

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：63801

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22115009

研究課題名（和文）マウス体性感覚系回路の発達期リモデリング

研究課題名（英文）Circuit remodeling during postnatal development in the mouse somatosensory cortex

研究代表者

岩里 琢治（Iwasato, Takuji）

国立遺伝学研究所・個体遺伝研究系・教授

研究者番号：00311332

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 84,700,000円

研究成果の概要（和文）：高等動物の脳がもつ高度な情報処理能力の基盤は精密に構築された神経回路である。神経回路は、動物の生後に環境から刺激を受けることにより成熟するが、そうした発達期回路リモデリングの機構の理解は不十分である。本課題では、生体脳において特定の神経回路を明るく標識する手法を開発し、新生仔マウスの体性感覚野の視床皮質回路が視床からの入力依存的にモデリングされる過程を二光子顕微鏡を用いて観察することに成功した。さらに独自に開発した単一細胞遺伝子ノックアウト法を組み合わせ、新生仔期の回路リモデリングにおけるNMDA型グルタミン酸受容体の役割を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Neuronal circuits of mammals are matured after extensive remodeling during postnatal development. In this project, we have developed a method for sparse and bright neuron labeling in vivo, and by using it we achieved in vivo time lapse imaging of dendritic remodeling of single cortical neurons in neonatal mouse. Furthermore, by combining novel single-cell gene targeting technology, we have revealed a role of NMDA-type glutamate receptors for the developmental circuit remodeling.

研究分野：神経科学

キーワード：神経回路 マウス 発達 発達期可塑性 遺伝子ノックアウト イメージング

1. 研究開始当初の背景

高等動物の脳がもつ高度な情報処理能力の基盤となる精密に構築された神経回路は、動物の生後に環境からの刺激を受けながらリモデリングされ成熟する。しかしながら、その機構の理解は不十分である。

マウスの大脳皮質一次体性感覚野の第4層における特徴的な視床皮質回路(バレル回路)はメゾ回路の発達期リモデリングを高解像度で解析するための有力なモデルである。

バレル回路リモデリングの分子機構の理解は、1990年代後半の我々のグループを含む数グループによる遺伝学的手法の導入が緒となって進んできた(Iwasato et al., Neuron 1997)。さらに、その後、我々は条件的遺伝子ノックアウトを世界にさきがけて導入し、バレル形成を回路レベルで理解する途を拓いた(Iwasato et al., Nature 2000)。

2. 研究の目的

本研究課題では、我々の得意とするマウス遺伝学技術に加え、in utero electroporation (IUE)、2光子顕微鏡などの技術を導入し組み合わせることにより、新しい角度からバレル回路リモデリング機構を解明することを目指した(1)。同時に、従来からの遺伝学的アプローチでの機構解明もさらに推進することを目的とした(2)。

3. 研究の方法

(1) 発達期の視床-皮質シナプスのプレ側とポスト側にあたる視床皮質軸索と第4層神経細胞を異なった蛍光蛋白質により同時標識する手法を開発し、バレル回路成熟の途中における回路の発達の様子を生体でタイムラプス観察する。それにより、正常なバレル形成の素過程を解明する。さらに、標識細胞特異的に遺伝子をノックアウトする手法を開発し、それを用いて、バレル形成の素過程における分子や神経活動の作用機序の一端

を解明する。

(2) 視床特異的 Cre マウスを開発し1型アデニル酸シクラーゼ遺伝子の視床特異的ノックアウトマウスを作製する。このマウスにおけるバレル形成を組織学的に解析することにより、バレル形成における cAMP 経路の作用機序を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 体性感覚野における視床皮質回路のリモデリングの in vivo イメージング

新生仔マウス大脳皮質 in vivo イメージングのための手法の開発

新生仔マウスの大脳皮質の神経回路を生きたまま観察するために2つの手法を開発した。1つは、「Supernova法」と名付けた、細胞を明るく疎らに蛍光標識する方法である。(詳細は Mizuno et al., Neuron 2014 を参照)。

もう1つは、「視床皮質軸索(TCA)」をGFPで標識する方法であり、発達期の視床特異的に発現するセロトニントランスポーター遺伝子のプロモーターを同定し、その制御下にGFPを発現するBACトランスジェニックマウス(TCA-GFPマウス)を作製した。

TCA-GFPマウスにSupernovaベクターをIUEを用いて導入することにより、視床皮質回路のプレ側である視床皮質軸索をGFP、ポスト側であるバレル細胞を疎らにRFPで蛍光標識することに成功した(図1)。

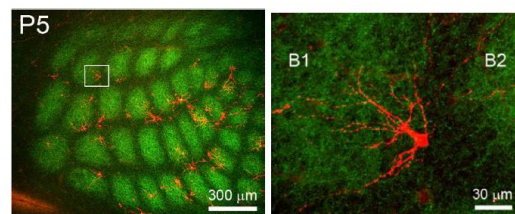


図1: 視床皮質回路のプレ、ポストの同時蛍光標識
TCA-GFPマウスを作製し、その大脳皮質第4層の神経細胞にSupernova RFPを導入することにより、プレ側の視床皮質軸索とポスト側のバレル細胞を同時に蛍光標識することに成功した。

視床皮質神経回路精緻化の in vivo イメージング

上記のマウスを用いて、第4層の個々の神

神経細胞を生後 5 日目から 18 時間にわたって二光子顕微鏡により経時観察することに成功した(図 2)。

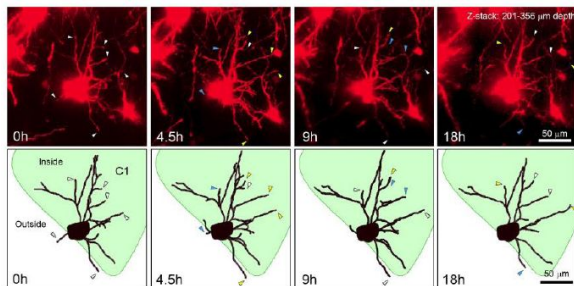


図2: 視床皮質軸索との回路形成中の皮質第4層神経細胞の樹状突起ダイナミクス。二光子顕微鏡による生後5日目から18時間の観察。(0hの白色の矢頭:最初の枝の先端の位置。4.5h, 9h, 18hの白色の矢頭:変化しなかった枝。黄色の矢頭:伸びた枝。青色の矢頭:縮んだ枝。緑色:パレル内側。)

正常な神経細胞の樹状突起は活発に伸び縮みを繰り返しながら、全体として、結合すべき正しい視床皮質末端軸索の末端のあるパレル内側に向かって伸びていく様子が観察された(図 3)。一方、遺伝子操作により NMDA 型グルタミン酸受容体(NMDA 受容体)の働きを抑えた神経細胞では、樹状突起の伸び縮みは異常に激しくなった。また、全体として正しい軸索の方向(パレルの内側)と無関係にランダムな方向に伸びることがわかった(図 3)。NMDA 受容体は正しい軸索とシナプスをつくった樹状突起を安定させて、正常な脳神経回路の形成を行っていると考えられた。

この研究では、新生仔の大脳皮質で神経回路が発達するときの正常な過程と異常な過程を直接観察することに世界で初めて成功

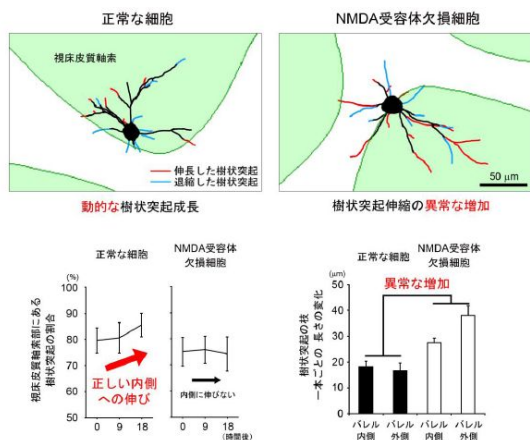


図3: 生後5日目から18時間の間の樹状突起の変化

し、その分子機構の一端を明らかにした。

(2) 視床皮質神経回路の精緻化における視床アデニル酸シクラーゼ1の役割の解明

視床特異的に標的遺伝子をノックアウトするために新規Creマウス(5HTT-Creマウス)を開発した。この5HTT-Creマウスと我々が以前に作製したアデニル酸シクラーゼ1(AC1)のfloxedマウスを交配することにより、視床特異的AC1のノックアウトマウスを作製した。このマウスの体性感覚野のパレル構造を組織学的に解析したところ、顕著な異常が検出された(図4)。一方、われわれは以前大脳皮質の興奮性神経細胞でのみAC1をノックアウトしたが、そのマウスではパレルはほぼ正常に形成された(Iwasato et al., J. Neurosci. 2008)。これらの結果を統合することにより、AC1がパレル形成においてプレ側の視床皮質軸索で重要な働きをしていることが示された。これらの結果により、パレル形成におけるcAMP経路の作用機序の一端が明らかになった。(Suzuki et al., Neuroscience. 2015)

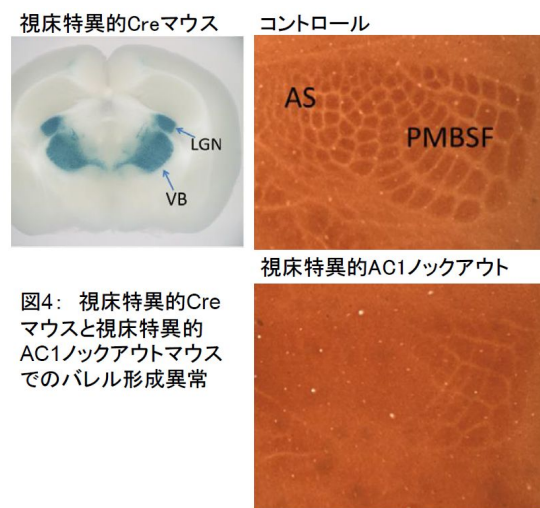


図4: 視床特異的Creマウスと視床特異的AC1ノックアウトマウスでのパレル形成異常

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 13 件)

原著論文(査読あり)のみ

- Iwata, R., Matsukawa, H., Yasuda, K., Mizuno, H., Itohara, S. & *Iwasato, T. Developmental RacGAP 2-Chimaerin

- Signaling Is a Determinant of the Morphological Features of Dendritic Spines in Adulthood. *J Neurosci.* **35**, 13728-44. (2015)
2. Suzuki, A., Lee, L.J., Hayashi, Y., Muglia, L., Itohara, S., Erzurumlu, R.S., & *Iwasato, T. Thalamic adenylyl cyclase 1 is required for barrel formation in the somatosensory cortex. *Neurosci.* **290**, 518-529. (2015)
 3. Takahashi, A. Lee, R.X, Iwasato, T. 以下 5 名. Glutamate input in the dorsal raphe nucleus as a determinant of escalated aggression in male mice. *J.Neurosci.* **35**, 6452-63 (2015).
 4. Iwata, R., Ohi, K., Kobayashi, Y., Masuda, A., Iwama, M., Yasuda, Y., Yamamori, H., Tanaka, M., Hashimoto, R., *Itohara, S. & *Iwasato, T. RacGAP a2 chimaerin function in development adjusts cognitive ability in adulthood. *Cell Rep.* **8**, 1257-1264. (2014).
 5. Arakawa, H., Suzuki, A., Zhao, S., Tsytsarev, V., Lo, F-S. Hayashi, Y., Itohara, S., Iwasato, T., & Erzurumlu, R.S. Thalamic NMDA receptor function is necessary for patterning of the thalamocortical somatosensory map and for sensorimotor behaviors. *J. Neurosci.* **34**, 12001-14. (2014).
 6. Mizuno, H., Luo, W., Tarusawa, E., Saito, Y.M., Sato, T., Yoshimura, Y., Itohara, S. & *Iwasato, T. NMDAR-Regulated Dynamics of Layer 4 Neuronal Dendrites during Thalamocortical Reorganization in Neonates. *Neuron* **82**, 365-379, (2014).
 7. Mita, S., de Monasterio-Schrader, P., Fünfschilling, U., Kawasaki, T., Mizuno, H., Iwasato, T., 以下 3 名. Transcallosal Projections Require Glycoprotein M6-Dependent Neurite Growth and Guidance. *Cerebral Cortex.* **25**,4111-25(2014)
 8. Borgius, L, Nishimaru, H, Caldeira, V, Kunugise, Y, Löw, P, Reig, R, Itohara, S, Iwasato, T., & Kiehn, O. Spinal Glutamatergic Neurons Defined by EphA4 Signaling Are Essential Components of Normal Locomotor Circuits. *J. Neurosci.* **34**, 3841-3853 (2014)
 9. Ogiwara, I., Iwasato, T., 以下 8 名 Nav1.1 haploinsufficiency in excitatory neurons ameliorates seizure-associated sudden death in a mouse model of Dravet syndrome. *Hum.Mol.Genet.***22**,4784-4804(2013)
 10. Sadakata, T., Kakegawa, W., Shinoda, Y., Hosono, M., Katoh-Semba, R., Sekine, Y., Sato, Y., Tanaka, M., Iwasato, T. 以下 4 名. CAPS1 deficiency perturbs dense-core vesicle trafficking and Golgi structure and reduces presynaptic release probability in the mouse brain. *J. Neurosci.* **33**, 17326-17334. (2013)
 11. Hägglund, M., Dougherty, K.J., Borgius, L., Itohara, S., Iwasato, T., & Kiehn, O. Optogenetic dissection reveals multiple rhythmogenic modules underlying locomotion. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **110**, 11589-11594 (2013)

12. Yamashita, H., Chen, S., Komagata, S., Hishida, R., Iwasato, T., 以下 5 名 Restoration of contralateral representation in the mouse somatosensory cortex after crossing nerve transfer. *PLoS One* 7, e35676 (2012).
13. Dhande, OS, Bhatt, S., Anishchenko, A., Elstrott, J., Iwasato, T., 以下 6 名. Role of adenylylate cyclase 1 in retinofugal map development. *J. Comp. Neurol.* **520**, 1562-1583 (2012).

[学会発表](計 29 件)

招待講演のみ

1. 岩里琢治 哺乳類中枢神経系における神経回路形成の遺伝学的解析 新潟大学脳研究所共同研究合同セミナー 2015 年 12 月 22 日 (新潟市)
2. T. Iwasato. In vivo imaging of neural circuit formation in the neonatal mouse cortex. 遺伝研研究会 Circuit Construction in the Mammalian Brain 2015 年 12 月 6 日-12 月 7 日 国立遺伝学研究所 (三島市)
3. 岩里琢治 新生仔マウス大脳皮質における神経回路形成の in vivo イメージング 認識と形成研究会 2015 2015 年 9 月 20 日-9 月 22 日 OIST (沖縄)
4. 岩里琢治 新生仔バレル皮質における回路発達の二光子イメージング 研究戦略ワークショップ「Strategy for Neuroscience 2015」 2015 年 9 月 4 日-9 月 5 日 玉川大学 (町田市)
5. T. Iwasato. In vivo Imaging of Circuit Refinement in Cortical Layer 4 of Neonatal Mouse. 第 38 回日本神経科学大会 (シンポジウム) 2015 年 7 月 28 日-7 月 31 日 (横浜市)
6. 岩里琢治. 新生仔マウス体性感覚野における回路機能シフトの動態と機構 第 1 回「適応回路シフト」領域班会議(夏の班会議) 2015 年 6 月 25 日- 26 日 (福島)
7. T. Iwasato In vivo imaging of neuronal circuit formation in the neonatal mouse barrel cortex. 1st NIG-NTU Symposium 2015 年 3 月 20 日 (台湾)
8. 岩里琢治. 哺乳類の脳神経回路の生後発達 東海医学会講演会 2015 年 3 月 13 日 (伊勢原市)
9. 岩里琢治. 哺乳類中枢神経系における神経回路形成の遺伝学的解析 新潟大学脳研究所共同利用共同研究合同セミナー 2014 年 12 月 24 日 (新潟市)
10. 岩里琢治 マウス体性感覚系回路の発達期リモデリング 包括脳ネットワーク冬のシンポジウム 2014 年 12 月 11 日- 13 日 (東京)
11. 岩里琢治 哺乳類の脳神経回路の生後発達 京都大学大学院理学研究科生物物理学セミナー 2014 年 9 月 8 日 (京都市)
12. 岩里琢治. 成体の海馬機能における発達期 RacGAP 2-chimaerin の役割. 遺伝研研究会 2013「哺乳類脳の機能的神経回路の構築メカニズム」, 2013.12.19-20, 三島.
13. 岩里琢治. Rac-GAP 2 chimaerin の認知機能とスパイン発達における役割. 認識と形成研究会, 2013.9.14-15, 岡崎.
14. 岩里琢治. 新生仔大脳皮質における神経回路発達. 第 43 回 (2013) 新潟神経学夏期セミナー, 2013.7.25-27, 新潟.
15. 岩里琢治. 神経回路の発達と機能のマウス遺伝学. 京都大学医学部セミナー 2013.3.22, 京都.
16. 岩里琢治. In vivo imaging of dendritic refinement of barrel cells in the neonatal mouse cortex. 国際高等研究所研究プロジェクト「ゲノム工学とイメージングサイエンスに基づく生命システム研究の新展開」研究会, 2013.2.22, 京都.
17. 岩里琢治. 新生仔マウス大脳皮質における「バレル形成」in vivo イメージング. 京大再生研セミナー 2013.2.8, 京都.
18. 岩里琢治. 脳高次機能における、キメ

- リン Rac-GAP の働き. 第 3 回脳表現型の分子メカニズム研究会, 2012.12.22, 名古屋
19. 岩里琢治. Towards in vivo imaging of barrel formation in neonatal mouse cortex. 遺伝研研究会 Circuit construction in the mammalian cerebral cortex : Genetic and imaging approaches, 2012.12.15-16, 三島.
 20. 岩里琢治. マウス体性感覚野パレル発達の in vivo イメージング. 認識と形成研究会 2012, 2012.12.1, 宇都宮.
 21. 岩里琢治. マウスを用いた脳の生後発達の研究. 九州大学 21 世紀プログラムセミナー, 2012.11.17, 福岡.
 22. 岩里琢治. Rac 不活化因子 -キメリンの神経回路発達における役割 山田科学振興財団研究交歓会, 2012.6.2, 東京.
 23. 岩里琢治. 幼仔脳における神経回路の発達: マウス体性感覚野(パレル野)での研究. 日本分子生物学会 第 12 回春季シンポジウム, 2012.4.25-26, 笛吹市.
 24. 岩里琢治. パレル皮質体性感覚マップ形成のマウス遺伝学. 帝京大学医学部セミナー, 2012.4.3, 東京.
 25. 岩里琢治. 神経回路発達・機能のマウス遺伝学. 東京医学部セミナー, 2010.12.14, 東京.
 26. 岩里琢治. Circuit refinement during postnatal development of the mouse somatosensory cortex. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会, 2010.12.7-10, 神戸.
 27. 岩里琢治. マウス遺伝学を用いた運動系神経回路発達機構の研究. 東京医科歯科大学医学部セミナー 2010.10.26, 東京.
 28. 岩里琢治. 体性感覚野発達の分子・細胞メカニズム. 熊本大学医学・生命科学セミナー, 2010.7.21, 熊本.
 29. 岩里琢治. 変異マウスが解き明かす脳回路の発達と遺伝子の働き. 埼玉大学セミナー, 2010.6.30, 埼玉.
- 〔図書〕(計 6 件)
1. 岩里琢治. 子どもの脳の発達の謎, 「遺伝子が語る生命 38 億年の謎」, 悠書館, 181-193. (2014)
 2. 岩里琢治, 水野秀信 神経回路の形成機構: 哺乳類大脳皮質神経回路の生後発達, 「脳神経系の発生・再生の融合的新展開」, 診断と治療社, 71-76, (2014)
 3. 岩里琢治. 免疫にかかわる遺伝子, 「遺伝子図鑑」(国立遺伝学研究所「遺伝子図鑑」編集委員会) 悠書館 184-185, (2013)

4. 岩里琢治. 体性感覚系神経回路発達に異常のある変異マウス, 「<series モデル動物利用マニュアル> 疾患モデルの作製と利用 - 脳・神経疾患」(三品昌美編), LIFE-SCIENCE INFORMATION CENTER, 162-172, (2011)
5. 岩里琢治, 糸原重美. Miffy 変異マウス: ウサギのように両足をそろえて歩く自然発生変異マウス, 「<series モデル動物利用マニュアル> 疾患モデルの作製と利用 - 脳・神経疾患」(三品昌美編), LIFE-SCIENCE INFORMATION CENTER, 99-110, (2011)
6. 岩里琢治. マウス逆遺伝学により明らかになる行動 - 神経回路 - 遺伝子, 「行動遺伝学入門 動物とヒトの“こころ”の科学」, 裳華房, 111-124, (2011)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 視床-皮質軸索で蛍光蛋白質 EGFP を発現するマウス

発明者: 岩里琢治、糸原重美

権利者: 情報・システム研究機構

種類: 特許

番号: 2014-041326

出願年月日: 2014 年 3 月 4 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

国立遺伝学研究所公開講演会 2014 講演

岩里琢治. マウスで迫る「子供の脳の発達のしくみ」 2014 年 11 月 1 日 (秋葉原)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩里 琢治 (IWASATO, Takuji)

国立遺伝学研究所・個体遺伝研究系・教授

研究者番号: 00311332

(3) 連携研究者

水野 秀信 (MIZUNO, Hidenobu)

国立遺伝学研究所・個体遺伝研究系・助教

研究者番号: 0056159