

学位論文

興奮性GABA入力により成体神経系前駆細胞は
脳回路に可塑性をもたらす

戸塚 祐介



THE UNIVERSITY OF TOKYO

東京大学
大学院新領域創成科学研究科
先端生命科学専攻
指導教官 久恒 辰博

目次

	ページ
序論	1-6
略語一覧	7-10
用語説明	11-23
第1章 興奮性 GABA 入力成体海馬神経系前駆細胞のニューロン分化を促進する	24
序論	25-30
実験方法	31-42
結果	43-72
考察	73-80
第2章 興奮性 GABA 入力成体大脳皮質神経系前駆細胞の BDNF 産生を促進する	81
序論	82-86
実験方法	87-92
結果	93-116
考察	117-126
結語	127
参考文献	128-159
謝辞	160-161

序論

考える組織、物事を記憶する組織、創造性を生み出す組織、そして人間性を生み出す組織、それが脳である。こうした脳の働きは、神経細胞（ニューロン）が互いにシナプスを介した複雑かつ精巧なネットワークを形成することによって発揮される生体超高次機能システムである。一般の臓器では、個々の細胞の機能を研究すれば、その臓器全体の機能がある程度理解できることが多いが、脳の場合、個々の細胞を研究し、その特性の詳細が解明できたとしても、それ自体で脳機能を明らかにできるわけではない。神経回路網としての機能を明らかにしなければならない。従って、単一細胞として解析するのではなく、どの細胞とどの細胞が機能的に連絡をしているか、そしてその連絡の意味する生理学的意義は何かというネットワークとして理解しなければ、脳の機能を明らかにすることは難しいと考えられる。

そして脳回路は経験によって変化する。子供のときに脳細胞の数や配置は遺伝情報によって全て決まる。胎生期の脳の発生過程において、神経系前駆細胞が何回分裂し、そして何個のニューロンを産生するか、また生まれたニューロンが適切な場所に移動していくことが全て遺伝情報内に組み込まれている。しかし機能的な脳回路として働くためには、生後初期における経験や環境の変化に応じたエピジェネティックな刺激による神経回路の活動が重要である。発達期における外界からの十分な刺激が入らないと十分な神経回路の形成は行われぬ。このようなダイナミックな神経回路形成が行われることで、機能的な神経回路が完成する。この経験による脳の変化は子供の時期に限らず、大人になってからでも起きている。何か物事を覚える前と覚えた後では、確実に脳回路に変化が生じているはずである。また、話せなかったことが話せるようになる、聞き取れなかったことが聞き取れるようになる。動かせなかった指先が器用に動かせるようになるなど、大人になってからでも経験や訓練によっていくらかでも脳回路は柔軟には鍛えることができる。成体脳における神経回路のダイナミクスおよび

可塑性は非常に興味深い現象である。

しかし、脳機能の中核であるニューロンは生後において産生されることはないと考えられて来た。また、成体脳においては、新たなシナプスの形成も起こらない固定化された回路であると考えられてきたため、成体脳における神経回路の可塑性は理解しがたい現象として捉えられてきた。また一度損傷をきたすと再生が難しいため、障害による神経回路の修復にも期待が寄せられてきた。しかし近年、成体脳においても新しいニューロンを生み出す母細胞である神経系前駆細胞の存在が脳のいたる領域において認められ、神経科学界にブレイクスルーをもたらした。そしてこれまでに、成体の脳内においてニューロンが新生している部位について精力的に研究が進められてきた。他の哺乳類（マウス、ラットやサル）では、海馬と側脳室周辺部から嗅球にかけての二つの限られた領域においてニューロンが新生している（図 1）。しかしヒトにおいては、現在のところ嗅球でのニューロン新生は確認されておらず、成体におけるニューロンの新生は海馬に限られている。このことは大人になってからでも、日々新たな神経回路が再編成されていること示しており、生涯に渡り脳は変化し続けていることを意味している。また障害を受けた領域における神経回路の修復を考えた場合、神経系細胞の持つ脳回路再生能力も魅力の一つであろう。興味深いことに、脳の活動により、神経系前駆細胞の増殖や分化が大きく左右され得ることもわかってきた。このことは、既存神経回路が神経系前駆細胞に直接的あるいは間接的に働きかけていることを示すものである。「成体脳におけるニューロン新生」が、「発達期におけるニューロン新生」と大きく異なる点は、成体脳内においては、既に神経回路が完成している点にある。これに対して、発達期では神経回路は発達途上にある。つまり成体脳におけるニューロン新生の特殊性は、周囲の既存神経回路によって神経系前駆細胞の増殖や分化、機能といったものが回路の活動によって強く制御され得る点にある。しかしこれまで、成体脳内における神経系前駆細胞はある種のグリア細胞ではないか

と議論されてきた。そのため、成体神経系前駆細胞と既存神経回路網がネットワーク内においてどのような機能的関わりをもっているのか、またその生理学的意義、神経回路の可塑性に及ぼす影響への理解に期待が持たれる。神経回路からの入力、神経系前駆細胞の分化や機能の調節にどのように関わっているかを解析することは、経験依存的な神経回路の可塑性の理解や、いかに脳の活動を高めることができるかということにもつながるであろう。また障害時における神経回路再生への新たな治療戦略につながるであろう。

本研究では、特に成体における脳の可塑性と深い関連のある海馬と大脳皮質に焦点を当てて解析を行った。海馬は記憶中枢であり、大脳皮質は認知、思考、運動の制御といった高次脳機能を司る領域である。これらの領域は、成体になってからでも経験刺激に応じた神経回路の再編成が盛んに行われている非常に可塑性に富んだ領域である。また神経系前駆細胞の存在も確認されている領域でもある。成体脳回路における可塑性がどのように生み出されているかを、神経系前駆細胞と既存神経回路網との機能的関わりという視点から明らかにしたいと考えた。そこで本研究では、(1)成体脳における神経系前駆細胞が既存神経回路網からどのような入力を受け取っているのかを明らかにし（神経系前駆細胞へのインプットを明らかにする）、(2)その入力に対して神経系前駆細胞がどのような反応（アウトプット）を示すのかを生理学的解析手法により明らかにすることを目的とした。

中間径フィラメントであるネスチンは神経系前駆細胞のマーカーとして知られており、このネスチン遺伝子プロモーター領域の第二イントロン部位に緑色蛍光タンパク質である GFP 遺伝子を組み込んだ *nestin-promoter-GFP* トランスジェニックマウス（以下 *nestin^P-GFP* マウス）を用いることで、急性脳スライス上での神経系前駆細胞を同定した（図 2）。そして神経ネットワークの解析に適した電気生理学的手法を導入し、神経系前駆細胞と既存神経回路網との機能的関わりを明らかにすることを目

指した。

本論文は2章から構成され、第1章では成体海馬における神経系前駆細胞と神経回路網との機能的関わりについて解析した。その結果、神経系前駆細胞は興奮性 GABA 入力を受け取っており、この興奮性シグナルが前駆細胞のニューロン分化を促すことが明らかとなった。第2章では、成体大脳皮質における神経系前駆細胞と神経回路との機能的関わりについて解析を行った。その結果、大脳皮質の神経系前駆細胞も興奮性 GABA 入力を受け取っていることが明らかとなった。この入力により、前駆細胞から BDNF の放出が促されることが明らかとなった。BDNF はシナプス伝達やシナプスの形成を促す神経回路の可塑性と非常に深い関連のある神経栄養因子である。成体脳において神経系前駆細胞は共に興奮性 GABA 入力を受け取っていることが示され、この興奮性 GABA 入力が神経系前駆細胞に働きかえることで、成体脳神経回路網に可塑性をもたらすと考えられる。

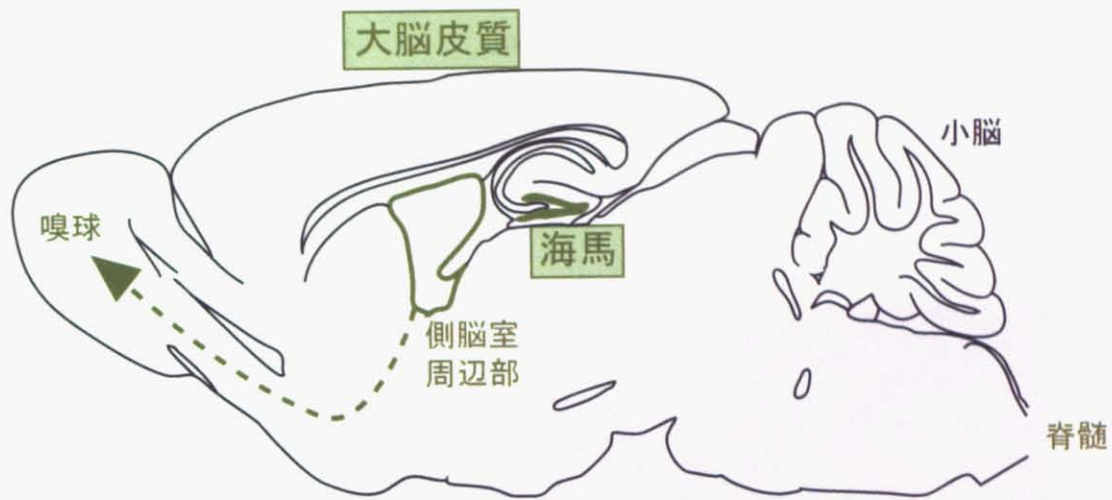


図1:成体脳における神経系前駆細胞の存在とニューロン新生部位

成体脳においてネスチン陽性神経系前駆細胞は、海馬歯状回、側脳室周辺部、大脳皮質、脊髄等に広く存在することが確認されている。しかし生体内においてニューロンの新生が認められている領域は、海馬歯状回と側脳室から嗅球にかけての2つの領域に限られる。本研究では、脳の可塑性と非常に関連の深い、海馬と大脳皮質における神経系前駆細胞と既存神経回路網との機能的関わりについて解析を行った。

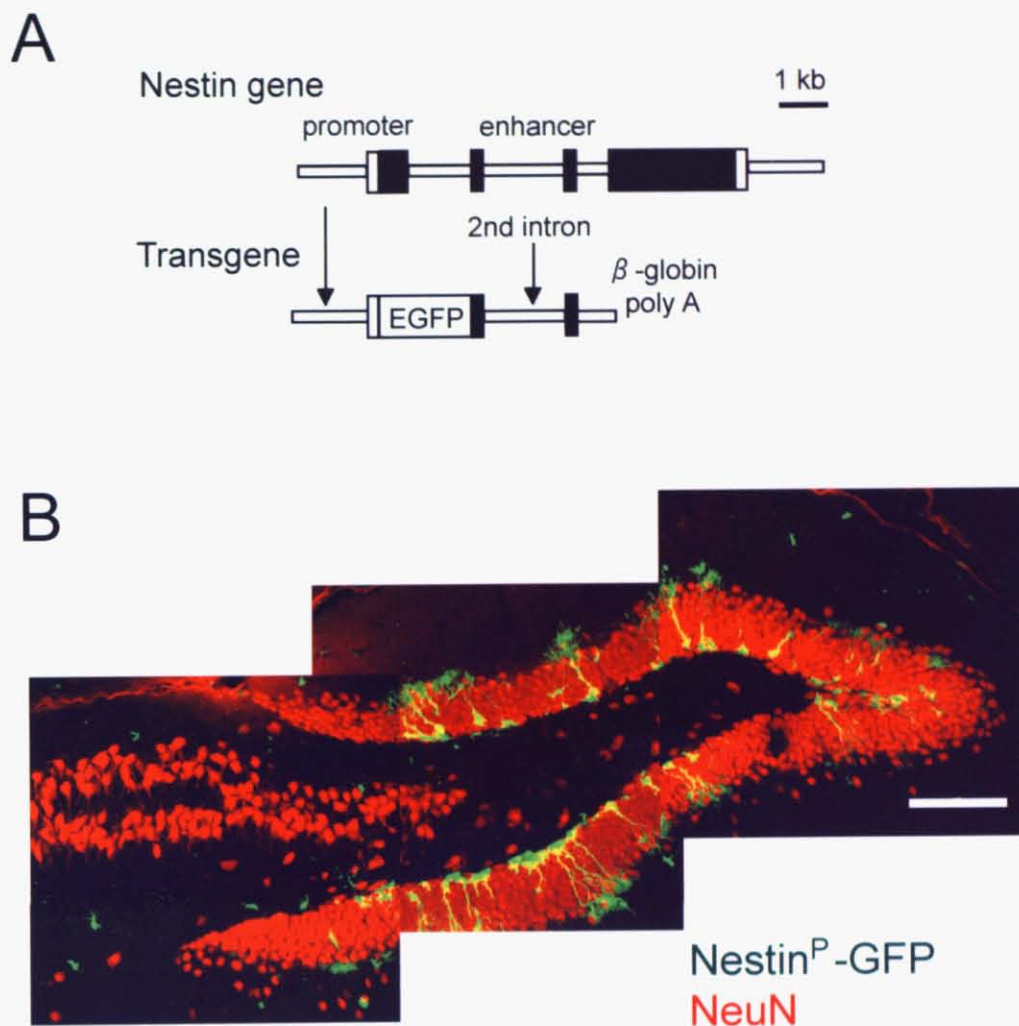


図2: Nestin^P-GFPトランスジェニックマウスの遺伝子構造と海馬歯状回。

(A) Nestin遺伝子プロモーター領域の第二イントロン部位にEGFPを組み込んだ融合遺伝子を導入したマウスである。Nestin遺伝子のプロモーター活性のある細胞においてGFPタンパクが発現する。

(B) 共焦点レーザー顕微鏡によるnestin^P-GFPマウスの海馬歯状回。顆粒細胞最内層において、ネスチン陽性の神経系前駆細胞が観察された。Scale bar: 100 μ m

略語一覧

本文中に出てくる略語について、その正式な名称および簡単な説明を以下に示す
(アルファベット順)。

- **ACSF** (artificial cerebro spinal fluid)

人工脳脊髄液。

- **AMPA** (alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazole-4-propionic acid) 受容体

AMPA 型グルタミン酸受容体。

- **BDNF** (brain-derived neurotrophic factor)

脳由来神経栄養因子。シナプス可塑性を高める他、ニューロンの保護作用や神経回路の再構築を促す神経栄養因子。

- **BrdU** (5-bromo-2'-deoxyuridine)

ブロモデオキシウリジン。チミジン類似物質で、細胞周期の S 期に核内に取り込まれる。分裂細胞及びその子孫細胞を標識できる。

- **BSA** (bovine serum albumin)

ウシ血清アルブミン。

- **CNQX** (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione)

AMPA 型グルタミン酸受容体阻害剤。

- **CREB** (cAMP response element-binding protein)

核内転写因子の一つ。

- **DMEM** (Dulbecco's modified Eagle's medium)

ダルベッコ改変イーグル培地。

- **ELISA** (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

試料中に含まれる抗体あるいは抗原の濃度を検出・定量する際に用いられる方法。

- **FBS** (fetal bovine serum)

ウシ胎仔血清。

- **4-AP** (4-amino pyridin)

カリウムチャンネル阻害剤。またシナプス末端からの伝達物質の放出を促す働きを持つと考えられている。

- **GABA** (gamma amino butyric acid)

γ -アミノ酪酸。成体脳内における抑制性の神経伝達物質であり、発達期では興奮性の神経伝達物質。

- **GAD** (Glutamic Acid Decarboxylase)

グルタミン酸脱炭酸酵素。グルタミン酸から GABA を生成する。GABA 作動性ニューロンにおいてその発現が認められる。

- **GFAP** (glial fibrillary acidic protein)

グリア繊維性酸性タンパク。アストロサイトに特異的に発現している中間系フィラメント。

- **GFP** (green fluorescent protein)

発光クラゲから同定された緑色蛍光タンパク質。

- **GLAST** (glial specific glutamate transporter)

グリア細胞に特異的に発現しているグルタミン酸トランスポーター。

- **HBSS** (Hank's Balanced Salt Solution)

ハンクス平衡塩溶液

- **MAP-2** (microtubule associated protein-2)

微小管関連タンパク-2。発達したニューロンの軸索において発現している。

- **NeuN** (neuronal nuclei antigen)

ニューロンに発現する核内タンパク。

- **NGF** (nerve growth factor)

神経成長因子。ニューロンの維持や分化を促す。

- **NGS** (normal goat serum)

標準ヤギ血清

- **NKCC1** ($\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ co-transporter)

細胞内へ Cl^- を組み入れるトランスポーター。前駆細胞や未成熟ニューロンでは、このトランスポーターの働きにより細胞内 $[\text{Cl}^-]$ が高い状態に保たれている。

- **NMDA** (N-methyl-D-aspartate) 受容体

NMDA 型グルタミン酸受容体。

- **PBS** (phosphate buffered saline)

リン酸緩衝生理食塩水。

- **PSA-NCAM** (polysialylated neural cell adhesion molecule)

ポリシアル化神経細胞接着分子。幼若ニューロンマーカーとされている。

- **TBS** (tris buffered saline)

トリス緩衝生理食塩水。

- **TTX** (tetrodotoxin)

テトロドトキシン。フグ毒。電位依存性ナトリウムチャンネル阻害剤。

- **VGAT** (vesicular GABA transporter)

GABA 作動性ニューロンの軸作末端において、放出される顆粒内に GABA を組み入れるトランスポーター。GABA 作動性ニューロンのシナプス末端のマーカーになる。

用語説明

以降の研究理解の助けとなるよう、各種実験手法や海馬および大脳皮質の神経回路等について簡単に説明する。

1. ニューロンとグリア細胞

中枢神経系を構成している細胞はニューロン（神経細胞）とグリア細胞の2種類に大きく分けられる。ニューロンは中枢神経系における情報処理過程を担う中心的な細胞である。ニューロンはシナプスを介して入力を受け取ることで活動電位を発生させ、他の細胞へと情報を伝達する。ひとつのニューロンに対し、複数の細胞から入力を受けたり、活動電位が起きる閾値を変化させることにより、情報伝達の修飾が行われる。活動電位の発生は、電位依存性ナトリウムチャンネルが開口することによって、瞬時にかつ一過的な細胞内への Na^+ が流入することで、膜の脱分極が起こる。また、ニューロンは分裂能力を持たない。

一方グリア細胞は、中枢神経系におけるニューロン以外の細胞を指し、神経系の維持に関与する細胞群のことを言う。アストロサイト、オリゴデンドロサイトがある。神経細胞に対し、位置の固定や栄養素の供給など恒常性の維持を担う細胞、髄鞘（ミエリン）の構成などの機能をもつ細胞、免疫系のような振る舞いをする細胞（ミクログリア）などがある。これまでは、過剰に放出されたイオンや神経伝達物質を細胞内に取り込むことで周辺組織の恒常性を維持するなど、比較的静的な役割を演じることでシグナル伝達に貢献すると考えられてきた。しかし近年になって、グリア細胞にも多種多様な神経伝達物質の受容体が発現していること、受容体へのリガンド結合を経てグリア細胞自身もイオンを放出するなど、これまで神経細胞のみが担うとされてきた動的な役割も果たしていることが次々に示されてきている。ニューロンとは異なり、分裂能力を持つ。

2. パッチクランプ法 (patch clamp)

パッチクランプ法は、細胞に微小ガラス電極を押し当て、細胞膜においてイオンチャンネル分子の活動を、それを通るイオン電流として記録する方法で、1976年に Neher と Sakmann によって開発された技術である (Neher and Sakmann, 1976)。この方法は細胞や分子レベルでの生理学研究に革命を引き起こし、ひいては遺伝子クローニング法とあいまって生命科学研究に大きな革新をもたらした。この貢献によって Neher と Sakmann は 1991 年にノーベル賞を授賞した。

本研究では、パッチクランプ法の中でも最も標準的な記録方法であるホールセルパッチ記録法とグラミシジン穿孔パッチ記録法を用いて解析を行った。ホールセルパッチ記録法は細胞膜に微小電極を押し当て、細胞膜を破り、標的とする一つの細胞の電位を任意の値に保持し、細胞膜を通過するイオンの流れを電流として検出する技術である (図 3A)。グラミシジン穿孔パッチ記録法は、おもに細胞内 $[Cl^-]$ を測定するために開発された技術である。予めパッチ内液にグラミシジンを溶解させておき、標的とする細胞にガラス電極を押し当てる。ここで膜を破らず、電極先端をオンセル (on cell) の状態に保持する。その間に細胞膜上に陽イオンのみ通過させるグラミシジン小孔が形成される。このことにより、細胞内陰イオンは細胞本来の組成が保たれることになる。 Cl^- の平衡電位 (反転電位) を求め、ネルンストの式より、細胞内 $[Cl^-]$ が算出できる (図 3B)。

3. 海馬の構造と神経回路

海馬は哺乳類の中樞神経系の中でももっとも詳しく研究されている脳領域の一つである。海馬 (Hippocampus) は、ギリシャ神話に登場する海神ポセイドンがまたがる海馬 (4 頭立ての馬車を引く架空の動物) に似ていることから、その名がつけら

れた。ギリシャ語で、Hippo は馬、Kampos は海獣を意味する。

海馬は大脳辺縁系の一部であり、大きく分けて、歯状回 (dentate gyrus)、CA1～CA3 領域、嗅内皮質 (entorhinal cortex) から成る。海馬はバナナのように細長く伸ばされた構造をしていて、その長軸方向がアルファベットの C 字型に湾曲している。軸の吻側は中隔核 (septum) 付近から始まり、間脳を巻き込むように伸び、外尾側の側頭葉へと伸びている。

海馬を構成する各領域と層は図 4 に示した。歯状回は 3 層からなる。中心をなす層として、顆粒細胞層 (granule cell layer) がり、すぐ上に位置するのが細胞密度が極めて低い分子層 (molecular layer)、そして下に位置するのは、細胞がまばらに見える歯状回門 (ハイラス; hilus)。CA1～CA3 領域においては、錐体細胞層 (pyramidal cell layer) と呼ばれる主要神経細胞層があり、その上にさらに細かい層 (stratum) が走っている。

歯状回顆粒細胞の細胞体は直径 10 μm ほどの小さな球形であり、細胞体層の厚みの方向に 4～6 個ほど並んでいる。顆粒細胞は樹状突起を分子層方向に伸ばし、嗅内皮質からの貫通繊維 (perforant pathway) から興奮性入力 (海馬へのインプット) を受けている。顆粒細胞の軸索は、そのシナプス末端の独特な形態から、苔状線維 (mossy fiber) と呼ばれている。苔状線維は細胞体の基底部から始まり、ハイラスの中へと伸長している。苔状線維は苔状細胞 (mossy cell) などいくつかの神経細胞に投射している。苔状線維は、ハイラスを出ると束になり、CA3 領域の錐体細胞樹状突起に投射している。CA3 錐体細胞は CA1 錐体細胞だけでなく、CA3 錐体細胞自身にも強い投射 (リカレント結合) をしている。CA1 錐体細胞への投射軸索はシェッファ一側枝 (Schaffer collateral) と呼ばれている。CA1 錐体細胞は嗅内皮質に投射している (海馬からのアウトプット)。

海馬神経回路を構成する細胞は、興奮性ニューロン (顆粒細胞と錐体細胞; 共にグ

ルタミン酸作動性ニューロン) と局所回路を形成する GABA 作動性ニューロン (または介在ニューロン) が存在する。歯状回の最も重要な GABA 作動性ニューロンの一つに、籠細胞 (バスケット細胞; basket cell) がいる。バスケット細胞は顆粒細胞層とハイラスの境界付近に存在し、顆粒細胞の細胞体に投射している。この他にも、歯状回には多種多様な GABA 作動性ニューロンが存在し、ハイラスの中だけに投射するものや、顆粒細胞層や分子層に投射するものもある。海馬において、現在特定されている GABA 作動性ニューロンは 16 種類あり (Somogyi and Klausberger, 2005)、GABA 系神経回路網はあまりにも複雑過ぎるため十分な解析が進んでいない。

4. 大脳皮質の構造と神経回路

大脳皮質を構成する細胞は錐体細胞 (pyramidal cell) と非錐体細胞 (non-pyramidal cell) の二種類に大きく分けられる。大脳皮質のニューロンの約 80% が錐体細胞である。錐体細胞は神経伝達物質としてグルタミン酸を用いる興奮性のニューロンであり、他の皮質領域や皮質以外の脳部位へ軸索を投射するニューロンである。一方、非錐体細胞は GABA を伝達物質とする抑制性のニューロン (GABA 作動性ニューロン) で、局所領域の活動を調節している。GABA 作動性ニューロンは、神経化学的、形態的、電気生理学的に極めて多様である (Kawaguchi and Kondo, 2002)。

大脳皮質は 6 層構造を成しており、各層の厚さは皮質領域間で異なるが、基本的にはどの皮質領域でも同様の 6 層構造を持つ。例えば、第 1 層には錐体細胞は見られず、第 5 層には大型の錐体細胞が存在する。錐体細胞の各層ごとの投射様式にも皮質領域間で同一性が見られ、第 2,3 層の錐体細胞の軸索は他の皮質領域へ、第 5 層は脊髄や脳幹および視床へ、第 6 層は視床へ、第 3,4,5 層の一部の錐体細胞は線条体へ投射している (図 5)。

上述したように、大脳皮質においても多種多様の GABA 作動性ニューロンが存在し、複雑な神経回路を形成している。形態学的分類では、バスケット細胞 (basket cell)、シャンデリア細胞 (chandelier cell)、マルチノッティ細胞 (martinotti cell)、ダブルブーケット細胞 (double bouquet cell)、ニューログリアフォーム細胞 (neurogliaform cell)、カハールレチウス細胞 (cajal retius cell) に大きく分類できる。(発火特性や発現マーカーの違いにより異なる分類もある。) しかし海馬と同様、その複雑さ故に詳しい解析は進んでいない。大脳皮質において、何種類の GABA 作動性ニューロンが存在するのかすら明確になっていない。

5. ネルンストの式とイオンの流れ

膜のチャンネルタンパクを通る任意のイオンの流れは、そのイオンの電気化学的勾配によって駆動される。この勾配は2つの要素、すなわち、膜内外の電位差とそのイオンの濃度差の組み合わせである。この2つの要素がつりあっているとき、そのイオンに対する電気化学的勾配はゼロで、そのイオンがチャンネルを通る正味の流れもゼロになる。この平衡状態をもたらす電位差(膜電位)を、そのイオンの平衡電位という。この値はネルンストの式と呼ばれる以下の式を用いて計算できる。(式の導入は省く)

$$V_X = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[X]_{out}}{[X]_{in}}$$

V_X = イオン X の平衡電位、R = 気体定数 (2 cal/K/mol)、T = 絶対温度(K)、

Z = イオンの価数、F = ファラデー定数 (2.3×10^4 cal/V/mol)、X : ある特定のイオン

グラミシジン穿孔パッチ記録法により、 Cl^- の平衡電位が求まることで、上式において $[\text{Cl}^-]_{\text{in}}$ のみが未知数となる。このネルンストの式を用いて細胞内 $[\text{Cl}^-]$ を算出した。

6. イオンチャンネル型受容体

神経伝達物質に対する細胞膜受容体は、イオンチャンネル型受容体、Gタンパク質共役型受容体、酵素内蔵型受容体の3種類に分類される。これらの受容体は、前シナプスまたは後シナプスに存在し、 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- の細胞膜を介した流出入に関与し、脱分極または過分極を起こすことにより神経伝達に関与する。神経伝達に関与する主なイオンチャンネル型受容体には、 GABA_A 受容体、NMDA型グルタミン酸受容体、AMPA型グルタミン酸受容体、グリシン受容体がある。これらのイオン透過型受容体は、歯状回顆粒細胞の発生過程および成熟後において発現が見られる受容体であり、ニューロン分化と緊密な関係にある。本研究では、これらの受容体が成体海馬神経系前駆細胞に発現しているかを調べた。以下に各受容体の生理機能について記載する。

GABA_A 受容体： GABA が結合することにより塩化物イオン(Cl^-)を選択的に透過するリガンド結合型イオンチャンネルである。通常、細胞内の Cl^- 濃度は細胞外よりも低く、平衡電位は静止膜電位よりも過分極側にある。このため GABA_A 受容体が活性化すると細胞内への Cl^- の流入が生じ、膜は過分極する。

NMDA受容体：グルタミン酸受容体サブタイプの一つ。NMDAにより活性化されることから、このように呼ばれている。受容体にグルタミン酸が結合することにより、 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} を透過するリガンド結合型イオンチャンネルである。

AMPA受容体：グルタミン酸受容体サブタイプの一つ。AMPAにより活性化されることから、このように呼ばれている。受容体にグルタミン酸が結合することにより、

Na⁺, K⁺を透過するリガンド結合型イオンチャンネルである。グルタミン酸の結合後、速い活性化と脱感作を示し、中枢神経系における興奮性シナプス伝達に専らこのクラスの受容体が関わっている。

グリシン受容体：GABA 受容体と同様に、グリシンが結合することにより Cl⁻を選択的に透過するリガンド結合型イオンチャンネルである。グリシン受容体が活性化すると細胞内への Cl⁻の流入が生じ、膜は過分極する（図 6）。

7. 臨界期

臨界期とは、脳の可塑性が非常に高い（一時的に脳の感受性が高まっている状態）生後間もない時期を示す。外部環境からの刺激が入ってきたとき、脳の中の覚えたり感じたりする神経回路がその刺激の影響で集中的に作られたり、回路の組み換えや再編成が盛んに行われる時期のこと。

例えば、生後の視覚野においては神経回路は未成熟であり、臨界期の開始と共に外部環境からの視覚刺激によって機能的な回路が形成される。この時期に視覚遮蔽を行うと、不可逆的な視覚機能の障害が生じる。

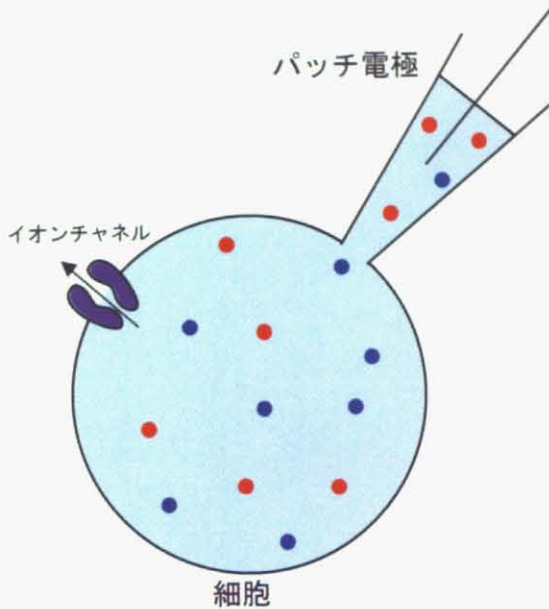
8. 細胞周期マーカー

本研究において、分裂細胞およびその子孫細胞を標識するために、異なる 3 種類の細胞周期マーカーに対する抗体を用いた。Ki67 は細胞周期の G1 後期から M 期にかけて発現する核内タンパクである。一般に、抗 Ki67 抗体は増殖期にある細胞を標識するのに用いられる。リン酸化ヒストン H3 (p H3) は細胞周期の M に発現する核内タンパクである。抗 p H3 抗体は細胞が分裂する瞬間を捉えることができる。

BrdU はチミジン類似物質であり、動物に投与することで、細胞周期の S 期にある細胞核内に取り込まれる。細胞分裂が停止し、分化の方向に移行しても核内に BrdU が取り込まれているため、分化後の細胞においても同定できる。抗 BrdU 抗体を用いることで、分裂期にある細胞や新生した細胞が標識できる (図 7)。

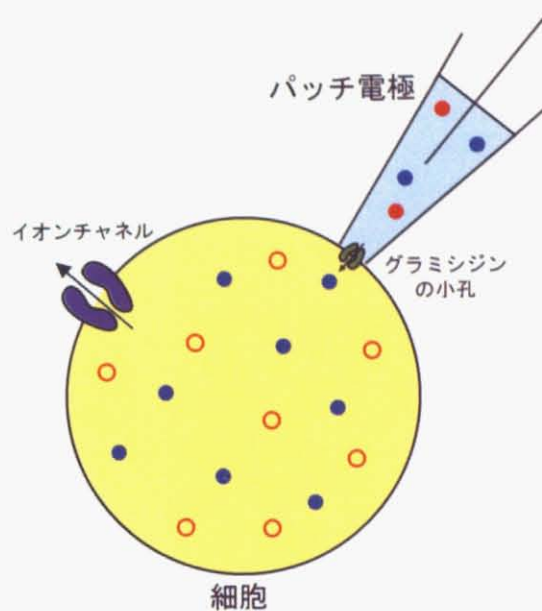
A

ホール・セルパッチ



B

グラミシジン穿孔パッチ



- 陽イオン
- 陰イオン
- 細胞本来の陰イオン

図3:ホールセルパッチ法とグラミシジン穿孔パッチ法。

(A) ホールセルパッチ法の模式図。細胞にガラス電極を押し当てて、吸引することで膜の一部が破れ、細胞内液がパッチ内液によって完全に入れ替わる。細胞膜上のイオンチャンネルやトランスポーターを介したイオンの流出入が電流として記録できる。細胞内の陽イオンおよび陰イオンをコントロールすることができる。

(B) グラミシジン穿孔パッチ法の模式図。パッチ内液にグラミシジンを溶かしておき、細胞にガラス電極を押し当てる。この状態でしばらくすると、膜上に陽イオンのみ透過するグラミシジンの小孔が形成される。陰イオンは細胞本来の組成が保たれる。細胞内の $[Cl^-]$ を測定するのに必要な手法である。ホールセルパッチ法と同様に、膜上のイオンチャンネルやトランスポーターを介したイオンの流出入が電流として記録できる。

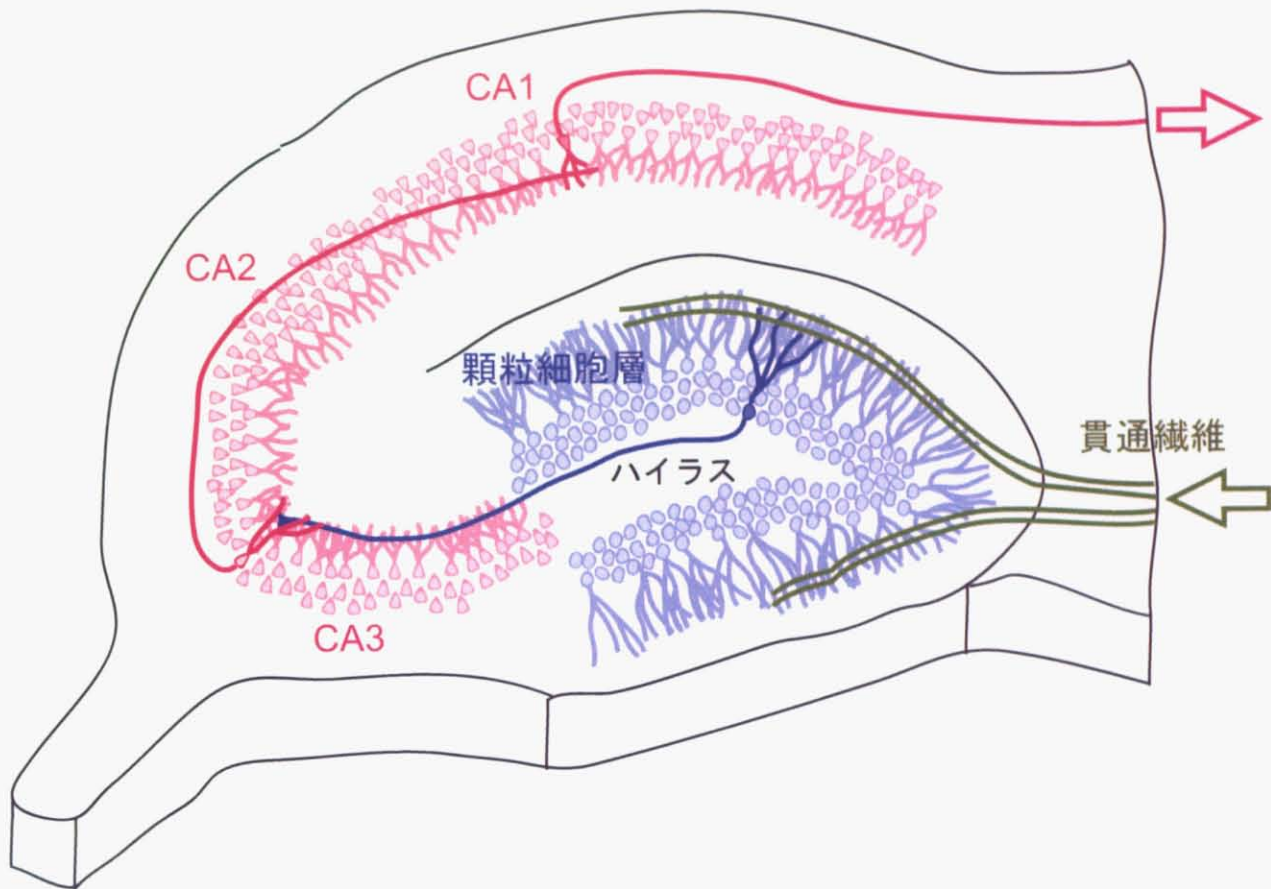


図4:海馬における主な神経回路網。

嗅内皮質から貫通繊維(グルタミン酸作動性)を介して海馬への入力伝わる。入力を受け取った顆粒細胞(グルタミン酸作動性)はCA3領域の錐体細胞(グルタミン酸作動性)へ投射する。CA3錐体細胞はCA1領域の錐体細胞(グルタミン酸作動性)へ投射し、CA1錐体細胞から再び嗅内皮質へ出力される。この他に、GABA作動性ニューロンが局所的な神経回路を形成し、興奮を抑えている。特にハイラス部には様々な種類のGABA作動性ニューロンが局所回路を形成している。その回路の複雑さゆえに十分な解析は行われていない。

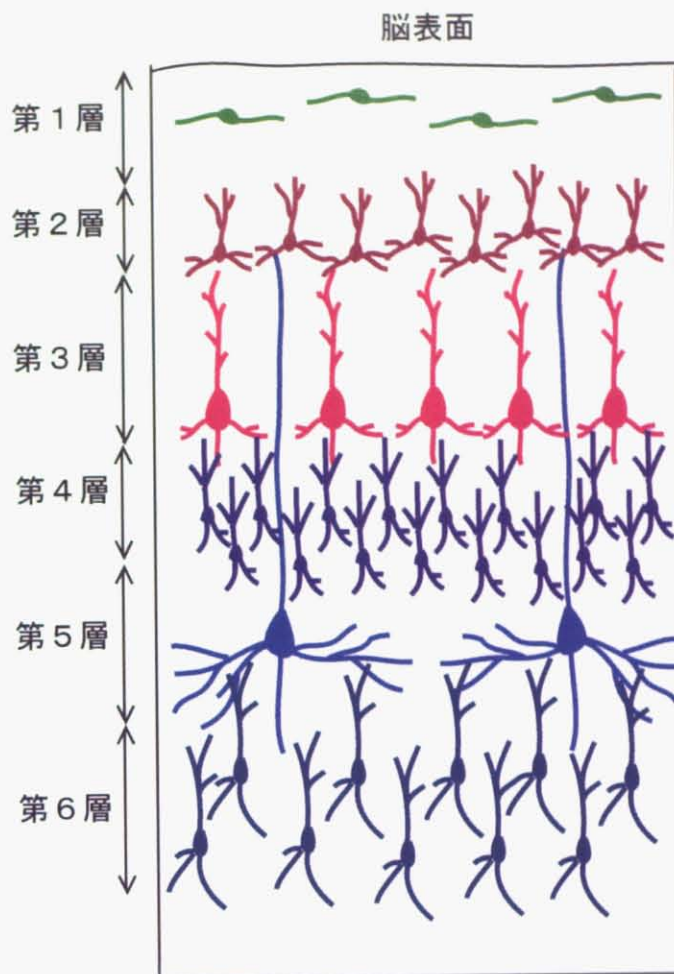


図5: 大脳皮質における主な神経回路。

大脳皮質は6層から成る。第1層から第6層までは、分子層 (molecular layer)、外顆粒層 (outer granular layer)、外錐体細胞層 (outer pyramidal layer)、内顆粒層 (inner granular layer)、内錐体細胞層 (inner pyramidal layer)、多型細胞層 (multiform cell layer) と名づけられている。それぞれの皮質構成神経細胞は、その細胞特有の円柱状の樹上突起展開領域を持ち、異なる入力を受け取っている。図には主な興奮性のニューロンを示してある。皮質内にはどの層にも満遍なく15~25%程度の抑制性GABA作動性ニューロンが存在し、神経回路の抑制やリズムの発生に関わっていると考えられている。

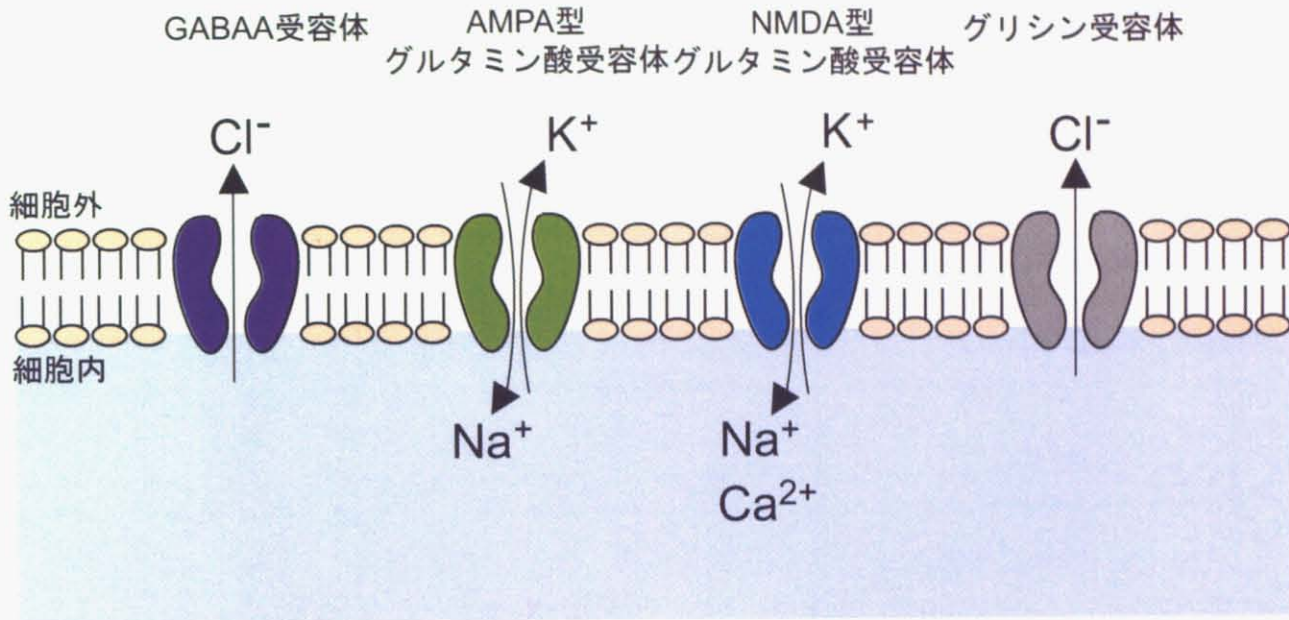


図6: 主なイオン透過型神経伝達物質受容体。

GABAA受容体は Cl^- チャネルであり、受容体が活性化すると Cl^- の流出入が起こる。通常、成体脳内においては、細胞内 $[\text{Cl}^-]$ が低い状態に保たれており、GABAA受容体が活性化すると Cl^- が細胞内へ流入し、膜は過分極する。AMPA型グルタミン酸受容体は細胞内への Na^+ の流入と細胞外への K^+ の流出を行うチャネルである。NMDA型グルタミン酸受容体は、細胞内への Na^+ および Ca^{2+} の流入と細胞外への K^+ の流出を行うチャネルである。静止膜電位付近においては Mg^{2+} による障害がかかっており、この Mg^{2+} の障害は脱分極することにより外れる。グリシン受容体もGABAA受容体と同様 Cl^- チャネルであり、 Cl^- が流入することで膜の過分極が起こる。

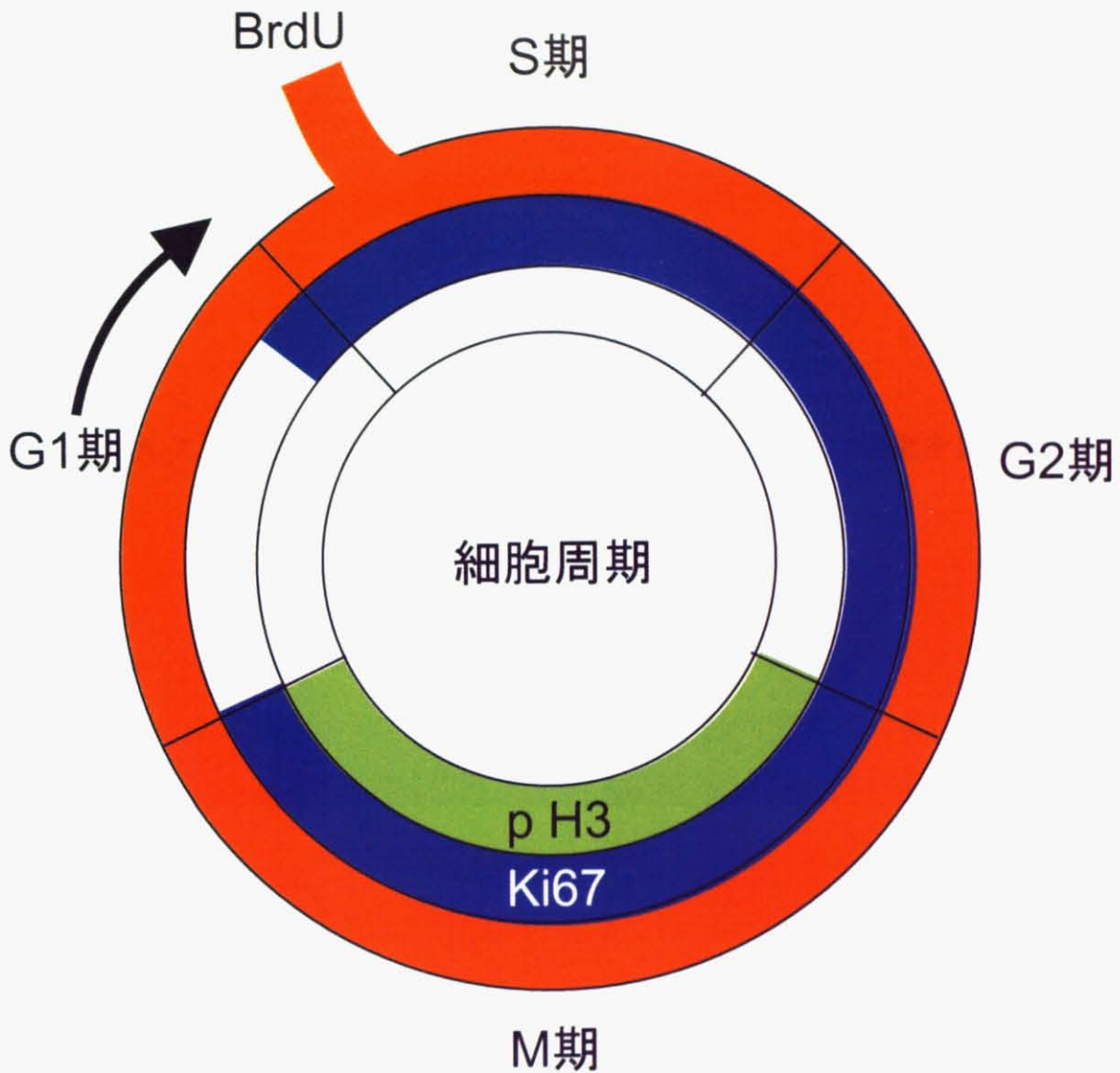


図7:細胞周期における各種マーカーの発現。

Ki67は細胞周期のG1後期からM期にかけて発現している。リン酸化ヒストンH3(p H3)はM期に発現している。BrdUを投与することで、細胞周期のS期に核内に取り込まれる。分裂細胞およびその子孫細胞を標識することができる。