

新潟大学脳研究所  
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」  
共同利用・共同研究報告書

## 新生仔期の大脳皮質神経回路発達メカニズム

研究代表者 岩里 琢治<sup>1), 2)</sup>

研究分担者 笹岡 俊邦<sup>3)</sup>

研究分担者 中川 直樹<sup>1), 2)</sup>

研究分担者 二橋 彩音<sup>1), 2)</sup>

1) 情報・システム研究機構国立遺伝学研究所神経回路構築研究室

2) 総合研究大学院大学先端学術院

3) 新潟大学脳研究所

### 研究要旨

高次機能を担う大脳皮質の神経回路は、出生前後から子供の時期にかけて、感覚入力や自発活動などの神経活動を受けて成熟する。マウスを用いてその仕組みを理解することは、ヒトの脳が子供の時期に環境の影響を受けながら正常に発達するメカニズムやその破綻としての発達障害を理解する上で重要である。本研究課題は、バレル野第4層において末梢からの入力依存的に視床皮質回路が発達する仕組みを、第4層spiny stellate細胞の樹状突起精緻化から読み解くことを目的とした。バレル地図を緑色蛍光標識するトランスジェニックマウスのバレル野第4層細胞を疎らに赤色蛍光標識し、新生仔期に短い時間間隔で*in vivo*観察することにより、樹状突起の変化をバレルとの関係で正確にとらえることが可能となった。その詳細な解析により、樹状突起精緻化メカニズムの一端が明らかとなった。

### A. 研究目的

生後発達期における神経活動依存的な回路発達モデルとして、マウスの体性感覚野（バレル野）第4層の興奮性神経細胞が新生仔期に神経活動依存的に特定の標的軸索群に向けて樹状突起を展開する仕組みの詳細を、樹状突起の個別の枝の動態のレベルで明らかにすることを目的とした。具体的には、樹状突起精緻化が活発に起きる生後4日目を標的とし、1時間間隔で、バレル野第4層の興奮性神経細胞の二光子顕微鏡*in vivo*タイムラプスイメージングを行い、樹状突起形態の変化を定量的に解析することにより、精緻化に伴う樹状突起動態を解明した。

### B. 研究方法

マウスバレル野第4層におけるバレル地図を生体で可視化するために、独自に作製した視床皮質

軸索を緑色蛍光標識するトランスジェニックマウス (Mizuo et al., Neuron 2014) を用いた。バレル野第4層の興奮性神経細胞の樹状突起形態を生体で明瞭に観察するために、独自に開発したSupernova法 (Mizuno et al., Neuron 2014; Luo et al., Sci. Rep. 2016) と子宮内電気穿孔法を組み合わせることにより、第4層細胞をまばらに明るく標識した。

生後4日目に、マウスの頭蓋骨に観察窓を取り付け、二光子顕微鏡を用いて、1時間おきに8時間にわたって樹状突起形態の観察を行った。最後のイメージングの直後に脳組織の取り出し、切片の作製を行い、*in vivo*でイメージングした細胞とバレル地図との関係を、組織学的に明らかにした。

得られた*in vivo*イメージングの画像を、専用

ソフトを用いて3次元構築し樹状突起の形態を明らかにした。そして、イメージングの時点毎の樹状突起形態を比較し、同じ樹状突起の同じ枝を同一し、その変化を定量解析した。

組換えDNA実験は、法律と所属機関の規程にしたがい、機関長に承認された計画に沿って行った。動物を使用する実験は、文科省の定める指針と所属研究機関の規程に従い、機関長に承認された計画に沿って行った。特定化学物質などの取扱については、所属機関の規程に従って使用した。

本課題は、遺伝子変異マウスの作出とその神経回路異常の解析に関して豊富な経験をもつ笹岡俊邦教授の協力を得ることによって、効率的な研究遂行が可能となった。

### C. 研究結果、考察

大脳皮質の神経回路が生後発達期に神経活動依存的に発達するメカニズムを理解するためのモデルとして、マウスのバレル野第4層の主要な興奮性神経細胞であるspiny stellate細胞の樹状突起が、新生仔期に視床皮質入力の影響下にバレル中心に向かって非対称的な形態を形成する過程を正確に理解することを目指した。研究代表者らは、これまでに、二光子顕微鏡生体イメージングを新生仔マウス大脳皮質の観察に用いて、バレル野で第4層細胞の樹状突起が入力依存的に精緻化される過程を生後3日目から6日目の3日間にわたって観察することに世界で初めて成功していた (Mizuno et al., Neuron 2014, Nakazawa et al., Nature Commun. 2018)。しかし、これらの解析では、脆弱な新生仔マウスを用いて長期間のイメージングを行うためのトレードオフとして、観察間隔を広く (8時間) せざるをえず、そのために、樹状突起の動態を正確に理解することが難しかった。

本研究では、樹状突起精緻化が活発に起きる生後4日目のバレル野第4層のspiny stellate細胞の樹状突起の変化を1時間おきに8時間にわたってイメージングすることを行った。視床皮質軸索に緑色蛍光蛋白質を発現するトランスジェニック

マウスを用いることにより、バレル地図をin vivoで可視化し、樹状突起の動態をバレル地図との関連で解析した。

バレルの縁に位置するspiny stellate細胞の樹状突起に着目して詳細な定量解析を行ったところ、樹状突起はバレルの内でも外でも激しく出現と消失を繰り返しており、いずれの頻度もバレルの内外で差はないことが明らかになった。また、樹状突起の枝レベルでの解析でも同様にバレルの内外に関係なく、激しくターンオーバーや伸縮を繰り返していることがわかった。これらの結果は、バレル野第4層のspiny stellate細胞が新生仔期に、バレル外側の樹状突起を選択的に刈りこんだり、バレル内側に選択的に樹状突起を増やしたりするのではなく、バレル内外に関わらず多くの樹状突起を作り、その中からバレル内側に生まれた枝の内のごく一部だけを選択し複雑化するという、トライアル&エラーによって非対称性を獲得するというモデルを指示するものと考えられる。今後は、さらに解析を進めることにより、こうした樹状突起動態を制御する分子機構の理解につなげたい。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表 [すべて査読有り]

1. Wang, L., Nakazawa, S., Luo, W, Sato, T., Mizuno, H., Iwasato, T. Short-term dendritic dynamics of neonatal cortical neurons revealed by *in vivo* imaging with improved spatiotemporal resolution. *eNeuro* 10(11) ENEURO.0142-23. (2023)

※ 遺伝子変異マウスの作出とその神経回路異常の解析に関して豊富な経験をもつ新潟大学脳研究所の笹岡俊邦教授の協力を得ることによって、効率的な研究の遂行が可能となった。

2. Hagihara, H., Iwasato, T. (22<sup>nd</sup> of 131 in total) Miyakawa, T. et al. Large-scale animal model study uncovers altered brain pH and lactate levels as a transdiagnostic

endophenotype of neuropsychiatric disorders involving cognitive impairment. *eLife*. 89376.2 (2023)

3. Nakagawa, N., and Iwasato, T. Golgi polarity shift instructs dendritic refinement in the neonatal cortex by mediating NMDA receptor signaling. *Cell Rep*. 42:112843 (2023)
4. Hirayama R, Taketsuru R, Sasaoka T, Sakimura K et al (14th of 15 in total) Production of marmoset eggs and embryos from xenotransplanted ovary tissues *Scientific Reports* 13, 18196, 2023.
5. Suzuki Y, Sasaoka T, Sakimura K et al (6th of 8 in total). Quantitative analysis of NMDA receptor subunits proteins in mouse brain. *Neurochem Int*. 165: 105517, 2023.
6. Jia W, Kawahata I, Cheng A, Sasaki T, Sasaoka T, Fukunaga K (5th of 6 in total) Amelioration of Nicotine-Induced Conditioned Place Preference Behaviors in Mice by an FABP3 Inhibitor. *Int J Mol Sci*.24(7):6644. 2023
7. Fukuda N, Fukuda T, Sasaoka T et al (9th of 9 in total). Axonal mRNA binding of hnRNP A/B is crucial for axon targeting and maturation of olfactory sensory neurons. *Cell Rep*. 42(5):112398, 2023

## 2. 学会発表

1. Takuji Iwasato (招待講演)  
Studies of Dendritic Refinement using Mouse Barrel Cortex Layer 4 Neurons as a Model. 日本分子生物学会 (シンポジウム) 2023年12月6日 (神戸)
2. 岩里琢治 (招待講演)  
新生仔マウスの体性感覚野における神経回路精緻化と自発神経活動. 日本発達神経科学会 (シンポジウム)

2023年11月18日 (福岡)

### 3. Takuji Iwasato (招待講演)

Activity-dependent circuit maturation in the neonatal brain: Studies using the mouse barrel cortex. (Tutored Seminar at Aix-Marseille University). 2023年5月22日 (Marseille, France)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし