

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2011～2014

課題番号：23115102

研究課題名（和文）メゾ回路編成における軸索分岐リモデリングの制御機構

研究課題名（英文）Axon branch remodeling mechanisms in mesoscopic neuronal circuit formation

## 研究代表者

山本 亘彦（YAMAMOTO, Nobuhiko）

大阪大学・生命機能研究科・教授

研究者番号：00191429

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 53,600,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、視床皮質投射系をモデルとして、軸索枝分れ形成に対する神経活動の役割、ならびに神経活動依存的な軸索分岐を制御する分子機構を明らかにすることを目指した。その結果、標的細胞側の機構として、神経活動依存的に皮質細胞が産生する因子により視床軸索の分岐が促進されること、また神経活動非依存的な分岐形成の機構のあることも明らかになった。軸索側のメカニズムとしては、通常はプレシナプスから分岐が形成されるが神経活動に依存してそれ以外の部位からの枝形成が生ずること、細胞骨格制御により軸索分岐が促進される分子機構の存在が見出された。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to reveal the role of neuronal activity in axon branching and the molecular mechanisms of branch formation, focusing on the thalamocortical projection system. We found that branching of thalamocortical axons is promoted by target-derived molecules which are expressed in an activity-dependent fashion and that an activity-independent mechanism also works on axon branching. We further found that branches mostly emerge from presynaptic sites of thalamic axons in normal conditions but appear from non-presynaptic sites with high neuronal activity. Evidence also suggests that a cytoskeleton-regulatory mechanism is involved in axon branching.

研究分野：神経科学

キーワード：軸索分岐 大脳 視床 神経活動

## 1. 研究開始当初の背景

神経回路の基本構造は発生プログラムで規定された軸索誘導機構によって構築されるが、その細部は自発発火や感覚入力により修飾されることが知られている。一旦神経回路が完成した後も、神経活動によって回路の再編が生ずる。発達期の視床から大脳皮質への投射系における視床軸索の枝分れ形成では、この神経活動依存的な現象がよく記述されている。

申請者らは、これまでに視床皮質回路を *in vitro* で再現することにより、視床軸索の皮質内での枝分れ形成に標的である皮質4層に発現する細胞外分子が必要なこと (Yamamoto et al, 1989, 1992, 1997, 2000) ならびに視床や皮質細胞の発火活動やその間のシナプス伝達が必要であることを明らかにしてきた (Uesaka et al, 2005, 2007)。また、内向き整流特性を持つカリウムチャネルの過剰発現を用いて、視床・大脳皮質細胞の両方の神経活動が、視床軸索の枝分れ形成に必要であることを示すに至っている。しかしながら、それらの分子メカニズムについてはほとんど明らかにされていなかった。

## 2. 研究の目的

上述の背景を踏まえて、本研究の目的は、視床皮質投射系をモデルとして、軸索枝分れ形成に対する神経活動の役割、ならびに神経活動依存的な軸索分岐を制御する分子機構を明らかにすることである。第1に、標的細胞側 (ポストシナプス側) のメカニズムについて、軸索枝分れのエフェクター分子として皮質細胞が神経活動依存的に産生する分子を見出し、その分子機構を解析する。第2に、軸索側 (プレシナプス側) のメカニズムについて、神経活動から軸索形態への変化を生じさせるダイナミクスを明らかにすることを目指す。

## 3. 研究の方法

標的細胞由来因子の軸索分岐作用を解析するためには、視床皮質共培養標本、遺伝子欠損動物を用いた。視床皮質共培養標本では、視床軸索を緑色蛍光タンパク質によって可視化し、*in vivo* での解析には軸索トレーサーを用いた。軸索側における標的由来分子に対する受容体同定のためには、*in situ* hybridization 法、細胞株を用いた結合実験を行った。また、候補受容体の作用を調べるためには、視床皮質共培養標本の視床細胞に対してその遺伝子の過剰発現やノックダウン

実験を行った。また、前シナプスでのエンドサイトーシスやエクソサイトーシスの役割を調べるためには、視床細胞にそれらの働きを阻害するタンパク質をコードする遺伝子の導入を行った。

視床軸索側のメカニズムについては、前シナプス特異タンパク質と蛍光タンパク質をコードする遺伝子を視床軸索に導入することにより軸索と前シナプスを可視化し、タイムラプス観察を行った。さらに、神経活動を増減させるチャネルタンパク質をコードする遺伝子を共発現させることにより、神経活動をコントロールし、視床軸索の動態を調べた。

## 4. 研究成果

### (1) 皮質細胞由来の Netrin-4 による神経活動依存的な視床軸索の分岐機構

視床軸索の標的である大脳皮質細胞に発現する遺伝子の探索を行い (Zhong et al., 2004; Takemoto et al, 2011) 発達期の軸索成長に関与すると考えられる遺伝子を複数個同定した。それらの中で、培養下で神経活動に依存して増大するものとして、*netrin-4* を得た。*netrin-4* は *netrin* ファミリーに属する遺伝子であるが、神経系での機能はほとんど知られていなかった。発達期においては、大脳皮質視覚野や体性感覚野に発現し、生後暗黒下で飼育したラットではその発現が著しく減少することが見出された。次に、その作用を調べるために、視床大脳共培養標本に *Netrin-4* タンパク質は添加すると、視床軸索の枝分れ形成が顕著に増大することがわかった。さらに、*netrin-4* 欠損ラット (北海道大学北田一博らのグループが作製、Kitada et al., 2008) において、視床皮質軸索の分岐を軸索トレーサーを用いて調べた。その結果、*netrin-4* 欠損ラットでは、視床軸索の分岐数ならびに分枝長が野生型に比べて有意に減少した。加えて、体性感覚野において 5-HTT (セロトリントランスポーター) に対する抗体を用いて視床軸索の終末分布を調べたところ、*netrin-4* 欠損ラットで、その染色強度が野生型に比べて減少していることも示された。以上より、*Netrin-4* が発達期大脳皮質で神経活動依存的に発現し、視床軸索の分岐形成を制御し得ることが示された。

次に、*Netrin-4* の視床軸索に対する作用機序を明らかにするために、その受容体を同定し、その下流の分子機構を調べた。*netrin* ファミリーの受容体の候補としては、DCC, Neogenin, Unc5A, Unc5B, Unc5C, Unc5D が挙

げられるので、それらの *in situ* hybridization を行った結果、*dcc*, *neogenin*, *unc5b* が生後発達期のラット視床に強く発現することが分かった。次いで、Netrin-4 との結合性を DCC, Neogenin, Unc5B を発現させた HEK293 細胞上で調べたところ、Netrin-4 は Unc5B にのみ強く結合することが分かった。さらに、Unc5B の機能を調べるために、視床皮質共培養系において RNAi 法を適応し視床軸索の分岐形成を観察した。shRNA により視床ニューロンの Unc5B をノックダウンすると、皮質切片での軸索分岐は顕著に減少した。以上の結果から、神経活動依存的な視床皮質軸索の分岐形成には、Netrin-4 が皮質ニューロンの活動状況を反映して産生され、一方皮質内に侵入した視床軸索は Unc5B によって Netrin-4 を受容し、細胞内シグナル伝達系を介して分岐形成を促進させることが示唆された。

#### (2) 視床軸索の枝分かれに対する BDNF の作用機序

標的由来因子として Netrin-4 に加えて、brain derived neurotrophic factor (BDNF) が視床軸索に作用して軸索分岐を促進することも見出された。実際、視床皮質共培養に BDNF を 200 ng/ml 添加することにより、軸索分岐が有意に増大した。さらに、BDNF による視床軸索への作用として、シナプス末端からの取り込みによって分岐が形成される仮説を掲げ、エンドサイトーシスの役割について解析を行った。そのため、視床ニューロンにエンドサイトーシスを阻害する AP180C タンパクをコードする遺伝子を視床細胞に遺伝子導入した。その結果、AP180C の濃度に応じて分岐形成が抑制されることが示された。また、エクソサイトーシスに関わるタンパク質として知られるシナプトタグミンのミュータントの遺伝子を視床細胞に導入することによっても同様の表現型が見出されたことから、シナプス小胞のリサイクリングによるシナプス部位での取り込み機構が神経栄養因子による軸索分岐に対して重要な役割を果たすことが示唆された。さらに、視床軸索側の発火活動が活発化するとリサイクリングが増大することと考え合わせると、神経活動依存的に視床軸索での神経栄養因子の取り込みが増大すると考えられ、以上の結果は神経活動依存的な軸索分岐のメカニズムとして重要なものであることが示唆される。

#### (3) 視床軸索の分岐形成における視床軸索の神経活動の役割

視床軸索の形態とシナプスの動態を観察するために、視床皮質投射を培養下で再現することができる視床皮質共培養を用いた。軸索とシナプスを可視化するためには、蛍光タンパク質の DsRed とプレシナプスマーカーとして知られている Synaptophysin (SYP) に蛍光タンパク質を繋いだ SYP-EGFP を用いた。これらのタンパク質をコードするプラスミドをエレクトロポレーション法によって視床ニューロンに導入し培養後期に観察を行ったところ、SYP-EGFP の集積 (puncta) が軸索に沿って形成される様子がみられた。さらに、ポストシナプスマーカーである PSD-95 の抗体染色を行った結果、SYP-EGFP の puncta が PSD-95 と隣接することが確認できた。次に、分岐点と SYP-EGFP の puncta に対する層分布を調べたところ、それらの分布には相関があり、分岐点と puncta はお互いに近傍に位置することが明らかになった。軸索分岐とシナプス形成の関連性を調べるために、視床軸索の枝分かれが形成され始める培養 9 日目から 1 日ごとに視床軸索の観察を行ったところ、分岐点には SYP-EGFP の puncta が頻繁に局在することがわかった。さらに、枝分かれと puncta 形成の因果関係を明らかにするため、2 時間間隔でタイムラプス観察を行ったところ、puncta から新しい分岐が形成される様子が観察された。

このようなシナプスを介した軸索分岐形成に対して神経活動が及ぼす作用を調べるために、遺伝子工学的手法を用いてプレシナプス側の神経活動を制御することにより、シナプス依存的な分岐形成機構に対する神経活動の役割を明らかにすることを試みた。神経活動の抑制のために Kir2.1 を、神経活動促進のためにバクテリア由来の電位依存性ナトリウムチャネルである NaChBac を視床軸索に発現させ、その際の軸索分岐を調べた。その結果、神経活動依存的に軸索分岐は増大するが、活動が活発になったときシナプス非依存的な分岐形成のモードが出現してくることが明らかになった。以上、本研究により、哺乳類大脳皮質における神経活動依存的な軸索分岐形成の細胞レベルとしての特質が明らかになった。

#### (4) 神経活動依存的な視床軸索由来因子の役割

大脳皮質を構成する多様な細胞の分化過程において、大脳皮質への主な入力線維であ

る視床軸索に由来する外来的因子が重要な役割を果たしていると示唆されてきたが、その実体や機能は示されていない。この問題に取り組むために、発生期の視床軸索に特異的に発現する分子の探索を行い、それらが脳皮質細胞の分化に対して持つ作用を解析した。まず、DNA マイクロアレイ解析やサブトラクションライブラリー構築による遺伝子発現の解析から、視床に特異的に発現する遺伝子を網羅的に探索し、複数の遺伝子が同定された。この中で、Neuritin-1 と Vgf は脳皮質感覚野に軸索を投射する感覚性視床核に特異的に発現し、細胞内局在の解析からこれらが視床ニューロンの軸索に輸送されることがわかった。次に、これらの視床由来分子が発生期の脳皮質細胞の発達に及ぼす作用を分散培養系において解析した結果、ニューロンの生存と樹状突起の形成を促進する効果を持つことを見出した。また、細胞形態の解析により錐体ニューロンに比べて多極性ニューロンの割合が増加していることが示唆された。さらに、Neuritin-1 と Vgf の作用する細胞の層分布を明らかにするために、スライス培養下にこれらのタンパク質を添加して調べた。その結果、5 層の錐体ニューロンの樹状突起形成に顕著な効果がなかったのに対して、4 層に存在する星状ニューロンの樹状突起数を有意に増加させる働きがあることを見出した。Neuritin-1 と Vgf は共に、神経活動に依存してその発現が増大することも良く知られており、そのことと考え合わせると、視床軸索に由来する外来因子が神経活動依存的に脳皮質ニューロンの生存と形態形成を細胞種特異的に制御する可能性が示唆された。

##### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 13 件)

1. Matsumoto, N., Hoshiko, M., Sugo, N., Fukazawa, Y. & \*Yamamoto, N. Synapse-dependent and independent mechanisms of thalamocortical axon branching are regulated by neuronal activity. *Develop Neurobiol.* [Epub ahead of print] (2015). 査読有
2. Sugo, N., Morimatsu, M., Arai, Y., Kousoku, Y., Ohkuni, A., Nomura, T., Yanagida, T. & \*Yamamoto, N. Single-molecule imaging reveals dynamics of CREB transcription factor bound to its target sequence. *Sci. Rep*

- 5, 10662 (2015). 査読有
3. Bruining, H., Matsui, A., Oguro-Ando, A., Kahn, R.S., Van't Spijker H.M., Akkermans, G., Stiedl, O., van Engeland, H., Koopmans, B., van Lith, H.A., Oppelaar, H., Tieland, L., Nonkes, L.J., Yagi, T., Kaneko, R., Burbach, J.P., Yamamoto, N. & \*Kas, M.J. Genetic Mapping in Mice Reveals the Involvement of Pcdh9 in Long-Term Social and Object Recognition and Sensorimotor *Development. Biol. Psychiatry* Available online February 7 (2015). 査読有
4. Hayano, Y., Zhao, H., Kobayashi, H., Takeuchi, K., Norioka, S. & \*Yamamoto, N. The role of T-cadherin in axonal pathway formation in neocortical circuits. *Development* **141**, 4784-93 (2014) 査読有
5. Hayano, Y., Sasaki, K., Ohmura, N., Takemoto, M., Maeda, Y., Yamashita, T., Hata, Y., Kitada, K. & \*Yamamoto, N. Netrin-4 regulates thalamocortical axon branching in an activity-dependent fashion. *Proc Natl Acad Sci. U S A* **111**, 15226-31 (2014). 査読有
6. Granseth, B., Fukushima, Y., Sugo, N., Lagnado, L. & \*Yamamoto, N. Regulation of thalamocortical axon branching by BDNF and synaptic vesicle cycling. *Front Neural Circuit* **7**, 202 (2013). 査読有
7. Malyshevskaya, O., Shiraishi, Y., Kimura, F. & \*Yamamoto, N. Role of electrical activity in horizontal axon growth in the developing cortex: A time-lapse study using optogenetic stimulation. *PLoS One* **8**, e82954 (2013). 査読有
8. Arnoux, I., Hoshiko, M., Mandavy, L., Avignone E., Yamamoto, N. & \*Audinat, E. Adaptive phenotype of microglial cells during the normal postnatal development of the somatosensory "barrel" cortex, *Glia* **61**,1582-1594 (2013) 査読有
9. Sato, H., Fukutani, Y., Yamamoto, Y., Tatara, E., Takemoto, M., Shimamura, K. & \*Yamamoto, N. Thalamus-derived molecules promote survival and dendritic

- growth of developing cortical neurons. *J Neurosci.* **32**, 15388-15402 (2012). 査読有
10. Hoshiko, M., Arnoux, I., Avignone, E., Yamamoto, N. & \*Audinat, E. Deficiency of the microglial receptor CX3CR1 impairs postnatal functional development of thalamocortical synapses in the barrel cortex. *J Neurosci.* **32**, 15106-15111 (2012). 査読有
  11. \*Yamamoto, N. & Lopez-Bendito, G. Shaping brain connections through spontaneous neural activity. *Eur J Neurosci.* **35**, 1595-604 (2012). 査読有
  12. Fukunishi, A., Maruyama, T., Zhao, H., Tiwari, M., Kang, S., Kumanogoh, A. & \*Yamamoto, N. The action of Semaphorin7A on thalamocortical axon branching. *J Neurochem* **118**, 1008-15 (2011). 査読有
  13. Zhao, H., Maruyama, T., Hattori, Y, Sugo, N., Takamatsu, H., Kumanogoh, A., Shirasaki, R. & \*Yamamoto, N. A molecular mechanism that regulates medially oriented axonal growth of upper layer neurons in the developing neocortex. *J Comp Neurol.* **519**, 834-48 (2011). 査読有
- [学会発表](計 25 件)
1. Yamamoto, N. “Activity-dependent neural circuit formation in the developing cortex”, The 92nd annual meeting of the physiological society of Japan, 2015. 3. 21-23, (招待講演)
  2. 松本直之, 星子麻記, 山本亘彦. 神経活動依存的な軸索分岐形成に対するシナプスの役割, 第 37 回日本神経科学大会, 2014.9.11-13, 横浜
  3. 北川宏信, 菅生紀之, 大國紋 & 山本亘彦. 大脳皮質神経細胞における神経活動依存的な転写調節因子 CREB 動態の 1 分子イメージング解析, 第 37 回日本神経科学大会, 2014.9.11-13, 横浜
  4. 大西公平, 菅生紀之 & 山本亘彦. 大脳皮質神経細胞分化における DNA 修復酵素 DNA ポリメラーゼ  $\beta$  の機能に関する研究, 第 6 回神経発生討論会, 2014.3.13-14, 大阪
  5. 山本亘彦, 神経活動依存的な皮質神経回路の分子機構, 第 86 回日本生化学大会, 2013.9.11-13, 横浜 (招待講演)
  6. 山本亘彦, 大脳皮質における神経活動依存的・非依存的な神経回路形成の制御機構 - 氏か育ちか, 第 35 回神経組織培養研究会, 2013.6.29, 大阪 (招待講演)
  7. Yamamoto, N. “Activity-dependent mechanisms of cortical circuit formation” Neuro2013 Formal Satellite Symposium “Neuronal circuits: Cutting edge approaches to the complexity”, 2013.6.19, 京都 (招待講演)
  8. 大西公平, 菅生紀之, 豊田峻輔, 平山晃斉, 八木健 & 山本亘彦 DNA ポリメラーゼ  $\beta$  の神経前駆細胞における作用が大脳皮質における神経細胞分化に必要である, Neuro 2013, 2013.6.20-23, 京都
  9. 早野祐紀, Hong Zhao & 山本亘彦. 大脳皮質神経回路形成における T-カドヘリンの役割, Neuro 2013, 2013.6.20-23, 京都
  10. Yamamoto, N. “Activity-dependent remodeling of thalamocortical axon branching” “Synaptic remodeling : molecular mechanisms and physiology” The 90th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, Tokyo, 2013.3.29, 東京 (招待講演)
  11. 菅生紀之, 森松賢順, 新井由之, 香束剛章, 大國紋, 野村泰伸, 柳田敏雄 & 山本亘彦. 1 分子イメージングによる転写因子 CREB の動態解析, 第 35 回日本分子生物学会, 2012.12.11-14, 福岡
  12. 山本亘彦. 神経活動依存的な軸索分岐の制御機構 神経組織の成長・再生・移植研究会. 第 27 回学術集会, 2012.10.26-27, 東京 (招待講演)
  13. Hayano, Y., Sasaki, K., Takemoto, M., Maeda, Y., Yamashita, T., Ohmura, N., Hata, Y., Kitada, K. & Yamamoto N. Activity-dependent expression of Netrin-4 regulates thalamocortical axon branching, Society for Neuroscience 42nd annual meeting, 2012.10.13-17, New Orleans, USA
  14. Malyshevskaya, O., Shiraiishi, Y., Tanabe, Y., Ruthazer, E.S., Yamamoto, N. The role of neuronal activity in cortical axon growth: A time-lapse study using optogenetic control,

- Society for Neuroscience 42nd annual meeting, 2012.10.13-17, New Orleans, USA
15. Sugo, N., Morimatsu, M., Arai, Y., Kousoku, K., Ohkuni, A., Nomura, T., Yanagida, T. & Yamamoto, N. Single-molecule imaging of transcription factor CREB in living cells, Society for Neuroscience 42nd annual meeting. 2012.10.13-17, New Orleans, USA
  16. Yamamoto, N. “Molecular mechanisms of thalamocortical axon branching: Nature and nurture programs” The 35th Annual Meeting of the Japan Neuroscience society, 2012.9.18-21, 名古屋 (招待講演)
  17. 佐藤-竹本晴香, 畠山淳, 山本巨彦 & 嶋村健児. マウス大脳皮質における入力線維依存的な領野特異的細胞構築, 第35回日本神経科学大会, 2012.9.18-21, 名古屋
  18. 松本直之 & 山本巨彦. 視床皮質軸索の枝分かれ形成に対するシナプス形成の役割, 第35回日本神経科学大会, 2012.9.18-21, 名古屋
  19. Shiraishi, Y., Malyshevskaya, Olga. & Yamamoto, N. Role of neuronal activity in cortical axonal growth: A study using a photostimulation technique with Channelrhodopsin-2, 第34回日本分子生物学会, 2011.12.13-16, 横浜
  20. Matsumoto, N., Kotera, M. & Yamamoto, N. Involvement of synapse formation In thalamocortical axon branching, 第34回日本分子生物学会, 2011.12.13-16, 横浜
  21. 早野泰史, 竹本誠, 前田有里枝, 北田一博 & 山本巨彦. 感覚入力によって発現する Netrin-4 が視床皮質投射における軸索枝分かれ形成を制御している, 第34回日本神経科学大会, 2011.9.14-17, 横浜
  22. Alchini, R., Sugo, N. & Yamamoto, N. “Histone deacetylase 9 (HDAC9) regulates thalamocortical axon branching by shuttling from the nucleus to cytoplasm in an activity-dependent fashion” 第34回日本神経科学大会, 2011.9.14-17, 横浜
  23. Alchini, R., Sugo, N. & Yamamoto, N. Nucleocytoplasmic translocation of the histone deacetylase 9 (HDAC9) regulates thalamocortical axon branching, Cortical Development Meeting, 2011.5.19-22, Crete, Greece
  24. Yamamoto, N. “Activity-dependent mechanisms of thalamocortical axon branching” Development and Plasticity of Thalamocortical Systems, 2011.1.31-2.3, Arolla, Switzerland (招待講演)
  25. Yamamoto, N. “Activity-dependent axon branching in cortical circuits” Building a functional Brain, 2011.1.29, New Zealand (招待講演)
- 〔図書〕(計4件)
1. 山本巨彦 脳神経系の再生医学 – 発生と再生の融合的新展開- (河崎洋志編) 診断と治療社, pp. 66-70 (2015)
  2. Matsumoto, N., Sasaki, K. & Yamamoto, N. Electroporation method for mammalian CNS neurons in organotypic slice cultures. In: Electroporation Methods and Neuroscience (Saito, T., ed) Springer, pp. 159-168 (2014).
  3. 山本巨彦 プロGRESSIVE生命科学(米田悦啓, 岡村康司, 金井好克, 西田幸二編) 南山堂, pp. 213-215 (2014)
  4. 山本巨彦 視床皮質軸索の枝分かれ形成の制御機構 ブレインサイエンス・レビュー (ブレインサイエンス振興財団 伊藤正男・河合述史編) (株)クバプロ, pp. 111-125 (2011)
- 〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/neurobiol/>
6. 研究組織
- (1)研究代表者  
山本巨彦 (YAMAMOTO, Nobuhiko)  
大阪大学・大学院生命機能研究科・教授  
研究者番号: 00191429
- (2)連携研究者  
菅生紀之 (SUGO, Noriyuki)  
大阪大学・大学院生命機能研究科・助教  
研究者番号: 20372625