

大阪大学大学院医学系研究科・教授

津 本 忠 治

「回路網形成における神経活動の関与メカニズム」

研究期間：平成 10 年12 月 1 日～平成 15 年11 月 30 日

1. 研究実施の概要

脳内神経回路網が形成されるプロセスは、発生初期・中期の主に遺伝情報に基づいて形成されるプロセスと、後期の主に外部からの入力や神経細胞の活動によって精緻化あるいは改変されるプロセスに分けられる。前者のプロセスに関する研究は、分子生物学的方法の適用によって最近著しく進展したが、後者に関する研究は数年前迄はそれほどの展開が見られなかった。ただ、その中では、大脳皮質視覚野の神経活動依存的变化は視覚入力の操作が容易なことから古くから活発に研究されてきた。例えば、1960年代にHubelとWieselによって見出された仔ネコの片眼遮閉後に生ずる視覚野ニューロンの両眼反応性変化や視覚野コラム構造の変化は発達脳の可塑性の代表例として注目され、その基礎にはシナプスの伝達効率や形態の変化があると想定されてきた。最近になって、研究代表者らを含めたいくつかの研究室でシナプス長期増強 (Long-term potentiation, LTP) や長期抑圧 (Long-term depression, LTD) といった伝達効率の長期、持続的な変化が発達期の視覚野で誘発されることが見出され、そのようなシナプス可塑性が入力変化による脳の機能と構造変化の最初のステップであろうとの仮説が提唱された。しかし、それらが実際に視覚野神経回路網変化の基礎にあるかどうかは全く不明であった。また、機能変化が形態変化をおこすメカニズムとして神経栄養因子等の関与が示唆されていたが、これも全く実証されていなかった。

研究代表者はこのような永年の疑問の解明に有用な手段や手掛かりとなる以下のような知見を研究開始前に得ることができ、本プロジェクトを提案した。まず、視覚入力を定量的にコントロールするために、従来の片眼遮閉ではなく、仔ネコの両側視神経に慢性刺激電極を留置し、求心路を既知の条件で操作できる方法を見出した。この方法を用いれば、入力のパターンや強度、頻度などを自由に変えることができ、シナプス強度変化に入力がいかに関与しているか、あるいは入力と出力の同期性が重要なかどうか（いわゆるヘップ則の妥当性）を定量的に調べることができると思われた。次に、視覚野でコラムの拡大や縮小を起こす因子と想定されてきた脳由来神経栄養因子 (Brain-derived neurotrophic factor, BDNF) がLTPやLTDに関与していることを見出

した。また、視覚野神経細胞の初代分散培養標本や孤立神経細胞培養標本という極度に単純化された神経回路がシナプス可塑性の研究に有用であることを見出した。本プロジェクトでは、このような研究開始直前に得られた方法や知見に立脚して、発達期における大脳神経回路網の機能的・形態的变化への神経活動関与のメカニズムを明らかにしようとしたものである。

本プロジェクト研究の遂行のために必要な実験標本や方法のなかで、研究代表者のグループが十分に備えていないものを補完するため、以下の研究グループが一部の研究を次のように分担することとした。大阪大学蛋白質研究所の畠中寛・山田雅司・小島正巳グループは蛍光蛋白質で標識した神経栄養因子のcDNAを組み込んだウィルスベクターやプラスミッドの作製を行う。理化学研究所脳科学総合研究センターのヘンシュ貴雄グループは、片眼遮蔽による視覚野ニューロン両眼性反応変化を可塑性の指標として、神経栄養因子を欠損したノックアウトマウスでは可塑性がどのような影響を受けるかを調べる。愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所の仙波りつ子グループは、各種神経栄養因子の機能を阻止あるいはその存在を免疫組織化学的に可視化するため、BDNFのみならずNerve Growth Factor (NGF) 等他のニューロトロフィンに対する特異的抗体を作製する。NTT基礎研究所の川名明夫・鳥光慶一グループは、複数のシナプスで同時に生じる可塑的变化を観察するため石英ガラス基盤上で神経細胞を培養しデザインどおりの神経回路を作製する研究を行う。以上、これらの分担研究グループは研究代表者のグループの研究を補完する形で統合的な研究を遂行できるよう計画した。

当研究の成果として、まず大脳視覚野の構造や機能変化には眼からの視覚入力だけでなく皮質ニューロンの活動も重要であること、及びBDNFがそれらの変化に関与していることを発見した。次に、BDNFは大脳皮質におけるシナプス伝達を急速に増強すること、及び発達脳において未熟なシナプス前部に働き、連続入力によって伝達物質の放出が減ることを防ぐ作用を示すことも見出した。また、生後発達の初期にみられるサイレントシナプスと呼ばれる未熟なシナプス（2種のイオンチャネル含有型グルタミン酸受容体のうち1種だけしか発現していない）の機能的成熟にもBDNFが関

与していることを見出した。さらに、BDNF遺伝子と緑色蛍光蛋白質 (Green Fluorescent Protein, GFP) 遺伝子を組み込んだプラスミドを神経細胞の核内に直接注入する方法を開発し、BDNFの動態を可視化することに成功した。その結果、BDNFは神経活動に応じてシナプス前から後細胞へ移行することを発見した。また、全ての体細胞にGFPを発現する遺伝子改変マウス (GFPマウス) とBDNFを欠損するマウス (BDNFノックアウトマウス) の2種類の遺伝子改変マウスから調製した皮質神経細胞のキメラ培養標本を用い、シナプス後細胞に移行したBDNFは、特にGABAニューロンにおいて、樹状突起の伸張やシナプス数の増加といった形態と機能の発達を促進することを見出した。また、BDNF蛋白質の発現は生後発達とともに増加するがその増加は入力に依存していることを見出した。BDNFに直接関連しない研究成果として、視覚野ニューロンの光反応性変化にシナプス長期増強が関与している可能性があること及びシナプス長期抑圧に蛋白質脱リン酸化酵素calcineurinが重要な役割を担っていることを見出した。また、生後発達にともなって生じる種々の視床一皮質投射線維の髄鞘化は、末梢よりの種々の入力が大脳皮質へ同期して入ってくるために必要だという従来想定されていなかった機能があることを発見した。

これらの知見を得る研究の過程で蛍光蛋白質で標識したBDNF遺伝子を含むプラスミドを微小ガラス管から神経細胞内の核内に直接注入すると標識BDNFを特定の神経細胞に確実に発現させることができることを見出した。このプラスミドの神経細胞核内直接注入法は、BDNFのみならず多くの他の蛋白質にも応用でき従来のウィルスベクターを使った方法やリン酸カルシウムなどで浸透圧ショックを与える方法よりも確実かつ有効な方法であることを示した。また、2種類の異なったタイプの遺伝子改変マウスから採取した神経細胞のキメラ培養標本の開発は内因性蛋白質の動態を解析できる有力な方法であることを明らかにした。

2. 研究構想

1) 研究の背景

臨界期と呼ばれる生後発達の初期に片眼を一時的に遮閉すると大脳皮質視覚野ニューロンの両眼反応性が永続的に変化することが1960年代にHubelとWieselによって報告された。さらに、視覚野のコラム構造も変化することがその後見いだされ、発達脳が生後環境に応じて神経回路の構造と機能を変える代表的な例として良く知られるようになった。その変化のメカニズムとして、出生直後には広範な投射していた両眼からの求心線維が発達とともにソーティングされコラムが形成されること、及びこのソーティングのプロセスは入力活動に依存しており、いわば両眼からの求心線維間の競合によって完成するという両眼性シナプス競合仮説が1970年代に提唱された。この仮説は当初は実体のない仮想的なものであったが、その後、当研究代表者らの報告 (Brain Res. 168, 190, 1979) を初めとしていくつかの研究室からシナプス長期増強 (Long-term potentiation, LTP) や長期抑圧 (Long-term depression, LTD) 等のシナプス可塑性がそのような変化の基盤である可能性が示唆された。このような背景のもとに、両眼反応性やコラム構造の変化の物質メカニズムがLTP、LTDを指標として研究されるようになった。しかし、求心線維の電気刺激という人工的な刺激で起こしたシナプス伝達効率の変化が片目遮閉の結果生じた皮質ニューロンの光反応性変化という、いわば生理的変化の基盤にあるのかどうかは、未だ全く証明されていなかった。また、コラムの拡大や縮小といった構造の変化にどのように関与しているのかも不明であった。さらに、そのような変化にどのような物質が関与しているか、という疑問に対しても解答は示されていなかった。

2) 研究の目標

当研究プロジェクトは上述した永年の疑問を解明するために計画された。そのような困難な問題の解明には、一面的な研究ではなく、システム、シナプス及び分子レベルの研究を統合した多面的な研究が必要と思われた。そのため、生体丸ごとの標本 (*in*

vivo 標本)、脳スライス標本、神経細胞初代分散培養標本及び孤立神経細胞培養標本を使用して以下の実験を行うことを計画した。システムレベルでは、視覚入力を定量的にコントロールするために、従来の片眼遮閉ではなく、仔ネコの両側視神経に慢性刺激電極を留置し、求心路を既知の条件で刺激できる方法を開発した。この方法でLTPあるいはLTDを起こす刺激が両眼反応性変化を起こし得るかどうかを明らかにしようとした。また、そのような変化に関与する物質として脳由来神経栄養因子 (Brain-derived neurotrophic factor, BDNF) に着目し、この因子及びその受容体がLTPやLTDに関与している可能性を調べる実験を計画した。さらに、BDNFが両眼反応性やコラムの変化にも関与しているかどうかを明らかにするために、BDNFを視覚野に直接投与し、片眼遮蔽によって縮小した眼優位コラムを回復、あるいは拡大させ得るかどうかを調べることにした。また、BDNFが皮質細胞と求心線維終末のどちらから放出されるのか、その放出は神経活動と関係しているのかどうかを明らかにするため、緑色蛍光蛋白質 (Green Fluorescent Protein, GFP) で標識したBDNF-GFPを培養神経細胞に発現させ、BDNFの動態の解明を試みた。また、種々の遺伝子改変マウスから調製した大脳皮質神経細胞の初代培養標本を使って、内因性BDNFの動態の解明をも試みた。

3) 当初の研究計画

当初は以下の実験を行うことを計画した。

A. LTPが両眼反応性や眼優位コラムの変化に関与している可能性を調べる実験

可塑性の高い時期（生後4～6週）の仔ネコの視神経に慢性刺激電極を設置し、片方にのみ100Hzのバースト刺激（持続30msec）を θ リズム（5Hz）で与えるという θ バースト刺激を2日間、間欠的に与える。両眼には網膜からの出力を止めるフグ毒tetrodotoxinを注入しておき、視覚野への入力のはほとんどは電気刺激によるものとする。このような刺激によって視覚野に同シナプス性LTPが生じることが期待される。実際にそのような変化が生じたかどうかは、外側膝状体と視覚野の誘発電位を同時記録して確認する。2日後にこの仔ネコを麻酔非動化し、視覚野ニューロ

ンがどちらの眼に強く反応するようになったかを光刺激に対する皮質ニューロンのスパイク応答記録法によって調べる。この実験によって、電気刺激という人工的刺激によって生じたシナプスの伝達効率変化と両眼反応性という皮質ニューロンの生理的性質の変化との対応関係を明らかにする。

B. 神経栄養因子が視覚野の可塑性に関与しているかを調べる実験

- ①BDNF, 神経成長因子 (Nerve Growth Factor, NGF), Neurotrophin-3 (NT3), Neurotrophin-4 (NT4) 等の神経栄養因子を充填した浸透圧ミニポンプを仔ネコの大脳皮質視覚野に装着し、各因子を皮質内に慢性的に投与した条件で片目遮蔽を行う。次に、遮蔽眼、あるいは反対側の眼にトリチウムでラベルしたprolineを注入する。一定期間後autoradiographyで視覚野における眼優位コラムを可視化し、眼優位コラムのサイズ等に変化が生じているかどうかを明らかにする。
- ②上記の実験において浸透圧ミニポンプの代わりに、各神経栄養因子遺伝子を組み込んだアデノウィルスベクターを仔ネコの皮質視覚野に注入し、視覚野細胞に神経栄養因子を強制発現させた条件で同様の実験を行う。
- ③内因性の各神経栄養因子の働きを明らかにするため、各因子の機能を特異的に阻害する活性を持った抗体を浸透圧ミニポンプに充填し、上記①と同様の実験を行う。
- ④各神経栄養因子のノックアウトマウスにおいて、片眼遮閉による視覚野ニューロンの両眼反応性変化を光刺激に対するスパイク応答記録法で解析する。

C. 神経栄養因子がシナプスの活動依存的変化に如何に関与しているかを調べる実験

- ①皮質視覚野ニューロンの分散培養標本作製する。この標本で各神経栄養因子が興奮性シナプス伝達、抑制性シナプス伝達に如何なる作用を及ぼすかを調べる。
- ②各神経栄養因子あるいはそれぞれの受容体の機能阻止抗体を還流液より投与して、上記の作用がどのように変わるかを観察する。
- ③この培養系において、各神経栄養因子遺伝子を組み込んだアデノウィルスベクターを皮質ニューロンに感染させ各神経栄養因子を強制発現させた標本作製し、興奮

性シナプス伝達、抑制性シナプス伝達がどのように変化したかを調べる。

- ④分散した皮質視覚野ニューロンと2個の外側膝状体組織片との共培養標本を作製する。この標本において皮質ニューロンのなかで各膝状体組織片から収束した入力を直接受けているものを電気生理学的に探し出す。次に、一側の膝状体組織片に高頻度刺激を与えた時にその側のシナプスにLTPが生ずるかどうかを継時的に観察する。また、もう一方の側のシナプス機能にどのような変化が生ずるかも観察する。

4) 研究の新展開

次章で後述するように2,3の計画を除いてほぼ目標を達成したが、前述のB-④で計画した各種ノックアウトマウスにおける片眼遮蔽実験は最も重要なBDNFノックアウトマウスが生後10日前後ではほぼすべてが死に至るため実施を中止した。

前述のB-②及びC-③の実験において、BDNFとGFPの連結遺伝子を組み込んだベクターを作製し、lipofection法あるいはウィルスベクターによって培養大脳皮質ニューロンに発現させようとしたが、発現が一部の細胞にだけ生じ、また、発現してもその程度の弱いものが多かった。そこでこれらの方法による実験は中止し、BDNF-GFPのcDNA含有プラスミドを微小ガラス管につめ顕微鏡下で培養ニューロンの核に直接注入する方法を試みた。その結果、注入後約24時間でBDNF-GFPが発現すること、その発現は十分に強いものであることを発見した。また、発現したBDNF-GFPは、細胞体や樹状突起だけでなく軸索にも存在し軸索終末に向かって移動することを見出した。さらに、BDNF-GFPはシナプスを介して他の細胞へ移行すること、及びこの移行は神経活動に依存することを発見した。従来のウィルスベクターなどの方法では多数の細胞にBDNF-GFPが発現するため細胞間移行を証明することが困難であった。ところが、核内直接注入法ではねらった一個の神経細胞にのみBDNF-GFPが発現するので、他の細胞にBDNF-GFPを検出したとすればそれは細胞間を移行したことになる。この論理にたってBDNFの順向性かつ神経活動依存的細胞間移行を証明することができた。このように、プラスミド核内直接注入法の開発は、特定の細胞にのみ所定の蛋白質を強制発現させることを可能とし、当初計画していなかった予想外の研究を展開する契機

となった。

上述したように、BDNF-GFPの利用によってBDNFの存在や移動、細胞間移行を明らかにすることができた。しかしBDNF-GFPは人工的な複合蛋白質なので内因性BDNFが観察されたBDNF-GFPと同じような動態を示すかは不明であった。この点を明らかにするため、当初の計画にはなかったが、全ての体細胞にGFPを発現するGFPマウスとBDNFを欠落するBDNFノックアウトマウスという2種類の遺伝子改変マウスから調製した大脳皮質神経細胞からなる共培養（キメラ培養）標本作製した。この標本ではGFPを発現する緑色の細胞は内因性BDNFを持っている。一方、無色の細胞はノックアウトマウス由来なのでBDNFは持っていない。従って、一定の刺激後無色の細胞にBDNFを検出できたとするとそれは内因性BDNFが移行したことを示している。このように、内因性BDNFの神経活動依存的細胞間移行を証明できたのみならず、複数の遺伝子改変マウス神経細胞のキメラ培養標本という新しい標本作製することができ、神経科学研究に新しい方法と知見を提供することができた。

5) 各グループが担った役割

上記の研究は主に津本グループが遂行したが、その研究をサポートあるいは補完するため他グループでは以下の実験を計画した。

A. 畠中・山田・小島グループ

BDNFとGFPの連結遺伝子を組み込んだプラスミドベクターを作製し、津本グループに提供した。また、それをlipofection法によって培養ニューロンに発現させるための最適条件を明らかにすることを計画した。さらに、この方法によってBDNF-GFPの動態を明らかにしようとした。

B. Henschグループ

当グループは種々の遺伝子改変マウスを使って、片眼遮蔽後に視覚野ニューロンに生じる眼優位性変化を指標として発達脳視覚野の可塑性のメカニズム解明を目指した。

C. 仙波グループ

当研究グループは BDNF の組織染色用抗体や生物活性を阻害する抗体を作製し、津本グループに提供することをめざした。また、各ニューロトロフィンの酵素免疫測定系を確立し、発達脳各部位における全てのニューロトロフィン蛋白量の測定を計画した。

D. 川名・鳥光グループ

本研究グループは、64チャンネルプレナー型アレイ微小電極による神経活動計測法、及び同電極に対する酵素反応系の積層によるグルタミン酸放出分布計測法を開発していたので、この方法を用いて、ラット大脳皮質神経細胞の分散培養系を作製し、BDNF 及び NGF の作用を明らかにしようとした。

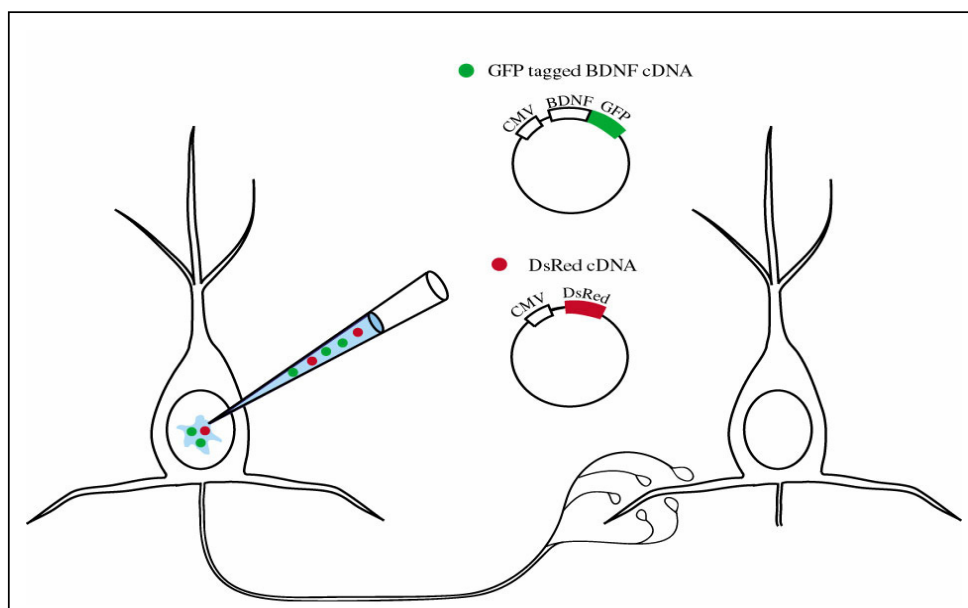


図 1. GFPで標識した BDNF の cDNA 含有 plasmid の神経細胞核内直接注入法。
注入した細胞を標識するため赤色蛍光蛋白質DsRedのcDNAも同時に注入する。

3. 研究成果

3.1 津本グループ

(1) 研究内容及び成果

仔ネコの *in vivo* 標本を使い、視覚野眼優位コラムの変化や神経細胞の光反応性変化を調べるグループと、主にラットやマウス視覚野のスライス或いは神経細胞培養標本を使い、シナプス伝達や神経細胞の形態の変化、さらにはその変化に関与する神経栄養因子の役割や動態を調べるグループに分けて研究を行い以下の成果を得た。

1) BDNFのシナプス後細胞への神経活動依存的移行

BDNFの動きを可視化するため、BDNFに緑色蛍光蛋白質 (Green Fluorescent Protein, GFP) を連結させた遺伝子を挿入したプラスミドを微小ガラス管からラット大脳視覚

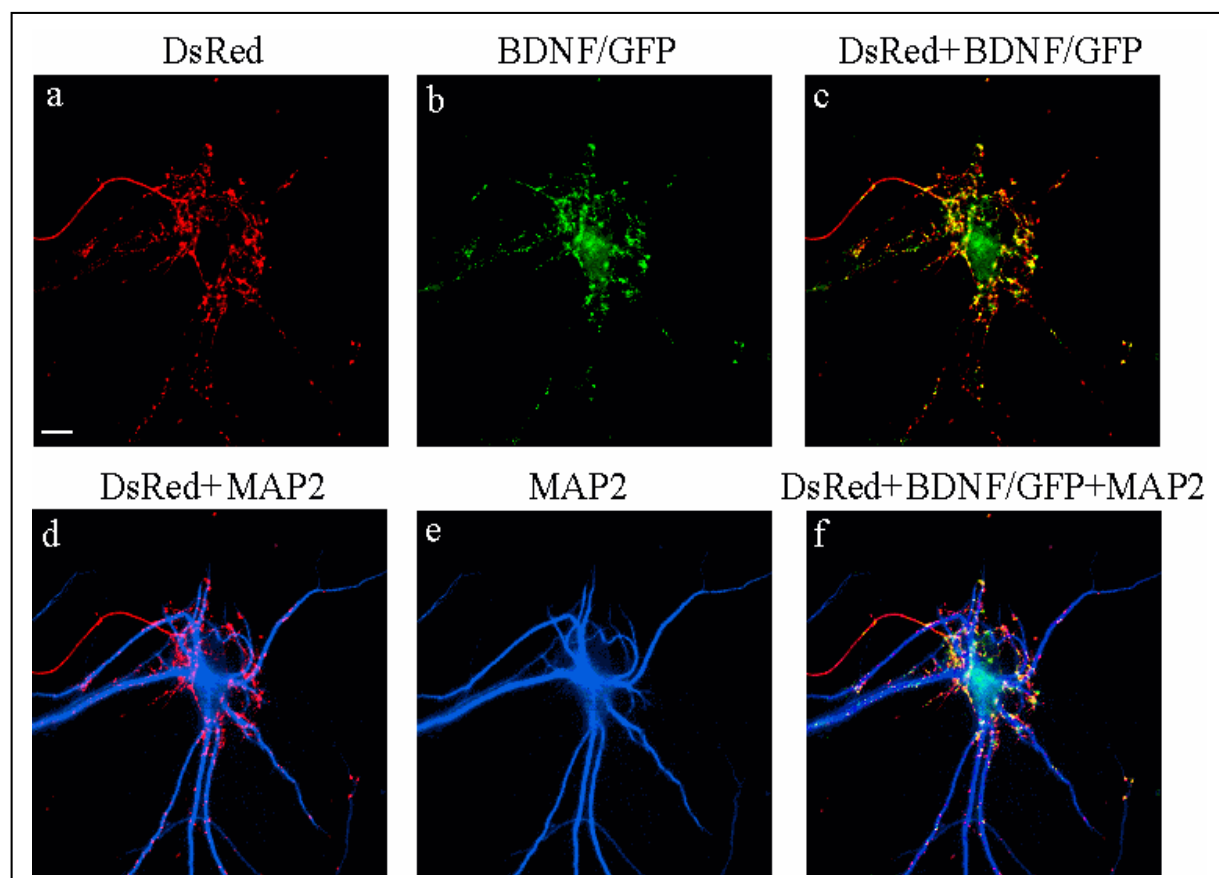


図 2. シナプス後細胞への BDNF-GFP の移行。a では DsRed 発現細胞の軸索がシナプス後細胞 (d-f のように抗 MAP2 抗体で染色すると可視化される) に網状の終末を作っている様子がみえる。b, c では緑色の BDNF-GFP がシナプス後細胞に検出される。

野培養神経細胞の核内に注入した（図1）。その結果、約24時間で蛍光蛋白質で標識されたBDNFが神経細胞内に発現し、軸索内をシナプス前終末部に向かって移動することやシナプス後部の神経細胞に移行することを見出した（図2）。また、この細胞間移動は神経細胞の活動を抑えると減少し、刺激すると増加することから神経細胞の電気活動に依存することも明らかとなった。さらに、この移動がBDNFに特有かどうかを明らかにするため赤色蛍光蛋白質を同時に発現させたところBDNFだけが他の神経細胞に移行することが認められた。すなわち、BDNFは神経細胞の電気活動とともにシナプス後の神経細胞に移ることが示された (Science 291, 2419-2423, 2001に発表)。

2) シナプス後GABAニューロンへ移行したBDNFの樹状突起発達促進作用

GFPで標識したBDNFは活動依存的にシナプス後細胞に移行することが判明したが、GFPを連結していない内因性BDNFが同様に移行するか、さらに移行したBDNFがシナプス後細胞に如何なる作用を及ぼすかは明らかでなかった。この点を解明するため、全ての体細胞にGFPを発現するGFPマウスとBDNFノックアウト (KO) マウス由来の脳皮質細胞からなるキメラ培養標本を開発した（図3）。この標本では、KOマウス

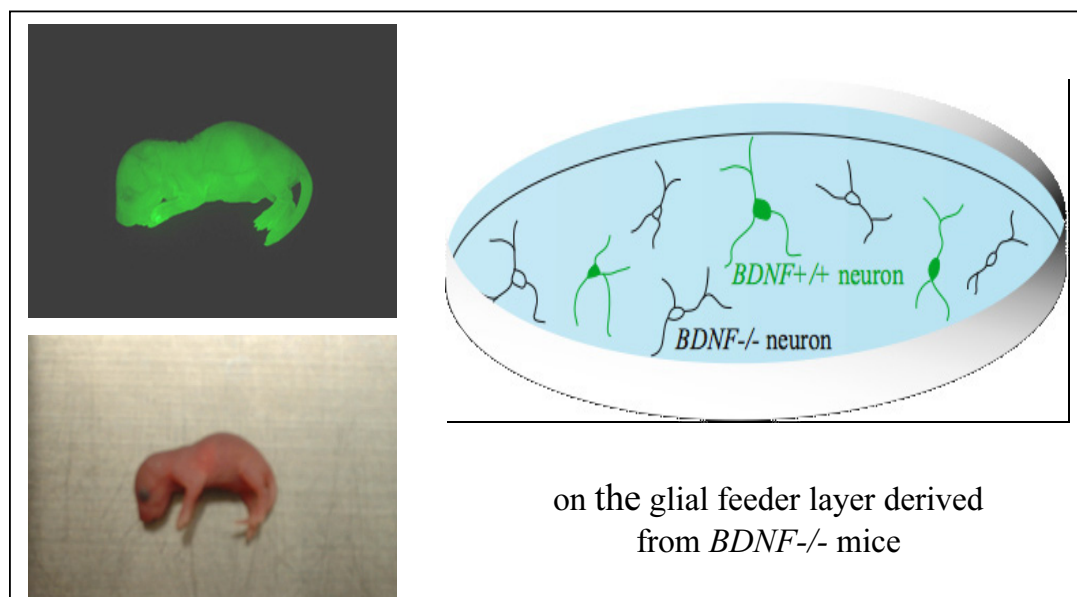


図3. 神経細胞キメラ培養標本。GFPマウス（左上）とBDNFノックアウトマウス（左下）から脳皮質神経細胞を調製し、共培養を行う。GFP陽性細胞は内因性BDNFを持つがノックアウトマウス由来細胞は持たないため、もし後者の細胞にBDNFが検出できたのであれば、それは内因性BDNFの細胞間移行を示す。

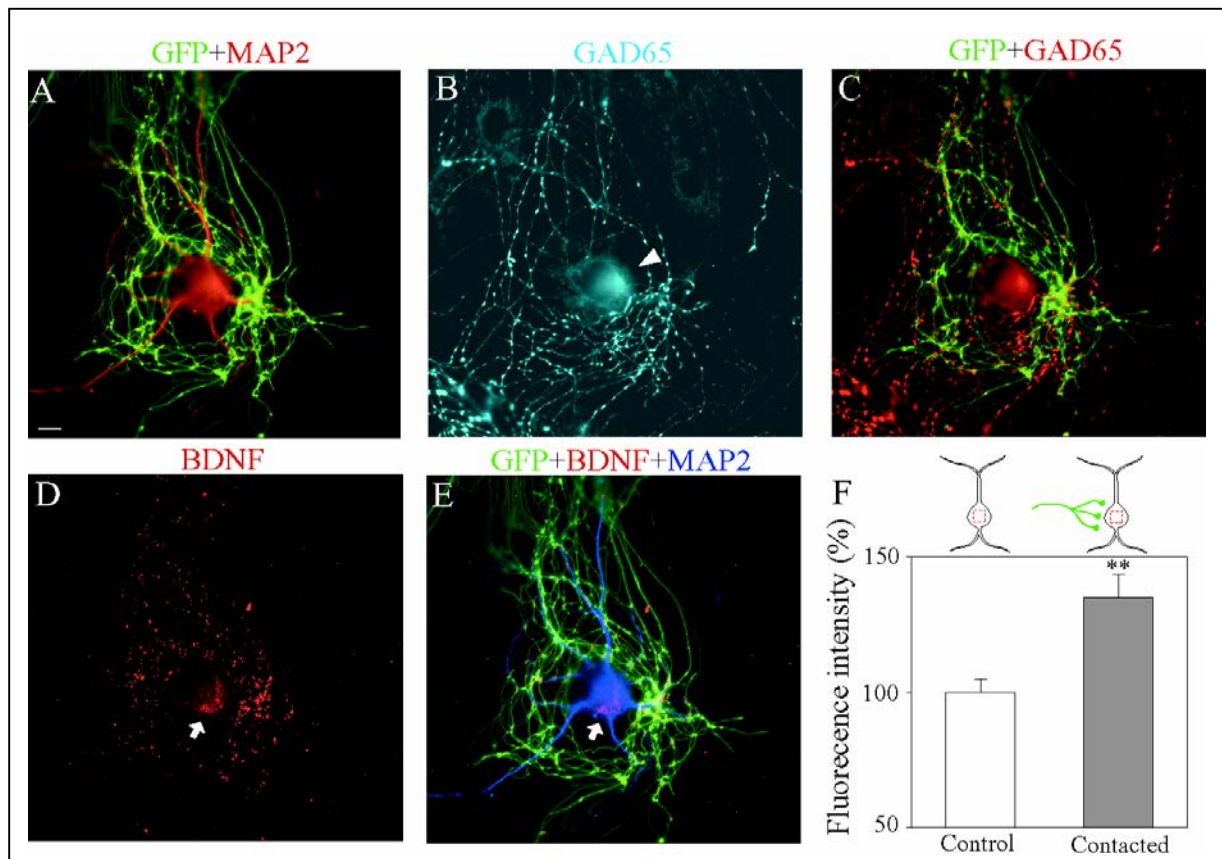


図4. 内因性BDNFの細胞間移行。Aでは緑色の軸索終末が網目状にシナプス後細胞に接触している様子が見える。シナプス後細胞はGABAの合成酵素GAD65を含むためGABA性ニューロンであると判定された(B)。このシナプス後細胞の細胞体に赤色のBDNFが見られることから内因性BDNFは細胞間移行をすることが示された(E, 矢印)。FはBDNFシグナルの強度の平均値と標準誤差。

由来細胞はGFPマウス由来細胞から内因性BDNFを受け得るものと受け得ないものがあり、両者の比較によって内因性BDNFの作用を見ることができる。この実験の結果、内因性BDNFはGABAニューロンに移行すること、及び移行したBDNFは樹状突起の伸張、分枝の増加、さらにはシナプス数の増加を起こすことを見出した(図4)。一方、興奮性細胞ではそのような効果はみられなかった。この結果は、興奮性細胞は自らBDNFを作るため他の細胞のBDNFに依存しないが、GABA性細胞は自ら作ることができないため、その樹状突起発達は興奮性細胞由来のBDNFに依存していることを示唆している(J. Neurosci. 23, 6123-6131, 2003に発表)。

3) 大脳皮質シナプスの機能的成熟へのBDNFの関与

出生直後の大脳にはAMPA型グルタミン酸受容体を欠如しNMDA型だけのいわゆる

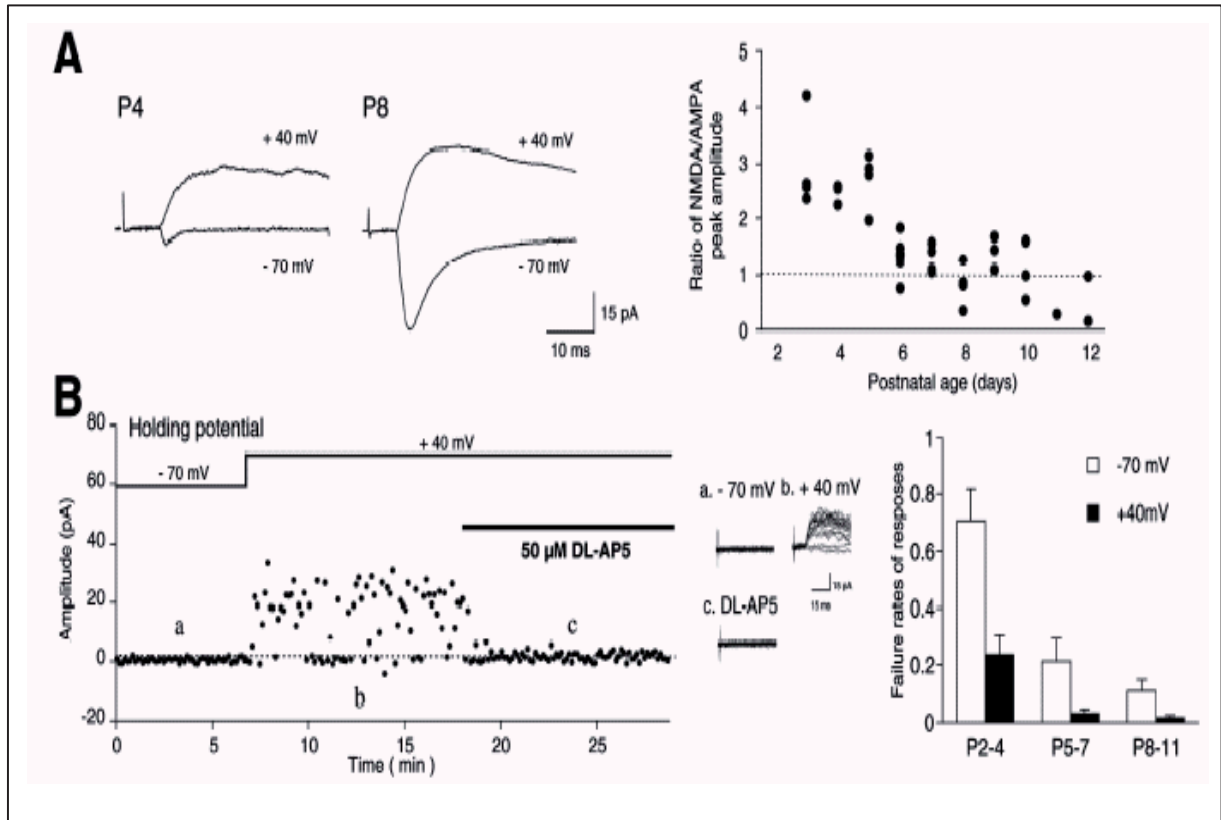


図5. 生後初期におけるサイレントシナプス（NMDA成分のみ）の存在と発達に伴う変化。A左、上向きの反応はNMDA成分、下向ききの反応はAMPA成分を示す。A右、NMDA成分とAMPA成分の比の発達に伴う変化。B左、-70mVの膜電位では反応が無いが、+40mVではNMDA成分の反応がみられる。B中、NMDA成分のみの反応の例。B右、NMDA成分（黒）とAMPA成分（白）の反応欠失率。

silent synapseが存在するが、発達につれて両者が共存した成熟型シナプスになることが知られている。この過程にBDNFが如何なる役割を示すか調べるために、BDNFノックアウト (KO) マウスからbarrel cortexと視床をともに含むスライス標本作製し、視床一皮質IV層シナプスの発達にともなう変化を調べた（図12参照）。野生型 (WT) マウスでは生後7, 8日目よりsilent synapseは急減したが、KOマウスではそのような減少は見られなかった。また、シナプス後脱分極と組み合わせて入力路刺激を行うペア刺激を行うと、WTマウスではAMPA受容体反応の出現が起きたが、KOマウスではそのような変化はみられなかった（図5）。ただし、KOマウスでも外部よりBDNFを投与するとAMPA受容体反応の出現がみられ、KO効果はレスキューされた。以上の結果は、生後初期にはNMDA受容体のみからなるsilent synapseが多いが、生後1週間の臨界期の間にAMPA受容体と並存するシナプスに変化すること、及びこの過程にBDNF

が関与していることを示している (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 13069-13074, 2003 に発表)。

4) BDNFのシナプス伝達増強作用

急性投与した外因性BDNFがシナプス伝達を持続的に増強することは、発達脳視覚野や海馬のスライス標本において、我々の数年前の研究や他のグループの研究によって明らかとなっていた。当研究では、新生仔ラット視覚野から培養した孤立神経細胞培養標本を使ってこの増強作用がシナプス前からの伝達物質放出増加によるのか、シナプス後部への作用によるのかを明らかにしようとした。その結果、前者の作用によることを確認するとともに、神経細胞の成熟につれてそのような作用が消失することを発見した (J. Physiol. Lond. 527, 579-592, 2000に発表)。このように、BDNFは、外部から急性投与した場合、シナプス伝達を増強することが、スライス標本で明らかとなった。しかし、その作用がどの程度の時間持続するかは、十数時間で状態の悪くなるスライス標本では調べられないので、*in vivo*の麻酔したラットを使用し、外側膝状体の電気刺激に対する視覚野の誘発電位を24時間にわたって記録、微小カニュラから投与した BDNF の影響を観察した (図6)。その結果、皮質反応は徐々に増大し約 4 時間

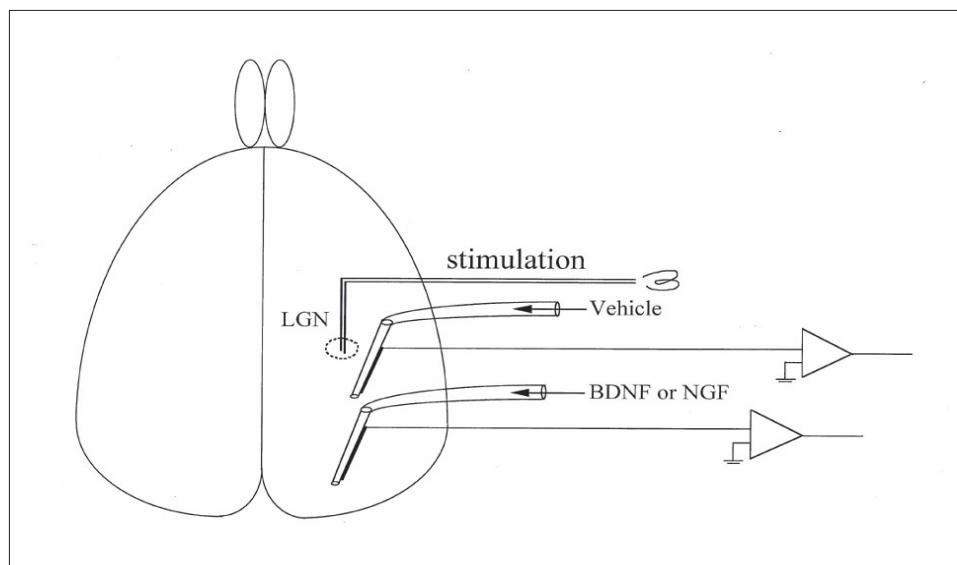


図6. ラット*in vivo* 標本における刺激電極と記録電極及びBDNF等投与のためのカニュラの配置を示す。LGN, 外側膝状体背側核(視床の視覚中継核)

で最大値に達し、約 8 時間持続した（図7）。また、このような BDNF の作用は生後 13-24日の幼若ラットで見られたが、成熟ラットでは見られなかった。次に、この誘発反応増大の機序を調べるため、受容体チロシンキナーゼの阻害薬をBDNF投与と同時に、20分後、140分後にそれぞれ投与した。その結果、同時、20分後投与の場合はBDNFの作用を阻止したが、140分後では阻止しなかった。この結果は、BDNFのシナプス増強作用は20分くらいまでは受容体チロシンキナーゼの活性を必要とするが、それ後はチロシンキナーゼより下流のシグナル伝達機構に活性が移行していることを示すと考えられた（Europ. J. Neurosci. 14, 1219-1228, 2001に発表）。

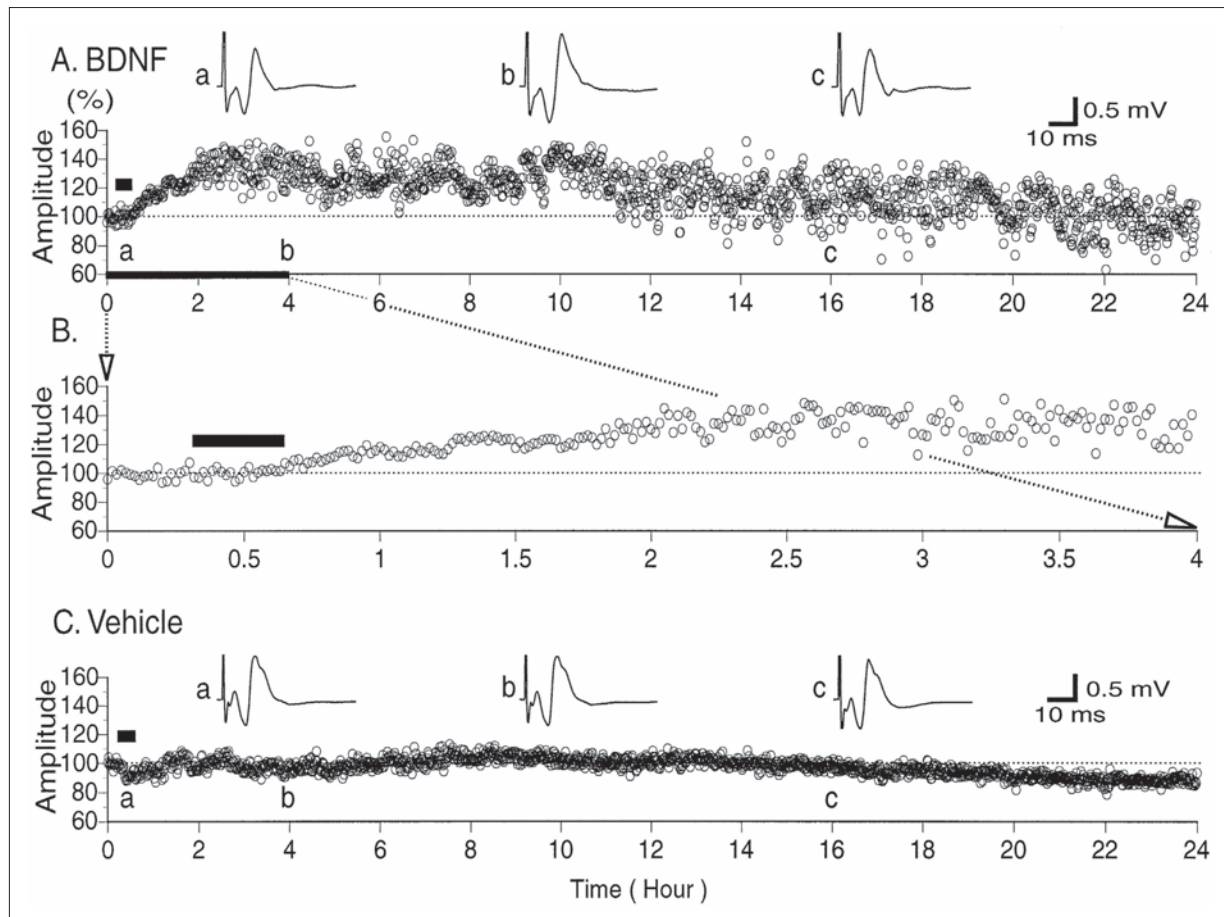


図7．外側膝状体刺激に対する皮質視覚野の反応のBDNF投与による緩徐かつ可逆的な増強。中段のグラフは上段のグラフの4時間までの部分を拡大したもの。

5) BDNFのシナプス抑圧阻止作用

長期増強と同様に発達脳の可塑的変化の素過程と考えられてきたシナプス長期抑圧にBDNFが関与しているかどうかは不明であったので、まず、幼若ラットの視覚野スライス標本を使用し、この疑問の解明を試みた。その結果、長期増強を起こすよりも低い濃度でBDNFが長期抑圧を阻止することを見出した (J. Neurosci. 19, 2122-2130, 1999に発表)。次に、BDNFのシナプス抑圧阻止作用がシナプス前部への作用であるのかどうか、また抑制性ニューロンを介さない直接的作用であるのかどうかを明らかにするため、興奮性孤立神経細胞培養標本を利用して実験を行った。その結果、この長期抑圧はシナプス前で生じていること、及びBDNFはそのシナプス前に作用していることを発見した (J. Physiol. Lond. 524, 195-204, 2000に発表)。さらに、内因性BDNFの存在する*in vivo*のラット脳において長期抑圧が起きるかどうかを調べた。その結果、スライス標本では長期抑圧を起こす低頻度連続刺激が*in vivo*では無効であることを見出した。また、スライス標本では、BDNF受容体の活性が低下していることを発見し、この低下が長期抑圧の起こり易い一因であることを見出した (J. Neurosci. 23, 3761-3770, 2003に発表)。この結果は、*in vivo*の発達脳では内因性のBDNFが未熟なシナプス前部に働き、連続入力によって伝達物質の放出が減ることを防いでいることを示唆している。これと関連して、幼若ラット視覚野スライス標本では、従来コントロール刺激として用いられてきた0.1Hzの刺激がシナプス抑圧を起こすことを見出した (Neuroscience 117, 305-320, 2003に発表)。この結果は、スライス標本ではBDNF受容体の機能が低下しているため、コントロール刺激の与え方等に特段の注意が必要であることを示したものである。

6) 視覚野コラム構造の変化への皮質ニューロン活動及びBDNFの関与

大脳視覚野の眼優位コラムの変化に眼からの入力に関与していることは従来から知られていたが、本実験では大脳皮質ニューロン自体の活動に関与しているかどうかを調べた。そのため、ニューロン活動を抑える抑制性作動薬を視覚野に持続的に注入した。その結果、皮質ニューロンの活動を抑制しておくと開眼側からの求心性線維終末

がかえって縮小してしまうことを発見した。この結果は、単に末梢からの入力のみならず皮質ニューロン自体の活動も大脳皮質の可塑的な変化の方向を決めるのに重要だということを意味している (Neuron 22, 375-381, 1999に発表)。次に、片目遮蔽によって縮小したコラムをBDNFが再び拡大できるかどうかを調べた (図8)。そのため、片眼を遮蔽した仔ネコ視覚野にBDNFをミニポンプを使って持続的に注入した。その結果、BDNFは遮蔽眼から入力を受けるコラムも、受けないコラムも共に拡大することを見出した。ただし、このような変化は臨界期を過ぎた成熟ネコでは見られなかった (図9)。この結果は、臨界期における視覚野コラムの変化にBDNFが関与していることを示唆している (J. Neurosci. 20, RC57, 1-5, 2000に発表)。

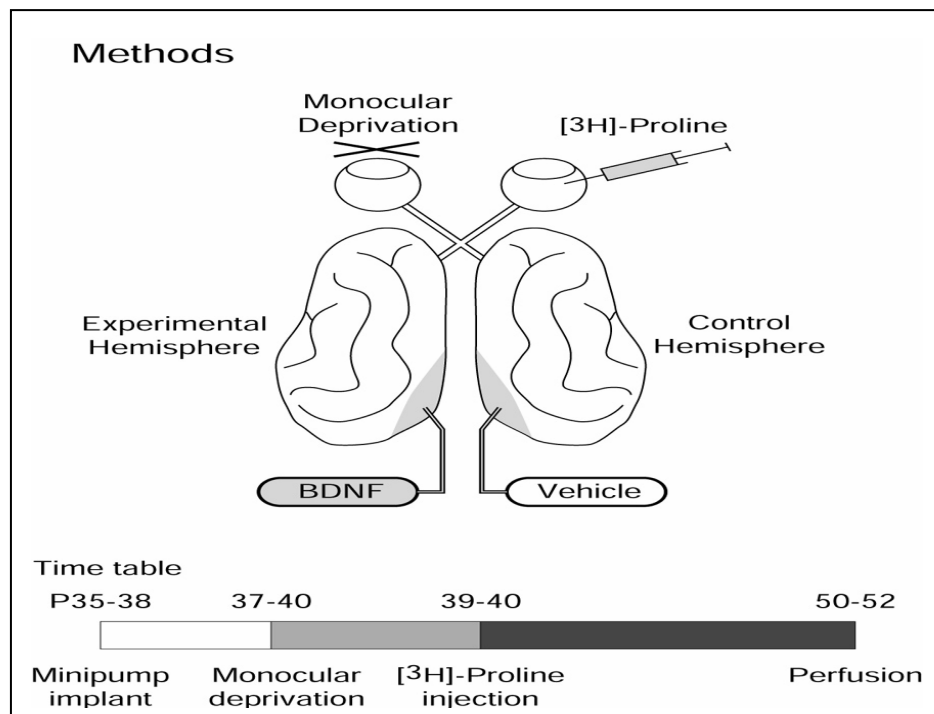


図8. 大脳皮質視覚野の眼優位コラムに対するBDNFの作用を調べるための実験標本。眼優位コラムは一侧の眼球へ³Hで標識したアミノ酸(proline)を注入し autoradiographyによって可視化する。下の横棒は実験の時間経過を示す。

7) BDNF蛋白質発現の生後発達と入力依存性

大脳視覚野における神経栄養因子蛋白質の発現が、発達や神経活動に関連して変化するかどうかを明らかにするため、フェレットを使用してBDNF等のニューロトロフィン蛋白質の定量を行った (図10)。両眼球にNa⁺チャネルのブロッカー、Tetrodotoxin

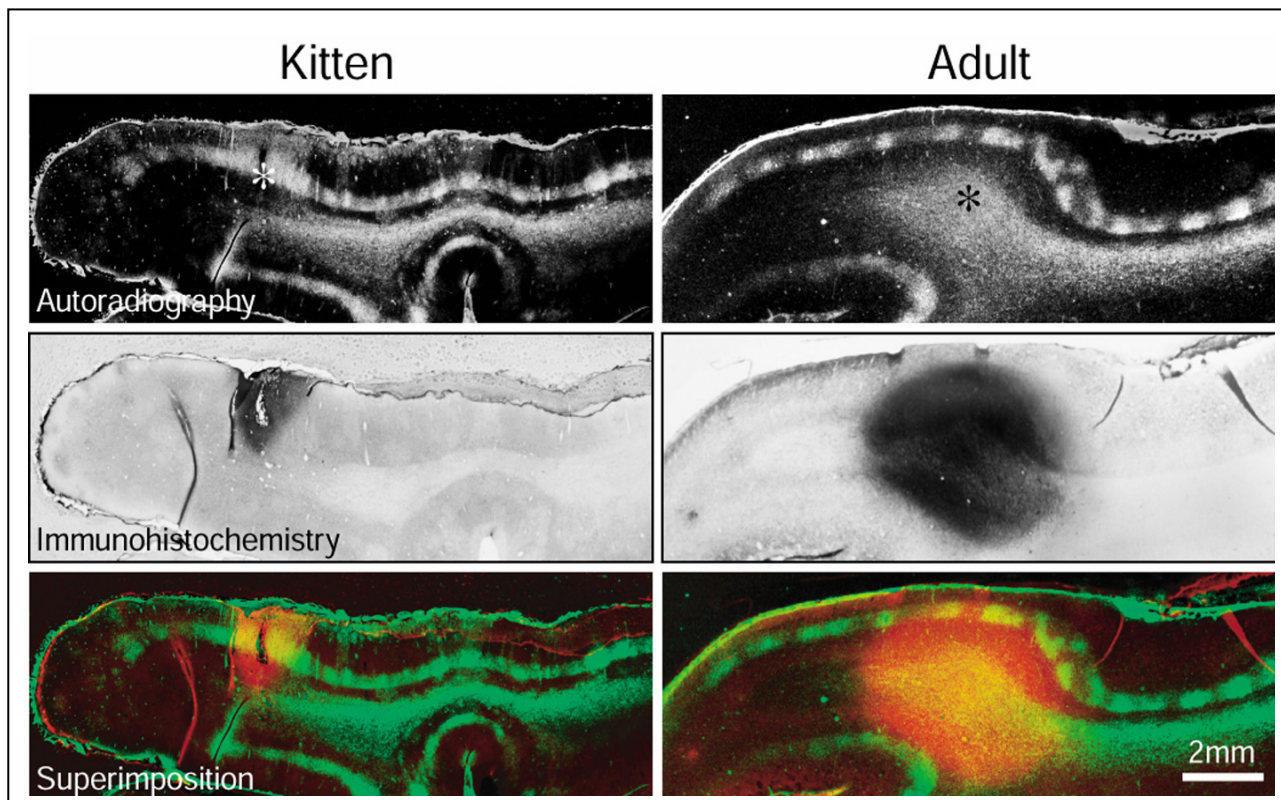


図9. 仔ネコ（左）と成ネコ（右）の大腦皮質視野IV層（白黒が交互に連なる帯状の層）における眼優位コラムとBDNFが浸透した領域（中段の黒い部分）におけるコラムの拡大（仔ネコにだけみられる）。

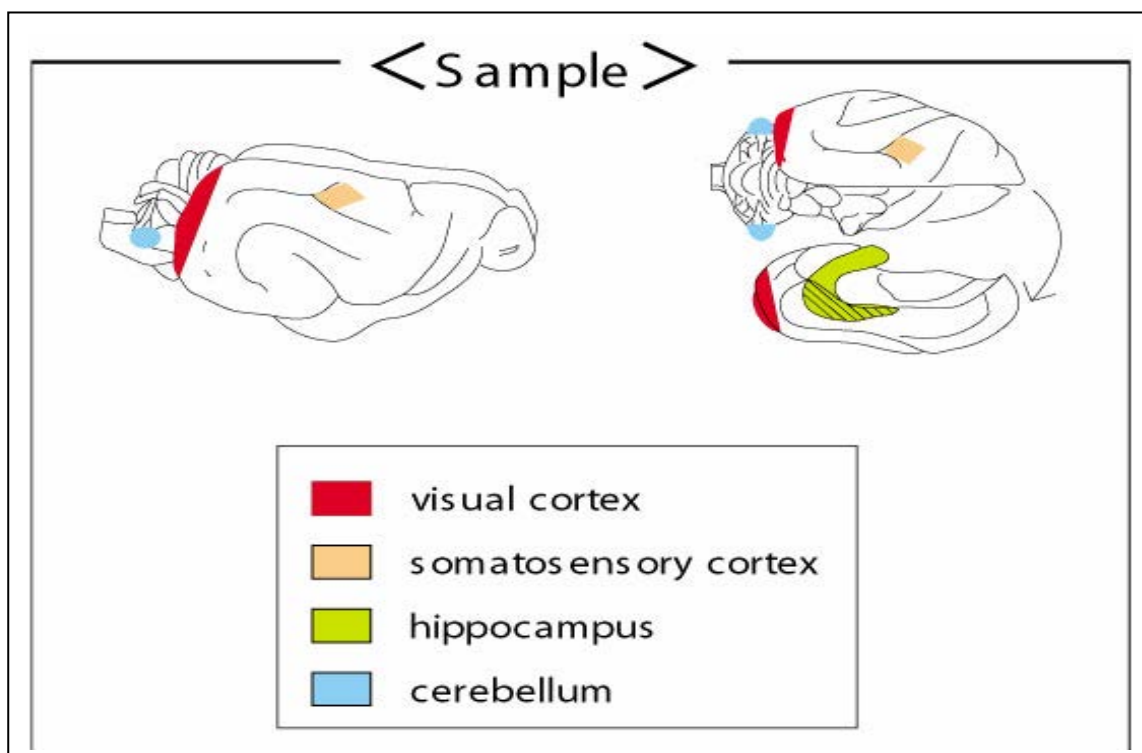


図10. 各ニューロトロフィン蛋白質の定量を行ったフェレットの脳領域。
右上の矢印は海馬を露出するために回転した大腦半球内側面を示す。

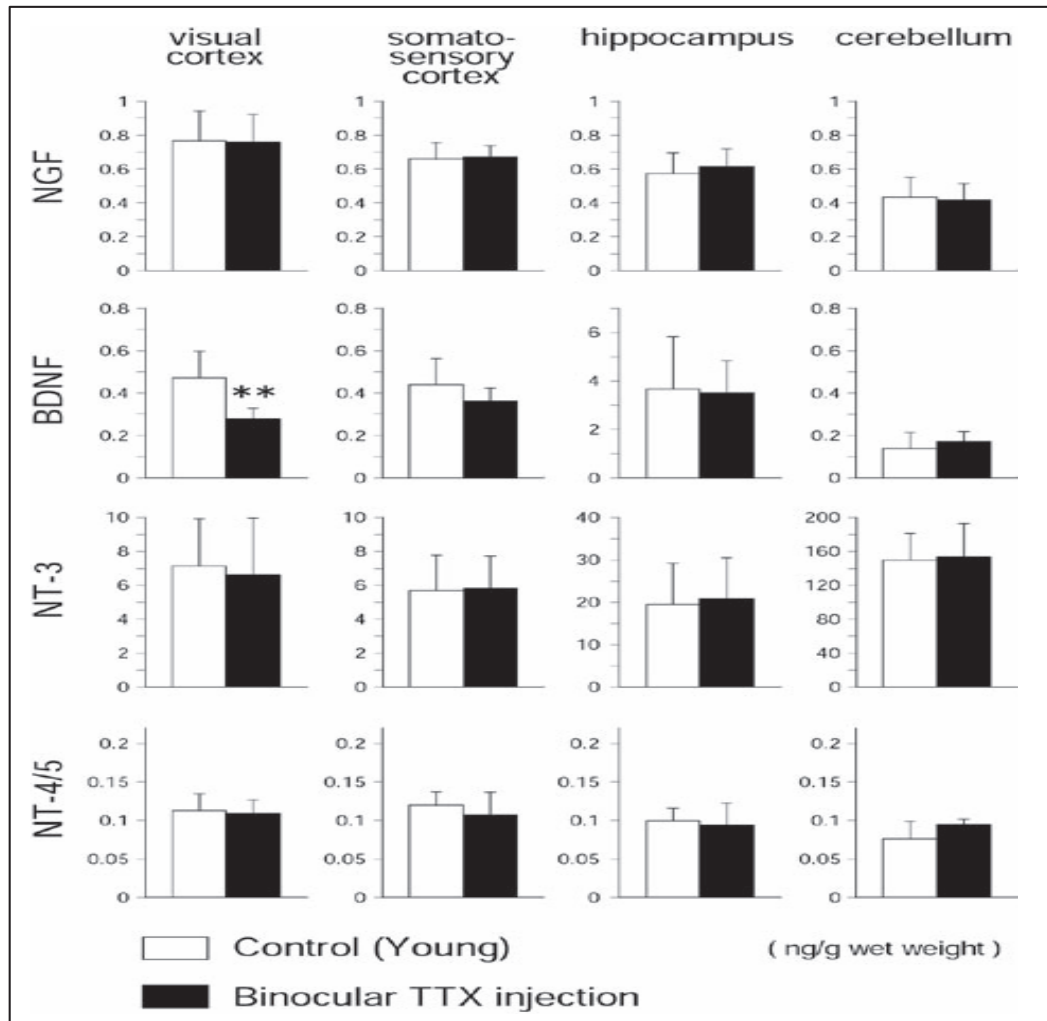


図11. それぞれの領域における各ニューロトロフィン量の視覚入力遮断による変化。

(TTX)、を注入し両眼からの入力を遮断したところ、視覚野においてBDNF量の有意な減少が認められた（図11）。しかし、視覚と直接関係しない体性感覚野、海馬、小脳ではそのような減少は見られなかった。また、TTXを片眼にのみ注入する実験を行ったところ、BDNF量は減少したが、その程度は両眼への注入実験における減少量の約半分に留まった。この結果は、BDNF蛋白質の発現が入力活動に依存していることを示している（Neuroscience 117, 361-371, 2003に発表）。

8) 生後発達にともなう視床一皮質投射線維髄鞘化の機能的意義

視床一大脳皮質投射線維の髄鞘化は一次感覚野では早く生じ、連合野では遅く生じることから髄鞘化は大脳各領域の機能発達に関与していると考えられてきた。本研究

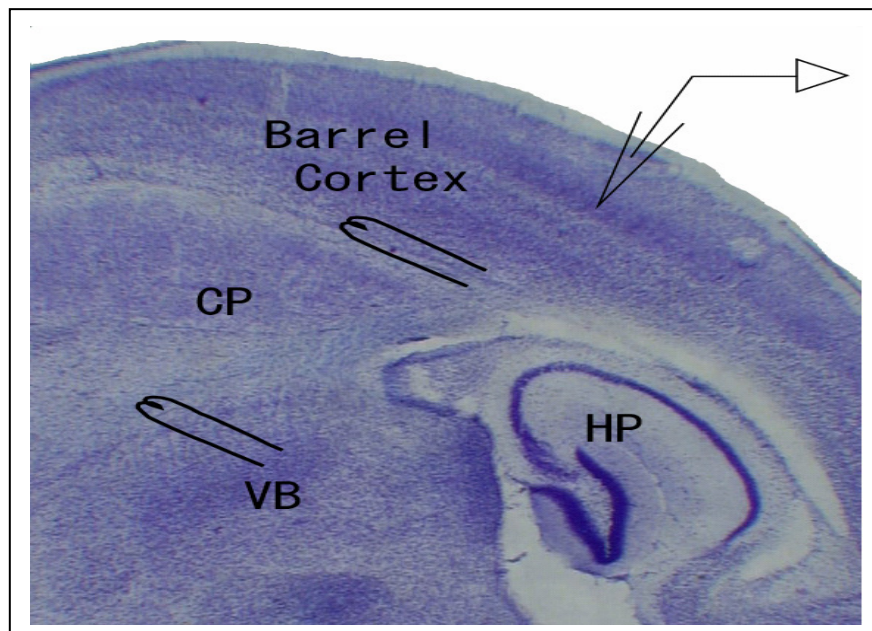


図12. 髭の感覚情報を処理する視床中継核 (VB) と barrel cortex を共に含むスライス標本における刺激電極と記録電極の配置を示す。HP, hippocampus. CP, caudate-putamen.

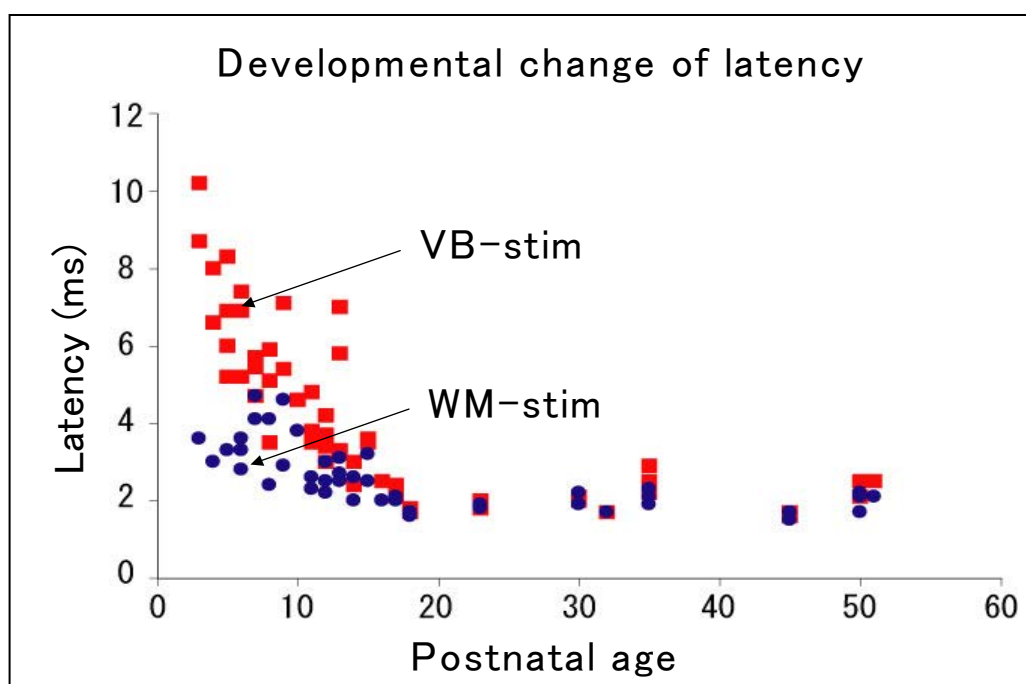


図13. 視床VB核及び白質 (WM) 刺激に対する大脳Barrel Cortexの反応潜時の生後発達にともなう変化。横軸は日齢を示す。

では体性感覚野の髯の領域、barrel cortex, と視床を含むスライス標本を作製し、視床—大脳皮質投射線維の伝導速度を電気生理学的に、髄鞘化の程度を形態学的に解析した。その結果、髄鞘化が生じる時期や髄鞘化の強弱は、発達によって伝導距離が異なる経路を上行してくる情報を大脳皮質でタイミングを揃えるために重要であることを示す知見を得た。この知見は、髄鞘化の遅速が大脳皮質各領域の機能発達の相違に関連しているという古くからの概念に新しい見方をもたらしたものである (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 6174-6179, 2003 に発表)。

9) 視覚野ニューロン光反応性変化へのシナプス長期増強の関与

シナプス長期増強が片目遮蔽後に生ずる視覚野の機能と構造の変化に実際に関与しているかどうかを直接調べるため、可塑性の高い時期（生後 4～6 週）の仔ネコの視神経に慢性刺激電極を設置し、片方にのみ長期増強を起こす高頻度（バースト）刺激を 2 日間、間欠的に与えた（図14）。その後、この仔ネコを麻酔非動化し、視覚野ニューロンがどちらの眼に強く反応するようになったかを光刺激に対する皮質ニュー

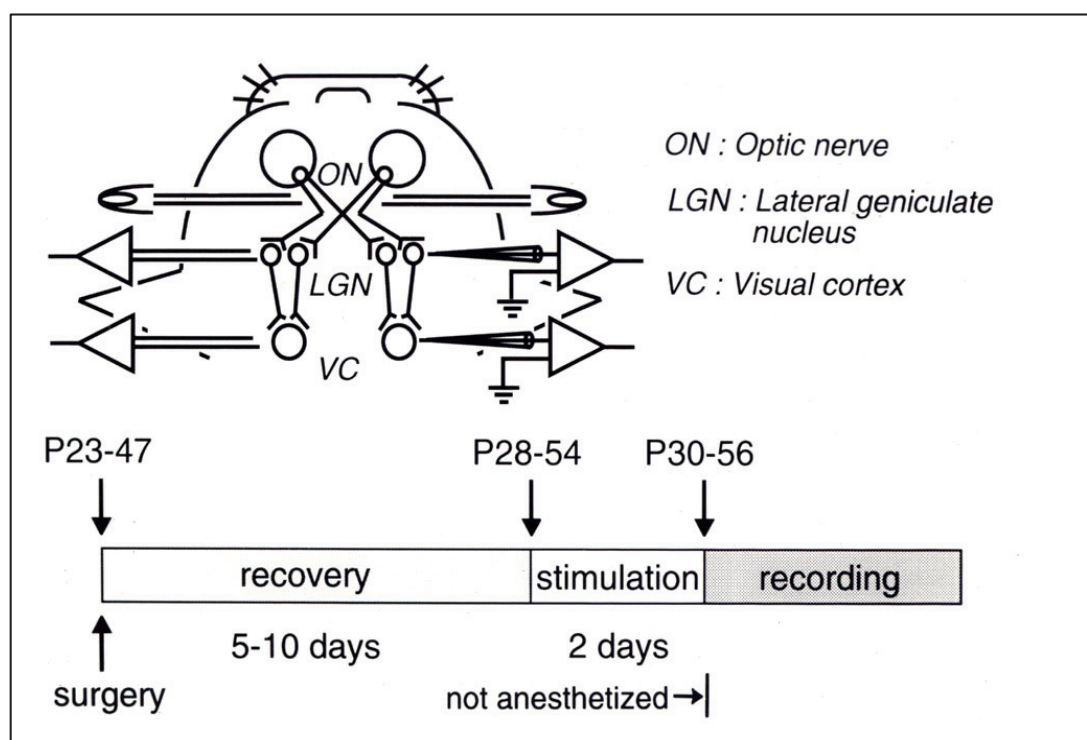


図14. 一側の視神経慢性刺激による視覚野ニューロン光反応性変化を調べるための標本。下の横棒は実験の時間経過を示す。

ロンのスパイク応答記録法によって調べた。その結果、ほとんどの例で皮質ニューロンは高頻度刺激を与えた側の眼により強く反応するようになっていた (図15)。この知見は、電気刺激という人工的刺激によって生じた長期増強が光反応性という視覚野ニューロンの生理的性質の変化に関与している可能性を示したものである (J. Neurophysiol., 88, 2147-2151, 2002に発表)。

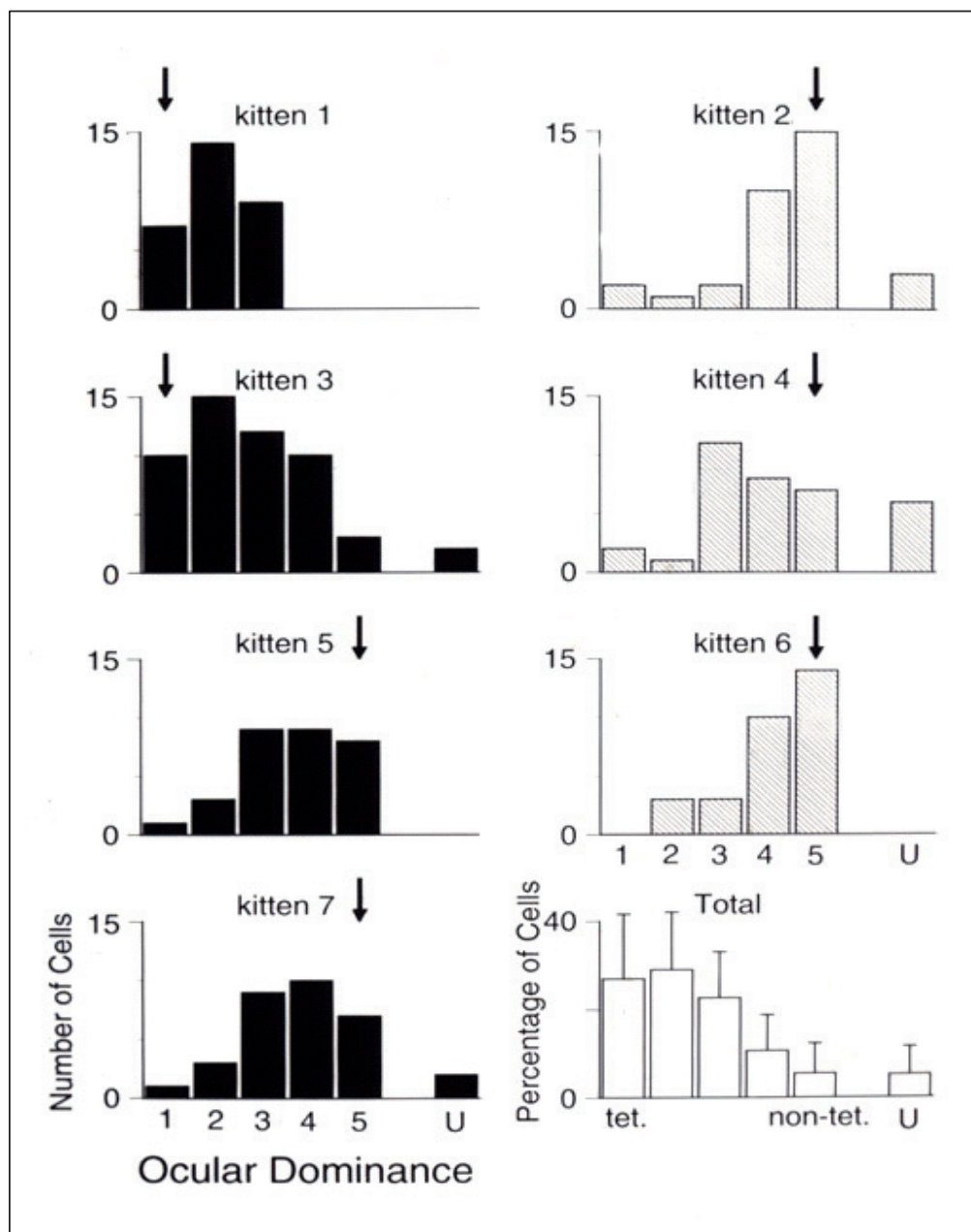


図15. 視神経慢性刺激後の視覚野ニューロン両眼反応性。黒ヒストグラムは二重盲検で記録したデータを示す。矢印は慢性テタヌス刺激を与えた側を示す。横軸の1と5は対側或は同側の眼にのみ反応する細胞、3は両眼に等しく反応する細胞、2と4はそれぞれの眼に偏って反応する細胞を示す。Uは光に反応しない細胞。右下は全体の平均値と標準偏差を示す。

10) シナプス長期抑圧における蛋白質脱リン酸化酵素の役割

シナプス長期抑圧に蛋白質脱リン酸化酵素である calcineurin (Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein phosphatase) が関与しているという仮説を検証するため calcineurin の基質に蛍光標識物質をつけた蛍光マーカーを作製し、皮質の錐体細胞に注入した。長期抑圧を起こす 1Hz の連続刺激を 15 分間続けると calcineurin が活性化すること、長期増強を起こす高頻度刺激では活性化しないことを見出した。また、活性化は樹状突起上のシナプス部位で特に顕著であった。これらの結果から、calcineurin の関与を確認するとともに長期抑圧を起こすのに長時間の低頻度刺激を要する理由を明らかにした (Europ. J. Neurosci. 17, 287-297, 2003 に発表)。

(2) 研究成果の今後期待される効果

前述したように、蛍光蛋白質と特定の機能蛋白質の連結遺伝子を組み込んだプラスミドを培養神経細胞の核内に直接注入し、蛍光標識された機能蛋白質を生きた神経細胞内に発現させることに成功した。この結果は、中枢神経細胞では初めて成功例であり、このプラスミド核内直接注入法はねらった神経細胞内で特定蛋白質の動態や分布を観察できる技術として注目された。さらに、BDNF がシナプス前部からシナプス後細胞に活動依存的に移行するというこの方法で得られた知見は、神経栄養因子に関する従来の想定を逆転させたもので、神経科学研究に大きなインパクトを与えた。

また、全ての体細胞が蛍光蛋白質を発現する遺伝子改変マウスと特定の蛋白質を欠落しているノックアウトマウスの神経細胞からなるキメラ培養標本の開発に成功したことは、神経回路網における特定の分子の機能を解明する新しい方法として高く評価されている。事実、この方法によって我々は、シナプス前より移行してきた BDNF が GABA ニューロンの発達に大きな影響を与えることを明らかにすることができた。この知見は、従来独立に研究されてきた GABA と BDNF の脳機能発達における作用を結びつけるものであり、脳発達研究に大きなインパクトを与えた。

脳内で機能している複雑な神経回路網を培養皿や電極基盤上に作り上げることは神経生物学者の夢の一つであった。それは、そのような標本では、神経結合ができるメ

カニズム、さらにはできた結合のなかで頻回使用の回路は強化され活動しない回路は退行するといったシナプス競合仮説の検証やそれに関与する物質を比較的容易に明らかにすることができるからである。上述したように、本研究が開発した方法によってこのような標本の確実な作製が期待され、自己組織、自己修復可能なバイオ人工神経回路、或いはバイオデバイスの開発につながり、それを組み込んだ新しい製品やシステムの創出として社会に還元できる可能性がある。

神経活動自身や生後環境からの入力による神経回路網改変メカニズムは、ヒトを含めた高等哺乳類の脳機能、特に高次脳機能、が完全に遺伝的支配によらない自由度をもつ基盤であるとされている。したがって、生後入力や神経活動が神経回路網改変に関与しているメカニズムが明らかになれば、発達脳科学のみならず発達心理学や教育学等の人文科学や社会科学にも強いインパクトを与えられると思われる。

3.2 畠中・山田・小島グループ

(1) 研究内容及び成果

BDNFとGFPの連結遺伝子を組み込んだプラスミドベクターを作製し、lipofection法によってGFPで標識されたBDNFをマウス海馬培養ニューロンに発現させた。その結果、BDNFは神経細胞の興奮によって放出されることを示唆する知見を得た (J. Neurosci. Res. 64, 1-10, 2001 に発表)。また、BDNFは興奮性伝達物質であるグルタミン酸やアスパラギン酸の軸索終末からの放出を促進することも見出した (J. Neurosci. Res. 66, 96-108, 2001 に発表)。さらに、BDNFの single nucleotide polymorphism (SNP) に関する研究を行った。その結果、BDNFのプロドメインにおいてValをMetにアミノ酸置換を引き起こすSNPは、海馬神経細胞からのBDNFの放出を阻害し、ヒトの Episodic Memoryを低下させることを発見した (Cell 112, 257-269, 2003に発表)。

(2) 研究成果の今後期待される効果

ヒトにおけるBDNF遺伝子の変異が1アミノ酸置換を起こし、それがBDNFの神経活動依存的放出能を変えて、その結果ある種の記憶能力に違いを生じるという発見は、

記憶の分子メカニズム解明に重要な手掛かりを与えた研究と思われる。しかし、その意義以上に、このSNP研究はヒトの種々の能力の個人差を分子生物学的に明らかにできる可能性を示したもので、SNP研究の重要な意義を示した画期的のものと思われる。この研究を契機として単に神経栄養因子に留まらず他の遺伝子のSNP研究も進展し、高次脳機能の個人差の分子生物学的基盤が明らかになることが期待される。

3.3 Henschグループ

(1) 研究内容及び成果

当グループは種々の遺伝子改変マウスを使って、片眼遮蔽後に視覚野ニューロンに生じる眼優位性変化を指標として発達脳視覚野の可塑性のメカニズム解明を目指した。前述したように、BDNFノックアウトマウスは致死的であったので使用を中止し、GABA合成酵素 (GAD65) ノックアウトマウスを使用し発達脳視覚野の可塑性におけるGABA抑制の役割解明を試みた。その結果、視覚野可塑性の臨界期（片目遮蔽によって皮質ニューロンの両眼反応性が変化する生後の一定の時期）はGABA抑制によって制御されていることを見出した (Nature 404, 183-186, 2000 に発表)。すなわち、GAD65ノックアウトマウスでは、臨界期がみられないが、GABA (A型) 受容体の作用を強める薬物 (Diazepam) を投与すると臨界期が早くなることを見出した。さらに、野生型マウスでも光刺激なしの暗闇で飼育すると臨界期の終止が延びることが知られていたが、その場合でもDiazepamを投与すると臨界期の終止が早くなることを見出した (J. Neurosci. 23, 6695-6702, 2003 に発表)。これらの知見は発達脳の可塑性の発現や終止にGABA抑制が関与していることを示したものである。

(2) 研究成果の今後期待される効果

外界からの入力によって脳内神経回路網が変わり易い時期、いわゆる“臨界期”、の開始及び終止にGABA抑制が関与しているという発見は臨界期のメカニズム解明に重要な糸口を与えたのみならず、臨界期の終止を実験的に操作し、大人の脳に高い可塑性を回復する治療法を開発する契機となることが期待される。

3.4 仙波グループ

(1) 研究内容及び成果

当研究グループは各種神経栄養因子抗体の作製及び各種神経栄養因子蛋白量の測定を目指してきたが、本研究において、BDNFの組織染色用抗体や生物活性を阻害する抗体の作製、およびNeurotrophin-4 (NT4) の酵素免疫測定系の確立に成功した。また、このNT4の酵素免疫測定系とこれまでに確立している他のニューロトロフィンの酵素免疫測定系や抗体を用いて、ニューロトロフィンの脳における動態や機能について調べ、Neurotrophin-3 (NT3) が小脳において顆粒細胞の生存と増殖を制御することを見出した (J. Neurochem. 74, 1923-1930, 2000 に発表)。一方、NT4は、胎生期には中脳や後脳の神経細胞に、成体では脳幹の神経細胞に局在することを明らかにした (J. Neurochem. 86, 660-668, 2003 に発表)。海馬のBDNFの合成がリルゾールによって促進され、その連続投与により海馬顆粒細胞の分裂が促進されることを見出した (FASEB J. 16, 1328-1330, 2002 に発表)。さらに、痙攣誘発物質によってBDNFが増加すること、及びこの増加には電位依存性カルシウムチャンネルが関与していることを見出した (J. Neurochem. 77, 71-83, 2001 に発表)。

(2) 研究成果の今後期待される効果

NT4蛋白量の酵素免疫測定系を世界にさきがけて確立したので、いままでBDNFに比して知見の乏しかったNT4の脳内における局在や入力にともなう変化を明らかにできるものと思われる。その結果、BDNFと受容体を共有しながらその機能の明確でなかったNT4の機能的役割が明確になることが期待される。

3.5 川名・鳥光グループ

(1) 研究内容及び成果

本研究グループは、64チャンネルプレナー型アレイ微小電極による神経活動計測法、及び同電極に対する酵素反応系の積層によるグルタミン酸放出分布計測法を開発した。この方法を用いて、ラット大脳皮質及び海馬の分散培養系において、BDNF及びNGF

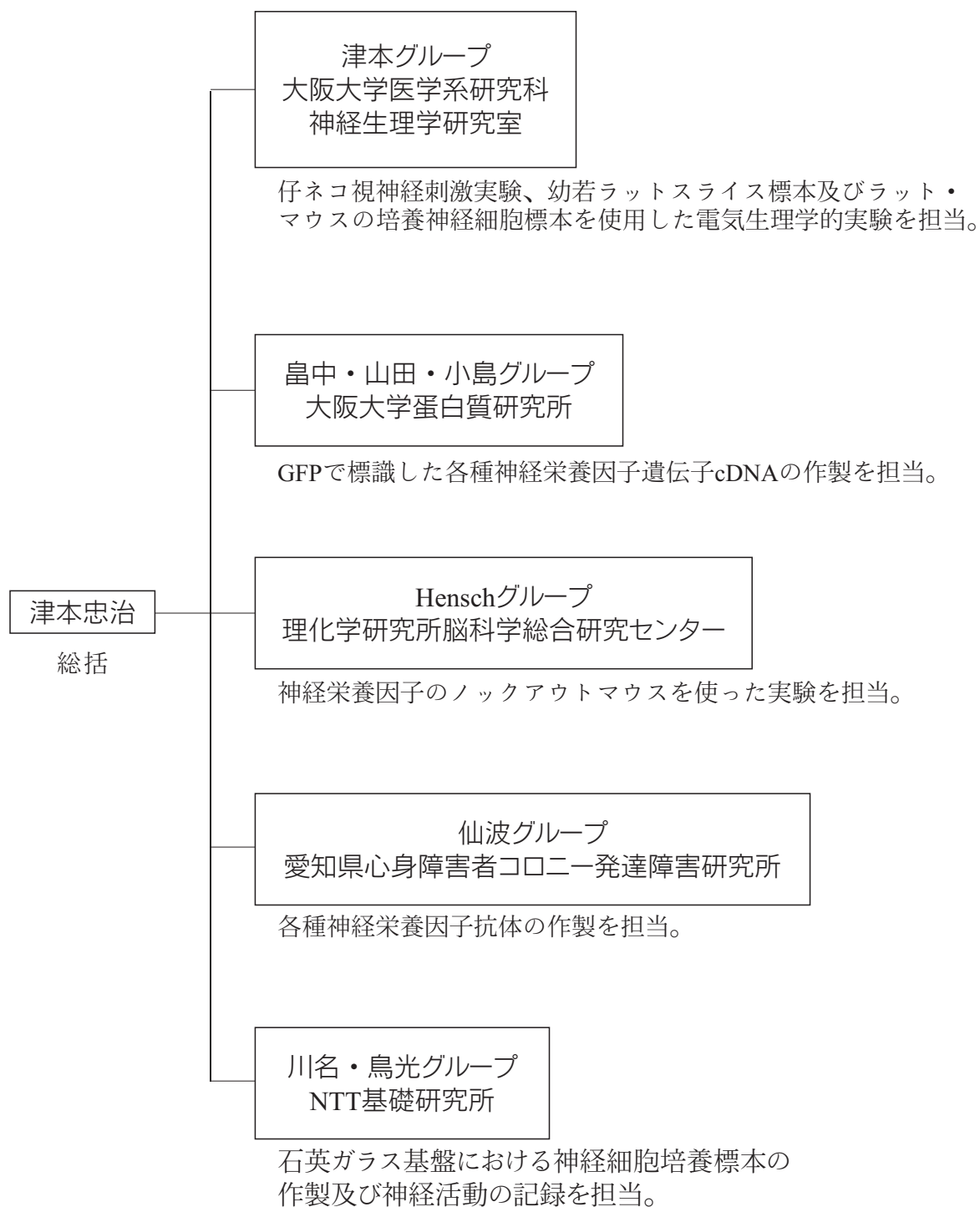
が一過性のシナプス活動の顕著な増加を起こすことを見出した (Neural Dev. 2, 474-480, 1999等に発表)。また、この時、細胞内カルシウム濃度の増加に伴い、グルタミン酸の一過性放出が観測された。チロシンキナーゼの阻害剤やカルシウムに対する依存性、活動的シナプス前終末に取り込まれる蛍光色素の挙動を比較することにより、この放出がBDNF, NGF誘起性であり、シナプス活動に依存しているものであることが確認された (Analytical Sci. 18, 1325-1327, 2002等に発表)。さらに、海馬スライスにおける神経活動やグルタミン酸放出の計測を試みた。その結果、刺激誘起性のグルタミン酸放出がスパイク頻度の増加に伴って起こり、その放出が、グルタミン酸受容体の阻害剤添加により、CA1, CA3の各領域において異なることを見出した (Neurosci. Lett. 304, 112-116, 2001等に発表)。これらの結果から、放出においてCA1ではNMDA受容体が、CA3ではnon-NMDA受容体が支配的であることが示唆された。

(2) 研究成果の今後期待される効果

64チャンネルプレーナ型アレイ微小電極の上で神経細胞の分散培養に成功したことにより神経回路網において多数の神経細胞の活動を同時にまた実時間で計測することが可能となった。従来の研究で、BDNFは興奮性細胞への興奮性入力には促進的作用、抑制性入力には抑圧的作用、抑制性細胞への興奮性入力には抑圧的作用を示すことが明らかとなっているが、このような多様な作用が実際の神経回路網にどのような影響を及ぼすかは従来の標本では観察できなかった。この多数の神経細胞の活動を同時に実時間で計測することのできる標本の開発によってシステム全体の動作に対するBDNF等の活性物質の作用を明らかにできることが期待される。

4. 研究実施体制

(1) 体制



(2) メンバー表

① 津本グループ（培養神経細胞実験、スライス標本実験、*in vivo*標本実験）

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
津本 忠治	大阪大学大学院 医学系研究科	教授	総括	平成10年10月～ 平成15年11月
木村 文隆	大阪大学大学院 医学系研究科	助教授	培養神経細胞実験	平成10年10月～ 平成15年11月
畠 義郎	大阪大学大学院 医学系研究科	助教授	仔ネコ実験	平成10年10月～ 平成13年 3月
安田 浩樹	大阪大学大学院 医学系研究科	助手	スライス標本実験	平成10年10月～ 平成15年11月 (平成12年1月から 14年8月までの間、 米国留学にて不在)
茜谷 行雄	大阪大学大学院 医学系研究科	助手	スライス標本実験	平成12年 4月～ 平成15年11月
久村 英嗣	大阪大学医学部	基礎系医員	培養神経細胞実験	平成10年10月～ 平成11年 3月
大島 稔	科学技術振興事業団	CREST研究員	仔ネコ実験	平成10年10月～ 平成13年 3月
木下秀一郎	大阪大学医学部	大学院生	スライス標本実験	平成10年10月～ 平成12年 3月
谷口 暢章	大阪大学医学部	大学院生	培養神経細胞実験	平成10年10月～ 平成12年 3月
宇野 里砂	大阪大学医学部	大学院生	スライス標本実験	平成10年10月～ 平成12年3月
高田 直樹	大阪大学医学部	大学院生	培養神経細胞実験	平成10年10月～ 平成13年 3月
一坂 吏志	科学技術振興事業団 大阪大学大学院 医学系研究科	研究補助員 学術振興会 研究員	栄養因子定量実験	平成10年10月～ 平成13年 3月

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
惣谷 和広	大阪大学大学院 医学系研究科	学術振興会 研究員	スライス標本実験	平成11年 4月～ 平成15年12月
北村 明彦	科学技術振興事業団	CREST研究員	培養神経細胞実験	平成11年 4月～ 平成15年12月
亀山 克朗	科学技術振興事業団	CREST研究員	仔ネコ実験	平成11年 4月～ 平成15年12月
安達 直樹	科学技術振興事業団	CREST研究員	栄養因子定量実験	平成14年 4月～ 平成15年12月
森島美絵子	科学技術振興事業団	研究補助員 大学院生	スライス標本実験	平成11年 4月～ 平成14年3月
丸山 篤史	大阪大学大学院 医学系研究科	大学院生	培養神経細胞実験	平成13年 4月～ 平成15年12月
柳沢 琢史	大阪大学医学部	学部生	培養神経細胞実験	平成14年 4月～ 平成15年12月
黄 艶	大阪大学大学院 医学系研究科	大学院生	スライス標本実験	平成15年 4月～ 平成15年12月
蔣 斌	科学技術振興事業団	CREST研究員	スライス標本実験	平成12年 4月～ 平成15年 8月
小原 圭吾	科学技術振興事業団	CREST研究員	培養神経細胞実験	平成12年 4月～ 平成16年 3月
Mahmoud Salami	科学技術振興事業団	CREST研究員	スライス標本実験	平成12年 4月～ 平成12年10月
蔣 敏海	科学技術振興事業団	CREST研究員	仔ネコ実験	平成13年 4月～ 平成14年 9月
Mohammad Reza Palizvan	科学技術振興事業団	CREST研究員	培養神経細胞実験	平成14年 4月～ 平成14年 7月
小島 正己	産業技術総合 研究所	研究員	培養神経細胞実験	平成15年 4月～ 平成15年12月
西田めぐみ	科学技術振興事業団	研究補助員	培養実験補助	平成12年 4月～ 平成15年12月
上田 亜樹	科学技術振興事業団	研究補助員	実験補助	平成11年 4月～ 平成12年 3月

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
佐納 美保	科学技術振興事業団	研究補助員	研究データの 収集・解析	平成12年 4月～ 平成13年12月
足羽 美恵	科学技術振興事業団	チーム事務員	経理事務	平成11年 3月～ 平成15年12月

② 畠中・山田・小島グループ（GFPで標識した各種神経栄養因子遺伝子cDNAの作製）

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
畠中 寛	大阪大学蛋白質 研究所	教授	ウィルスベクターの 作製	平成10年10月～ 平成13年 5月
山田 雅司	大阪大学蛋白質 研究所	助手	マウスの ジェノタイプピング	平成10年10月～ 平成14年 3月
荒木 敏行	大阪大学蛋白質 研究所	大学院生	ウィルスベクターの 作製	平成10年10月～ 平成12年 3月
小清水久嗣	大阪大学蛋白質 研究所	大学院生	ウィルスベクターの 作製	平成12年10月～ 平成13年 3月
小島 正己	大阪工業技術研究所 有機機能材料部	研究員	培養神経細胞実験	平成11年10月～ 平成13年 3月
（畠中教授は平成13年5月に急逝、引き継いだ山田助手が米国に留学したため小島研究員が引き継ぐ。）				

③ Henschグループ（神経栄養因子のノックアウトマウスを使った実験）

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
T. Hensch	理研脳科学総合 研究センター	グループ リーダー	ノックアウトマウスによる 神経栄養因子機能の解析	平成10年10月～ 平成15年12月

④ 仙波グループ（各種神経栄養因子抗体の作製）

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
仙波りつ子	愛知県心身障害者 コロニー	研究室長	抗ニューロトロフィン抗 体の作製・微量定量 法の開発	平成10年10月～ 平成15年12月
池田めぐみ	科学技術振興事業団	研究補助員	実験補助	平成11年 4月～ 平成13年 6月
山田 敦子	科学技術振興事業団	研究補助員	実験補助	平成12年 6月～ 平成12年 9月
宮崎 則子	科学技術振興事業団	研究補助員	実験補助	平成13年 7月～ 平成15年12月

⑤ 川名・鳥光グループ（石英ガラス基盤における神経細胞培養標本の作製及び神経活動の記録）

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
川名 明夫	NTT基礎研究所	グループ リーダー	培養神経細胞標本 の作製とシナプス可 塑性の解析	平成10年10月～ 平成11年 3月
鳥光 慶一	NTT基礎研究所	グループ リーダー	培養神経細胞標本 の作製とシナプス前 終末変化の解析	平成11年 4月～ 平成15年12月
古川由里子	科学技術振興事業団	研究補助員	培養実験補助	平成12年 4月～ 平成15年12月

⑥ 畠グループ（仔ネコ等の*in vivo*標本を使って、大脳視覚野におけるコラム形成への神経栄養因子の関与を解明する実験）

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
畠 義郎	鳥取大学大学院 医学系研究科	教授	<i>in vivo</i> 実験	平成13年 4月～ 平成15年12月
一坂 吏志	鳥取大学医学部	助手	<i>in vivo</i> 実験	平成13年 4月～ 平成15年12月
高村 明孝	鳥取大学大学院 医学系研究科	大学院生	<i>in vivo</i> 実験	平成15年 7月～ 平成15年12月

（畠義郎が平成13年4月より鳥取大学大学院医学系研究科の教授に赴任したため、津本グループより独立した）

5. 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2002年8月 29、30日	Japan-UK Workshop "From Molecules to Memory 2002"	奈良県新公会堂	約200人	脳の可塑性に関する 最新の知見を発表し 情報交換を行った。

(2) 招聘した研究者等

氏名（所属・役職）	招聘の目的	滞在先	滞在期間
Hugh P. C. Robinson（英国ケンブリッジ大学生理学研究所・講師）	微小電極アレイを用いた電気生理測定に関する討論及び実験のため。	NTT基礎研究所 機能物質科学部	平成11年3月14日～ 平成11年3月27日
伊丹千晶（国立精神神経センター・センター研究員）	視床-皮質投射経路を含む標本の作製方法を学び、共同実験を行うため。	大阪大学医学部 神経生理研究室	平成11年8月30日～ 平成11年9月30日
Zafar Bashir（英国ブリストル大学皮質可塑性研究グループ・グループ長）	Japan-UK Workshop From Molecules to Memory 2002に参加し、口演及び情報交換を行うため。	奈良県新公会堂	平成14年8月26日～ 平成14年8月31日
Timothy V. B. Bliss（英国王立医学研究所神経科学グループ・グループ長）	Japan-UK Workshop From Molecules to Memory 2002に参加し、口演及び情報交換を行うため。	奈良県新公会堂	平成14年8月21日～ 平成14年8月31日
Graham L. Collingridge（英国ブリストル大学医学部解剖学部門・教授）	Japan-UK Workshop From Molecules to Memory 2002に参加し、口演及び情報交換を行うため。	奈良県新公会堂	平成14年8月27日～ 平成14年8月31日
Jeremy Henley（英国ブリストル大学分子神経科学・教授）	Japan-UK Workshop From Molecules to Memory 2002に参加し、口演及び情報交換を行うため。	奈良県新公会堂	平成14年8月26日～ 平成14年8月31日

氏名（所属・役職）	招聘の目的	滞在先	滞在期間
Emilie Ann Marcus（雑誌"Neuron" 編集長）	From Molecules to Memory 2002に参加し、情報交換を行う。また大阪大学医学系研究科において講演を行い、情報交換を行うため。	奈良県新公会堂 大阪大学大学院 医学系研究科	平成14年8月27日～ 平成14年9月 3日
宮下保司（東京大学医学系研究科・教授）	From Molecules to Memory 2002に参加し、口演及び情報交換を行うため。	奈良県新公会堂	平成14年8月28日～ 平成14年8月31日
尾藤晴彦（京都大学医学系研究科・講師）	From Molecules to Memory 2002に参加し、口演及び情報交換を行うため。	奈良県新公会堂	平成14年8月28日～ 平成14年8月30日
真鍋俊也（神戸大学医学系研究科・教授）	From Molecules to Memory 2002に参加し、口演及び情報交換を行うため。	奈良県新公会堂	平成14年8月28日～ 平成14年8月31日
狩野方伸（金沢大学医学系研究科・教授）	From Molecules to Memory 2002に参加し、口演及び情報交換を行うため。	奈良県新公会堂	平成14年8月28日～ 平成14年8月31日
三品昌美（東京大学医学系研究科・教授）	From Molecules to Memory 2002に参加し、口演及び情報交換を行うため。	奈良県新公会堂	平成14年8月28日～ 平成14年8月30日
中西重忠（京都大学医学系研究科・教授）	From Molecules to Memory 2002に参加し、口演及び情報交換を行うため。	奈良県新公会堂	平成14年8月29日～ 平成14年8月30日
重本隆一（生理学研究所脳形態解析研究部門・教授）	From Molecules to Memory 2002に参加し、口演及び情報交換を行うため。	奈良県新公会堂	平成14年8月29日～ 平成14年8月30日

6. 主な研究成果物、発表等

(1) 論文発表（海外英文、48論文）

津本グループ

1. Itami, C., Kimura, F., Kohno, T., Matsuoka, M., Ichikawa, M., Tsumoto, T and Nakamura, S. (2003) BDNF-dependent unmasking of "silent" synapses in developing mouse barrel cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 13069-13074.
2. Kohara, K., Kitamura, A., Adachi, N., Nishida, M., Itami, C., Nakamura, S. and Tsumoto, T. (2003) Inhibitory, but not excitatory cortical neurons require presynaptic BDNF for dendritic development, as revealed by chimera cell culture. *J. Neurosci.*, **23**, 6123-6131.
3. Jiang, B., Akaneya, Y., Hata, Y. and Tsumoto, T. (2003) Long-term depression is not induced by low frequency stimulation in rat visual cortex *in vivo*: A possible preventing role of endogenous BDNF. *J. Neurosci.*, **23**, 3761-3770.
4. Salami, M., Itami, C., Tsumoto, T and Kimura, F. (2003) Change of conduction velocity by regional myelination yields constant latency irrespective of distance between thalamus and cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 6174-6179.
5. Akaneya, Y., Altinbaev, R. S., Bayazitov, L.T., Kinoshita, S., Voronin, L.L. and Tsumoto, T. (2003) Low-frequency depression of synaptic responses recorded from rat visual cortex. *Neuroscience*, **117**, 305-320.
6. Ichisaka, S., Katoh-Semba, R., Hata, Y., Ohsima, M., Kameyama, K. and Tsumoto, T. (2003) Activity-dependent changes in the protein level of brain-derived neurotrophic factor but no change in other neurotrophins in the visual cortex of young and adult ferrets. *Neuroscience*, **117**, 361-371.
7. Katoh-Semba, R., Ichisaka, S., Hata, Y., Tsumoto, T., Eguchi, K., Miyazaki, N., Matsuda, M., Takeuchi, I. K. and Kato, K. (2003) Neurotrophin-4 is distributed in limited

- regions of the nervous system in embryonic and adult rats. *J. Neurochem.*, **86**, 660-668.
8. Yasuda, H., Higashi, H., Kudo, Y., Inoue, T., Hata, Y., Mikoshiba, K. and Tsumoto, T. (2003) Imaging of calcineurin activated by long-term depression-inducing synaptic inputs in living neurons of rat visual cortex. *Eur. J. Neurosci.*, **17**, 287-297.
 9. Ohshima, M., Hata, Y., Ichisaka, S., Wakita, M., Fukuda, M., Kameyama, K. and Tsumoto, T. (2002) Chronic, electrical stimulation of afferents from one eye changes ocular dominance of visual cortical neurones in kittens. *J. Neurophysiol.*, **88**, 2147-2151.
 10. Kohara, K., Kitamura, A., Morishima, M. and Tsumoto, T. (2001) Activity-dependent transfer of brain-derived neurotrophic factor to postsynaptic neurons. *Science*, **291**, 2419-2423.
 11. Jiang, B., Akaneya, Y., Ohshima, M., Ichisaka, S., Hata, Y. and Tsumoto, T. (2001) Brain-derived neurotrophic factor induces long-lasting potentiation of synaptic transmission in visual cortex *in vivo* in young rats, but does not in the adult. *Eur. J. Neurosci.*, **14**, 1219-1228.
 12. Hata, Y., Ohshima, M., Ichisaka, S., Wakita, M., Fukuda, M. and Tsumoto, T. (2000) BDNF expands ocular dominance columns in visual cortex in monocularly deprived and non-deprived kittens, but does not in adult cats. *J. Neurosci.*, **20** RC57, 1-5.
 13. Kumura, E., Kimura, F., Taniguchi, N. and Tsumoto, T. (2000) Brain-derived neurotrophic factor blocks long-term depression in solitary neurones cultured from rat visual cortex. *J. Physiol. (Lond.)*, **524**, 195-204.
 14. Taniguchi, N., Takada, N., Kimura, F. and Tsumoto, T. (2000) Actions of BDNF on evoked and spontaneous EPSCs dissociate with maturation of neurones cultured from rat visual cortex. *J. Physiol. (Lond.)*, **527**, 579-592.
 15. Yoshimura, Y., Kimura, F. and Tsumoto, T. (1999) Estimation of single channel conductance underlying synaptic transmission between pyramidal cells in the visual cortex.

Neuroscience, 88, 347-352.

16. Hata, Y., Tsumoto, T. and Stryker, M. P. (1999) Selective pruning of more active afferents when cat visual cortex is pharmacologically inhibited. *Neuron*, **22**, 375-381.
17. Kinoshita, S., Yasuda, H., Taniguchi, N., Katoh-Semba, R., Hatanaka, H. and Tsumoto, T. (1999) Brain-derived neurotrophic factor prevents low-frequency inputs from inducing long-term depression in the developing visual cortex. *J. Neurosci.*, **19**, 2122-2130.
18. Kimura, F., Fukuda, M. and Tsumoto, T. (1999) Acetylcholine suppresses the spread of excitation in the visual cortex revealed by optical recording: possible differential effect depending on the source of input. *Eur. J. Neurosci.*, **11**, 3597-3609.
19. Sato, H., Hata, Y. and Tsumoto, T. (1999) Effects of blocking non-NMDA receptors on visual responses of neurons in the cat visual cortex. *Neuroscience*, **94**, 697-703.

畠中・山田・小島グループ

1. Egan, M.F., Kojima, M., Callicott, J.H., Goldberg, T.E., Kolachana, B.S., Bertolino, A., Zaitsev, E., Gold, B., Goldman, D., Dean, M., Lu, B. and Weinberger, D.R. (2003) The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell*, **112**, 257-269.
2. Suzuki, S., Mizutani, M., Suzuki, K., Yamada, M., Kojima, M., Hatanaka, H. and Koizumi, S. (2002) Brain-derived neurotrophic factor promotes interaction of the Nck2 adaptor protein with the TrkB tyrosine kinase receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **294**, 1087-1092.
3. Numakawa T, Yamagishi S, Adachi N, Matsumoto T, Yokomaku D, Yamada M, Hatanaka H. (2002) Brain-derived neurotrophic factor-induced potentiation of Ca(2+) oscillations in developing cortical neurons. *J Biol Chem.*, **277**, 6520-6529.
4. Yamada M, Numakawa T, Koshimizu H, Tanabe K, Wada K, Koizumi S, Hatanaka H. (2002) Distinct usages of phospholipase C gamma and Shc in intracellular signaling

stimulated by neurotrophins. *Brain Res.*, 955, 183-190.

5. Matsumoto, T., Numakawa, T., Adachi, N., Yokomaku, D., Yamagishi, S., Takei, N. and Hatanaka, H. (2001) Brain-derived neurotrophic factor enhances depolarization-evoked glutamate release in cultured cortical neurons. *J. Neurochem.*, **79**, 522-530.
6. T. Numakawa, T. Matsumoto, N. Adachi, D. Yokomaku, M.. Kojima, N. Takei, and H. Hatanaka, (2001) Brain-driven neurotrophic factor triggers a rapid glutamate release via the neuronal glutamate transporter in cultured cerebellar neurons. *J. Neurosci. Res.*, **66**, 96-108.
7. Kojima, M., Takei, N., Numakawa, T., Ishikawa, Y., Suzuki, S., Matsumoto, T., Katoh-Semba, R., Nawa, H. and Hatanaka, H. (2001) Biological characterization and optical imaging of BDNF-GFP suggest an activity-dependent local release of BDNF in neurites of cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci. Res.*, **64**, 1-10.
8. Numakawa, T., Takei, N. and Hatanaka, H. (2000) BDNF rapidly induces aspartate release from cultured CNS neurons. *Neurosci. Res.*, **37**, 59-65.
9. Hashimoto, Y., Abiru, Y., Nishio, C. and Hatanaka, H. (1999) Synergistic effects of BDNF and CNTF on cultured basal forebrain cholinergic neurons from postnatal two-week-old rats. *Dev. Brain Res.*, **115**, 25-32.
10. Numakawa, T., Takei, N., Yamagishi, S., Sakai, N. and Hatanaka, H. (1999) Neurotrophin-elicited short-term glutamate release from cultured cerebellar granule neurons. *Brain Res.*, **842**, 431-438.

Hensch グループ

1. Iwai, Y., Fagiolini, M., Obata, K. and Hensch, T.K. (2003) Rapid critical period induction by tonic inhibition in visual cortex. *J Neurosci.* **23**, 6695-702.
2. Fagiolini, M., Katagiri, H., Miyamoto, H., Mori, H., Grant, S.G., Mishina, M. and Hensch, T.K. (2003) Separable features of visual cortical plasticity revealed by N-

methyl-D-aspartate receptor 2A signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 2854-2859.

3. Mataga, N., Nagai, N. and Hensch, T.K. (2002) Permissive proteolytic activity for visual cortical plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 7717-7721.
4. Renger, J.J., Hartman, K.N., Tsuchimoto, Y., Yokoi, M., Nakanishi, S. and Hensch, T.K. (2002) Experience-dependent plasticity without long-term depression by type 2 metabotropic glutamate receptors in developing visual cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 1041-1046.
5. Mataga, N., Fujishima, S., Condie, B.G. and Hensch, T.K. (2001) Experience-dependent plasticity of mouse visual cortex in the absence of the neuronal activity-dependent marker *egr1/zif268*. *J. Neurosci.*, **21**, 9724-9732.
6. Fagiolini, M. and Hensch, T.K. (2000) Inhibitory threshold for critical-period activation in primary visual cortex. *Nature*, **404**, 183-186.

仙波グループ

1. Katoh-Semba, R., Asano, T., Ueda, H., Morishita, R., Takeuchi, I.K., Inaguma, Y. and Kato, K. (2002) Riluzole enhances expression of a brain-derived neurotrophic factor with consequent proliferation of granule precursors in the rat hippocampus. *FASEB J.* **16**, 1328-1330 (online#10.1096/fj.02-0143fje).
2. Katoh-Semba, R., Takeuchi, I. K., Inaguma, Y., Ichisaka, S., Hata, Y., Tsumoto, T., Iwai, M., Mikoshiba, K. and Kato, K. (2001) Induction of brain-derived neurotrophic factor by convulsant drugs in the rat brain: Involvement of region-specific voltage-dependent calcium channels. *J. Neurochem.*, **77**, 71-83.
3. Katoh-Semba, R., Takeuchi I.K., Semba, R. and Kato, K. (2000) Neurotrophin-3 controls proliferation of granular precursors as well as survival of mature granule neurons in the developing rat cerebellum. *J. Neurochem.*, **74**, 1923-1930.
4. Katoh-Semba, R., Takeuchi I.K., Inaguma Y., Ito, H. and Kato, K. (1999) Brain-derived

neurotrophic factor, nerve growth factor and neurotrophin-3 in selected regions of the rat brain following kainic acid-induced seizure activity. *Neurosci. Res.*, **35**, 19-29.

川名・鳥光グループ

1. Jimbo, Y., Kasai, N., Torimitsu, K., Tateno, T. and Robinson, H.P.C. (2003) MEA-based multi-site stimulation system. *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **50**, 241-248.
2. Torimitsu, T. (2003) Nano-bio science-unification of neural functions with nanotechnology. *Electrochemistry*, **71**, 809-813.
3. Kasai, N., Jimbo, Y. and Torimitsu, K. (2002) Electrochemical monitoring of glutamate release at multiple positions in a rat hippocampal slice. *Analytical Science*, **18**, 1325-1327.
4. Kasai, N., Jimbo, Y., Niwa, O., Matsue, T. and Torimitsu, K. (2001) Real-time observation of evoked glutamate distribution in a rat hippocampal slices. *Neurosci. Lett.*, **304**, 112-116.
5. Hayashi, K., Horiuchi, T., Kurita, R., Torimitsu, K. and Niwa, O. (2000) Real-time electrochemical imaging using an individually addressable multi-channel electrode. *Biosens. Bioelectron.*, **15**, 523-529.
6. Kasai, N., Jimbo, Y., Niwa, O. and Torimitsu, K. (2000) Multi-channel glutamate monitoring by electrode array electrically immobilized with enzymes. *Electrochemistry*, **68**, 886-889.
7. Kasai, N., Jimbo, Y., Niwa, O. and Torimitsu, K. (2000) Neurotransmitter monitoring using a modified electrode array -Multi-site electrochemical monitoring of glutamate from a rat hippocampus. *Tech. Report IEICE*, OME2000, **154**, 27-32.
8. Torimitsu, K., Kurita, R. and Niwa, O. (1999) Enzyme-based real-time detection of synaptic glutamate release modulated by GABA and neurotrophins in cultured rat cortical neurons. *Neural Dev.*, **2**, 474-480.

9. Jimbo, Y., Robinson, H.P.C. and Kawana, A. (1999) A strengthening of synchronized activity by etanic stimulation in cortical cultures: Application of planar electrode arrays. *IEEE Trans BME-45*, 1297-1304.

(2) 口頭発表

① 招待、口頭講演（国内学会 20件、国際学会 22件）

国際学会

1. Tsumoto T (Osaka University) "A dynamic role of brain-derived neurotrophic factor in LTP/LTD in the developing visual cortex", Satellite Symposium of the 30th Annual Society for Neuroscience Meeting "LTP, LTD, and Synaptic Plasticity in the Brain", New Orleans, USA, November 3, 2000
2. Tsumoto T (Osaka University), "Roles of brain-derived neurotrophic factor in LTP/LTD and ocular dominance plasticity in the developing visual cortex", The NIBB International COE Symposium "Mechanisms of Neural Network Formation", Okazaki, Japan, March 15, 2000
3. Tsumoto T (Osaka University) "Roles of brain-derived neurotrophic factor in LTP/LTD and ocular dominance plasticity in the developing visual cortex", The international Symposium "Neurotrophic Factors and Synaptic Development and Plasticity", Niigata, Japan, October 2, 2000
4. Tsumoto T (Osaka University) "Roles of brain-derived neurotrophic factor in LTP/LTD and ocular dominance plasticity in the developing visual cortex" Federation of Asian-Oceanian Neuroscience Societies Symposium, Hong Kong, China, December 9, 2000
5. Tsumoto T (Osaka University) "Transfer of BDNF from pre- to postsynaptic cortical neurons and its action on NMDA and AMPA receptors" Gordon Research Conference on Neurotrophins, New Port, USA, June 12, 2001
6. Tsumoto T (Osaka University) "Roles of brain-derived neurotrophic factor in synaptic

- plasticity in the developing visual cortex", 19th International Australian Winter Conference on Brain Research, Queenstown, New Zealand, August 23, 2001
7. Tsumoto T (Osaka University) "Different actions of brain-derived neurotrophic factor on NMDA and AMPA receptors of cultured cortical neurons", 11th Neuropharmacology Conference on "Molecular Mechanisms of Synaptic Transmission", San Diego, USA, November 8, 2001
 8. Tsumoto T (Osaka University) "Roles of BDNF in synaptic plasticity in the developing visual cortex", 7th International Conference on NGF and Related Molecules, Modena, Italy May 16, 2002
 9. Tsumoto T (Osaka University) "Actions of brain-derived neurotrophic factor on NMDA and AMPA receptors of cultured cortical neurons", Japan-UK Workshop on "From Molecules to Memory 2002", Nara, Japan, August 30, 2002
 10. Tsumoto T (Osaka University) "Actions of brain-derived neurotrophic factor on function and morphology of visual cortical neurons", 12th Keio University International Symposia for Life Sciences and Medicine on "The Neural Basis of Early Vision", Tokyo, Japan, September 4, 2002
 11. Tsumoto T (Osaka University) "Actions of brain-derived neurotrophic factor on inhibitory cortical neurons", The 3rd Federation of Asian-Oceanian Neuroscience Societies Congress, Seoul, Korea, September 29, 2002
 12. Tsumoto T (Osaka University) "BDNF depresses excitatory synaptic transmission to GABAergic neurons in visual cortical slices of GAD67-GFP knock-in mice", The 33rd Annual Meeting of Society for Neuroscience, New Orleans, USA, November 11, 2003
 13. Itami C (National Center of Neurology and Psychiatry) "BDNF regulates activation of silent synapse in developing mouse barrel cortex", The 31st Society for Neuroscience Annual Meeting, San Diego, USA, November 14, 2001

14. Fumitaka Kimura (Osaka University) Release probability at the thalamocortical synapse is transiently higher during critical period: possible relevance to postsynaptic silent synapses, Satellite Symposium of the 33rd Annual Meeting of the Society for Neuroscience on Barrels, New Orleans, USA, November 6, 2003
15. Hirososhi Hatanaka (Osaka University) "BDNF stimulates interaction of shp2 with pi3-k and grb2 in cultured cerebral cortical neurons", 17th ISN/ESN Joint Meeting, Berlin, Germany, August 9, 1999
16. Masami Kojima (National Institute of AIST) "BDNF-Dependent Recruitment of TrkB Receptor into Neuronal Lipid Rafts", The 3rd FAONS Congress, Olympia Hotel, Seoul, Korea, September 29, 2002
17. Takao Hensch (RIKEN, BSI) "Dark-rearing selectively restores inhibitory sub-circuit and plasticity to visual cortex lacking GAD65", Satellite Symposium of the 30th Annual Meeting of Society for Neuroscience Society, Atlanta, USA, November 8, 2000
18. Keiichi Torimitsu (NTT Basic Res. Lab.) "Analysis of Brain Functions and Nano-Bio Device Architecture", 1st Joint Japan-Sweden workshop on Bioelectronics, Sigtunastiftelsen, Sweden, August 19, 2002
19. Keiichi Torimitsu (NTT Basic Res. Lab.) "Effect of ATP on neuronal bursts and its relation to synaptic activity in rat cortex and hippocampus in vitro", 7th International Symposium on Adenosine & Adenine Nucleotides, Gold Coast, Australia, December 19, 2002
20. Keiichi Torimitsu (NTT Basic Res. Lab.) "Nanostructure controlled substrates: Surface modified substrates for nerve cell growth", 9th Int. Conf. Eng.(ICCE/9), San Diego, USA, July 5, 2002
21. Keiichi Torimitsu (NTT Basic Res. Lab.) "Nanostructure controlled substrates: Effect of nanostructure conditions on neural growth in surface modified substrates", 8th Int. Conf. Eng.(ICCE/8), Tenerife, Spain, August 5, 2001

22. Keiichi Torimitsu (NTT Basic Res. Lab.) "Neural modulation induced by neurotrophic factors in rat cortical and hippocampal neurons", EuroMed Lab 2001(14th IFCC-FESCC), Prague, Czech Republic, May 26, 2001

国内学会

1. 津本忠治（大阪大学）"脳の可塑性と神経栄養因子" 第30回新潟神経学夏季セミナー 新潟、2000年7月27日
2. 津本忠治（大阪大学）"脳の可塑性と神経栄養因子" 文部科学省特定領域研究「先端脳」第2回公開シンポジウム、東京、2001年12月19日
3. 津本忠治（大阪大学）"機能発達の臨界期とそのメカニズム" 第10回脳の世紀シンポジウム、東京、2002年9月11日
4. 津本忠治（大阪大学）"脳の発達と可塑性" 第14回日本発達心理学会、神戸、2003年3月28日
5. 津本忠治（大阪大学）"神経栄養因子とシナプスの可塑性" 第7回宮崎Neuroscience研究会、宮崎、2003年6月7日
6. 伊丹千晶（国立精神・神経センター）"発達期マウスバレル皮質に存在するサイレントシナプスの活性化に於けるBDNFの作用機構" 第23回日本神経科学大会・第10回日本神経回路学会合同大会、横浜、平成12年9月6日
7. 小原圭吾（大阪大学）"大脳皮質神経細胞における脳由来神経栄養因子の動態—シナプス後細胞への活動依存的移動" 第24回日本神経科学・第44回日本神経化学合同大会シンポジウム、京都、平成13年9月27日
8. 小原圭吾（大阪大学）"大脳皮質神経細胞における脳由来神経栄養因子の動態と機能" 第76回日本薬理学会年会・第80回日本生理学会大会シンポジウム"シナプス機能を修飾するメカニズム", 福岡, 平成15年3月24日
9. 安田浩樹（大阪大学）海馬CA1長期増強メカニズムの発達によるスイッチ, 第76

回日本薬理学会年会・第80回日本生理学会大会, 福岡, 平成15年3月25日

10. 北村明彦（大阪大学）"脳由来神経栄養因子のマウス視覚野における長期抑圧阻止作用" 第76回日本薬理学会年会・第80回日本生理学会大会, 福岡, 平成15年3月25日
11. 高田直樹（大阪大学）"脳由来神経栄養因子の慢性投与が培養皮質ニューロンのシナプスに及ぼす効果" 第24回日本神経科学・第44回日本神経化学合同大会シンポジウム, 京都, 平成13年9月27日
12. 畠義郎（鳥取大学）"大脳皮質視覚野に見られる経験依存的な神経回路発達の仕組み" 国立長寿医療研究センターセミナー, 大府, 平成14年5月24日
13. 畠義郎（鳥取大学）"発達期の神経活動が視覚野神経回路に与える影響"平成14年度生理学研究所研究会「シナプス可塑性と丸ごとの脳機能」, 岡崎, 平成14年5月23日
14. 畠義郎（鳥取大学）"大脳皮質視覚野に見られる経験依存的な神経回路発達" 第2回赤ちゃん学会学術集会, 福岡, 平成14年4月13日
15. 中村俊（国立精神・神経センター）"体制感覚野バレル形成とその可塑性における神経栄養因子の役割" 第78回日本生理学会シンポジウム "Structural plasticity in the nervous system: its molecular and cellular mechanisms" 京都, 平成13年3月29日
16. 中村俊（国立精神・神経センター）"サイレントシナプスの活性化における脳由来神経栄養因子、BDNFの役割" 第24回日本神経科学・第44回日本神経化学合同大会シンポジウム, 京都, 平成13年9月27日
17. 仙波りつ子 (愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所)" リルゲール投与による脳内BDNF合成の誘導と海馬歯状回における細胞分裂促進" 第43回日本神経化学会, 金沢, 平成12年10月20日
18. 仙波りつ子 (愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所) "ニューロトロフィン-4

の高感度酵素免疫測定系の確立と神経系における分布"第24回日本神経科学・第44回日本神経化学合同大会シンポジウム, 京都, 平成14年11月25日

19. 鳥光慶一 (NTT物性科学基礎研究所) "Transient response of Neurotrophins on Intracellular Ca Concentration and Synaptic Activity in cultured Rat cortex" Focus on microscopy 2000, 白浜、和歌山、平成12年4月11日
20. 鳥光慶一 (NTT物性科学基礎研究所) "Real-time electrochemincal observation of glutamate release at multiple positions in a rat hippocampal slice, Joint symposium on bio-imaging" TERRSA、山形, 平成13年8月2日

② ポスター発表 (国際学会 23件、国内学会 39件)

(国際学会)

1. Hiroki Yasuda (Osaka University) Spatiotemporal dynamics of the activation of calcineurin in layer II/III pyramidal neurons by LTD-inducing stimulation in rat visual cortex, Society for Neuroscience 29th Annual Meeting, Miami Beach, Florida, USA, October 27, 1999
2. Jiang Bin (Osaka University) BDNF induces a long-lasting potentiation of synaptic transmission in visual cortex *in vivo* in young but not adult rats, 30th Annual Meeting, Society for Neuroscience, New Orleans, USA, November 4, 2000
3. Satoshi Ichisaka (Osaka Univeristy) Activity-dependent changes in the level of bdnf protein in the visual cortex of young and adult ferrets. 30th Annual Meeting, Society for Neuroscience, New Orleans, USA, November 4, 2000
4. Chiaki Itami (National Center of Neurology and Psychiatry) Involvement of BDNF in activating the silent synapses during neonatal development of mouse barrel cortex. Society for Neuroscience 30th Annual Meeting, New Orleans, USA, November 5, 2000
5. Fumitaka Kimura (Osaka Univeristy) Developmental changes in conduction velocity of thalamocortical pathway in the mouse somatosensory system, 31st Society for

Neuroscience Annual Meeting, San Diego, USA, November 12, 2001

6. Jiang Bin (Osaka University) Endogenous BDNF prevents low frequency stimulation from inducing LTD in *in vivo* visual cortex of young rats, The SFN 32nd Annual Meeting, Orlando, USA, November 6, 2002
7. Takufumi Yanagisawa (Osaka University) Synaptic transmission: presynaptic mechanisms of glutamatergic synaptic transmission, The SFN 32nd Annual Meeting, Orlando, USA, November 5, 2002
8. Fumitaka Kimura (Osaka University) Release probability at the thalamocortical synapse is transiently higher during critical period: possible relevance to postsynaptic silent synapses, 33rd Annual Meeting of the Society for Neuroscience, New Orleans, USA, November 11, 2003
9. Naoki Adachi (Osaka University) Trafficking and release of neurotrophins in cultured cortical neurons, 6th IBRO WORLD CONGRESS OF NEUROSCIENCE, Prague, Czech Republic July 12, 2003
10. Hiroki Yasuda (Osaka University) BDNF depresses excitatory synaptic transmission to GABAergic neurons in visual cortical slices of GAD67-GFP knock-in mice, Social mixer for the Japanese Neuroscientists in Neuroscience 2003, New Orleans, USA, November 11, 2003
11. Hiroshi Hatanaka (Osaka University) Subcellular localization and regulated disappearance of GFP-tagged BDNF in hippocampal neurons, Society for Neuroscience 29th Annual Meeting, Miami Beach, Florida, USA, October 27, 1999
12. Hiroshi Hatanaka (Osaka University) IP3-triggered increase of intracellular calcium is essential for BDNF -dependent glutamate release from cultured cerebellar granule cells, Society for Neuroscience 29th Annual Meeting, Miami Beach, Florida, USA, October 27, 1999

13. Hirioshi Hatanaka (Osaka University) SHP-2 specifically regulates several tyrosine-phosphorylated proteins in BDNF signaling pathway in cultured cortical neurons, 17th ISN/ESN Joint Meeting, Berlin, Germany, August 9, 1999
14. Takao Hensch (RIKEN, BSI) Transient TrkB blockade impairs maturation of parvalbumin-positive interneurons in visual cortex, 31st Society for Neuroscience Annual Meeting, San Diego, USA, November 11, 2001
15. Akio Kawana (NTT Basic Res. Lab.) Neurointerface-Interface of neuronal networks to electrical circuit-, 12th IEEE International conference on Micro Electro Mechanical Systems, Orlando, USA, January 17, 1999
16. Keiichi Torimitsu (NTT Basic Res. Lab.) Effect of Neurotrophics on Intracellular Ca Concentration and Electrical Activity in Cultured Rat Cortex, The 39th American Society for Cell Biology Meeting, Washington DC、USA, December 11, 1999
17. Keiichi Torimitsu (NTT Basic Res. Lab.) Calcium Transients Underlying Synchronized Bursts in Cortical Neurons, Substrate-integrated Micro Electrode Arrays: hard-, soft- and wetware, Reutlingen, Germany, June 22, 2000
18. Keiichi Torimitsu (NTT Basic Res. Lab.) Real-time multichannnel monitoring of glutamate in a rat hippocampal slice evoked by electric stimulation, 30th Annual Meeting, Society for Neuroscience, New Orleans, USA, November 8, 2000
19. Keiichi Torimitsu (NTT Basic Res. Lab.) Modulation of neural activities induced by neurotrophins in cultured rat cortex and hippocampal neurons, 18th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Birmingham, UK, July 19, 2000
20. Keiichi Torimitsu (NTT Basic Res. Lab.) Glutamate transients at multiple positions in a rat hippocampal slie induced by low magnesium, The 34th World Congress of the International Union of Physiological Sciences, Christchurch, New Zealand, August 29, 2001

21. Keiichi Torimitsu (NTT Basic Res. Lab.) Nanostructure controlled substrates: nanostructure modification of bio-active substrates for nerve cell growth, 8th Int. Conf. Eng.(ICCE/8), Tenerife, Spain, August 5, 2001
 22. Keiichi Torimitsu (NTT Basic Res. Lab.) Modulation of neural activities by neurotrophic factors and ATP in rat cortical and hippocampal neurons, Society for Neuroscience 32nd Annual Meeting, Orlando, USA, November 19, 2002
 23. Keiichi Torimitsu (NTT Basic Res. Lab.) Glutamate transients and neuronal bursts at multiple positions in a rat cortex and hippocampus induced by low magnesium, Gordon Research Conference: Magnesium in Biochemical Processes and Medicine, Ventura, CA, USA, February 3, 2002
- ③ ポスター発表（国内学会 39件）
1. 高田直樹 (大阪大学) 孤立皮質細胞培養標本におけるBDNF慢性投与のシナプス反応に及ぼす効果, 第22回日本神経科学大会、大阪, 平成11年7月7日
 2. 一坂吏志 (大阪大学) 皮質視覚野における神経栄養因子蛋白量の入力依存的な変化, 第22回日本神経科学大会、大阪, 平成11年7月7日
 3. 木村文隆 (大阪大学) 皮質視覚野におけるアセチルコリンによる入力路選択的抑制効果, 第22回日本神経科学大会、大阪, 平成11年7月6日
 4. 一坂吏志 (大阪大学) 大脳皮質視覚野における脳由来神経栄養因子量の入力依存的な変化, 第93回近畿生理学談話会, 大阪, 平成12年8月25日
 5. 高田直樹 (大阪大学) 孤立皮質培養ニューロンのシナプスに及ぼす脳由来神経栄養因子の慢性作用, 第93回近畿生理学談話会, 大阪, 平成12年8月25日
 6. Mahmoud Salami (大阪大学) 視床-皮質投射線維の伝導速度の発達に伴う変化, 第23回日本神経科学大会第10回日本神経回路学会合同大会, 横浜, 平成12年9月5日
 7. 宇野里砂 (大阪大学) 幼若ラット皮質視覚野II/III層錐体細胞における水平と垂直

方向のシナプス伝達の比較, 第77回日本生理学会大会, 横浜, 平成12年3月28日

8. 一坂吏志（大阪大学）幼若期・成熟期フェレット大脳皮質視覚野における神経栄養因子タンパク質量の神経活動依存的変化, 第24回日本神経科学・第44回日本神経化学合同大会, 京都, 平成13年9月28日
9. 木村文隆（大阪大学）コリン性投射による入力由来依存性の制御：ニコチニック受容体による視床-皮質投射の促通作用, 第24回日本神経科学・第44回日本神経化学合同大会, 京都, 平成13年9月27日
10. 谷口暢章（大阪大学）培養皮質ニューロンにおけるBDNFの伝達物質放出確率増大作用、第77回日本生理学会大会、日吉、横浜、平成12年3月27日
11. 高田直樹（大阪大学）BDNFの慢性投与における孤立皮質培養ニューロンの機能的シナプス部位の増大, 第23回日本神経科学大会・第10回日本神経回路学会合同大会, 横浜, 平成12年9月6日
12. 森島美絵子（大阪大学）遺伝子導入によって皮質神経細胞内に発現したBDNF動態の解析, 第23回日本神経科学大会・第10回日本神経回路学会合同大会, 横浜, 平成12年9月5日
13. 高田直樹（大阪大学）脳由来神経栄養因子の慢性投与が培養皮質ニューロンのシナプスに及ぼす効果, 第78回日本生理学会大会, 京都, 平成13年3月29日
14. 北村明彦（大阪大学）脳由来神経栄養因子ノックアウトマウス視覚野におけるシナプス長期抑圧, 第78回日本生理学会大会, 京都, 平成13年3月30日
15. 大島稔（大阪大学）発達脳視覚野へのBDNF投与による外側膝状体ニューロンの軸索形態への影響, 第24回日本神経科学・第44回日本神経化学合同大会シンポジウム, 京都, 平成13年9月26日
16. 北村明彦（大阪大学）マウス視覚野における脳由来神経栄養因子のシナプス長期抑圧阻止作用, 第25回日本神経科学大会, 東京, 平成14年7月9日

17. 小原圭吾（大阪大学）順行性に移行した脳由来神経栄養因子の皮質抑制性ニューロン樹状突起伸展作用, 第25回日本神経科学大会, 東京, 平成14年7月9日
18. 蔣敏海（大阪大学）ニューロトロフィン受容体抑制による発達視覚野眼優位可塑性の阻害, 第25回日本神経科学大会, 東京, 平成14年7月9日
19. 柳沢琢史（大阪大学）視床-皮質シナプスにおける伝達物質放出の生後発達に伴う変化, 第79回日本生理学会, 広島, 平成14年3月28日
20. 安達直樹（大阪大学）大脳皮質ニューロンにおけるニューロトロフィンの動態と放出機構, 第26回日本神経科学学会, 名古屋, 平成15年7月23日
21. 小原圭吾（大阪大学）脳由来神経栄養因子の動態と機能の解析, 第26回日本神経科学学会, 名古屋, 平成15年7月23日
22. 惣谷和広（大阪大学）脳由来神経栄養因子はGABA性シナプス伝達を強化する, 第26回日本神経科学学会, 名古屋, 平成15年7月24日
23. 畠義郎（鳥取大学）視神経電気刺激による発達期視覚野眼優位可塑性の誘導, 第26回日本神経科学学会, 平成15年7月25日
24. 畠中寛（大阪大学）BDNFによるグルタミン酸放出作用における細胞内カルシウム依存性, 第22回日本神経科学大会, 大阪, 平成11年7月7日
25. 畠中寛(大阪大学)簡便な遺伝子導入法を用いた培養中枢神経細胞におけるBDNF遺伝子産物の動態解析, 第22回日本神経科学大会, 大阪, 平成11年7月7日
26. 畠中寛（大阪大学）大脳皮質ニューロンのBDNFシグナルにおけるSHP2の役割, 第22回日本神経科学大会、大阪, 平成11年7月7日
27. 仙波りつ子（愛知県心身障害者コロニー）攣誘発物質による脳由来神経栄養因子の産生誘導(II)：電位依存性カルシウムチャネルの関与, 第23回日本神経科学大会第10回日本神経回路学会合同大会, 横浜, 平成12年9月5日

28. 仙波りつ子 (愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所), 神経系におけるニューロトロフィン-4の分布, 第25回日本神経科学大会, 東京, 平成14年7月9日
29. 仙波りつ子 (愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所) Involvement of adenosine receptor in riluzole-induced BDNF production in the rat hippocampus, 第26回日本神経科学学会, 名古屋, 平成15年7月23日
30. 鳥光慶一 (NTT物性科学基礎研究所) Effect of neurotrophic factors on neural activity in cultured rat cortex, Frontiers of the mechanisms of memory and dementia, 横浜, 平成11年11月22日
31. 鳥光慶一 (NTT物性科学基礎研究所) 神経初代培養における神経突起と表面状態の認識, 第41回日本組織細胞化学学術集会, 高知, 平成12年12月8日
32. 鳥光慶一 (NTT物性科学基礎研究所) 神経細胞の初代培養における培養皿の表面状態と成育, 第72回日本組織培養学会大会, 岡山, 平成12年9月7日
33. 鳥光慶一 (NTT物性科学基礎研究所) ラット海馬スライスから放出されるグルタミン酸のリアルタイム多点計測, 第23回日本神経科学大会第10回日本神経回路学会合同大会, 横浜, 平成12年9月4日
34. 鳥光慶一 (NTT物性科学基礎研究所) 神経回路活動の時空的計測, 平成15年度電気学会全国大会, 仙台市, 平成15年3月17日
35. 鳥光慶一 (NTT物性科学基礎研究所) 培養神経回路における可塑性, 平成14年度電気学会電子情報システム部門大会, 矢上, 平成14年9月2日
36. 鳥光慶一 (NTT物性科学基礎研究所) カイニン酸を投与したラット海馬スライス培養における細胞死と苔状線維の発芽の変化, 第45回日本神経化学会, 札幌、平成14年7月17日
37. 鳥光慶一 (NTT物性科学基礎研究所) ビキュキュリンによって引き起こされるラット海馬スライス培養における細胞死と苔状線維の発芽の変化, 第79回日本生理学

会, 広島, 平成15年3月28日

38. 鳥光慶一（NTT物性科学基礎研究所）ラット脳神経細胞の活動に及ぼす神経栄養因子の影響, 第24回日本神経科学・第44回日本神経化学合同大会シンポジウム, 京都, 平成13年9月27日
39. 鳥光慶一（NTT物性科学基礎研究所）酵素反応を用いた微小センサによる神経伝達物質計測, 第78回日本生理学会大会, 京都, 平成13年3月31日

(1) 特許出願（国内 2 件）

1. 発明の名称：「脳由来神経栄養因子誘導剤」
出 願 日：2000年6月27日
出願番号：特願2000-192170、特開2002-3401
発 明 者：仙波りつ子
出 願 人：科学技術振興事業団（識別番号396020800）
2. 発明の名称：「生体の局所領域における蛋白質発現抑制方法、及びその装置システム」
出 願 日：2004年2月13日
出願番号：特願2004-37540
発 明 者：茜谷行雄
出 願 人：科学技術振興機構

(2) 新聞報道等

1. 「脳内の栄養因子 動きとらえた」Science 発表紹介記事（平成13年5月9日付け読売新聞）
2. 新・赤ちゃん学国際シンポジウム（平成15年12月2,3日、於東京・大手町サンケイプラザ）基調講演紹介報道（平成15年12月24日付け産経新聞）

7. 結 び

平成10年からこの戦略的基礎研究推進事業の助成を受けたことにより、発達脳視野の神経回路が神経活動に応じて変わるメカニズム、特に脳由来神経栄養因子（BDNF）の役割、に関してかなりの成果を得ることができた。例えば、蛍光蛋白質とBDNFの連結遺伝子を組み込んだプラスミドを培養神経細胞の核内に直接注入し、蛍光標識されたBDNFを生きた神経細胞内に発現させ、それが実際に動く様子を time-laps image recordingで動画として解析することに成功した。この結果は、中枢神経細胞では初めての成功例であり、このプラスミド核内直接注入法はねらった神経細胞内で特定の機能蛋白質の動態や分布を観察できる技術として注目された。さらに、BDNFがシナプス前部からシナプス後細胞に活動依存的に移行するというこの方法で得られた知見は、神経栄養因子に関する従来の想定を逆転させたもので、神経科学研究に大きなインパクトを与えたものと思われる。

また、全ての体細胞が蛍光蛋白質を発現する遺伝子改変マウスと特定の蛋白質を欠落しているノックアウトマウスの神経細胞からなるキメラ培養標本の開発に成功したことは、神経回路網における特定の分子の機能を解明する新しい方法として高く評価されている。事実、この方法によって我々は、シナプス前より移行してきた内因性BDNFがGABAニューロンの発達に大きな影響を与えることを明らかにすることができた。このように、異なった蛍光蛋白質を発現する細胞、及びノックアウトマウスからの細胞を組み合わせるキメラ培養標本と蛍光標識された機能蛋白質cDNAの核内直接注入法の開発によって、神経科学研究者の永年の夢であった神経活動による神経回路網の形成と変化を顕微鏡下で実時間で観察できるようになった。さらに、この方法を発展させれば、自己組織、自己修復可能なバイオ人工神経回路、或いはバイオデバイスの開発につながり、それを組み込んだ新しい製品やシステムの創出として社会に還元できる可能性が開けるとと思われる。

最後に、前述してきたように、戦略的基礎研究推進事業によって寛大な財政的、事務的なサポートをいただいて新しい研究方法を開発し、またいくつかの新知見を得る

ことが出来たことは研究者として大変幸せであったと思う。このように機会を与えていただいたことに厚く感謝する次第である。