

(論文内容の要旨)

哺乳類の脳は発達過程において複雑かつ正確な神経回路を形成する。脳・神経系の回路形成過程は、遺伝的プログラム依存的に大まかな回路が形成される初期と、神経活動依存的に回路の再構成・維持が起こる後期に分けられる。しかし神経回路形成のどこまでが遺伝的に決定されており、どこから神経活動依存的に変化し得るのかについては、いまだ不明な点が多い。本研究ではこれを明らかにするためのモデルとして、脳梁線維の投射パターン形成機構に着目した。脳梁線維は、左右の大腦半球を領域特異的かつ層特異的につなぐ脳における最も太い神経線維束であり、高次精神活動等に関わる。本研究で対象とした大腦皮質視覚野の脳梁投射細胞は、反対側皮質視覚野の皮質 1～3 層と 5 層へ正確な軸索投射を行うことが知られている。

胎仔期のマウス大腦皮質の神経細胞内に 蛍光タンパク質 GFP 発現ベクターを電気穿孔法により遺伝子導入することで脳梁線維を可視化した。発達過程の解析から、脳梁線維が生後 15 日齢までにほぼ成体型の投射パターンを形成することを明らかにした。さらに、その過程が生後 5 日齢までの標的領域に軸索を伸長する時期、生後 10 日齢までの標的層へ到達し軸索分枝を形成し始める時期、生後 15 日齢までの標的層で多くの軸索分枝を形成する時期、を経る多段階的なものであることを示した。また、マウス幼仔の大腦皮質に GFP 発現ベクターを局所注入し電気穿孔法を行うことで脳梁単一軸索を可視化する手法を確立し、脳梁単一軸索の形態形成過程も明らかにした。

次に上記の脳梁線維可視化法を用い、神経活動が脳梁線維形成過程のどの段階に関与するかを検討した。カリウムチャネルの一つである Kir2.1 (inward rectifier potassium channel 2.1) を大腦皮質細胞に過剰発現させると、大腦皮質細胞の神経活動が抑制されることを見出した。脳梁線維を投射する神経細胞の活動電位発生頻度を抑えると、脳梁投射細胞の細胞移動・運命決定・脳梁軸索の標的領域への伸長には大きな影響を与えなかったが、脳梁軸索の皮質 1～3 層への終末分枝形成が阻害されることが明らかになった。Kir2.1 を発現した脳梁線維投射細胞軸索の投射パターンの変化は、生後 10 日齢にはすでに起きていた。また、生後 9 日齢において一本ごとの脳梁軸索の形態を解析したところ、神経活動を抑制された細胞の軸索は、皮質侵入後の伸長が阻害されていた。これらの結果は、脳梁投射細胞の神経活動が脳梁軸索の伸長過程に関与することを示唆している。

次に脳梁軸索の投射を受ける細胞の神経活動の関与を検討した。脳梁軸索の投射を受ける反対側皮質 2/3 層細胞に Kir2.1 を発現させると、生後 9 日齢では軸索形態に変化が見られなかったが、生後 15 日齢では標的層での軸索分枝が抑えられていた。この結果は、投射を受ける細胞の神経活動は、脳梁軸索の伸長には関与しないが、終末分枝形成に必要であることを示している。

以上の研究により、脳梁投射パターン形成が多段階的であり、その形成過程に脳梁軸索を投射する神経細胞と投射を受ける神経細胞両者の神経活動が関与することが明らかになった。

(論文審査の結果の要旨)

哺乳類の脳は複雑かつ正確な神経回路を形成する。脳・神経系の回路形成過程は、遺伝的に決定されたメカニズムにより大まかな回路が形成される初期と、感覚受容等による神経活動依存的な回路の再構成・維持が起こる後期に分けられる。しかしながら、神経回路形成のどの過程が神経活動依存的に変化し得るかについては、明らかにしていない。

本研究では、脳梁線維の投射パターン形成機構をモデルとして、神経回路形成のどの段階が神経活動依存的に変化し得るかを解明することを目指した。胎仔期のマウス大脳皮質の神経細胞内に、蛍光タンパク質である GFP の発現ベクターを電気穿孔法により遺伝子導入することで、脳梁線維を可視化した。そして、脳梁線維が生後 15 日齢までにほぼ成体型の投射パターンを形成することを明らかにした。さらに、その過程が生後 5 日齢までの標的領域に軸索を伸長する時期、生後 10 日齢までの標的層へ到達し軸索分枝を形成し始める時期、生後 15 日齢までの標的層で多くの軸索分枝を形成する時期、を経ることを示した。また、マウス幼仔の大脳皮質に GFP 発現ベクターを局所注入し電気穿孔法を行うことで、脳梁単一軸索を可視化する手法を確立し、脳梁単一軸索の形態形成過程も明らかにした。

次に、脳梁投射細胞の神経活動が脳梁線維形成過程のどの段階に関与するかを検討した。カリウムチャネルの一つである Kir2.1 を大脳皮質細胞に過剰発現させることにより、脳梁投射細胞の神経活動を抑制した。神経活動抑制は、脳梁投射細胞の移動・運命決定・軸索の標的領域への伸長には大きな影響を与えなかったが、軸索の皮質 1~3 層への終末分枝形成を阻害した。生後 9 日齢において、神経活動を抑制された細胞の軸索では、皮質侵入後の伸長が阻害されていた。これらの結果から、脳梁投射細胞の神経活動が自身の軸索伸長過程に関与することが判明した。

脳梁軸索の投射を受ける細胞の神経活動の脳梁線維形成過程への関与も検討した。脳梁軸索の投射を受ける反対側皮質 2/3 層細胞に Kir2.1 を発現させると、生後 9 日齢では脳梁軸索形態に変化が見られなかったが、生後 15 日齢では標的層での分枝が抑えられていた。この結果は、投射を受ける細胞の神経活動は、脳梁軸索の伸長には関与しないが、終末分枝形成に必要であることを示している。

本学位申請者水野秀信は、以上のように多くの脳梁軸索と個々の軸索の可視化方法を開発し、脳梁軸索形成過程を明らかにした。さらに、脳梁軸索を投射する神経細胞と投射を受ける神経細胞両者の神経活動が脳梁軸索形成に関与することを示した。これらの知見は、中枢神経系神経回路形成メカニズムの理解に貢献する重要な成果である。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。また、論文内容とそれに関連した事項について試問を行い、合格と認めた。