

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830013

研究課題名(和文)片眼摘出による対称なレチノトピー形成メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanisms of the duplicated retinotopic map reorganization induced by monocular enucleation

研究代表者

亀山 克朗 (KAMEYAMA, Katsuro)

鳥取大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80446517

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：視覚情報は網膜の神経節細胞で受け取られ、その情報は外側膝状体を経て、大脳皮質一次視覚野へと伝えられる。この経路において視野上の位置関係は保たれたまま伝えられており、この性質はレチノトピーと呼ばれる。本研究では片眼摘出後のレチノトピーの変化を光計測法により観察した。その結果、視覚反応領域が拡大し、そのレチノトピーは対称となるように変化していることが観察された。また外側膝状体から大脳皮質一次視覚野に至る軸索投射を観察したところ、レチノトピーが対称となる様を反映するようにその軸索投射が変化していることがわかり、この視覚経路のダイナミックな変化によって対称なレチノトピーが生じることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Visual input is received by retinal ganglion cells and their axons project mainly to the lateral geniculate nucleus (LGN) of the thalamus. Then neurons in the LGN send their axons to the primary visual cortex (V1). Precise projections of the retinogeniculate and geniculocortical pathways render the topographic arrangement called retinotopy in the visual cortex. We used an optical imaging technique to investigate the change of the retinotopic map in the monocularly enucleated (ME) animals. We observed the duplication of the retinotopic map clearly across V1. The responding cortical area in the ME animals was larger compared with that of normal animals. To examine possible changes in the geniculocortical projections, we visualized the geniculocortical afferents in V1 and compared their location in V1 with the retinotopic map. The results suggest that the functional change of retinotopy is presumably accompanied with an anatomical alteration of the visual pathways.

研究分野：神経生理学

キーワード：視覚 レチノトピー

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 感覚情報を処理するニューロンは脳内で整然とした秩序をもって配置されている。視覚系においては、あるひとつのニューロンは受容野と呼ばれる視野の一領域を担当しており、複数のニューロンがそれぞれ別の異なる視野上の位置を担当することで視野全体を見ることが出来る。この視野上の位置関係とニューロンの位置関係はばらばらに配置されているわけではなく、脳内においても視野の位置関係と対応するように連続的に表現されており、この性質はレチノトピーと呼ばれている。大脳皮質一次視覚野でみられるレチノトピーは、発達期に外側膝状体から一次視覚野へと向かう軸索投射によって形成され、その形成過程において網膜での神経活動と軸索の伸長に関わる分子が重要な働きをしていると考えられている。しかしながらこれほど正確な神経回路がどのように形成され、機能を持つようになるのかはいまだ不明な点が多い。

(2) 齧歯類の視覚経路において、眼球の網膜神経節細胞の軸索は約95%視交叉で交差して対側の外側膝状体に投射しており、残り約5%が同側の網膜からの投射である。その結果、対側の眼からの入力の方が優位となっており、大脳皮質一次視覚野では両眼に反応する「両眼反応領域」と対側の眼のみに反応する「単眼反応領域」に分かれ、割合としては「単眼反応領域」のほうがより広い領域を占めている。そこで、もし対側の眼球を摘出した場合、入力を失った「単眼反応領域」はなんの機能も持たない使われない領域となるのであろうか？

(3) 一方、レチノトピーという性質は齧歯類においても霊長類と同様にみられる性質である。先行研究によると、生後すぐに片眼を摘出すると、残っている眼に対し同側の大脳皮質のレチノトピーは通常の動物と異なり、皮質上の前後方向の軸に対称となることが電気生理学的な実験によって示されている。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究では片眼を摘出したときに入力を受け取らなくなった大脳皮質一次視覚野の「単眼反応領域」はなにか機能を持つようになるのか、ここでは残っている眼からの入力を受け取っているという可能性を考え、視覚刺激に対する反応を調べていく。まず電気生理学的な実験で示されている対称なレチノトピーの形成が確かに起こっているのか、脳の広範囲を一度に測定できる光計測法という別の手法を用いることでより明確に観察する。

(2) 片眼を摘出した後に起こる変化はどのようなメカニズムで起こるのか、まず視覚経路である外側膝状体から大脳皮質一次視覚野に至るニューロンの軸索投射に変化が生

じていないか明らかにしていく。つぎに外側膝状体でも片眼を摘出することによりレチノトピーに変化が生じていないのかを確認する。

(3) 外側膝状体から大脳皮質一次視覚野に至る経路に変化が生じているとすれば、その軸索投射に関わっている分子の発現にも変化が生じていると考えられる。軸索の投射を決まった位置に誘導する分子として、エフリンとその受容体エフがおもな役割を果たしていると考えられている。そこでこれらの分子の発現が片眼摘出により影響を受けていないか調べる。

(4) 以上により、片眼を摘出したときに大脳皮質でどのような神経回路の再編が起こるか測定し、そのメカニズムを形態および分子発現の観察から明らかにしていく。これにより、脳の持つ代償的な機能を獲得する機構の解明を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) まず光計測法を用いて片眼摘出による大脳皮質一次視覚野の視覚刺激に対する反応の変化を観察する。光計測法とは赤色の光を脳表面に当て、その反射光をカメラにより計測するものである。脳が活動するとその活動した部位の血流量が増加し、その結果その部位のとくに赤色の光に対する反射率が変化する。これをカメラにより計測することで脳のどの部位が活動しているのかがわかる。光計測法は電気生理学的な手法のようにニューロンひとつひとつの活動を計測することはできないが脳の広い範囲にわたる活動を一度に計測することができ、本研究のような視覚野全体にわたるレチノトピーの観察に適した方法である。

(2) 光計測により脳活動を測定する際に用いる視覚刺激として、ディスプレイ上を左右もしくは上下にある周期で繰り返し動くバー状の視覚刺激を動物の眼前に呈示する。このように視覚刺激を周期的に呈示することでその刺激に誘発される脳の視覚反応も周期的に現れてくることが期待され、この周期性を検出することでニューロンの反応を測定する。赤色の光を照射することにより得られる時系列の画像データに高速フーリエ変換を施すことで、呼吸や心拍による脳の揺れを除いた反応のシグナルを抽出することができる。時系列データに高速フーリエ変換を施すとデータに含まれる周波数の振幅と位相が得られるが、位相成分が視覚刺激の呈示に対し反応する位置を表し、振幅がその反応の強さを表すこととなる。このような解析を用いることにより、従来の光計測法で用いられてきたデータを平均化する手法より記録時間を大幅に短縮することができ、実験を効率よく進めていくことができる。

(3) 外側膝状体ニューロンの大脳皮質へ至る軸索投射は、ガラスピペットに神経トレー

サーであるバイオサイチンを含んだ溶液を充填し、外側膝状体に刺入することで観察する。溶液を満たしたガラスピペットに電極を入れ、初めにニューロンの電気活動を視覚刺激を呈示しながら記録する。これにより外側膝状体の位置を確認し狙っている位置にきたら、電流を電極を通して流すことによりバイオサイチンをニューロンに取り込ませる。バイオサイチンが軸索先端まで輸送されるまで数日待ち、その後、脳の固定標本を作成して染色し外側膝状体ニューロンの皮質へと至る軸索投射を可視化する。

(4) 外側膝状体は脳の深部にあるので、大脳皮質の場合のように、表面から光を当てて脳の活動を計測する光計測法のような方法を用いることは難しい。そこで外側膝状体のレチノトピーの計測は金属電極を外側膝状体に刺入し、ニューロン活動を記録することで行う。金属電極の位置を外側膝状体内で少しずつ動かしていくことで、外側膝状体のさまざまな位置にあるニューロンがどの位置に視覚刺激を呈示したときに反応するのかを調べる。このときに用いる視覚刺激としては、一辺が5~6°の正方形の視覚刺激をディスプレイ上のすべての領域を埋め尽くすようにランダムに呈示する。そのときに得られる視覚反応を記録し、視覚刺激を呈示した位置との対応を再構成することで外側膝状体のレチノトピーを明らかにする。

(5) 軸索投射に関わっている分子の可視化は *in situ* ハイブリダイゼーション法により行う。*in situ* ハイブリダイゼーションで使用するプローブを作成するために、まず動物の脳組織から cDNA を作成する。つぎに目的とする遺伝子、エフリンとその受容体エフの一部の領域を特異的に認識するプライマーを設計し、PCR 法により cDNA にこのプライマーを作用させ目的領域の配列を増幅する。増幅した配列からジゴキシゲニンで標識された mRNA を転写させ、これをプローブとして用いる。固定した脳標本を作成し、適切な温度でプローブを脳標本に作用させ、つぎにジゴキシゲニンに対する抗体を用いて染色することにより、そのプローブ、つまりエフリンとその受容体エフが脳のどこに存在するのかを観察する。

#### 4. 研究成果

(1) 脳の内因性シグナルを測定する光計測法を用いることにより、片眼を摘出した動物において視覚反応を示す領域が本来は反応しない「単眼反応領域」まで拡大していることが明らかとなった。またレチノトピーはその拡大した領域にレチノトピーを折り返したように対称となって表現されていることが確認された。このことは、光計測法だけではなく電気生理学的な手法によっても確認し、確かに対称なレチノトピーが生じていることがわかった。

(2) 外側膝状体に神経トレーサーであるバイオサイチンを注入し、外側膝状体ニューロンの軸索をその投射先である大脳皮質一次視覚野において観察すると、普通の動物ではその投射先が1ヶ所のみ観察されるのに対し、片眼を摘出した動物では投射先が2ヶ所観察された。この結果は対称なレチノトピーを形成するように、ある位置に受容野をもつニューロンが大脳皮質において同じ位置に受容野をもつニューロンの2ヶ所に軸索投射を行っているものと考えられる。

(3) 上述の神経トレーサーを用いた実験ではどうしても外側膝状体の複数のニューロン群にバイオサイチンが取り込まれ、ひとつひとつのニューロンの軸索を染め分けるのは困難であった。そこで記録するニューロンのごく近傍にガラス電極を持っていき、そのニューロンの受容野を電気生理学的に記録した後、電流を流してバイオサイチンを取り込ませ、単一の軸索投射を観察することを試みた。まず試みとして大脳皮質内のニューロンでこの傍細胞記録法を行ったところ、ニューロンの活動を記録し、またそのニューロンの軸索の形態を観察することができた。しかしながら外側膝状体ニューロンについてその反応は記録できるものの軸索の染色はうまくいかず、さらなる検討が必要である。

(4) 電極を外側膝状体に刺入し、外側膝状体におけるレチノトピーの観察を行ったところ、片眼を摘出して外側膝状体においてはレチノトピーが対称となっていない様子が観察された。まだ数が少なくさらなる検討の余地があるものの、対称なレチノトピーは外側膝状体自身の変化ではなく、外側膝状体から大脳皮質一次視覚野に至る経路が変化することで生じている可能性がある。

(5) *in situ* ハイブリダイゼーション法により、エフリンとその受容体エフの大脳皮質一次視覚野での発現パターンの可視化を試みた。cDNA の作成、PCR 法による遺伝子配列の増幅まではうまく行えていると思われるものの、そこから mRNA に転写し、プローブを脳の固定標本に作用させて染色したが、明瞭なシグナルは得られなかった。そのため本当に遺伝子配列から mRNA にうまく転写され標識されたプローブができあがっているのか、あるいは染色方法に問題がなかったのか確認し改良することが必要である。

(6) 以上、片眼を摘出した動物において、視覚反応領域が拡大し対称なレチノトピーが大脳皮質一次視覚野で生じること、また分子の発現はうまく観察できなかったが、この変化は外側膝状体から大脳皮質一次視覚野に至る経路が大きく変化することにより生じることが明らかとなった。このメカニズムをさらに探ることにより、脳の損傷や腫瘍などによりある感覚機能が失われたときにそれを代償するようなメカニズムがどのようにして働くのか、さらにはそのときに有効なリハビリテーション法の開発に繋がっている

くものと期待される。

## 5．主な発表論文等

〔学会発表〕(計2件)

亀山 克朗、土江 佑佳、宮田 悠、  
畠 義郎  
片眼摘出による網膜地図再構成のメカ  
ニズム  
第120回日本解剖学会 第92回日本生理  
学会大会 合同大会  
2015年3月23日  
神戸コンベンションセンター(兵庫県・  
神戸市)

亀山 克朗、土江 佑佳、宮田 悠、  
畠 義郎  
Observations of the geniculocortical  
pathway in the duplicated retinotopic  
map induced by monocular  
enucleation  
第66回日本生理学会中国・四国地方会  
2014年11月1日  
情報通信交流館(香川県・高松市)

## 6．研究組織

(1)研究代表者

亀山 克朗 (KAMEYAMA, Katsuro)  
鳥取大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：80446517