

2007年3月15日

独立行政法人 理化学研究所
独立行政法人科学技術振興機構

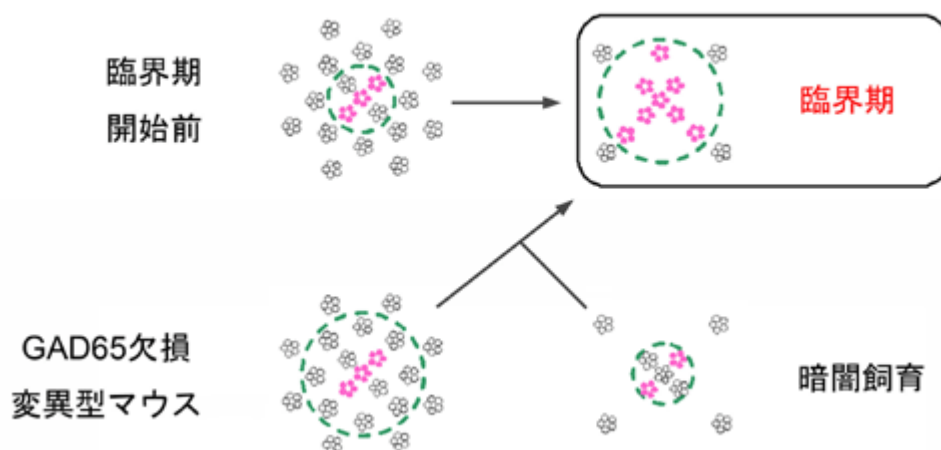
大脳皮質の発達過程における「臨界期」開始メカニズムに新たな知見

- 神経回路網再構築には適量適所の抑制性情報伝達が必要 -

スポーツや語学が上達したりすることは、脳の発達とリンクしています。生まれてまもない動物が片目の見えない状態で育つと、数ヶ月で弱視となり、目に映るものが何であるかを認識できず、その機能は回復しません。このことから特定の機能が育つ期間「臨界期」があるとされ、例えば、「語学の発音の認識は幼児期に獲得される」などと高い関心が寄せられています。しかし、この臨界期の開始時期やメカニズムはまだナゾのままです。

この臨界期のナゾの解明に取り組んでいた理研脳科学総合研究センター神経回路発達研究チームは、開始メカニズムを解く新たな知見を得ました。臨界期の開始は、神経細胞のある特定部位の抑制情報伝達がカギを握り、神経細胞膜に存在する抑制性受容体の数が多くても少なくても臨界期が始まらないことをマウスの実験で明らかにしたのです。以上のことから、抑制性受容体の数が適量であることが、臨界期に見られる神経回路の構築に重要な役割を果たしていることとなります。

さらに、今回得た研究成果は、抑制性情報伝達の異常が引き起こすとされているてんかん発作、自閉症、統合失調症などに新しい知見をもたらし、今までにない治療方法の確立に貢献することになりそうです。



(イメージ図)臨界期開始時の受容体のダイナミックな変化

2007年3月15日

独立行政法人 理化学研究所
独立行政法人科学技術振興機構

大脳皮質の発達過程における「臨界期」開始メカニズムに新たな知見

- 神経回路網再構築には適量適所の抑制性情報伝達が必要 -

◇ポイント◇

- 神経細胞のある特定部位の抑制性情報伝達が臨界期開始をもたらすことを発見
- 臨界期開始機構は過剰でも過少でもない適度な数の抑制性受容体がかさどる
- 抑制性情報伝達の異常が原因と考えられる病気の新治療法の開発に期待

独立行政法人理化学研究所（野依良治理事長）は、独立行政法人科学技術振興機構（JST、沖村憲樹理事長）と共同で、脳が発達する初期に、自らの経験により神経回路の再構築を行う「臨界期」*1の開始には、神経細胞の特定部位の抑制情報伝達が重要であることを世界で初めて発見しました。理研脳科学総合研究センター（甘利俊一センター長）神経回路発達研究チームヘンシュ貴雄チームリーダー、片桐大之研究員らによる研究成果です。本研究は、JST戦略的創造研究推進事業チーム型研究（CREST）「脳の機能発達と学習メカニズムの解明」研究領域（研究総括：津本忠治理研脳科学総合研究センター ユニットリーダー）の一環として行われました。

ほ乳類の新生児における学習、記憶、発達の基礎過程である臨界期において、神経回路網が再構築される現象は、約50年前に発見されました。臨界期をつかさどる分子メカニズムの解明は、脳の機能発現を理解する上での重要な研究テーマであり、昨今の分子生物学のめざましい発展により、大きな成果をあげています。大脳皮質の視覚野では、両眼からの視覚入力を受け取る神経細胞の情報伝達を適度に抑制することは、臨界期の開始に重要な働きをすることが明らかになってきました。

神経細胞の抑制は、神経細胞膜に存在する受容体に「 γ -アミノ酪酸（GABA）»*2が結合することで起こります。研究チームでは、この受容体に焦点を当て、臨界期開始の分子メカニズムの解明に挑みました。まず始めに、神経細胞の特定部位における受容体の活動を測定したところ、臨界期には神経細胞の細胞体表面に存在する受容体の数が減少していることがわかりました。次に、生まれた直後から暗闇飼育して、視覚入力を遮断し、臨界期開始に異常が見られるマウスと、正常なマウスを比較したところ、異常をきたしたマウスでは受容体の数がさらに減少していました。一方、GABAの量が少なく、視覚野の臨界期を迎えないマウスでは、正常なマウスに比べ受容体の数が多くなっています。つまり、受容体の数が多すぎても、少なすぎても、臨界期は始まらないのです。そこで、このGABAの量が少ないマウスを暗闇飼育することにより、受容体の数にどのような変化をもたらされるかを調べたところ、受容体の数は多くも少なくもない“中間値”を示し、臨界期が正常に開始することを確認しました。今回、明らかになった成果は、神経回路網の再構築という観点に新しい概念を投げ、神経疾患の症状を正常に戻すための重要な知見として貢献することが期待されます。

本研究成果は、米国の科学雑誌『Neuron（ニューロン）』（3月14日・オンライン）に掲載されます。

1. 背景

外国語を習得したり、楽器を弾いたり、スポーツが上達する過程では、個人差があるにしても習い始める時期が早ければ早いほど苦勞しません。こうしたことを、人々は自分達の体験・経験等として知っています。つまり、生まれてからある一定の若い期間の経験は、脳が発達していく過程で、記憶や学習といった高次機能に多大なる影響を及ぼすといえます。しかし、どのようなメカニズムでこの脳回路が集中的に形成される時期がおとずれるのかは、まだわかっていません。

この問題を解決する糸口として研究チームは、哺乳類の視覚野に着目し、研究を行っています。普通、脳の右半球の視覚野に存在している錐体細胞^{*3}と呼ぶ神経細胞は、左目からの入力に対して強く反応を示します(図1)。一方、左目をふさぎ、左目からの入力を弱めてやると、今度は逆に右目からの入力に対して強く反応を示すようになります(図1)。この現象は、「臨界期」という生後間もない特定の期間だけ観察することができます。研究チームは、この臨界期開始を世界で初めて人為的に操作することに成功しました(平成16年3月12日記者発表: 大脳の形成を司る神経回路網の働きを同定)。

神経細胞同士の情報のやりとりは、シナプス前終末から放出された神経伝達物質が、シナプス後膜に存在するその受容体と結合することで行われます(図2)。神経伝達物質の一つであるγ-アミノ酪酸(GABA)は、錐体細胞の細胞膜に存在するGABA_A受容体を介して錐体細胞の活動を抑制します(図2)。そのGABA_A受容体の働きを促進させる薬剤「ベンゾジアゼピン薬」^{*4}を、通常の臨界期開始時期よりも早い段階で野生型マウスに投与し、臨界期を開始させることが出来ました。さらに、臨界期を開始させることが出来ないと言われていたGABAの合成酵素の一種を欠損させた変異型マウス(GAD65欠損変異型マウス)に、ベンゾジアゼピン薬を投与すると、その時点から臨界期が開始するという劇的な作用を見つけました。このようなことから、錐体細胞のGABA_A受容体を介する抑制入力に臨界期開始に重要な役割を果たしていることがわかってきました。

研究チームは、この成果をもとに、GABA_A受容体を構成しているサブユニットに焦点を絞りました。そしてこれまでに、ベンゾジアゼピン薬が作用する4種類のGABA_A受容体サブユニットの中の「α1サブユニット」が臨界期開始の鍵を握っていることを突き止めました。

2. 研究手法と成果

脳の視覚野には、錐体細胞の他に介在細胞^{*5}があり、この細胞にはGABAの合成酵素が含まれています。介在細胞の一種であるパルバルブミン(parvalbumin)陽性介在細胞(PV陽性細胞)の軸策は、錐体細胞の軸策起始領域^{*6}及び細胞体にシナプスを形成しています(図2)。この二つの領域にはGABA_A受容体が存在しており、特に、細胞体にはα1サブユニットが多く含まれていることが知られています(図2)。このことは軸策起始領域ではなく細胞体に存在するGABA_A受容体が臨界期開始に関与していることを示唆するのではないかと予測しました。

(1) ケージド化合物を用いた刺激方法

この予測が正しいかを調べるために、ケージド化合物を用いた刺激方法を用い

ました。この刺激装置は、オリンパス株式会社の協力のもとに開発したものです。ケージド化合物とは、目的とする分子の活性部位に光保護基を結合させて分子生理活性部位を隠す化合物で、紫外線レーザー光 (UV) を照射すると、活性部位と保護基の結合が分解され、目的とする分子が不活性型から活性型へと変換します。この UV 照射を光学顕微鏡下で行うと、照射領域は細かく制限できます。つまり、細胞の任意の局所領域に、活性型の目的分子を導き出すことができます。実際に、研究グループはマウス視覚野を含んだスライス標本にある一つの錐体細胞を可視化し (図 3A)、その細胞体のある一点の部位にこの UV 刺激を行いました (図 3B)。その結果、この UV 刺激を行った部位を、細胞体上でスポットとして観察できました (図 3C)。以上のことから、この刺激方法は特定部位に存在する受容体の刺激の解析に適していることを確認しました。

(2) GABA_A受容体の数を算出

スライス標本を、ケージド化合物の一種であるケージドGABAを含む人工生理食塩水で浸し、錐体細胞の軸策起始領域及び細胞体にそれぞれUV照射し、その領域にのみ活性型GABAを活性化させ、発生する電気生理学的応答を記録しました。そして実験終了後にノイズ解析^{*7}という方法を用いGABA_A受容体の数を算出しました。その結果、臨界期開始前後で、軸策起始領域におけるGABA_A受容体の数の変化には有意な差が認められなかったのに対し、細胞体ではGABA_A受容体の数が減少していることを観察しました (図 4AとB)。また、軸策起始領域よりも細胞体により強く出るベンゾジアゼピン薬の効果が、臨界期開始との間に密接な関係があることを示唆することになりました。

(3) 二種類の臨界期開始異常マウスのGABA_A受容体数

次に、臨界期開始に異常がみられる二種類のマウスについて調べました。生まれた直後から暗闇飼育することで視覚入力が遮断されたマウスでは、細胞体におけるGABA_A受容体の数はより減少していました (図 4A)。一方、臨界期開始に異常を示す、GAD65 欠損変異型マウスでは、前例のマウスとは異なり、通常飼育マウスの臨界期前のように、多くの受容体の数を観察できました (図 5)。つまり、細胞体における受容体の数が多すぎても少なすぎても、臨界期が開始しなかったのです。

そこで、このGAD65 欠損変異型マウスを生まれた直後に暗闇飼育すると、受容体の数がどのような変化をするかを調べました。その結果、細胞体のGABA_A受容体の数は、多くもなく少なくもない“中間値”で、臨界期中のマウスにおける細胞体のGABA_A受容体の数に近い値を示しました (図 5)。同時に、このマウスでは臨界期が開始することを見出しました (図 6)。

(4) まとめ

この一連の実験から、本研究で見出した適度なGABA_A受容体の数は、PV陽性細胞が錐体細胞の細胞体と情報伝達のやりとりを行う部位の大きさに適したGABA_A受容体の数を意味していると考えられます。そして、PV陽性細胞からもたらされる抑制性情報GABAと情報を受け取るGABA_A受容体が量的質的に

適合することが、臨界期に見られる神経回路網の再構築に重要な役割を果たしていると結論づけました (図 7)。

3. 今後の展開

本研究は、抑制性情報伝達の受容体分子が、神経細胞の特定部位でダイナミックな動きを示している可能性を提唱することになりました。今後は、臨界期開始のメカニズムの解明には、抑制性受容体の数を制御するしくみを明らかにしていくことが重要であると考えられます。また本研究の成果は、アルコール依存症、自閉症、統合失調症といった抑制性情報伝達の異常が引き起こすと考えられている病気に、新しい知見を与えることが期待されます。つまり、過剰でも過少でもない抑制性情報伝達をもたらすこと、その重要性を基盤とした治療法の確立に貢献すると期待できます。

(問い合わせ先)

独立行政法人理化学研究所

脳科学総合研究センター

臨界期機構研究グループ

神経回路発達研究チーム チームリーダー

Takao K. HENSCH (ヘンシュ 貴雄)

Tel : 048-467-9634 / Fax : 048-467-2306

脳科学研究推進部 嶋田 庸嗣

Tel : 048-467-9596 / Fax : 048-462-4914

独立行政法人科学技術振興機構

戦略的創造事業本部 研究推進部 研究第一課

Tel : 048-226-5635 / Fax : 048-226-1164

(報道担当)

独立行政法人理化学研究所 広報室 報道担当

Tel : 048-467-9272 / Fax : 048-462-4715

Mail : koho@riken.jp

独立行政法人科学技術振興機構 広報・ポータル部広報室

Tel : 03-5214-8404 / Fax : 03-5214-8432

<補足説明>

※1 臨界期

大脳皮質の視覚領 (両目からの情報を最初に受け取る領域) では、生後 8 歳までに

限って視覚刺激による神経回路の再構成が起こる。このように、神経回路が経験によって集中的に作られる時期を「臨界期」と呼ぶ。例えば、英語の“R”の発音を習得するには生後6ヶ月前後が臨界期であるなどが知られている。

※2 γ -アミノ酪酸(GABA)

大脳、小脳や海馬の主要抑制性伝達物質。脳内 GABA 濃度の低下はけいれんを誘発させ、病態との関連が注目されている。

※3 錐体細胞

大脳皮質の神経細胞のうち、約80%を占める神経細胞。脳の他の部位の神経細胞から受けた興奮性の信号を、また他の脳の部位に伝える役割を担う。

※4 ベンゾジアゼピン薬

この薬種には抑制性伝達を制御する作用があり、その一種であるジアゼパムのように GABA 伝達を推進するもの（アゴニスト）は抗てんかん剤、催眠鎮静剤、抗不安薬として用いられ、不安・緊張を抑制する作用がある。

※5 介在細胞

大脳皮質の神経細胞のうち、錐体細胞を除いた約20%を占める抑制性神経細胞。多種多様で、おのおの異なった役割を持ち、局所神経回路の活動を制御する。

※6 軸策起始領域

一本の長い神経突起である軸策が細胞体から出た、最初の領域。活動電位の発信部位。axon initial segment。

※7 ノイズ解析

受容体に分子が結合して活性化すると、イオンが通過する通路(チャネル)が開く。また、イオンが通り電流が発生すると、ごくわずかな電流ノイズの変化としてとらえられ、周囲の電流ノイズと区別できる。そのゆらぎ具合を理論に基づいた式にあてはめることで、チャネルにおけるイオンの通りやすさや、チャネル数を推測する解析法。

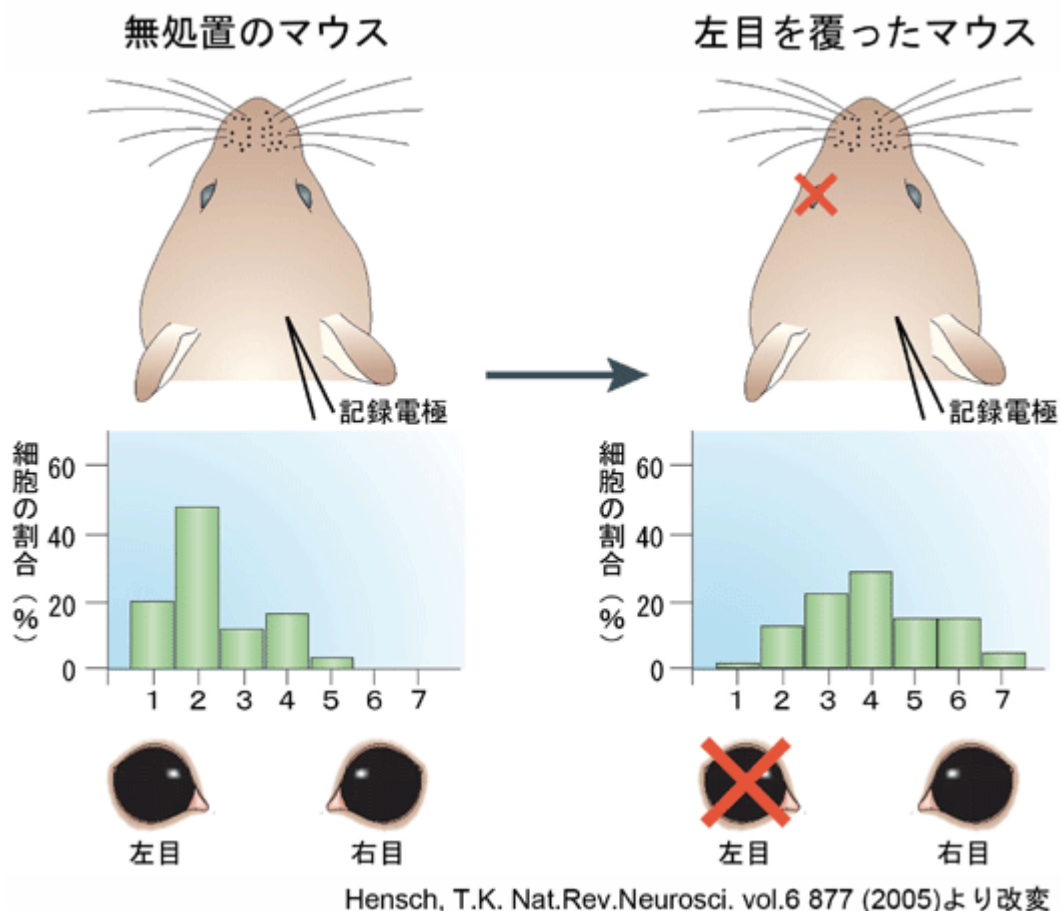


図1 「臨界期」における視覚野の神経回路網再構築

脳の右半球の第一次視覚野両眼性領域（左目、右目、両方からの視覚入力を統合する神経細胞が存在している領域）からの電気信号を記録し、左目、右目からの視覚入力に対して反応する神経細胞の割合をヒストグラムで示したもの。グループ4はどちらの目にも同じ程度に反応する細胞群を表す。1、7に近づくにつれて、それぞれ左目、右目からの視覚入力に強く反応する細胞の割合が増加し、最終的に1は左目だけに、7は右目だけに反応する細胞群を意味する。

左図：無処置の場合、左側のヒストグラムに見られるように、左目からの視覚入力に多くの細胞が反応する。

右図：次に、「臨界期」中で、左目のまぶたを縫い4日間視覚入力を遮ってやり、記録する寸前に閉じていたまぶたを再び開けて記録をとる。すると、右目からの視覚入力に反応する細胞の数が増えることがヒストグラムからわかる。

マウスの場合、この現象は生まれてから約1ヶ月の頃がピークで、生涯において一度しか起こらない。なおこれまでの研究では、生後1ヶ月の頃に見られるはずの臨界期が、生まれてからずっと暗闇の中で飼育したマウス、そして、GAD65欠損変異型マウス（研究チームの以前の成果（Hensch, T.K. et al. Science 282 vol.1504 (1998)）では、起こらないとされていた。

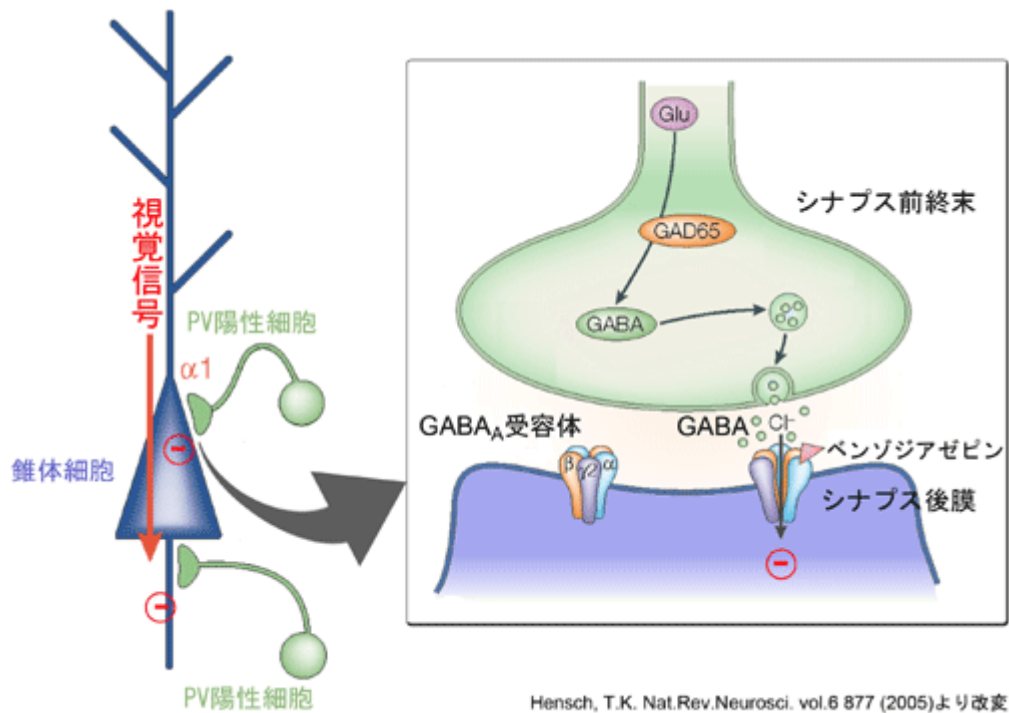


図2 PV陽性細胞による視覚信号の抑制

左図：第一次視覚野における錐体細胞上を伝播している視覚信号は、その錐体細胞とPV陽性細胞との間で形成している抑制性シナプスを介して制御される。

右図：抑制性シナプスでの制御のメカニズムを示した。PV陽性細胞のシナプス前終末では、グルタミン酸からGABA合成酵素であるGAD65によりGABAが合成される。刺激に応じて放出されたGABAは、錐体細胞のシナプス後膜上にあるGABA_A受容体に結合し、イオンチャネルを通して細胞内へのCl⁻流入を増大させ、錐体細胞の膜興奮を迎える。

なお、ベンゾジアゼピンはGABA_A受容体の開いている時間を長くすることで、GABA_A受容体の機能を促進する薬。研究チームは以前、錐体細胞の細胞体に多く発現している、GABA_A受容体のサブユニットであるα1サブユニットが「臨界期」開始に重要な役割を示している分子として見出した (Fagiolini, M. et al. Science vol.303 1681 (2004))。

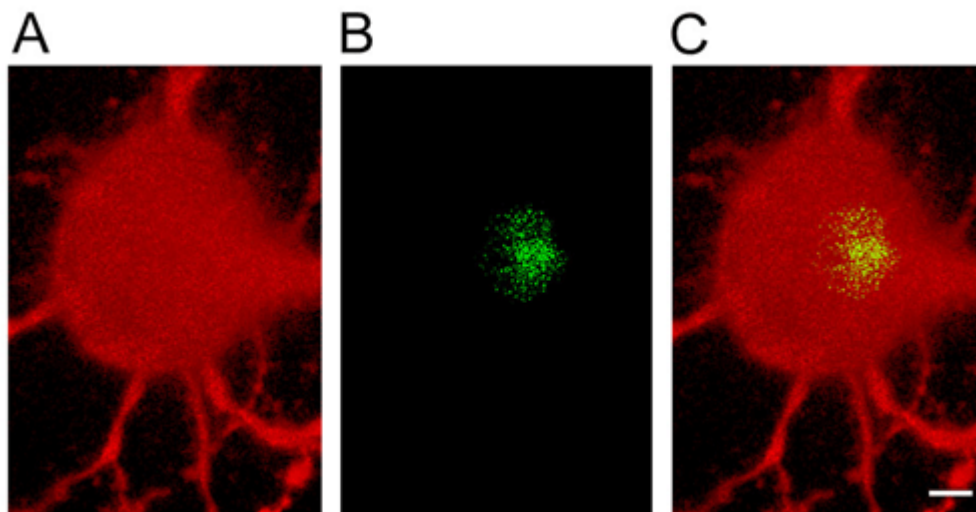


図3 レーザー光照射による細胞上の局所刺激

- A : 可視化した一つの錐体細胞体部位。この細胞上の $\alpha 1$ サブユニットをもつ GABA_A 受容体に、レーザー照射があたった時のみ蛍光を発するように施した。
- B : 実際に、研究チームのシステムを使って、細胞体の任意の位置にレーザー照射し、蛍光発色させたもの。
- C : AとBを重ねあわせた図。スケール、 $4\mu\text{m}$ 。

この実験から、レーザー光照射で、細胞の任意の局所領域に存在する受容体を活性化することが可能であることがわかった。

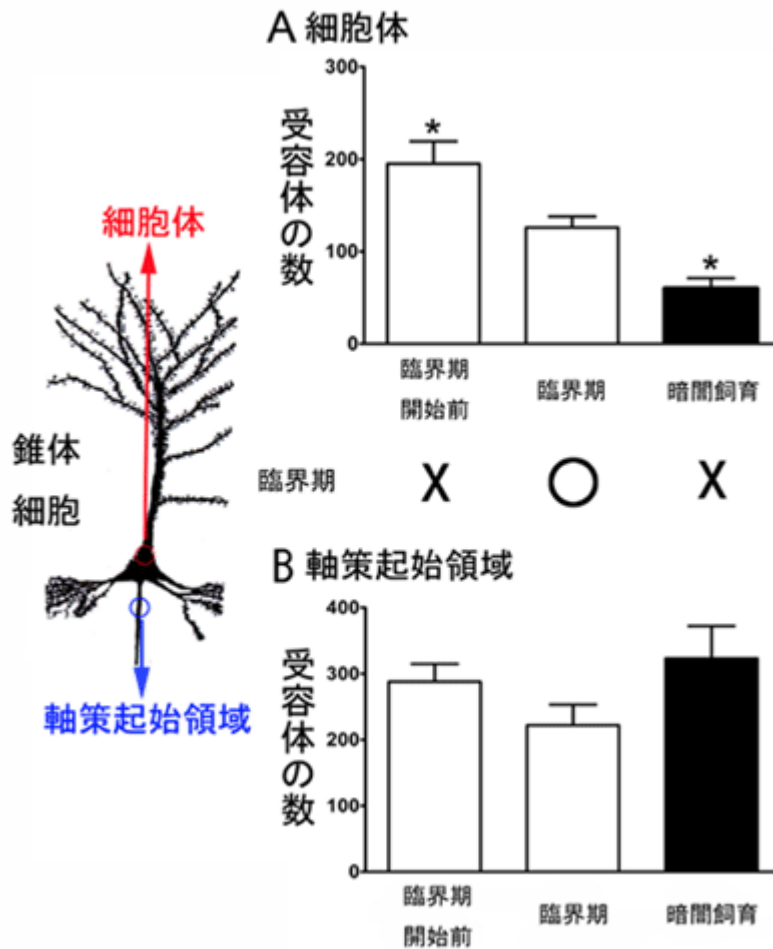


図4 臨界期開始時に変化する細胞体領域の受容体の数

左図：ケージドGABA存在下で、錐体細胞の軸策起始領域、および、細胞体にレーザー照射。その際の電気応答を記録し、実験終了後の解析により、照射した各領域におけるGABA_A受容体を推定した。

右図(A)：(1)細胞体における臨界期中の受容体の数は、臨界期開始前よりも減少していた。(2)臨界期に異常が認められる暗闇飼育したマウスでは、臨界期中のマウスよりさらに受容体の数が減少していた。

右図(B)：一方、軸策起始領域における受容体の数は、いずれのマウスの間でも顕著な差が認められなかった。

以上から、細胞体領域におけるGABA_A受容体の数と臨界期開始との間には密接な関係があることがわかる。

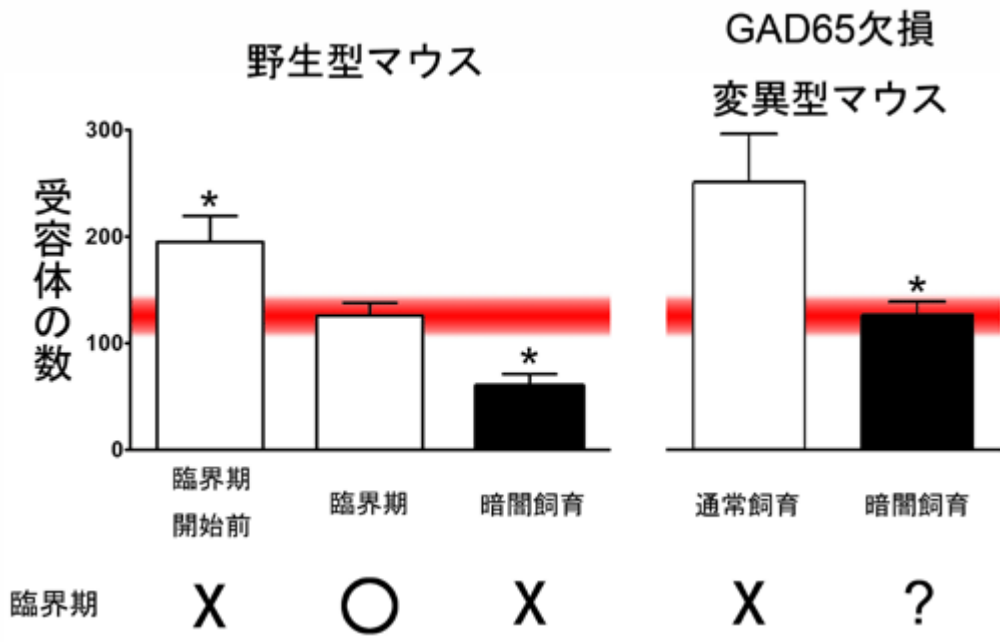


図5 臨界期開始時に最適な受容体の数

臨界期開始を示さないGAD65欠損変異型マウスについて調べたところ、細胞体におけるGABA_A受容体は、臨界期開始前の野生型マウスのように、多くの受容体が存在していた。生後1ヶ月で臨界期が見られない、暗闇で飼育した野生型マウスは、臨界期中のマウスより受容体の数が少なくなっていたことから、GAD65欠損変異型マウスを暗闇飼育した時の、受容体の数の変化を調べてみた。細胞体のGABA_A受容体の数は、多くもなく少なくもない“中間値”で、臨界期中のマウスにおける細胞体のGABA_A受容体の数に近い値を示した。図の赤いラインの付近に、細胞体でのGABA_A受容体が存在することが、臨界期開始の鍵を握っていることがわかった。

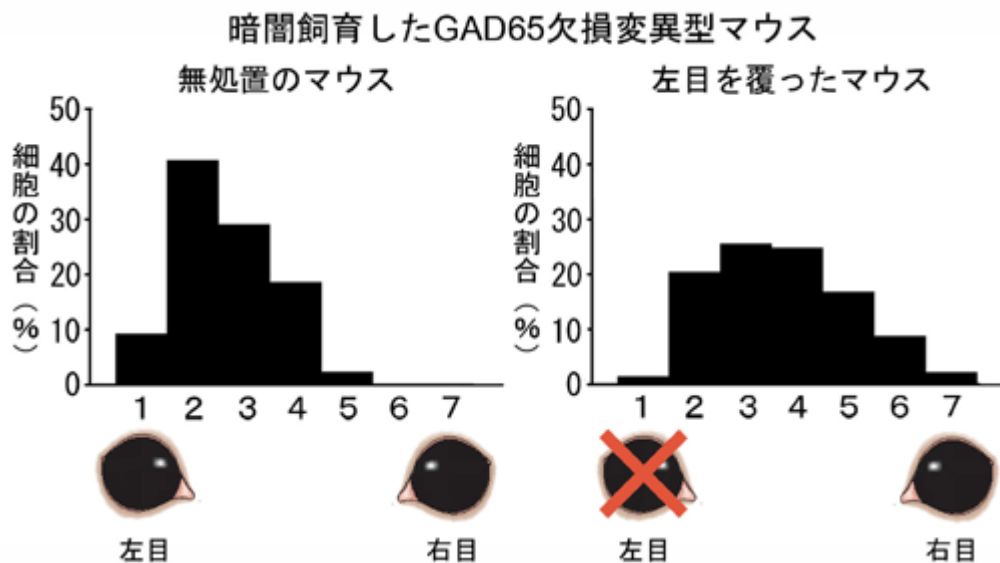


図6 GAD65 欠損変異型マウスの暗闇飼育による臨界期正常化

暗闇飼育した GAD65 欠損変異型マウスが、普通に臨界期を開始しているか（図5の「？」）を調べた。

左図：GAD65 欠損変異型マウスでも、無処置の場合、左目からの視覚入力に多くの細胞が反応する。

右図：4日間の左目の遮蔽により、右目の方からの視覚入力に反応する細胞が多くなったことで、ヒストグラムが右側にシフトした。

つまり、GAD65 欠損変異型マウスが失っていた臨界期が、このマウスを暗闇飼育することで、正常に戻った。

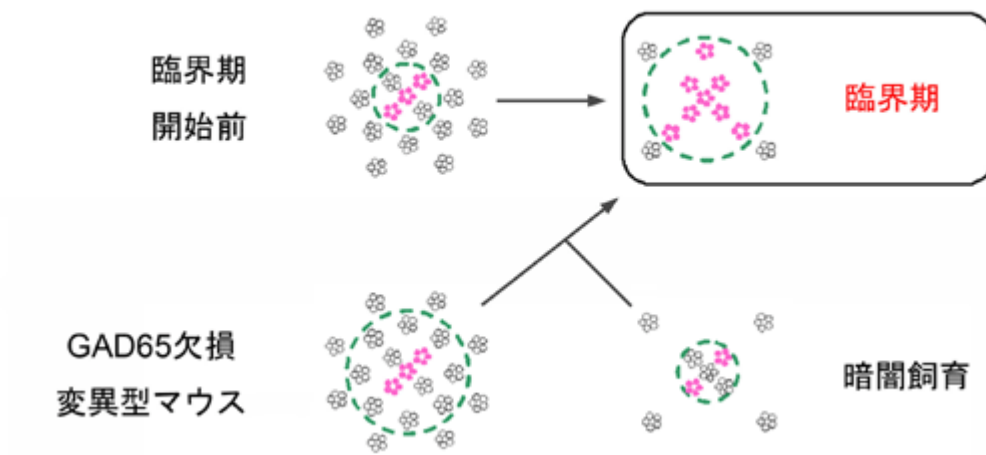


図7 本研究の結果から推測された、臨界期開始における受容体のダイナミックな変化

緑の点線の輪は、PV陽性細胞のシナプス前終末の大きさ、灰色が機能していないGABA_A受容体、ピンクが機能しているGABA_A受容体を表す。緑の点線の輪内に、ピンクの受容体が量的に満たされること、つまりPV陽性細胞からもたらされる抑制性情報GABAと情報を受け取るGABA_A受容体が量的質的に適合することが、臨界期に見られる神経回路網の再構築に重要な役割を果たしていると結論づけた。