

令和元年5月29日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04263

研究課題名(和文) マウス体性感覚野第4層におけるカラムの機能的成熟と神経活動

研究課題名(英文) Column maturation and neural activity in mouse somatosensory cortex L4

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) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：大脳皮質の情報処理の単位である「カラム」の機能的成熟における神経活動の役割を理解することを目的として、マウス大脳皮質体性感覚野(バレル野)においてヒゲ感覚情報を担うカラムである「バレル」をモデルとして研究を行った。「パッチワーク型」というユニークな時空間的パターンを示す自発活動が、バレル形成期である新生仔期のバレル野に存在することを、GCaMP6sを用いた in vivoカルシウムイメージングによって明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトを含む哺乳類の脳では膨大な数のニューロンが回路を形成し、多様な情報の処理や行動の制御を行っている。そうした複雑な神経回路は、ゲノム情報によって大まかに作られた後、主に生後に実際に使われる中で調整され、成熟する。今回、そうした子供期の脳における回路試運転の実態の一端が、マウス体性感覚野をモデルとした研究で明らかになった。この成果は、ヒトの正常な子供の脳の発達の理解、および、その破綻による発達障害や精神疾患の理解にもつながることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In order to understand the role of neural activity in columnar maturation in the neocortex, whisker-barrel system in the mouse was used as a model. Our in vivo imaging analyses using the GCaMP6s have revealed spontaneous activity with a unique spatio-temporal pattern in the neonatal mouse barrel cortex.

研究分野：神経科学

キーワード：神経科学 神経回路 マウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

「カラム」は似た反応特性をもつ神経細胞が物理的に集合してできる構造であり、大脳皮質の情報処理の単位である。その形成の過程と機構を理解することは神経科学の重要課題である。マウス大脳皮質体性感覚野（バレル野）においてヒゲ感覚情報を担うカラムである「バレル」は、新生仔期にヒゲ由来の入力（＝神経活動）依存的に形成される。しかしながら、バレルの機能的成熟がおきる新生仔期における神経活動の実体はよくわかっていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、二光子顕微鏡を用いた神経活動解析（カルシウムイメージング）を行い、バレルの機能的成熟と神経活動の関係を明らかにする。特に、バレルの機能的成熟が活発に行われる新生仔期における、感覚刺激によらない神経活動である自発活動の実体を理解することを目的とした。

### 3. 研究の方法

バレル野の第4層神経細胞あるいは視床皮質軸索にカルシウムインディケータであるGCaMP6sを導入し、バレル形成の起きる新生仔期において二光子顕微鏡を用いたカルシウムイメージングを行い、自発活動の時空間パターンを調べた。そして、バレル形成の完了した生後2週目のものと比較した。また、解析のためのトランスジェニックマウスを2種類作製した。

### 4. 研究成果

#### (1) 新生仔期のバレル野にみられるパッチワーク型の自発活動

視床皮質軸索でRFPを発現するトランスジェニック(TCA-RFP)マウスを作製した。そして、子宮内電気穿孔法(IUE)を用いて、そのマウスの第4層神経細胞にGCaMP6sを高密度で導入した(図1)。このマウスの頭に観察窓を装着し、生後5日目で二光子顕微鏡を用いたカルシウムイメージングを行った。

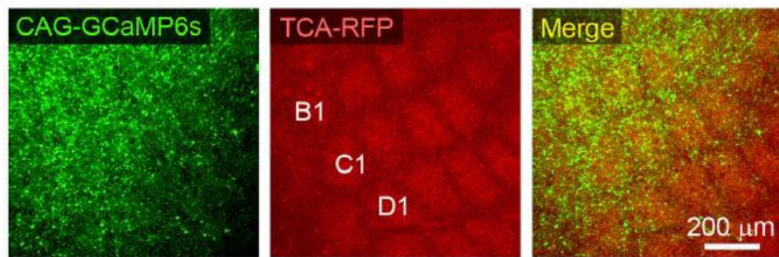


図1 バレル野での自発活動の観察

視床皮質軸索にRFPを発現するトランスジェニックマウス(TCA-RFPマウス)を作製し、そのバレル野第4層に子宮内電気穿孔法でGCaMP6sを発現させた。

その結果、ヒゲを刺激しなくても、バレル野にバレルに対応したパッチワーク型の時空間パターンをもつ特徴的な自発活動が存在することが明らかとなった(図2)。

すなわち、ヒゲに何も触れていない状態でも、マウスの体性感覚野はバレル毎に発火していた。

#### (2) 新生仔期における同一バレルに属する神経細胞の同期

自発活動のパターンを細胞レベルで解析するために、Supernova法を用いてバレル野の第4層に疎ら(まばら)にGCaMP6sを発現し、生後5日目にin vivoカルシウムイメージングを行った。その結果、同じバレルに属する神経細胞は同期する傾向があるが、別のバレルに属するものは同期しない傾向があることがわかった(図3)。

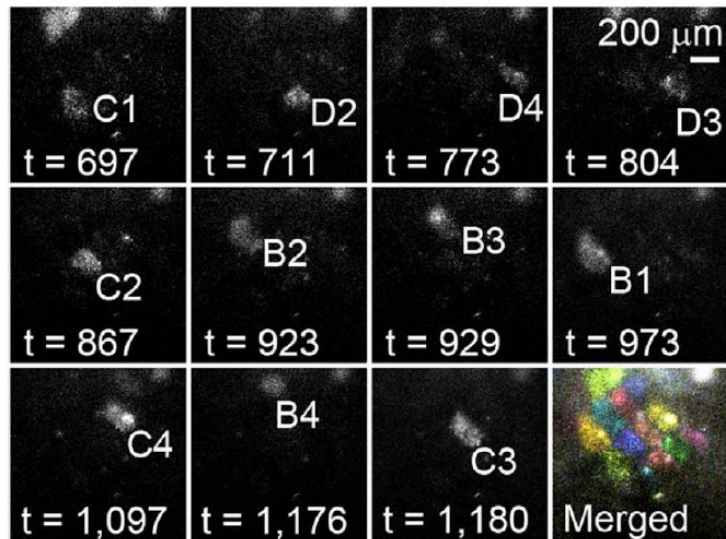


図2 バレル野の二光子顕微鏡カルシウムイメージング  
異なったタイミングで活動(子宮内電気穿孔法でバレル野の第4層にGCaMP6sを導入)した部位に異なった色をつけて重ねるとパッチワークのように見える。同時に活動する単位はバレル(TCA-RFPマウスを利用して可視化)に一致することがわかった。C1、D2などは対応するバレルを表す。

#### (3) 視床皮質軸索のパッチワーク型自発活動

視床皮質軸索に GCaMP6s を発現するトランスジェニックマウスを作製し、同様に、生後5日目に *in vivo* カルシウムイメージングを行った。その結果、視床皮質軸索もまたパッチワーク型の自発活動を示すことがわかった。このことは、バレル野第4層でみられるパッチワーク型自発活動が、視床皮質軸索によって大脳皮質に運ばれていることを示唆する。

#### (4) 自発活動の起源

ヒゲの根元に局所麻酔を注入するとバレル野のパッチワーク活動が消えた。このことは、パッチワーク型活動が末梢由来であることを示唆する。しかし、ヒゲと三叉神経節を結ぶ眼窩下神経を切断したところ、バレル野のパッチワーク型活動は消えなかった。また、新生仔期の齧歯類ではヒゲの自発的な動きがみられるが、それとバレル野の自発活動の関係を両者を同時に観察することによって解析した。その結果、このヒゲの自発的な動きとバレル野でのパッチワーク型活動との間はほぼ独立であることが明らかとなった。このことと眼窩下神経切断実験の結果は整合性がある。自発活動がどこに由来するのかは今後の研究で明らかにしたい。

#### (5) 生後2週目におけるパッチワーク型自発活動の消失

以上の研究は、バレル形成期である生後5日目で行ったものであるが、バレル形成が完了した生後11日目で同様に大脳皮質の神経活動の観察を行った。その結果、同じバレルに属する神経細胞であってもばらばらの発火をすることがわかった(図4)。このことは、パッチワーク型の自発活動が、バレル形成期である生後1週目にのみ存在することを示し、バレルカラム形成において重要な役割を担う可能性を示唆する。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 13 件)

Nakazawa S, Mizuno H, Iwasato T. Differential dynamics of cortical neuron dendritic trees revealed by long-term *in vivo* imaging in neonates. *Nat Commun.* 9, 3106. (2018)

査読有

DOI: 10.1038/s41467-018-05563-0

Mizuno H, Nakazawa S, Iwasato T. *In Vivo* Two-photon Imaging of Cortical Neurons in Neonatal Mice. *J. Vis. Exp.* 140, e58340. (2018) 査読有

DOI: 10.3791/58340

Mizuno, H., Ikezoe, K., Nakazawa, S., Sato, T., Kitamura, K., Iwasato, T. Patchwork-Type Spontaneous Activity in Neonatal Barrel Cortex Layer 4 Transmitted via Thalamocortical Projections. *Cell Rep.* 22, 123-135. (2018) 査読有

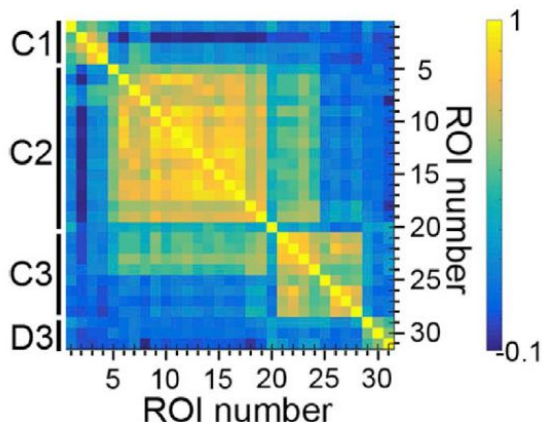


図3 生後5日目の単一細胞解析

生後5日目のバレル野では、同じバレル(C1、C2など)に属する細胞は同期する傾向がみられる。

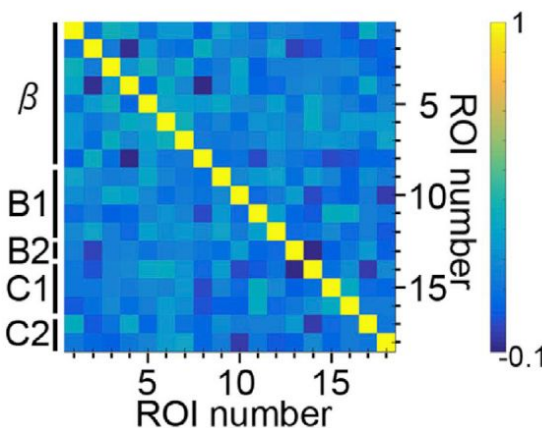


図4 生後11日目の単一細胞解析

生後11日目のバレル野では、同じバレル(B1、B2など)に属する細胞も同期しない。

DOI: 10.1016/j.celrep.2017.12.012

Iwasato, T., Erzurumlu, Reha, S. Development of tactile sensory circuits in the CNS. *Current Opinion in Neurobiology*, 53, 66-75, ELSEVIER (2018) 査読有

DOI: 10.1016/j.conb.2018.06.001

Katori, S., Noguchi-Katori, Y., Okayama, A., Kawamura, Y., Luo, W., Sakimura, K., Hirabayashi, T., Iwasato, T., Yagi, T. Protocadherin- C2 is required for diffuse projections of serotonergic axons. *Sci Rep.* 7, 15908. (2017) 査読有

DOI: 10.1038/s41598-017-16120-y

Katori, S., Noguchi-Katori, Y., Itohara, S., Iwasato, T. Spinal RacGAP -Chimaerin is Required to Establish the Midline Barrier for Proper Corticospinal Axon Guidance. *J Neurosci.* 37, 7682-99. (2017) 査読有

DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3123-16.2017

Moreno-Juan, V., Filipchuk, A., Anton-Bolanos, N., Mezzera, C., Gezelius, H., Andres, B., Rodriguez-Malmierca, L., Susin, R., Schaad, O., Iwasato, T., Schuele, R., Rutlin, M., Nelson, S., Ducret, S., Valdeolmillos, M., Rijli, F., Lopez-Bendito, G. Prenatal thalamic waves regulate cortical area size prior to sensory processing. *Nature Commun.* 8, 14172. (2017) 査読有

DOI: 10.1038/ncomms14172

Luo, W., Mizuno, H., Iwata, R., Nakazawa, S., Yasuda, K., Itohara, S., Iwasato, T. Supernova: A Versatile Vector System for Single-Cell Labeling and Gene Function Studies in vivo. *Sci Rep.* 6, 35747. (2016) 査読有

DOI: 10.1038/srep35747

Iwata, R., Iwasato, T. In vitro Assay for Dendritic Spine Retraction of Hippocampal Neurons with Sparse Labeling. *Bio-Protocol* 6, e1937. (2016) 査読有

DOI: 10.21769/BioProtoc.1937

Shinoda, Y., Ishii, C., Fukazawa, Y., Sadakata, T., Ishii, Y., Sano, Y., Iwasato, T., Itohara, S., Furuichi, T. CAPS1 stabilizes the state of readily releasable synaptic vesicles to fusion competence at CA3-CA1 synapses in adult hippocampus. *Sci Rep.* 6, 31540. (2016) 査読有

DOI: 10.1038/srep31540

Mita, S., de Monasterio-Schrader, P., Fünfschilling, U., Kawasaki, T., Mizuno, H., Iwasato, T., Nave, K. A., Werner, H. B., Hirata, T. Transcallosal Projections Require Glycoprotein M6-Dependent Neurite Growth and Guidance. *Cereb Cortex.* 25, 4111-25. (2015) 査読有

DOI: 10.1093/cercor/bhu129

Iwata, R., Matsukawa, H., Yasuda, K., Mizuno, H., Itoharu, 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) 査読  
有

DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0419-15.2015

岩田亮平、岩里琢治、学習能力の発達を調節するタンパク質-成長期における 2 キメリン  
の働きが、おとなでの脳機能を左右する、化学と生物、53 巻、568-570、(2015) 査読無

[学会発表](計 21 件)

岩里琢治、赤ん坊の脳の中での神経回路の発達 マウス遺伝学と二光子イメージングを用  
いた研究、第 18 回 BIRD 脳科学セミナー、2019 年

Takuji Iwasato. In vivo imaging of barrel cortex layer 4 during thalamocortical  
reorganization. 遺伝研研究会 2018 “Circuit construction in the mammalian brain”,  
2018 年

Takuji Iwasato. In vivo imaging of barrel cortex circuit refinement in neonates.  
Spontaneous Activity in Brain Development (SPONT 2018), 2018 年

Takuji Iwasato. In vivo functional and morphological imaging of neural circuit  
refinement in the neonatal barrel cortex. CSHA(Cold Spring Harbor Asia) on  
Neuroscience 2018, 2018 年

岩里琢治、新生仔マウスのパレル皮質神経回路発達の in vivo イメージング(In vivo  
imaging of barrel cortex circuit refinement in neonates)、第 41 回日本神経科学大会、  
2018 年

岩里琢治、マウスで迫る「赤ん坊の脳の発達のしくみ」、JT 生命誌研究館・国立遺伝学研  
究所共同企画シンポジウム、2018 年

岩里琢治、マウス遺伝学を用いた体性感覚系神経回路発達の解析、新潟大学脳研究所共同  
研究合同セミナー、2017 年

Takuji Iwasato. Unveiling the mechanisms of neuronal circuit refinement in the  
neonatal mouse barrel Cortex. Academia Sinica Symposium, 2017 年

岩里琢治、マウス大脳皮質の生後発達期神経回路リモデリング、第 12 回「認識と形成」研  
究会、2017 年

岩里琢治、生後発達期の大脳皮質リモデリング、生理学研究所研究会「大脳皮質回路の機  
能原理を探る」、2017 年

岩里琢治、マウス大脳皮質の生後発達期神経回路リモデリング、第 5 回「幸福脳」研究会  
(名古屋大学・慶応大学合同ミーティング)、2017 年

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、2017 年

Takuji Iwasato. In vivo imaging of neonatal mouse barrel cortex. Dart Neuroscience  
Seminar Series at The Scripps Research Institute 2016 年

岩里琢治、新生仔大脳皮質における神経回路スクラップ&ビルド、スクラップ&ビルドによ

る脳機能の動的制御シンポジウム、2016年

岩里琢治、独自の二光子イメージング技術を用いた、新生仔マウス大脳皮質における神経回路発達の解析、第159回日本獣医学会学術集会、2016年

Takuji Iwasato. In vivo imaging of neonatal mouse barrel cortex. シンポジウム "Circuit Construction in the Mammalian Brain", 2016年

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

Takuji 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

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

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

- ② Takuji 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、2015年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：ベクターシステム、遺伝子発現方法、標的遺伝子ノックアウト方法、標的遺伝子ノックダウン方法、標的遺伝子編集方法、及び遺伝子発現キット

発明者：岩里琢治、水野秀信、羅ブンジュウ、岩田亮平

権利者：大学共同利用機関法人情報・システム研究機構

種類：特許

番号：特願 2016-165093 号

出願年：平成 28 年

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://iwasato-lab.sakura.ne.jp/>

## 6. 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。