件)

- ① Nakadate K., Imamura K., Watanabe Y. (2013) c-Fos activity mapping reveals differential effects of noradrenaline and serotonin depletion on the regulation of ocular dominance plasticity in rats. *Neurosci.*235:1-9. 査読有
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.01.013>
- ② Kato K., Shirao T., Yamazaki H., Imamura K., Sekino Y. (2013) Regulation of AMPA receptor recruitment by the actin binding protein drebrin in cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci. Neuroengin.*, 1: 153-160. 査読有 doi:10.1166/jnsne.2012.1018
- ③ Nakadate K., Imamura K., Watanabe Y. (2012) Effects of monocular deprivation on the spatial pattern of visually induced expression of c-Fos protein. *Neurosci.*, 202: 17-28. 査読有
doi:10.1016/j.neuroscience.2011.12.004
- ④ Shimazawa M., Ito Y., Inokuchi Y., Yamanaka H., Hayashi T., Jin B., Higuchi M., Suhara T., Imamura K., Araie M., Watanabe Y., Onoe H., Hara H. (2012) An alteration in the lateral geniculate nucleus of experimental glaucoma monkeys: In vivo positron emission tomography imaging of glial activation. *PLoS one*, 7(1): e30526 1-14. 査読有
doi:10.1371/journal.pone.0030526

[学会発表] (計6件)

- ① T. Kobayashi, H. Murayama, K. Imamura Evaluation of non-alcohol beer intake by elevated plus-maze. *The Journal of Physiological Sciences*, 63, Suppl.1, S279. Mar. 29, 2013 (タワーホール船堀、東京都)
- ② K. Kato, K. Imamura and Y. Sekino (2011) Involvement of drebrin, an actin binding protein, in regulation of AMPA receptor recruitment in cultured hippocampal neurons. *International radiation neurobiology*, P03, 12, Jan. 29, 2011 (群馬大学医学部刀城会館、群馬県)
- ③ K. Imamura (2011) Ocular dominance plasticity in abnormally developed visual cortex. *International radiation neurobiology*, P10, 19, Jan. 29, 2011 (群馬大学医学部刀城会館、群馬県)

馬県)

[図書] (計 1 件)

- ① Imamura K., Shimazawa M., Onoe H., Watanabe Y., Ishii, K., Mayama C., Akasaki T., Shimegi S., Sato, H., Nakadate, K., Hara H., Araie M. (2011) Central changes in glaucoma: neuroscientific study using animal models. THE MYSTERY OF GLAUCOMA, Kofronova M. and Kubena T. eds. INTEC, pp. 307-330. ISBN 978-953-307-567-9.

[その他]

ホームページ等

[http:// www.maebashi-it. ac. jp/~imamurak/](http://www.maebashi-it.ac.jp/~imamurak/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今村 一之 (IMAMURA KAZUYUKI)

前橋工科大学・工学部・教授

研究者番号：30203326

(2) 研究分担者

白尾 智明 (SHIRAO TOMOAKI)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20171043