



研究ノート

脳の神経ネットワークが形成される仕組み

山本 亘彦*

Mechanisms of neuronal circuit formation in the developing brain

Key Words : Target recognition, Axon guidance, Cortex, Thalamus, Layer

はじめに

脳は一千億もの神経細胞から成る巨大な細胞ネットワークであるが、その基本構造は個体差どころか種を越えても保存されている。このことは、神経細胞間の結合性を決める発生プログラムの存在を強く想像させるものである。

脳のネットワークは基本的には胎児期に形成される。分裂を終えたニューロンは軸索を伸長させて適切なニューロンとシナプス結合を形成するのである。この回路形成を担うメカニズムとしては、古くから軸索が感知できる化学物質の存在が想定されていたが¹⁾、近年になって分子生物学的手法の進展により、軸索伸長を誘引あるいは反発する分子や軸索の成長活性を持つ分子などが多数同定されるに至っている。しかしながら、膨大なネットワークを形成するための原理を説明するにはまだ程遠い。

私たちはこの問題に興味を持って、大脳皮質における神経回路、特に視床から大脳皮質への投射系を対象として研究を行っている。視床とは感覚の中継部位であり、そこから発した軸索は大脳皮質に投射し、皮質内では6層構造の内、第4層で特異的に神経結合を作る。この投射は哺乳類で共通であり、回路形成の基本機構を研究するのに適した系である。本稿では、視床皮質投射の形成について、これまで

に得た知見ならびに今後の研究の方向性を紹介したい。

軸索の標的認識過程

一言にネットワーク形成と言っても、さまざまな過程から成り立っている。私たちが研究対象としている視床皮質投射を例にとると(図1)、まず視床ニューロンの軸索は細胞体部から外側に向かって伸長し始める。内包と呼ばれる部位で大きくカーブし、大脳皮質の線維層に合流する。その後適切な位置で皮質板、すなわち大脳の細胞層に入る。さらに大脳皮質の深層(第6層, 5層)を通り抜け、標的である4層で枝分かれをしながらシナプス結合を形成する。このように目的地に到達するまでには、コース選択や標的選択などさまざまな過程があるが、特に問題としているのは、最終的な標的層での結合性である。すなわち、どのようにして視床ニューロンの軸索は標的となる層を識別するかである。

私たちは、organotypic culture法(細胞構築を維持する培養法)を開発し、視床皮質投射をin vitroで再現することによって、この問題に取り組んでき

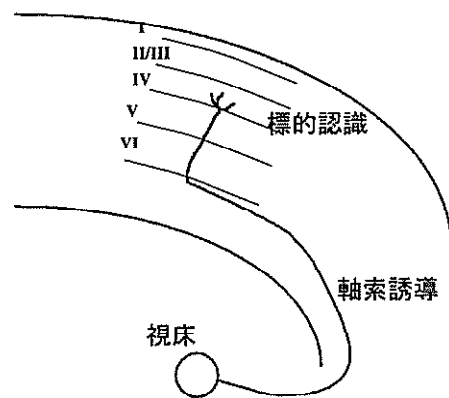


図1 視床ニューロンの大脳皮質への投射パターン



* Nobuhiko YAMAMOTO

1957年2月生

1976年大阪大学・基礎工学部・生物工学科卒業

現在、大阪大学大学院生命機能研究科脳神経工学講座、教授、工学博士、神経生物学

TEL 06-6879-4636

FAX 06-6879-4636

E-Mail nobuiko@fbs.osaka-u.ac.jp

た²⁾。実際、視床組織片と大脳皮質切片を共培養すると、脳内で形成されるのと同様な層に特異的な神経結合が再現されるのである。この培養下で軸索の挙動を観察することによって、標的認識に必要な細胞間相互作用を明らかにしている³⁾。

視床-大脳共培養で、蛍光色素で標識した視床軸索を共焦点レーザー顕微鏡で経時的に観察すると、皮質脳質側から侵入した視床軸索は深層を一定した速度で伸長するが、標的の第4層に到達すると急激に速度を落とすのである(図2)。また面白いことに、成長の停止は髄膜側(1層側)から侵入してきた場合にも見られたが、層と平行に侵入してきた軸索では起こらなかった。おそらく視床軸索は標的層と隣接する層との相対的な分子差を識別しているのであろう。

標的認識に伴う軸索の挙動でもう一つ重要なものは枝分かれである。脳内でも培養下でも、一つ一つの視床軸索は第4層で複雑に枝分かれするが、上述した経時的な観察から枝の出現箇所が4層に限局することが示された(図2)。さらに、軸索の成長停止とは異なって、皮質切片のどの方向から侵入しても、標的層で枝分かれを作り始める。加えて、第4層で停止しそこなっても枝分かれが生ずることから、軸索分枝と軸索成長の停止を担う分子機構は互いに独立していると考えられる。

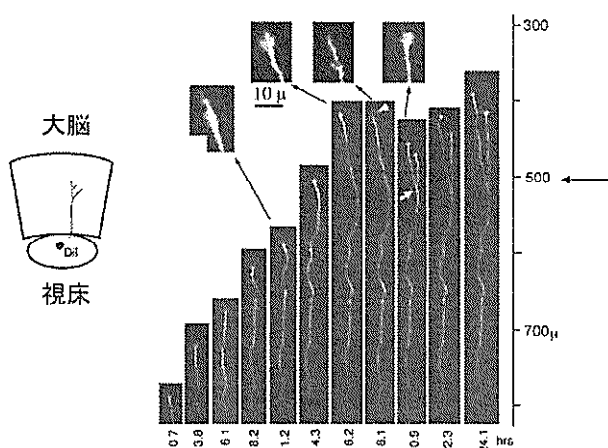


図2 視床-大脳共培養における視床軸索の成長様式。蛍光色素で標識した視床ニューロンの軸索が共焦点レーザー顕微鏡下で約2時間ごとに観察された。右の矢印は皮質4層と5層のボーダーを示す。文献3)より改変。

標的認識の分子機構

以上のように、層特異的な視床皮質投射の形成には、軸索伸長の停止と枝分かれ形成の2つの過程が必要であると考えられる。それらを制御する分子機構はどのようなものであろうか? 層ごとの軸索の成長活性や枝分かれ活性を調べる実験を行い、以下の点が明らかになっている。1)全層に軸索伸長に対して促進的に働く分子が分布すること。2)第2/3層から第4層にかけて軸索成長を抑制する分子が分布する。3)第4層に枝分かれを促進する因子が局在する。4)枝分かれ形成を抑制する分子が全層に分布する。これらの結果は、特定の脳部位で軸索が結合するためだけでも、複数の分子が協同的に働いていることを示唆している。

次の問題はこれらの分子を同定し、分子機構の全貌を明らかにすることである。そのための一つの戦略としては、既知の分子を調べることが挙げられる。軸索伸長については、これまでも伸長活性や抑制活性のある分子が発生期の脳に発現していることが示されている。たとえば、カドヘリン(接着因子)やセマフォリン(軸索伸長に対して抑制的・反発的に作用する因子として発見された)などのタンパク質が発生期脳に発現することが示されている。これら、既知分子の発現パターンと機能を明らかにすることが一つの攻め方であろう。

もう一つのアプローチとしては、特定の層にだけ発現する分子を探索することが挙げられる。私たちは視床皮質投射の形成に必要な軸索成長抑制因子と枝分かれ促進因子を同定する目的で、2/3-4層ある

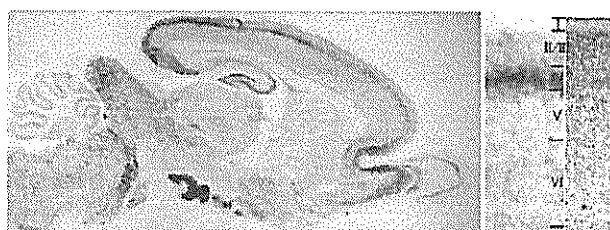


図3 発生期大脳皮質の第4層に特異的に発現する遺伝子。左は生後7日ラットの脳切片をunc5h4のプロローブを用いてin situ hybridizationを行った。真中の図は、左図の大脳皮質の拡大を表す。右図は隣り合う切片のニッスル染色を表す。文献3)より改変。

いは4層に特異的に発現する分子の探索を行っている。実際のところは、発生期の第4層と隣接する第5層にそれぞれ発現する遺伝子を抽出し、サブライブラリーを作製し、網羅的な探索を行うのである。その結果、これまでに層特異的に発現する遺伝子を複数個単離することに成功している⁴⁾。その内の一つは発生期を通して4層細胞に特異的に発現することが示され(図3)、千葉のかずさDNA研究所との共同研究の結果、この分子はネトリン受容体ファミリーに属する新規分子unc5h4であることが判明した。今後は、unc5h4を含めて、得られた候補分子の視床ニューロン軸索に対する機能を明らかにすることが必要である。

では、その機能を暴くためにはどうすればいいのか。これはゲノムプロジェクトが終了した現在、生物学のさまざまな分野での共通な問題と言ってもよいが、特に定まった方法がある訳ではない。ノックアウト動物など遺伝子改変動物を作製するのが定石の一つとなっているが、それだけで十分な証拠が得られるとは限らない。これらお決まりの解析に加えて、*in vivo*や*in vitro*で新たな分析法を開発することが、研究の発展に重要な要素になってくる。また、上述したように、軸索の標的認識という一つ現象でも複数の分子によって制御されていることから、それらをシミュレーションする理論的研究も必須となると思われる。

おわりに

本稿では、神経ネットワーク形成の中で、個体、

種を越えて共通な側面について述べたが、そのような言わば先天的な要因だけで構築されるわけではない。環境要因も脳の発生において極めて重要な要素であることが古くから指摘されている。五感を経て入力される神経活動がネットワーク形成、すなわちニューロン間の結合性を変化させるのである。この性質は、進化した動物ほど、また進化した脳においてより顕著であると言われている。今後は、神経活動依存性の見地からも、大脳皮質を用いて神経回路形成の研究を進展させたいと考えている。

引用文献

- 1) Purves D, Lichtman JW(1985)In : Principles of neural development. Sunderland, MA : Sinauer.
- 2) Yamamoto N, Yamada K, Kurotani T, Toyama K(1992)Laminar specificity of extrinsic cortical connections studied in coculture preparations. *Neuron* 9 : 217-228.
- 3) Yamamoto N, Higashi S, Toyama K(1997) Stop and Branch behaviors of geniculocortical axons : A time-lapse study in organotypic cocultures. *J Neurosci* 17 : 3653-3663.
- 4) Zhong Y, Takemoto, M, Fukuda T, Hattori Y, Murakami F, Nakajima D, Nakayama M, Yamamoto N(2004)Identification of the genes that are expressed in the upper layers of the neocortex. *Cerebral Cortex*. In press.

この記事をお読みになり、著者の研究室の訪問見学をご希望の方は、当協会事務局へご連絡ください。事務局で著者と日程を調整して、おしらせいたします。

申し込み期限：本誌発行から2か月後の月末日

申し込み先：生産技術振興協会 tel 06-6395-4895 E-mail seisan@maple.ocn.ne.jp

必要事項：お名前、ご所属、希望日時(選択の幅をもたせてください)、複数人の場合はそれぞれのお名前、ご所属、代表者の連絡先

著者の都合でご希望に沿えない場合もありますので、予めご了承ください。