

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700393

研究課題名(和文) 大脳皮質の神経活動による視床の発達期神経回路形成の制御

研究課題名(英文) Regulatory role of cortical activity for maintenance of afferent synapses in the sensory thalamus

研究代表者

鳴島 円(Narushima, Madoka)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：30596177

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：感覚系視床の中継ニューロンは末梢からの求心性入力と大脳皮質からの強いFeedback入力を受けるが、発達期における皮質入力の機能は未解明である。視覚系視床では、発達期に一度完成した求心性線維由来シナプスが感覚経験依存的に維持されることが知られており、本研究では皮質神経活動の抑制が成熟型の求心性線維由来シナプスの維持に与える影響を解析した。その結果、(1)皮質由来シナプスに多く発現する1型代謝型グルタミン酸受容体(mGluR1)が感覚経験依存的な成熟型結合パターン維持に寄与する(2)大脳皮質の神経活動の抑制は求心性線維視床シナプスの再編成を引き起こすことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In the sensory thalamus, relay neurons receive both afferent and feedback inputs from the cerebral cortex. Although developmental process of afferent synapses has been studied, the functional role of cortical inputs in development of thalamic circuits is still unclear. In the visual thalamus, it was reported that once established afferent synapses are maintained in visual experience-dependent manner. I hypothesized that cortical activity was involved in the maintenance of afferent synapses in the thalamus. I found that type 1 metabotropic glutamate receptor (mGluR1) in the thalamus which was densely expressed at corticothalamic synapses was involved in the experience-dependent maintenance of afferent synapses and pharmacological blockade of cortical activity triggered remodeling of once established afferent synapses. These results suggest that cortical activity maintain connection pattern of afferent synapses, possibly via mGluR1 activation.

研究分野：神経生理学

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：視床 代謝型グルタミン酸受容体 シナプス維持 外側膝状体 大脳皮質 シナプス除去 視覚 体性感覚

1. 研究開始当初の背景

感覚系神経回路の多くの領域では、発達期に神経活動依存的な神経回路網の可塑的な変化が起きることが知られており、生物が生育環境に適した情報処理回路を獲得するための脳内基盤になっていると考えられる。

感覚情報は末梢から中継核である視床を介して大脳皮質の各感覚野に送られる。げっ歯類の視覚系視床の外側膝状体 (dLGN) および体性感覚系視床の後内側腹側核 (VPm) のニューロンは、それぞれ求心性の視神経線維または脳幹・主知覚核 (PrV) 由来の内側毛帯線維からの入力を受け、大脳皮質の一次視覚野および一次体性感覚野に出力する一方、大脳皮質からの強い興奮性の Feedback 入力を受け取っている。発達期において、視神経線維および内側毛帯線維と視床ニューロン間のシナプスでは神経活動依存的な余剰シナプスの刈り込みが起き、げっ歯類では生後 3 週齢までに、ひとつの視床ニューロンは dLGN では 2~3 本、VPm ではただ 1 本の求心性線維により支配されるようになる。また、dLGN では余剰シナプスの刈り込み後、一週間の暗室飼育を行うと、支配線維数が再度増加する神経回路の再編成が起こることが報告されており、成熟後のシナプス結合パターンが感覚経験により積極的に維持される機構の存在が示唆されている。申請者のこれまでの研究から、1 型代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR1) 欠損 (mGluR1-KO) マウスでは、生後 3 週齢まで正常に余剰シナプスの刈り込みが進行し、成熟型のシナプス結合パターンが形成されるものの、生後 4 週齢ではひとつの dLGN ニューロンあたりの投射線維数が増加し、結合パターンが再編成されて多数の視神経線維に支配されるようになる。このため、視神経線維 dLGN 間のシナプスの成熟型結合パターンの維持に mGluR1 が寄与することが示唆されていた。しかしながら、感覚神経系のどの部位にある mGluR1 がどのように活性化

されるかについては未解明であった。

一方、大脳皮質由来の興奮性入力については、成熟後に視床ニューロンの活動パターンを変化させる等の報告があるものの、発達期における機能はこれまで明らかになっていなかった。大脳皮質由来シナプスには、AMPA および NMDA 受容体のイオン透過型グルタミン酸受容体のほかに、mGluR1 が豊富に発現している。このことから、視床における成熟型シナプス結合パターンの維持機構の細胞レベルでのメカニズムとして、大脳皮質の神経活動が大脳皮質 視床シナプスの mGluR1 を活性化し、求心性線維 視床シナプスの成熟型結合パターンの維持に寄与する可能性が考えられた。

2. 研究の目的

感覚系視床における求心性線維 視床ニューロン間シナプスの成熟型結合パターン維持機構に大脳皮質の神経活動が関与するかを明らかにし、関与していた場合、その下流の分子メカニズムとして mGluR1 の活性化が関わるかを明らかにすることを目的として研究を行った。まず、成熟型結合パターン維持に関わる mGluR1 の存在部位を特定するため、これまで研究を行ってきた視覚系神経回路を対象に、薬理学的手法を用いて mGluR1 の阻害実験および暗室飼育時の賦活実験を行った。次に、ひとつの視床ニューロンに投射する求心性線維がただ 1 本であり、成熟型結合パターンからの再編成をより観測しやすい体性感覚系の内側毛帯線維 VPm ニューロン間のシナプスを対象に、大脳皮質体性感覚野の神経活動阻害がシナプス結合パターンに与える影響について解析を行った。

3. 研究の方法

(1) スライスパッチクランプ記録法による電気生理学的解析

生後 28-33 日齢の野生型および mGluR1-KO

マウスから dLGN または VPm を含む脳スライス標本を作成し、パッチクランプ法により、視神経線維または内側毛帯線維の電気的刺激により誘発される興奮性シナプス後電流 (EPSC) を記録した。記録中は細胞外液に GABA_A 受容体および GABA_B 受容体の阻害薬である Bicuculline (10 μM) および CGP55845 (1 μM) を加え、抑制性シナプスからの入力を抑制して興奮性入力を分離した。AMPA 受容体を介する EPSC (AMPA-EPSC) のみの記録を行う場合は NMDA 受容体 (NMDAR) の阻害薬である D-APV (100 μM) を投与した。

視神経 - dLGN シナプスおよび内側毛帯 VPm シナプスは、連続した 2 発刺激に対する EPSC の振幅比 (Paired-pulse ratio; PPR) が 1 以下の値を示すことから、PPR が 1 以上の値を示す大脳皮質由来入力と容易に判別することができる。また、ともに放出確率が高いため、シナプス前線維の活動電位の発生に伴い、ほぼ全無則に従って振幅の揺らぎの小さい EPSC が発生する。このため、複数の線維からの投射を受けている場合、EPSC の振幅が刺激強度を上げるに従ってステップ状に増加する。本研究ではこの性質を利用し、EPSC の振幅の変化のステップ数を数えることで、投射線維のおおよその数を見積もった。また、最小刺激および最大刺激で誘発される AMPAR-EPSC および NMDAR-EPSC の振幅 (SF-EPSC および Max-EPSC)、AMPA-EPSC の SF-EPSC と Max-EPSC の比 (Fiber Fraction)、AMPA-EPSC と NMDAR-EPSC の振幅比 (AMPA/NMDA ratio)、NMDAR-EPSC の減衰時定数 (decay time constant) の解析を行った。記録後、スライス標本をチトクロームオキシダーゼおよびバイオサイチンで染色し、記録を行った細胞の局在を確認した。

(2) 浸透圧ポンプを用いた dLGN への薬液投与

浸透圧ポンプの brain infusion kit (alzet 社) を用いて、dLGN への持続的な薬液投与を

行った。brain infusion kit のカニューレを dLGN 直上に刺入し、野生型マウスを用いて、mGluR1 の阻害薬である CPCOEt (10 mM) または mGluR1 の賦活薬 DHPG (5 mM) とポジティブアロステリック調節薬 Ro 67-4853 (10 mM) の混合溶液を生後 21 日齢から 7~10 日間投与した後、(1) と同様にスライス標本を作成して、視神経 dLGN シナプスの電気生理学的解析を行った。

(3) EVA 樹脂を用いた大脳皮質神経活動の阻害

大脳皮質の神経活動を低侵襲性に抑制するため、エチレン - 酢酸ビニル共重合樹脂である EVA 樹脂による局所的慢性投与方法を用いた。EVA 樹脂は目的の薬液を混合して成型すると、持続的に薬物が放出される性質を持ち、また調整前に十分に殺菌を行えば生体に埋め込んでも炎症などを引き起こさない。神経活動の抑制には GABA_A 受容体の賦活薬である Muscimol を用いた。EVA 樹脂に Muscimol 水溶液 (100 mM、10 μl) を混合して成型し、生後 21 日齢のマウスを用いて、穿孔した頭蓋骨から体性感覚野付近の大脳皮質表面に埋め込みを行った。術後 7-10 日後に (1) と同様にスライス標本を作成して、内側毛帯シナプスの電気生理学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) dLGN の mGluR1 による感覚経験依存的な成熟型シナプス結合パタンの維持

mGluR1 は中枢神経系に広く発現し、視覚系神経回路では網膜の内網状層、dLGN の中継ニューロンおよび大脳皮質の抑制性介在ニューロンに発現が見られる。これまで解析を行ってきた mGluR1-KO マウスは小脳を除くすべての領域で mGluR1 が欠損しているため、どの領域の mGluR1 が成熟型シナプス結合パタンの維持に関わるかが明らかではなかった。そこで、浸透圧ポンプを用いて野生型マウス dLGN の mGluR1 を選択的に阻害または賦活す

る実験を行った。

dLGN の mGluR1 の選択的な阻害

野生型マウスで生後 21 日齢から 7-10 日間、mGluR1 の選択的阻害薬である CPCCOEt または生理食塩水を投与した後、スライスパッチクランプ法を用いて電気生理学的解析を行った。その結果、対照群と比較して () EPSC ステップ数の増加 () SF-EPSC amplitude の低下 () Max-EPSC amplitude の増大 () Fiber Fraction の低下が観察された。これらの結果は暗室飼育により誘導されるシナプス結合パタンの再編成と同様であり、投射線維数の増大を示唆していると考えられる。

暗室飼育時における dLGN の mGluR1 の選択的な賦活

野生型マウスで生後 21 日齢に mGluR1 の選択的賦活薬 DHPG とポジティブアロステリック調節薬 Ro 67-4853 または生理食塩水の投与を開始し、その後 7-10 日間マウスを暗室に入れて飼育し、と同様に電気生理学的解析を行った。その結果、生理食塩水投与で暗室飼育を行った対照群と比較して () EPSC ステップ数の減少 () SF-EPSC amplitude の増大 () Max-EPSC amplitude の低下 () Fiber Fraction の増大が観察された。これらの結果は生理食塩水投与の手術を行い、通常環境で飼育した群と同程度であり、mGluR1 を活性化させることにより、暗室飼育下でシナプスの再編成を防ぐことができたと考えられる。

以上の結果より、dLGN の mGluR1 が視神経線維 dLGN シナプスの成熟型シナプス結合パタンの維持に寄与していることが示唆された。

(2) 大脳皮質神経活動の抑制による内側毛帯 VPm シナプスの再編成

mGluR1 は大脳皮質 視床シナプスに多く発現するため、視床の mGluR1 の活性化は生

体内では大脳皮質の神経活動を反映している可能性がある。そこで体性感覚系神経回路を対象に、大脳皮質体性感覚野の神経活動の抑制が内側毛帯 VPm シナプスの成熟型結合パターンに与える影響を解析した。

生後 21 日齢で GABA_A 受容体の賦活薬 Muscimol または生理食塩水を含む EVA 樹脂を体性感覚野付近の大脳皮質直上に埋め込み、7-10 日後にスライス標本を作成して電気生理学的解析を行った。生理食塩水投与群では all-or-none の内側毛帯 EPSC が記録され、単一の内側毛帯線維に支配される成熟型結合パターンが維持されていたのに対し、Muscimol 投与群では () EPSC ステップ数の増加 () SF-EPSC amplitude の低下 () Fiber Fraction の低下が観察された。生理食塩水投与群では約 75% の VPm ニューロンが単一の内側毛帯線維に支配されるのに対し、Muscimol 投与群では約 50% のニューロンが 2 本以上の内側毛帯線維からの投射を受けていた。

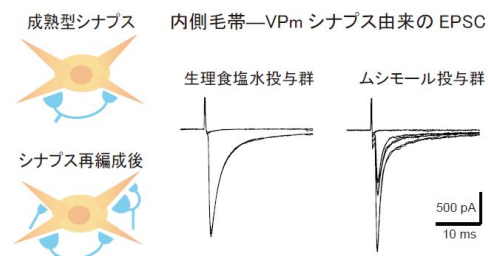


図1 大脳皮質神経活動の抑制による内側毛帯—VPm シナプスの再編成

また、内側毛帯シナプスの AMPAR- EPSC の性質を解析すると、生理食塩水投与群と比較して、Muscimol 投与群では膜電位依存的な内向き整流性が減弱する傾向が見られた。AMPA- EPSC の内向き整流性は、AMPA を構成するサブユニットのうち、GluA2 を含まない受容体に特徴的な性質であるため、Muscimol 投与群では AMPA 受容体のサブユニット構成が変化していることが示唆された。

以上の結果より、生後 21 日齢以降の大脳皮質体性感覚野の神経活動が、成熟型の内側毛帯 VPm シナプスの結合パターンおよび

AMPA の性質の維持に寄与することが示唆された。

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)

宮田麻理子、鳴島円 「シナプス特性の観点から見た皮質視床路の役割」 Clinical Neuroscience, 31,1: 2013-1, 38-41 総説・査読なし

[学会発表](計 3件)

鳴島円 他「Requirement of type 1 metabotropic glutamate receptor for experience-dependent pruning of retinogeniculate synapses.」IBR02011 平成23年7月18日 イタリア・フィレンツェ

鳴島円 他「発達期網膜 外側膝状体シナプス除去における代謝型グルタミン酸受容体1型の役割」 第35回日本神経科学大会 平成24年9月20日 名古屋

鳴島円 他「大脳皮質の神経活動による内側毛帯線維 視床シナプス結合パタンの制御」 第91回日本生理学会大会 平成26年3月16日 鹿児島

[図書](計 1件)

公益財団法人ブレインサイエンス振興財団 廣川信隆編 クバプロ「ブレインサイエンス・レビュー2014」P205-232「感覚神経系における特徴抽出機構の発達」2014年刊

[産業財産権]

出願状況(計 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 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

鳴島円 (NARUSHIMA, Madoka)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号: 30596177

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: