

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23650165

研究課題名（和文）

視覚野におけるシナプス可塑性と経験依存的機能発達のサイトカインによる調節

研究課題名（英文）Regulation of visual cortical synaptic plasticity and experience-dependent functional development by cytokine

研究代表者

小松 由紀夫 (KOMATSU YUKIO)

名古屋大学・環境医学研究所・教授

研究者番号：90135343

研究成果の概要（和文）：ラットやマウスでは感受性期に片眼遮蔽すると、遮蔽開始後3日で遮蔽眼刺激により視覚野に誘発される反応の減弱が生じ、4日以降に非遮蔽眼刺激により視覚野に誘発される反応の増強が起こる。この増強は、T型 Ca^{2+} チャンネル依存性長期増強(T-LTP)を阻害した場合には起こらない。また、シナプスのスケーリング機構による興奮性シナプスの量子振幅の増大を担うことが知られている $\text{TNF-}\alpha$ を欠損した場合にも起こらない。これらの結果から、T-LTP あるいはシナプスのスケーリングが非遮蔽眼反応の増強を担うとする2つの説が提唱されている。本研究では、これらの仮説を検証する実験を行った。片眼遮蔽後3日と6日および片眼遮蔽なしのコントロールのラットから視覚野スライス標本作製し、微小興奮性シナプス後電流(mEPSC)を視覚野の両眼視領域の2/3層錐体細胞からホール・セル記録し、片眼遮蔽によりスケーリングが起こるか調べた。mEPSCの振幅には3群間で全く差が認められなかったため、片眼遮蔽してもスケーリングは起きないと結論される。ラット視覚野スライス標本において薬理的に $\text{TNF-}\alpha$ の作用を抑えると、T-LTPの発生は妨げられた。 $\text{TNF-}\alpha$ ノックアウトマウスから作成した視覚野スライスでは、T-LTPは生じなかったが、 $\text{TNF-}\alpha$ を灌流液に加えると起こった。以上より、 $\text{TNF-}\alpha$ はT-LTPの発生に必要であり、 $\text{TNF-}\alpha$ を欠損すると片眼遮蔽しても非遮蔽眼刺激により視覚野に誘発される反応に増強が起こらないのは、スケーリングが生じないためではなく、T-LTPが起こらないためと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In rodents, monocular deprivation produces depression of visual cortical responses evoked by the stimulation of deprived eye at 3 days after the start of the deprivation during the critical period of visual cortical development, and produces potentiation of visual cortical responses evoked by the stimulation of non-deprived eye when the deprivation is continued for 4 or more days. The potentiation is prevented by the blockade of T-type Ca^{2+} channel-dependent long-term potentiation (T-LTP). The potentiation is also prevented by a deficiency of $\text{TNF-}\alpha$, which is known to mediate the increase of quantal amplitude of excitatory synaptic currents via the synaptic scaling mechanism. These observations suggest that the potentiation of non-deprived eye responses is mediated by either T-LTP or synaptic scaling. I investigated these two possibilities in this study. Visual cortical slices were prepared from rats after 3 or 6 days of monocular deprivation and from control rats, and miniature excitatory synaptic currents (mEPSCs) were recorded from layer 2/3 pyramidal cells in the binocular region using the whole-cell recording method. No significant differences were found in the mEPSC amplitude between the 3 groups of rats, indicating that monocular deprivation did not initiate synaptic scaling. In rat visual cortical slices, the pharmacological blockade of the action of $\text{TNF-}\alpha$ prevented T-LTP production. In slices prepared from $\text{TNF-}\alpha$ knockout mice, T-LTP did not occur and it was rescued by the addition of $\text{TNF-}\alpha$. These results demonstrate that $\text{TNF-}\alpha$ is required for the production of T-LTP and suggest that the failure of potentiation of non-deprived eye responses in $\text{TNF-}\alpha$ knockout mice is ascribed to the

deficiency of T-LTP, but not synaptic scaling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：経験依存的発達、可塑性、視覚野、サイトカイン、スケーリング、長期増強、T型 Ca^{2+} チャネル

1. 研究開始当初の背景

(1) 脳内においてサイトカインは病的状況における細胞間信号伝達に関与すると考えられてきたが、正常な脳機能にも重要な役割を果たす可能性が近年の研究により示唆されている。感覚情報等の信号は、グルタミン酸と GABA による興奮性と抑制性の速いシナプス伝達により処理される。ニューロモデュレーターは、状況に応じて適切な情報処理が行えるように、速い信号伝達を調節する。ニューロモデュレーターとしては、モノアミン類、ニューロペプチド、神経栄養因子等が良く知られているが、TNF- α 、IL-1 β 等の炎症性サイトカインもそのような役割を果たすことが分かってきた。

(2) シナプス可塑性においては、シナプス前細胞と後細胞の活動の相関に依存して個々のシナプスに選択的に増強あるいは減弱が起こる Hebb 型の可塑性が当初注目され、詳しい解析が行われてきた。その後、細胞あるいは神経回路全般的に、シナプスの強さを一様に調整するシナプスのスケーリングの機構が存在することが示された (Turrigiano et al., 1998)。神経活動レベルが低い場合には、興奮性シナプスの AMPA 受容体数が増えて量子振幅が大きくなり、興奮性伝達が増強する。神経活動レベルが高い場合には、逆の過程が起こり、興奮性伝達が減弱する。この機構により、入力信号に応じて増減する出力信号を発生出来るように、神経細胞の平均的発火頻度が適当なレベルに保たれる。スケーリングにより興奮性シナプス伝達を強化する過程にグリアに由来する TNF- α が関与することが示されている (Stellwagen & Malenka, 2006)。

(3) 感受性期と呼ばれる生後発達の一時期には、視覚体験に依存して皮質視覚野の神経回路が精緻化され、選択的な視覚反応性が形成される。シナプスの長期増強や長期抑圧がこの過程において中心的役割を果たすと考えられ、眼優位可塑性はそのモデルとして詳しく研究されてきた。感受性期に 4-5 日間片

眼遮蔽すると、その後遮蔽眼刺激に対する視覚野細胞の反応は減弱し、非遮蔽眼刺激に対する視覚野細胞の反応は増強する。我々は、非遮蔽眼反応の増強は T 型 Ca^{2+} チャネル依存性長期増強(T-LTP)により引き起こされることを報告している (Yoshimura et al., 2008)。一方、TNF- α を介するスケーリングが非遮蔽眼反応の増強を引き起こすことを示唆する報告もある (Kaneko et al., 2008)。

2. 研究の目的

サイトカインの中で、ニューロンの生理的機能に様々な影響を与えることが示されている TNF- α が、視覚野のシナプス可塑性と経験依存的機能発達にどのような役割を果たすかを明らかにすることを目指した。特に、感受性期における片眼遮蔽による非遮蔽眼刺激に対する視覚野反応の増強を、T-LTP とシナプスのスケーリングのどちらが担うかを解明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) TNF- α が T-LTP の発生に関与するかを、感受性期 (生後 25-32 日) の Long-Evans ラットより作製した視覚野スライス標本を用いて調べた。4 層に双極刺激電極を二対刺入し、その刺激により 2/3 層細胞に誘発されるシナプス応答をガラス微小電極で細胞外記録した。テスト刺激を 5 秒間隔で 2 対の刺激電極を通して交互に与えた。一方の刺激電極に 2 Hz 刺激を 15 分間与えて、その刺激により T-LTP が誘発されるかを調べ、他方の電極をそのコントロールとした。一部の実験では 2 Hz 刺激を 5 分間与えた。

(2) スケーリング説を提唱しているグループが使ったものと同じ TNF- α ノックアウトマウス (Tnf $^{-/-}$, Jackson Laboratories) と野性型マウスを用いて TNF- α が T-LTP の発生に関与するかを調べた。視覚野のスライス標本はラットの場合と同様に感受性期の動物から作製した。LTP 実験もラットの場合と同様に行った。

(3) 片眼遮蔽により視覚野 2/3 層錐体細胞の興奮性シナプスにスケーリング起きるかを、生後 31-32 日齢の Long-Evans ラットから作製した視覚野スライス標本を用いて調べた。片眼遮蔽開始後 3 日で先ず遮蔽眼反応の減弱が起こり、4 日以降に非遮蔽眼反応の増強が起こるので、眼縫合による片眼遮蔽を 3 日間、6 日間施した動物と片眼遮蔽なしのコントロールの 3 群のラットを用いた。一次視覚野の両眼視領域の 2/3 層錐体細胞からホール・セル記録を行い、抑制性シナプス後電流の逆転電位 (-70 mV) に電位固定して微小興奮性シナプス後電流 (mEPSC) を記録した。記録細胞を染色するために、パッチ電極内液にはバイオサイチンを加えた。灌流液には Na^{2+} チャンネル・ブロッカーのテトロドトキシンを加えて活動電位の発生を止めた。

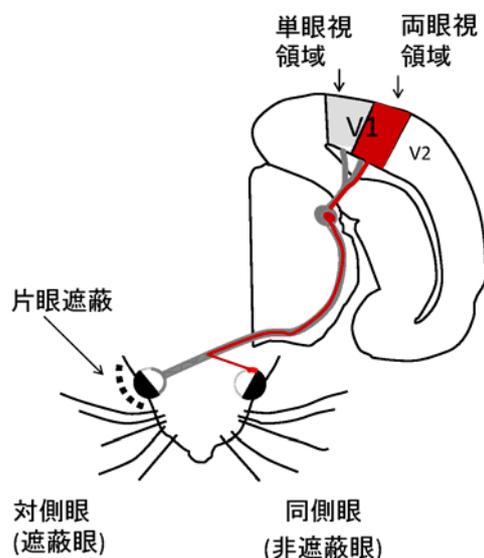


図 1

両眼視領域の同定には、短時間の神経活動により発現が上昇する c-Fos を用いた。片眼遮蔽の実験では、遮蔽眼の対側の半球の視覚野で解析するので (図 1)、片眼遮蔽した動物を切片標本作製の前夜から暗室飼育して、標本作製当日の朝に 1 時間正常視覚環境に曝し、その直後に遮蔽眼の対側の半球から視覚野スライス標本作製した。両眼視領域は同側眼と対側眼からの両入力を受けるのに対して、単眼視領域は対側眼からの入力のみを受けるので (図 1)、この視覚刺激条件下では両眼視領域においてのみ高い c-Fos の発現が見られる。視覚野のスライス標本作成し、一枚おきに記録実験用と c-Fos 染色用とし、c-Fos 染色用は切片作製後直ちに固定した。このようにして、両眼視領域を c-Fos の高い部位として同定した。コントロール動物では

実験前夜に片眼遮蔽し、片眼遮蔽群と同様な手続きにより両眼視領域を同定した。

4. 研究成果

(1) $\text{TNF-}\alpha$ が T-LTP に必要かを、ラット視覚野スライス標本を用いて検討した。 $\text{TNF-}\alpha$ の機能中和抗体を灌流液に加えると、2Hz 刺激を 15 分間与えても長期増強は起こらなかった。また、 $\text{TNF-}\alpha$ 三量体に非共有結合的に結合してサブユニットの解離を促進し、 $\text{TNF-}\alpha$ がその受容体に結合することを妨げるインヒビター存在下でも長期増強は起こらなかった。2Hz 刺激を 5 分間与えた場合、長期増強はコントロール液中では起こらないが、 $\text{TNF-}\alpha$ (3 μM) を灌流液に加えた場合には起きた。これらの結果は、T-LTP の発生に $\text{TNF-}\alpha$ による活性化が必要であることを示す。

(2) スケーリング説を提唱しているグループが使っているものと全く同じ由来の $\text{TNF-}\alpha$ 欠損マウスを使って、 $\text{TNF-}\alpha$ が T-LTP に必要かを検討した。野生型マウスにおいて、2Hz 刺激を 15 分間与えるとラットと同様に、 Ni^{2+} で誘発が阻害される T-LTP が起きた。 $\text{TNF-}\alpha$ 欠損マウスでは T-LTP は全く起こらなかった。しかし、 $\text{TNF-}\alpha$ (3 μM) の存在下では野生型マウスと同様に T-LTP が生じた。これらの結果は、マウスにおいても T-LTP の発生に $\text{TNF-}\alpha$ によるその受容体の活性化が必須であることを示す。

(3) 片眼遮蔽開始後 3 日で先ず遮蔽眼反応の減弱が起こり、4 日以降に非遮蔽眼反応の増強が起こる。この所見を踏まえて、3 日と 6 日間片眼遮蔽したラット及び遮蔽なしのコントロール・ラットから視覚野スライス標本作製し、両眼視領域の 2/3 層錐体細胞から mEPSC を記録し、その振幅を比較することにより、片眼遮蔽によりスケーリングが起きるかを検証した。両眼視領域からサンプルしたことを注意深く確認した細胞を用いて解析した結果、3 群間に mEPSC の振幅 (量子振幅) の大きさに差は全く認められなかった (Kruskal-Wallis test, $P = 0.71$)。また、記録細胞のシリーズ抵抗 (ANOVA, $P = 0.14$) と入力抵抗 (ANOVA, $P = 0.49$) のどちらにも群間の差は認められなかった。従って、片眼遮蔽により興奮性シナプスにスケーリングは起きないことが判明した。

(4) 以上の実験結果は、 $\text{TNF-}\alpha$ は T-LTP の発生に必須であることを示すと共に、非遮蔽眼刺激に対する反応の増強を担うのはスケーリングではなく、T-LTP であることを強く支持する。

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

小松由紀夫 (KOMATSU YUKIO)

名古屋大学・環境医学研究所・教授

研究者番号: 90135343

(2) 研究分担者 なし

()

研究者番号:

(3) 連携研究者 なし

()

研究者番号: