

180. 発達期における経験依存的な神経回路維持の分子機構

宮田 麻理子

東京女子医科大学 医学部 生理学（第一）講座

Key words : 視覚経験, 外側膝状体, リモデリング, 網膜外側体シナプス, 維持機構

緒言

視覚視床である外側膝状体 (dLGN) には網膜膝状体シナプス (RG シナプス) が上行性線維として入力する。RG シナプスは生後発達期において3つの過程を経る。すなわち 1) 両眼から投射の分離 (第1期: 生後7日齢) 2) RG シナプス強化と不必要なシナプスの除去 (第2期: 生後7日から15日齢) そして3) 視覚依存的にそれが維持される過程 (第3期: 生後20日から30日齢) である¹⁾。第3期で視覚経験を遮断すると、第2期で強化されたシナプスが維持されず、既存のシナプスは弱体化し新たな RG シナプスが侵入するリモデリングが起きる。今まで、第1期~2期にかけての分子メカニズムは多く報告されたが、第3期の維持機構に関わる分子はほとんど明らかになっていなかった。本研究では我々は、マウス dLGN に高発現している代謝型グルタミン酸1型 (mGluR1) に着目し、mGluR1 が RG シナプスの経験依存的維持機構に極めて重要な役割を持つことを明らかにした²⁾。

方法

mGluR1 KO マウスの第3期の維持機構への関与について電気生理学的解析法を用いて証明した。以下に詳細を記す。

1. *mGluR1* KO マウスと野生型マウスにおいて通常飼育下でそれぞれの発達期で d LGN スライスを作製し、視神経を刺激し、投射細胞から RG シナプス EPSC を記録した。
2. 維持期の LGN 細胞は、2~3本の軸索で支配されているので、視神経を刺激すると通常は数本のステップ状 EPSC が記録でき、さらに paired-pulse depression を示すことで容易に他のシナプスと区別ができる。維持機構が破綻し、dLGN 細胞が再多重支配をしている場合は、刺激強度を強めてゆくと、支配線維数に応じて多数の step 状に EPSC が観察される。これらを解析することにより、支配様式を明らかにした (ステップカウンティング法)³⁾。
3. 単なる支配様式の解析のみでなく、ストロンチウムを用いたシナプスの素量解析、シナプス電流のキネティクスおよび、AMPA 受容体電流/NMDA 受容体電流比など詳細な解析を行い、再多重化支配様式の変化に加えて RG シナプスの機能的実態を明らかにし、結果 dLGN 細胞の投射機能にどのような影響を与えるのかを調べた。

1~3の実験から mGluR1 の維持機構への関与を明らかにした。さらに、これらが経験依存的か否かを証明するため、暗室飼育下で KO マウスを飼育する実験も行った。さらに、正常動物の LGN にポンプを入れることで mGluR1 を活性化し、P20 以降に暗室飼育下で飼育することで、維持機構が回復するかを調べた。また、上記実験に組み合わせ、ウイルスベクター薬剤による、視床 mGluR1 の賦活化、不活性化を行った。

結果および考察

1. dLGNにおける mGluR1 量は開眼後に増加する

まず、発達の各時期で mGluR1 のタンパク発現解析を行った。成熟後（生後 20 日、30 日）の dLGN では mGluR1 が開眼前に比べて多く発現しているのに対し、開眼前の生後 10 日では発現が低かった。mGluR1 の発現は開眼後の生後 15 日から網膜-dLGN シナプスが成熟する生後 20 日にかけて急激に増加し、その後一定することが明らかになった。

2. *mGluR1* KO マウスでは、RG シナプスは正常なシナプス除去のあと、再び幼若型の複数の線維で支配されるようになる

次に、発達期における mGluR1 の機能を明らかにするため、*mGluR1* KO マウスの dLGN ニューロンから、スライスパッチクランプ法を用いて視索刺激により誘発される網膜神経節細胞シナプス線維由来の興奮性シナプス後電流 (EPSC) を記録した。RG シナプスは放出確率の高いシナプスであるため、網膜由来線維の EPSC は全か無かの法則で出現する。複数の線維が投射している場合、視索刺激の強度を徐々に上げると、EPSC の振幅がステップ状に増加する。ステップの数を数えることにより、ひとつの dLGN ニューロンに投射する軸索の数を EPSC のステップ数として概算することが可能である。

発達の各時期で RG シナプスの EPSC を記録すると、野生型マウスと *mGluR1* KO マウスともに、開眼前（生後 9～12 日齢）では刺激強度を上げると EPSC の振幅がステップ状に増大し、dLGN ニューロンが RG 線維 6 本以上で支配されていることが示唆された。単一ニューロンあたりの入力線維の数はシナプス除去により発達とともに減少し、生後 22～24 日齢では 70% 以上のニューロンで 5 本以下となった。また成熟後は単一の入力線維あたりの EPSC の振幅が増大し、シナプスが強化されていることが示唆された、つまり *mGluR1* KO マウスにおいても、RG シナプスの形成、強化および除去は正常であった。

一方、生後 28 日以降では、野生型マウスの dLGN ニューロンの約 80% が 5 本以下の線維から入力を受けるのに対し、*mGluR1* KO マウスでは再び入力線維の数が増加し、約 60% の dLGN ニューロンが 6 本以上の RG 線維に支配されていた。また *mGluR1* KO マウスでは単一線維あたりの EPSC の振幅が、野生型マウスおよび生後 22～24 日齢グループと比較して減少していた。つまり *mGluR1* KO マウスでは RG シナプスが正常に発達した後、生後 28 日以降で幼若型に退行しており、mGluR1 が成熟型の RG シナプスの維持に関わる可能性が示唆された。

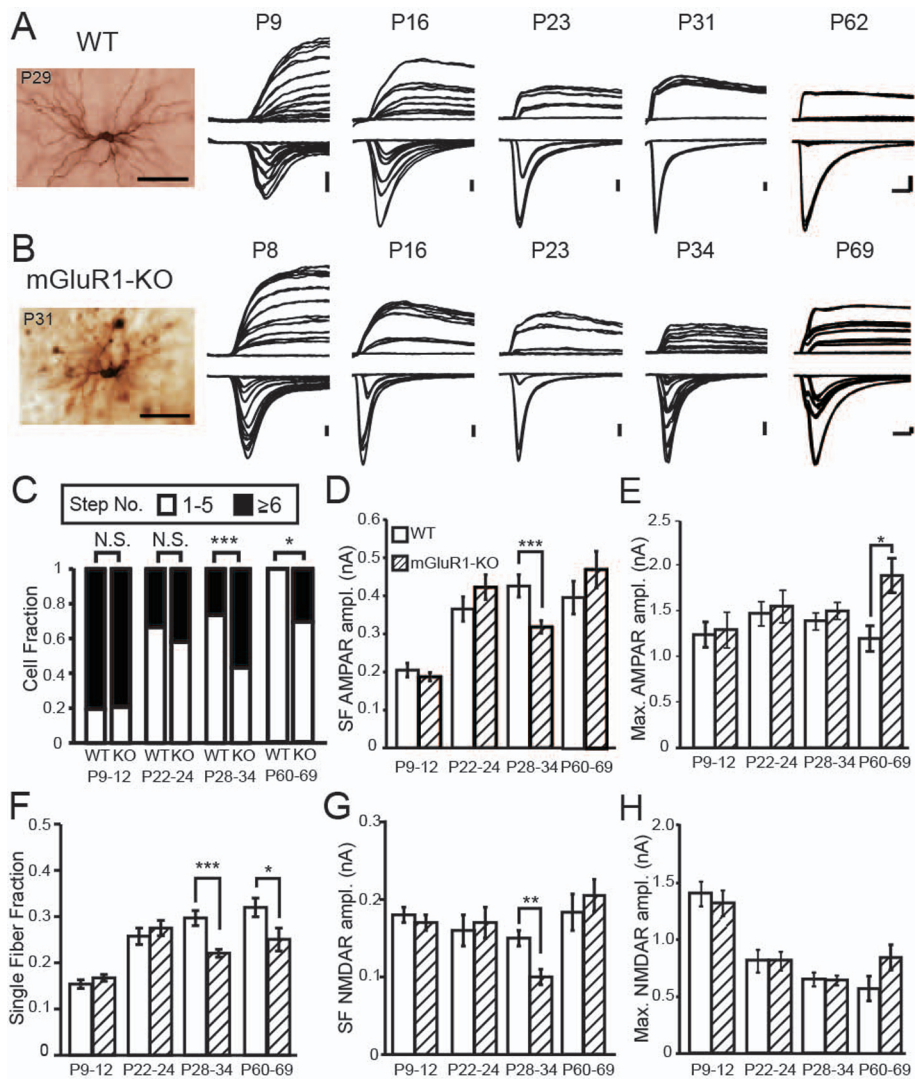


図 1. *mGluR1* KO マウスの発達過程における RG シナプスのリモデリング

A : WT、B : *mGluR1* KO マウスの例。左の写真は記録した細胞像。右側は各発達段階における dLGN 細胞への RG シナプスの EPSC の電流変化を示す。EPSC のステップ数により入力本数の変化が概算できる。

C : EPSC のステップ数 (支配本数) での細胞分布。6 本以上に支配される細胞が KO では発達期後期 (維持期) に再び増える。

D、E : 一本線維あたりの AMPA 受容体を介したシナプス電流とすべての線維が刺激された場合の電流最大値。

G、H : NMDA 受容体を介した EPSC 値。D、E と同様に示す。

F : 一本あたりの電流値が最大電流値に占める割合。

3. *mGluR1* KO と視覚経験遮断の効果は相殺する

次に、*mGluR1* が視覚経験依存的な RG シナプスの維持に関わるかを調べるため、*mGluR1* KO マウスの暗室飼育を行った。野生型マウスでは過去の報告のとおり (4.5)、生後 21 日から一週間の暗室飼育で RG シナプスが幼若型支配様式に退行した。一方、*mGluR1* KO マウスでは通常飼育時にも生後 28 日齢以降で RG シナプスの幼若型への退行がみられ、生後 21 日から暗室飼育を行っても明室飼育と変化がなかった。このことから、*mGluR1* の欠損と視覚経験の遮

断は相殺 (occlude) されたと考えられ、mGluR1 が視覚経験依存的なシナプスの維持に関わる分子であることが示唆された。

4. 生後 21 日以降の dLGN における mGluR1 活性化が成熟型シナプス維持に必要である

mGluR1 の活動部位と時期を明らかにするため、dLGN および発達の時期特異的な mGluR1 の薬理的阻害および shRNA による発現抑制を行った。

まず、生後 21 日齢から 7~10 日間、浸透圧ポンプを用いて dLGN に mGluR1 の阻害薬である CPCCOEt を投与し、生後 28 日齢以降で RG シナプスの性質を解析した。その結果、dLGN の mGluR1 を阻害することで入力線維数の増加と単一線維あたりの EPSC 振幅の減少が起こり、幼若型結合への退行が誘導された。

さらに、生後 14 日齢からウイルスベクターを用いて mGluR1 の miRNA を dLGN ニューロンに導入し、mGluR1 を欠損させると、薬理的阻害と同様に幼若型結合への退行がみられた。一方、近傍の mGluR1 陽性細胞では成熟型結合が維持されていた。

また、*mGluR1* KO マウスの dLGN で、生後 14 日齢からレンチウイルスベクターによる mGluR1 の強制発現を行うと、入力線維の数が野生型と同等程度に回復しており、成熟型結合が維持されていた。

以上の結果より、dLGN ニューロンの mGluR1 が成熟型の RG シナプス維持に重要であることが示された。

5. mGluR1 は視覚経験依存的な成熟型 RG シナプス維持に関わる

3 および 4 の実験より、dLGN の mGluR1 が視覚経験依存的なシナプスの維持に関わる可能性が示唆されたため、暗室飼育中に dLGN の mGluR1 を活性化する実験を行った。浸透圧ポンプを用いて mGluR1 の賦活薬である DHPG および Ro 67-4853 の混合溶液を投与する手術を行ったマウスを 7~10 日間暗室で飼育し、生後 28 日齢以降で解析を行った。その結果、mGluR1 活性化により視覚経験を遮断した状態でも成熟型結合が維持されていた。したがって、dLGN の mGluR1 がシナプスの視覚経験依存的な維持機構に中心的な役割を果たす分子であることが示された。

6. mGluR1 は大皮質視床路シナプス後部に多く発現する

過去の知見から、mGluR1 活性化による遅い脱分極電位は大脳皮質由来の入力線維を高頻度刺激したときのみ誘発されるため、mGluR1 は主に大脳皮質の神経活動を dLGN に伝える分子として知られていた。そこで、dLGN における mGluR1 の発現を単一シナプスレベルで解析するため、電子顕微鏡による免疫組織化学的染色の解析と三次元再構成を行った。その結果、mGluR1 は大脳皮質-dLGN シナプス (皮質視床路シナプス) および RG シナプス後部にも発現しているが、皮質視床路シナプス後部に約 2 倍高い密度で集積していることが明らかとなり、大脳皮質由来入力が異シナプス性に RG の成熟型神経回路の維持に関わる可能性が示唆された。

共同研究者

共同研究者は東京女子医科大学医学部第一生理の鳴島円准講師、矢ヶ崎有希助教、南雲康行助教 (研究当時)、北海道大学大学院医学研究科解剖発生の内ヶ島基政助教、渡辺雅彦教授、東京大学大学院医学系研究科附属疾患生命工学センターの原田武志助教 (研究当時)、饗場篤、広島大学大学院医歯薬保健学研究科神経生理学の橋本浩一教授、東京大学大学院医学研究科神経生理上阪直史助教、狩野方伸教授である。

文 献

- 1) Contributions of receptor desensitization and saturation to plasticity at the retinogeniculate synapse. Chen C, Blitz DM, Regehr WG. *Neuron*. 2002 Feb 28;33(5):779-88. PMID: 11879654
- 2) The Metabotropic Glutamate Receptor Subtype 1 Mediates Experience-Dependent Maintenance of Mature Synaptic Connectivity in the Visual Thalamus. Narushima M, Uchigashima M, Yagasaki Y, Harada T, Nagumo Y, Uesaka N, Hashimoto K, Aiba A, Watanabe M, Miyata M, Kano M. *Neuron*. 2016 Sep 7;91(5):1097-109. 2016 Aug 18. PMID: 27545713
- 3) Miyata M, Imoto K. Different composition of glutamate receptors in corticothalamic and lemniscal synaptic responses and their roles in the firing responses of ventrobasal thalamic neurons in juvenile mice. *J Physiol*. 2006 Aug 15;575(Pt 1):161-74. PMID: 16777934.
- 4) Distinct roles for spontaneous and visual activity in remodeling of the retinogeniculate synapse. Hooks BM, Chen C. *Neuron*. 2006 Oct 19;52(2):281-91. PMID: 17046691

- 5) Vision triggers an experience-dependent sensitive period at the retinogeniculate synapse. Hooks BM, Chen CJ *J Neurosci*. 2008 Apr 30;28(18):4807-17. JNEUROSCI.4667-07.2008. PMID: 18448657