

視覚経験による回路形成と分子基盤の解明

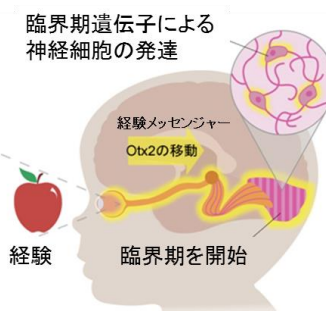
新潟大学大学院医歯学総合研究科神経発達学

杉山 清佳

1、背景

人々の経験則として古くから伝えられる「3つ子の魂100まで」のことわざは、脳の成長では現実の現象として注目されている。外国語やスポーツ、音楽といった習い事は、大人より子どもの上達が早いことを実感した方も多いはず。それは、子どもの脳には経験を柔軟に吸収し、神経回路を機能的にする特別な時期（臨界期）があるためと考えられている。それでは、なぜ臨界期は子どもの脳だけに現れ、大人の脳には現れないのであろうか。長い間、臨界期には記憶・学習と同じメカニズムが働くと考えられ、神経生理学からの観点で主に研究が行われてきた。さらに、記憶・学習の研究蓄積から、回路網の可塑的变化はシナプスの伝達効率や形態の変化に起因すると考えられ、転写・翻訳の必要性が論じられながらも、未だ解明された分子は数少ない。

これまでに申請者は、胎児の脳を作るホメオ蛋白質Otx2が、生後の臨界期を活性化することを見出した (Cell, 2008, J. Neurosci. 2012)。マウスの脳においてOtx2蛋白質の量を増減させると、視覚の臨界期を人為的に操作できる（大人の脳に臨界期を再活性化することも可能である）。Otx2は転写因子であるにも関わらず、視覚経験に依存して目から大脳視覚野の抑制性介在ニューロン（PV細胞）へと運ばれ、PV細胞の機能を促進するというユニークな性質を持つ (Cell, 2008, Sci. Rep. 2017)。ゲノム上でOtx2の標的遺伝子を網羅的に探索すると、精神疾患に関わる遺伝子群が同定され、PV細胞の機能不全が精神疾患の一因になることと一致した (Front. Neurosci. 2017)。さらに申請者は、Otx2が転写と翻訳の両面から標的遺伝子の発現を制御すると推測している (Sci. Rep. 2017)。実際に、ヒトのOtx2変異では言語・睡眠・摂食に関する発達障害（自閉症）が報告され、このホメオ蛋白質が、経験を回路に伝えるメッセンジャーとして回路の成長期に寄与することが伺える (Dev. Growth Differ, 2018)。そこで本研究では、発達障害などの精神疾患に深く関わる時期として臨界期を捉え、分子基盤を紐解く。



2、目的

臨界期は、経験を吸収して脳の機能を獲得する回路の成長期であり、現在では、記憶・学習とは一線を画する、生涯に一度の特別な時期と捉えられている。加えて、臨界期の偏った経験は、例えば、片目に眼帯をすると視力が衰える（弱視）など、思わぬ疾患を引き起こす。臨界期はヒトの脳において顕著であるが、視覚の臨界期のメカニズムはマウスによる研究が可能である（眼科, 2019）。さらに申請者は、視覚以外の機能解析も進めており、発見した臨界期の分子基盤は、情動発達など、発達障害を念頭に他の脳領域の回路形成に広げて検証できる（新潟医学雑誌, 2018）。

臨界期を制御する転写・翻訳因子は、未だ申請者らが明らかにしたOtx2以外に報告がない。申請者は、Otx2が経験に応じて運ばれることにより、標的遺伝子（GABA合成酵素、細胞外基質因子など）を発現誘導して、PV細胞の機能発達を促すことを示してきた (Neurochem Int. 2018)。さらに本研究では、Otx2を新たな翻訳制御因子の一部と捉え、翻訳における役割を明らかにする。Otx2は転写と同様に、特定の遺伝子の翻訳を制御することが期待される (Sci. Rep. 2017)。ホメオ蛋白質は培養細胞において翻訳を促すことが示唆されているが、生体内における報告はなく、世界的にも先行研究となる。生後の経験に依存した翻訳の活性化と、翻訳の活性化による臨界期の制御メカニズムを明らかにする。

3、方法

Otx2は転写因子として良く知られるが、本研究では、mRNAから蛋白質を生成する、新規の翻訳因子として注目する。これまでに申請者らは、大脳においてOtx2が翻訳開始因子eIF4Eと結合し、標的mRNAの翻訳に関与することを示唆した (Sci. Rep. 2017)。次世代シーケンス解析によりOtx2-eIF4E複合体の標的mRNAを網羅的に探索すると、Otx2-eIF4E複合体に結合する標的mRNAには、eIF4Eリン酸化因子やmTORが含まれることが分かった。すなわち、Otx2は翻訳開始因子と結合するだけでなく、積極的に翻訳を活性化することが推測された。さらに、標的mRNAには、自閉症リスク因子である細胞骨格形成因子が多く同定され、中でも、以前に申請者らが報告した新規のアクチン重合因子Coactosin (Dev. Biol. 2013) が、Otx2による翻訳制御を顕著に受けることが分かった。

そこで、臨界期における翻訳制御の必要性を明らかにするために、Coactosinに注目した。PV細胞特異

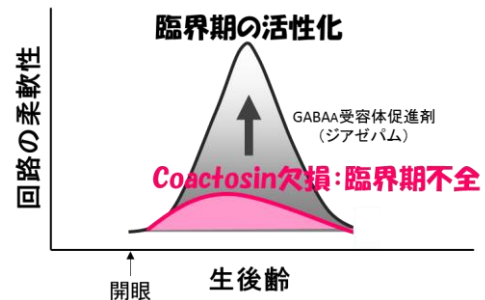
的なCoactosin欠損マウスを作成し（共同研究：新潟大学、崎村建司教授）、抑制性ニューロンの形態形成と、臨界期における視覚機能の発達を解析した。抑制性ニューロンの細胞形態は、子宮内遺伝子導入法によりGFPを発現させて可視化し、NeuroLucidaソフトウェアを用いてトレース解析を行い、数値化した。また、視覚機能は、視覚刺激に対する神経細胞応答（視覚誘発電位）を電気生理学的に記録し、解析を行った。臨界期に観察される回路の可塑性は、片眼遮蔽を4日間行った後、視力の低下（弱視）を記録することにより確認した。

4、結果

新規アクチン重合因子の臨界期遺伝子としての役割:

本研究において申請者らは、生後の経験により細胞特異的に翻訳を活性化される分子として、アクチン重合因子Coactosinに注目した。Coactosinは、申請者らによって初めて神経細胞における機能が解明された新規アクチン重合因子であり、これまでに生後の脳における報告はない。はじめに、免疫組織化学染色法により大脳視覚野におけるCoactosinの発現を検出すると、Coactosin蛋白質は、臨界期の開始とともに、視覚野のPV細胞に強く局在することが観察された（抗体の特異性は欠損マウスにより確認済みである）。さらに、視覚経験を遮断した暗所飼育マウスや、Otx2欠損マウスの視覚野では、PV細胞におけるCoactosin蛋白質の局在が有意に減少した。一方で、Coactosin mRNAは、視覚野の錐体細胞にも検出され、Otx2欠損マウスにおいても減少しなかった。すなわち、Coactosin mRNAは、Otx2-eIF4E複合体と結合することで、PV細胞特異的に翻訳誘導されると考えられた。Otx2は経験に依存してPV細胞に運ばれるため、視覚経験がこのアクチン重合因子の翻訳に必要である。

これまでの報告から、Coactosin蛋白質が減少する暗所飼育マウスや、Otx2欠損マウスの視覚野では、臨界期不全が観察される。そこで、PV細胞特異的なCoactosin欠損マウス（Cot11-flox/PV-cre）を用いて、臨界期におけるCoactosinの作用を解析した。その結果、この欠損マウスでは片目を遮蔽しても視力が低下（弱視）せず、臨界期に顕著に見られる、経験による回路の再形成が観察されなかった。この際、抑制性ニューロンの機能を高める薬剤（GABA_A受容体促進剤、ジアゼパム）を脳室投与すると、Coactosin欠損マウスの臨界期が回復した。すなわち、PV細胞の抑制性機能の減弱が、この欠損マウスの臨界期不全の主な原因であると考えられた。これらの結果から、CoactosinはOtx2とともに臨界期に必要な「臨界期遺伝子」として機能すること、さらに、生後の経験による臨界期遺伝子の翻訳制御が、PV細胞の機能発達と臨界期の活性化に必要であることが示唆された（投稿準備中）。

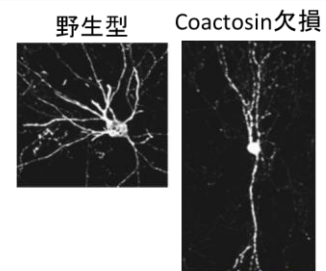


生後の抑制性ニューロンの分化決定（形態形成）因子の発見:

PV細胞を含め、抑制性ニューロンは形態・機能的な特徴から十種類以上あり、特性に合わせて大脳皮質の情報処理を分担する。一方で、細胞種の運命がどのように決定されるのかには未だ不明な点が多い。近年、抑制性ニューロンが生後の神経活動依存的に細胞死を起こすなど、回路への組み込まれ方によって成熟が左右されることが示唆されている。前述のように、Otx2が、視覚経験依存的にPV細胞の成熟を促すのも1つの良い例である。さらに、抑制性ニューロンの多様な細胞種のすべてが、胎生期に運命を決定されているのか、疑問が呈され始めている。もし、個体の経験の違いによって抑制性ニューロンの細胞運命に変化が起きるのであれば、様々な大脳皮質の情報処理に影響が及ぶと考えられる。

Coactosinは、新規の細胞骨格因子であり、経験依存的にPV細胞に発現誘導される。そこで、Coactosinが、PV細胞の形態形成因子として機能するのか解析を行った。抑制性ニューロンの細胞形態は、子宮内遺伝子導入法によりGFPを発現させ、細胞形態をトレース解析することにより明らかにした。Coactosin欠損マウスにおいて抑制性ニューロンの樹状突起形態を観察すると、PV細胞の樹状突起の本数および分枝が有意に少なくなることが分かった。さらに、樹状突起の分布を極座標ヒストグラムで表し、細胞間でクラスタリング解析を行うと、6割以上のPV細胞の形態特性（多極性の樹状突起）が、他の抑制性ニューロン（VIP/ Calretinin(CR)細胞）の形態特性（双極性の樹状突起）に転換するのが観察された。逆に、Coactosinを強制発現したVIP/CR細胞の樹状突起は、本数と分枝を増やし、PV細胞様の多極性形態へと変化した。この際、Coactosinは樹状突起の基部に局在してアクチン重合を促し、多極性形態を積極的に誘導することが示唆された。一連の結果から、Coactosinは、臨界期を活性化するために必要な「臨界期遺伝子」であると同時に、生後のPV細胞の分化方向を決定する形態形成因子であることが分かった。視覚経験を遮断した暗所飼育マウスにおいて、Coactosinの量は著しく減少する。すなわち、PV細胞が多極性形態を獲得して発達するためには、視覚経験が必要であると考えられた。この結果は、抑制性ニューロンの最終的な形態分化が神経活動によって決定されることを示唆する、初めての成果と考えられる（投稿準備中）。

Coactosin欠損により PV細胞がCR細胞の特徴に転換



PV細胞特徴 CR細胞特徴

多極性 約6割 → 双極性

低い 入力抵抗 → 高い 入力抵抗 (弱い入力でも発火)

高頻度発火は変化せず

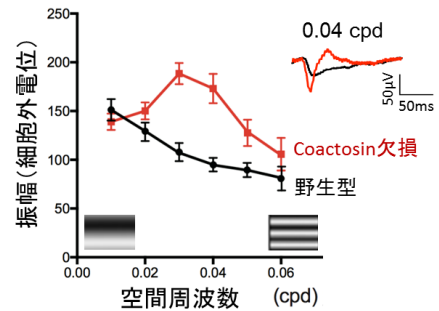
形態形成因子の欠損と情報処理の異常：

抑制性ニューロンの形態と機能の特性は、細胞種を判別する最終的な指標となる。一方で、形態と機能がどのように影響しあうのか不明な点も多い。今回、Coactosinを欠損したPV細胞の半分以上が、多極性ではなく双極性の樹状突起を有した。生理学的特性をwhole-cellパッチクランプ法により記録すると、双極性形態を示すPV細胞では入力抵抗が有意に高く、より少ない興奮性入力で発火すると推測された(共同研究：自然科学機構、川口泰雄教授)。この際、高頻度発火 (FS) も観察されており、双極性PV細胞がPV細胞の機能特性 (FS) と、VIP/CR双極性細胞の特性 (高い入力抵抗) を併せもつと考えられた。

生後に生じた抑制性ニューロンの特性変化は、視覚の情報処理にどのような影響を与えるのであろうか。PV細胞は、視床からの入力を受けて臨界期の皮質回路の形成を誘導する。一方、VIP/CR細胞は臨界期には関与せず、むしろ抑制性ニューロンを局所的 (~120µm) に抑制して、空間解像度を向上させることが報告されている。本研究の解析から、Coactosin欠損マウスでは、予想と一致して、弱視の臨界期が誘導されず、視覚応答と空間解像度が有意に向上することが分かった。さらに視覚誘発電位の波形から、第4層において逸早く視覚応答を抑制する機能 (feed-forward inhibition) が弱まる一方、遅い抑制機能 (feed-back inhibition) は強まる傾向が観察された。すなわち、PV細胞の特性の変化によって、双極性の抑制性ニューロンが増加し、臨界期だけでなく視覚の情報処理に広く影響が及ぶことが示唆された。一連の解析により、個体の経験の違いから、抑制性ニューロンの形態が変化し、臨界期および情報処理に差が生じることが示唆された (投稿準備中)。

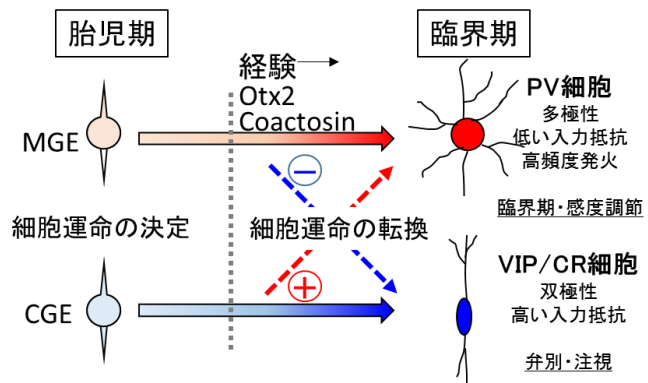
CR様細胞による空間解像度の向上

視覚刺激に対する優位な応答



5、考察

本研究において申請者らは、経験依存的に翻訳発現誘導される新規の細胞骨格因子が、抑制性ニューロンの分化方向を最終的に決定し、視覚の情報処理 (臨界期と空間解像度) に作用することを明らかにした。近年、胎生期における抑制性ニューロンの運命決定に疑問が生じる一方、生後に運命が転換したという報告はない。この点で、Coactosin欠損によるPV細胞の分化方向の転換は、国内外に大きなインパクトを与えると予想される。さらに、PV細胞は、産生・形態・機能・分子の視点から双極性細胞 (VIP/CR細胞) とは対極の性質を持つと考えられている。それにも関わらず、申請者らの解析から生後にPV細胞とVIP/CR細胞の特性が交じり合い、分化方向の交錯が可能であることが分かった。現在公開されている、自閉症リスク因子 (SFARI: Simons Foundation Autism Research Initiative) には多くの翻訳制御因子が含まれるが、作用機序には不明な点が多い。さらに、近年のRNA修飾 (エピトランスクリプトーム) の報告を考慮すると、神経細胞の分化・発達を制御する新たな分子基盤として、神経活動依存的な翻訳の制御メカニズムに注目することが重要と考えられる。



個体の経験の違いによって抑制性ニューロンの分化方向に変化が起きるのであれば、様々な大脳皮質の情報処理、例えば、自閉症で見られるような感覚過敏 (ボトムアップ型)、視覚優位や感覚統合不全 (トップダウン型) に影響を与えることが推測される。実際、多極性のPV細胞はボトムアップ型の伝達経路を強く抑制することができ、双極性のVIP/CR細胞はトップダウン型の情報処理に関与することが示唆されている。すなわち、経験の違いによる抑制性ニューロンの分化方向の変化は、臨界期における大脳の回路形成と情報処理に大きな影響を与えると推測される。今後、経験による抑制性ニューロンの形態形成機構の詳細と、個々の抑制性ニューロンが必要とされる場面が明らかになれば、発達障害などの疾患に対する創薬 (形態形成因子の促進剤など) と、強化学習の提唱につながると期待される。

6、文献 (申請者が著者に含まれるもの)

杉山ら、眼科 61, 63-69. (2019)
 Sakai et al. *Dev. Growth Differ.* 8, 473-482. (2018)
 Igarashi et al. *Neurochem Int.* 119, 77-83. (2018)
 飯島友也ら、新潟医学会雑誌 第132巻 第2号 (2018)
 Hou et al. *Sci Rep.* 7:12646. (2017)
 Sakai et al. *Front Neurosci.* 11:307. (2017)
 Hou et al. *Dev. Biol.* 379, 53-63. (2013)
 Beurdeley et al. *J. Neurosci.* 32, 9429-9437. (2012)
 Sugiyama et al. *Cell* 134, 508-520. (2008)