

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：63905

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700362

研究課題名(和文) 経験依存的な知覚機能変化に伴う神経回路再編成メカニズムの解明

研究課題名(英文) Study for the experience-dependent reorganization of neural circuits.

研究代表者

足澤 悦子 (Tarusawa, Etsuko)

生理学研究所・行動・代謝分子解析センター・特別協力研究員

研究者番号：00446262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝的聴覚機能欠損マウスを用い、大脳皮質聴覚野の神経細胞が聴覚以外の感覚入力に反応するか、また神経修飾物質が大脳皮質の神経活動に与える影響を検証するために、神経活動依存的に発現するfosタンパクの免疫染色法を用い検証した。その結果、聴覚機能欠損マウスの聴覚野神経細胞は、視覚入力を受けていること、アセチルコリンは、探索行動時の大脳皮質の活動増加に寄与していること、一方セトロンは、探索していない時の神経活動を抑制していることが明らかになった。以上の成果から、長期の聴覚遮断による経験依存的神経回路再編成に神経活動を増減する神経修飾物質がどのように関与するのかを今後検証するための実験基盤ができた。

研究成果の概要(英文)：To reveal the mechanism for experience-dependent reorganization of cortical neural circuits, we used mutant mice which have impairment of hearing. Immunohistochemical analysis for fos protein which is activity dependently expressed in neurons were performed. We found that fos-expressing neurons in auditory cortex of mutant mice were more frequent than that of naive mice. Furthermore, we found that acetylcholine and serotonin modulate the cortical activity by the facilitation or the depression during exploration and stationary state, respectively.

研究分野：神経回路網

キーワード：神経回路

1. 研究開始当初の背景

長期にわたる感覚遮断を経験した動物にとって、残された感覚入力的重要性が増し、その知覚機能を向上させることができることは自明の事実である。しかし、どのようなメカニズムで、ある特定の知覚機能が経験依存的に変化するかについては、わかっていない。これまでに、大脳皮質の神経細胞間結合には可塑性があること、またその可塑性誘導に神経修飾物質が重要であると考えられてきた。このメカニズムを解明することは、脳梗塞や事故によって失われた感覚機能を、残された健全な感覚により補完する代償性リハビリテーションの開発等に役立つことが期待される。

2. 研究の目的

本課題では、感覚遮断とそれに伴う知覚機能の向上が、どのような神経回路再編成を経ているか、また神経修飾物質が神経回路再編成に与える影響を明らかにすることをゴールとしており、感覚遮断された大脳皮質の感覚領域にどのような変化が起きているか検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 感覚遮断とそれに伴う神経回路再編成を調べるために、長期の感覚遮断モデルマウスとして、遺伝的に聴覚機能を欠損したミュータントマウスを用いた。このマウスにおいて、大脳皮質聴覚野の神経活動が正常なマウスに比べて、どのように変化しているかを、神経活動依存的に発現する fos タンパクを指標とし、免疫染色によって検証した。

(2) 神経修飾物質が大脳皮質の神経活動に与える影響を調べるために、神経修飾物質の枯渇剤や受容体の阻害剤を大脳皮質に投与し、動物の探索行動時、また静止時に神経修飾物質が神経活動に与える影響を、fos タンパクの免疫染色によって検証した。

(3) 大脳皮質、神経細胞間結合関係を調べるために、パッチクランプ法により電気生理学的記録を行い、その周囲の細胞をケージドグルタミン酸のレーザー光刺激により活動させ、記録している細胞へのシナプス入力強度および入力範囲を調べた。

(4) 知覚機能を調べるために、water maze による視覚弁別課題の実験系を確立した。

4. 研究成果

(1) 聴覚機能欠損マウスにおいて、大脳皮質聴覚野の神経細胞が、視覚刺激に対して応答するかどうかを検証するために、完全な暗

室で数日飼育した聴覚機能欠損マウスと正常なマウスを、明るい部屋に出した直後の神経活動を活動依存的に発現する fos タンパクの免疫染色によって調べた。通常、特別な刺激を与えずケージで飼育したマウスの大脳皮質における fos 発現は非常に低く(図1上段)神経細胞の活動性が低いことが分かる。しかし、マウスを一時間新奇環境へ移したことによって、大脳皮質神経細胞の活動は非常に高くなっていることが、この fos 免疫染色法によってわかる(図1下段)。完全な暗室で数日飼育した聴覚機能欠損マウスと正常なマウスの両方を、実験当日に明るい部屋に1時間出し光刺激を与えた後に fos の免疫染色を行った。その結果、まず正常なマウスの大脳皮質視覚野において、fos 陽性細胞の著しい増加が認められた。一方で、正常なマウスの大脳皮質聴覚野においては、視覚野に比べて fos 陽性細胞の割合は低かった。これに比べて、聴覚機能欠損マウス、大脳皮質聴覚野における fos 陽性細胞の割合は、正常なマウスよりも高かった。これは、視覚入力に対して応答した聴覚野の神経細胞が正常なマウスの聴覚野よりも多く存在していたことを示唆しており、マウスにおいても、長期にわたり聴覚機能を欠損したマウス聴覚野の神経細胞は、聴覚以外の感覚入力を受けていることが明らかになった。

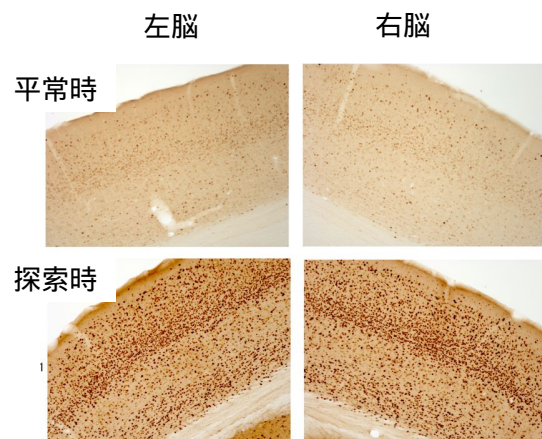


図1 .fos 抗体による免疫染色像

(2) 神経細胞のシナプス可塑性に重要な役割を果たすと考えられている神経修飾物質が、大脳皮質の神経活動にどのように関わるかを検証した。脳内には、複数の神経修飾物質が存在し、それぞれを産生し放出する神経細胞がある。これらの神経細胞は、大脳皮質に広く投射し、動物の覚醒レベルの変化に伴って放出されることにより、大脳皮質の神経活動を調節していると考えられている。正常なマウスの大脳皮質片半球に、代謝型アセチルコリン受容体の阻害剤を投与するために、オスモティックポンプを利用した。薬剤を入れたポンプをマウスの皮下に装着することにより、時間をかけて薬剤を大脳皮質に投与

することができる。その結果、通常ではマウスを新奇環境に入れたときに観察される fos 発現細胞の増加が観察されなかった。マウスの新奇環境探索時の大脳皮質の神経活動は、アセチルコリンを介した代謝型アセチルコリン受容体の活性化によって増強されていることが明らかになった。一方、セトロンを枯渇させる薬剤をマウス大脳皮質の片半球に投与したところ、新奇環境に入れていない平常時にもかかわらず、fos 陽性細胞の増加が観察され、セトロンは大脳皮質の神経活動を抑制していることが明らかになった。

(3) 大脳皮質における神経細胞間結合関係を調べるために、ホールセルパッチクランプ法とケージドグルタミン酸レーザー光刺激法を組み合わせて実験を行った。

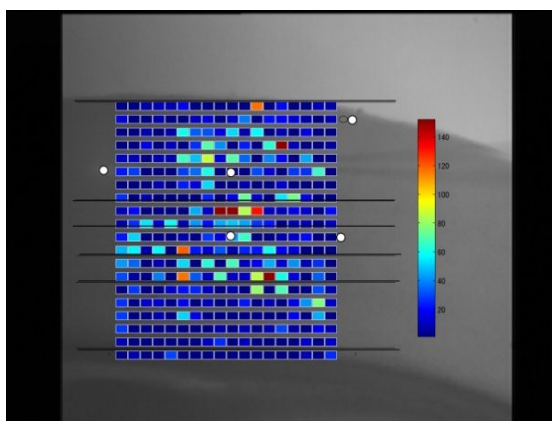


図2．大脳皮質 2/3 層錐体細胞への興奮性入力マップ

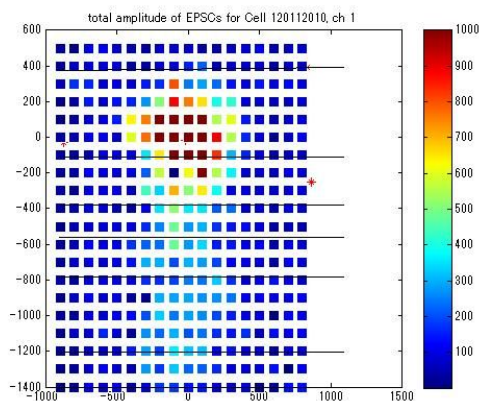


図3．大脳皮質 2/3 層錐体細胞への抑制性入力マップ

大脳皮質 2/3 層の錐体細胞からホールセル記録を行い、記録細胞周辺の数 100 ミクロンの範囲に青色のレーザー光を照射すると、ケージドグルタミン酸がアンケージングされることにより、その周辺の神経細胞のグルタミン酸受容体が活性化し、細胞に活動電位を引き起こすことができる。ホールセル記録をしている細胞へシナプス結合している神経

細胞において活動電位が起きていれば、興奮性のシナプス入力として記録細胞から記録することができる。レーザーを照射した場所とそのときホールセル記録していた細胞から記録された興奮性シナプス入力の強度をシュドカラーで表示したものが図 2 である。この実験では、空間解像度を良くするために、一回のレーザー照射によって局所的に神経細胞を活動させることが重要である。そのために、レーザー強度と照射時間、およびケージドグルタミン酸の濃度検討を行った。条件検討の結果、先行研究に一致して、2/3 層の錐体細胞が 4 層から強いシナプス入力を受けていること、また同じ 2/3 層からも入力を受けている結果を得ることができる条件が整った。同様にして、抑制性神経細胞からのシナプス入力を調べることができた(図 3)。

この結果から、2/3 層の錐体細胞は、その周辺から強い抑制性シナプス入力を受け、また細胞と同じカラムの 4 層、5 層、6 層からも弱い抑制性シナプス入力を受けていることが分かった。

(4) 知覚機能を調べるために、water maze による視覚弁別課題の実験系を確立した。視覚刺激として、片方のモニターには灰色の画面を表示、もう片方には空間周波数が 0.1 cycle/degree の sinusoidal grating bar を表示し、縞刺激の方にのみ台を置いた。野生型のマウスが、縞刺激の方に台が置いてあるということを学習する過程を調べるために、2 グループで実験を行った。試験グループでは、縞刺激の方にのみ台を置き、縞刺激と灰色の画面を弁別させ、コントロールグループでは、灰色の刺激と縞刺激の両方に台を置いて視覚弁別を必要としないようにした。縞模様の方へ泳いで行った場合を正解として正解率を出したところ、コントロールグループは学習期間を通して 50% の正解率(縞刺激の方へ泳いだ)を示したが、試験グループでは、学習 4 日目には 75% の正解率にまで視覚刺激を正しく弁別できるようになった(図 4)。この系を利用して、縞刺激のコントラストや空間周波数を変えることで、弁別能が向上したかどうかを判断することが可能になった。

以上の結果より、長期の感覚遮断モデルマウスとして、遺伝的に聴覚機能を欠損したミュータントマウスがモデルマウスとして有効であること、また、聴覚機能を欠損しているマウス大脳皮質聴覚野の神経細胞は、その後の経験依存的に視覚入力を受けるようになってきていること、さらに、神経細胞間結合の可塑性に影響を与えるアセチルコリンは、マウスの探索行動時の大脳皮質の活動増加に寄与していること、またセトロンは、探索していない時の神経活動を抑制していることが明らかになった。また、長期感覚遮断に

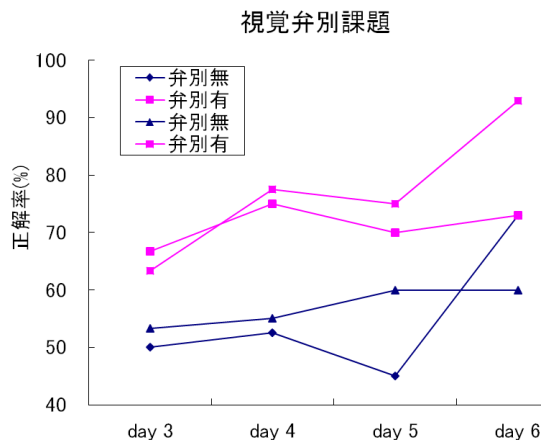


図4 .Water maze による視覚弁別課題

よって起きている神経回路再編成を調べる手段として、ホールセル記録とレーザー光刺激法を組み合わせ、シナプス入力マップを調べるための条件が明らかになった。以上の成果から、長期の感覚遮断によって経験依存的に獲得される新たな神経回路形成には、アセチルコリンによる神経活動の増加が重要なのか、セロトニンによる活動抑制が重要なのかを検証し、またどのような神経回路再編成が起きているかを検出するための実験基盤ができた。今後これらの知見を生かして、長期の感覚遮断に伴う神経回路再編成のメカニズムを解明することが期待される。

6 . 研究組織

(1)研究代表者

足澤 悦子 (TARUSAWA, Etsuko)

生理学研究所・行動・代謝分子解析センタ

ー・特別協力研究員

研究者番号：00446262