

新潟大学脳研究所
「病理リソースを活用した脳神経病態共同研究拠点」
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^{1) 2)}
研究分担者 笹岡 俊邦³⁾, 中川 直樹^{1) 2)}, 二橋 彩音^{1) 2)}

1) 情報・システム研究機構国立遺伝学研究所 2) 国立大学法人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

高次脳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。マウスの一次体性感覚野の第4層には、生後1週間に、視床皮質軸索を介した神経入力の影響下に、「バレル」とよばれる特徴的な組織学的構造が形成される。バレル形成は哺乳類脳神経回路の生後発達の主要なモデルの一つとして長年にわたって注目されてきたが、脳の中でバレルがどのようにして形成されるか動的な側面はほとんどわかっていない。本研究課題では、バレル形成のメカニズムを細胞動態の観点から明らかにすることを目的とした。また、そのためのマウス脳生体イメージング手法の開発、及び、解析方法の工夫を行った。

A. 研究目的

マウスの一次体性感覚皮質は、生後発達期における哺乳類脳の神経回路の神経活動依存的発達の有力モデルの一つである。本研究課題では、マウスの一次体性感覚野の第4層神経細胞が、頬ヒゲに対応した体性感覚地図であるバレルを形成するメカニズムを、細胞動態の観点から明らかにすることを目的とした。具体的には、組織学的に一次体性感覚野にバレルが検出され始める生後3日齢から、バレルがほぼ完成する生後6日齢まで、バレル野の第4層を毎日観察し、同じ神経細胞を同定した上で、その動きを追跡・理解することを目指した。さらに、そのための方法論の開発（特に、イメージング手法と定量解析手法）を行った。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

マウス一次体性感覚野第4層におけるバレル地図を生体で可視化するために、研究代表者らが以

前に独自に開発した TCA-GFP マウス（視床一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）(Mizuno et al., Neuron 2014) を用いた。一次体性感覚野の第4層の興奮性神経細胞の位置を生体で明瞭に観察するために、独自に開発したスーパーノバ法 (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、疎らな第4層細胞の神経核を明るく赤色蛍光で標識した。バレル形成の開始時期である生後3日目に、マウスの頭蓋骨の一部を除去し、観察窓を取り付けた。そして、二光子励起顕微鏡を用いて、バレル皮質第4層の観察を生後6日目まで24時間ごとに行った。最終のイメージングの直後に脳組織を取り出し切片作製を行い、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。

本研究課題での組換えDNA実験は、法律と所属

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。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、結論

研究代表者らは、これまで様々な新規手法分野に新たに導入あるいは独自に開発することにより、マウス一次体性感覚野を用いて生後発達期における神経活動依存的な神経回路発達のメカニズムの解明に取り組んできた。具体的には、研究代表者は、神経回路の生後発達研究に遺伝子ノックアウトの手法を最初期に導入した一人であり (Iwasato et al., Neuron 1997)、この研究では笹岡教授 (現・新潟大脳研教授) に共同研究者として協力を得た。その後、大脳皮質特異的に Cre 組換え酵素を発現する Emx1-Cre マウスを世界に先駆けて開発し、さらに、視床特異的な Sert-Cre マウスなど領域・細胞種 特異的 Cre マウスを開発することを行い、同時に、いくつかの flox マウスを作製した。そして、それらのマウスを組み合わせることにより、大脳皮質、視床など体性感覚系の回路を切り分けて回路精緻化の分子機構を理解することに取り組んできた (Iwasato et al., Neuron 1997, Nature 2000, J. Neurosci. 2008; Mizuno et al., Neuron 2014; Luo et al., Sci. Rep. 2016)。また、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ることに成功し、新生仔マウスの大脳皮質の中で神経回路が入力依存的に精緻化される過程を数日間にわたって観察することに世界で初めて成功した (Mizuno et al., Neuron 2014, Nakazawa et al., Nature Commun. 2018; Wang et al., eNeuro 2023)。さらに、二光子顕微鏡カルシウムイメージングで新生仔マウス大脳皮質の活動を観察することに世界で初めて成功し、新生仔期体性感覚野における自発的活動の性質およびそれが

発達とともにどのように遷移するかを明らかにした (Mizuno et al., Cell Rep. 2018, Nakazawa et al., J. Neurosci. 2020)。

本研究では、こうした研究基盤の上に、バレル形成のメカニズムを細胞動態の観点から理解することを目指した。具体的には、まず、独自に作製した TCA-GFP トランスジェニックマウスを用いることにより、バレル皮質におけるバレル地図を生体で可視化した。そのマウスに子宮内電気穿孔法を用いて、胎生 14 日目の段階でスーパーノバベクターを導入することにより、一次体性感覚野の第 4 層細胞にまばらに赤色蛍光蛋白質 (RFP) を導入した。このマウスが生後 3 日齢になった段階で、麻酔下でマウスの頭蓋骨に観察窓を取り付けることを行った。そして、二光子励起顕微鏡を用いて、バレル皮質第 4 層の観察を行った。このマウスは、観察後には麻酔から覚めたことを確認した上で母親のもとに戻して、他の同腹仔とともに育てさせることにより、正常に成長させることができた。そして、24 時間ごとに顕微鏡下で同じ細胞を同定・観察することを生後 6 日齢まで行った。最終のイメージングの直後に脳組織を取り出し、切片を作製することにより、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。そして、イメージングの時点毎の細胞体の位置関係を比較することにより同じ細胞を同定し、日ごとの位置の変化を正確に理解することを目指した。大脳皮質の面積は新生仔期に急激に増大するため、その効果をノーマライズすることが必要であり、そのために様々な条件を検討した。ノーマライズされたデータを様々なパラメータで定量解析することにより、バレル形成の臨界期における第 4 層神経細胞の相対的な動きを数匹のマウスで明らかにすることができた。研究代表者らの一連の研究・解析によりバレル形成における神経細胞動態の一端が明らかになりつつある。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

1. Nakagawa, N.*, and Iwasato, T.*

Activity-dependent dendrite patterning in the postnatal barrel cortex *Front. Neural Circuits.* 18

(2024)

<https://doi.org/10.3389/fncir.2024.1409993>

2. 学会発表

1. Takuji Iwasato (招待講演)
Activity-dependent neuronal circuit refinement in the postnatal barrel cortex. SPONT2024 2024 年 11 月 4 日－6 日 (スペイン)
2. Takuji Iwasato (招待講演)
Activity-dependent circuit maturation in the neonatal brain: Studies using the mouse barrel cortex. Seminar at Indiana University (Gill Institute for Neuroscience) 2024 年 10 月 4 日 (Bloomington, USA)
3. Takuji Iwasato (招待講演)
Emergence of neural circuits for somatosensory processing in neonatal mouse cortex 国際シンポジウム Dynamic Connectome and Emergent Brain Function (NEURO2024 サテライト企画) 2024 年 7 月 23 日 (福岡)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし