

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H06143

研究課題名（和文）新生仔脳深部の生体イメージングによる活動依存的な視床皮質回路形成の包括的解析

研究課題名（英文）In vivo imaging of neonatal brain to elucidate the mechanism of activity-dependent thalamocortical circuit formation

研究代表者

水野 秀信（Mizuno, Hidenobu）

熊本大学・国際先端医学研究機構・特任准教授

研究者番号：00567159

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 20,700,000円

研究成果の概要（和文）：発達期脳の自発的な同期神経活動は神経回路形成に必須であるが、生体内における同期活動の様式、および同期活動依存的な回路形成メカニズムは多くが不明である。研究では、マウスのヒゲ感覚を処理する体性感覚野バレル皮質第4層の視床皮質回路形成をモデルとした。バレル皮質第4層にはバレル構造がヒゲの配置と一致し配置している。視床皮質回路形成が起こる生後1週齢において、バレル皮質第4層の神経細胞を生体2光子カルシウムイメージングしたところ、各バレル内の神経細胞で同期活動が見られた。一方、回路形成後の生後2週齢では同期は低下した。以上の結果は、バレルごとの同期活動が視床皮質回路形成に関わることを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトは認知や思考といった高次脳機能を持つ。これらの機能獲得には、発達期に脳神経回路が正確に配線されることが必要である。神経回路の配線には、同期活動など神経細胞群の活動様式が関わると考えられているが、発達期脳内の活動様式はほとんどわかっていない。本研究では、マウスのヒゲ感覚を処理する体性感覚野神経回路をモデルとし、この課題に取り組んだ。体性感覚野神経回路の配線が行われる生後5日目まで神経細胞の興奮状態を観察したところ、ヒゲごとの感覚を処理する細胞群が同期活動していた。この同期活動は脳神経回路の配線に関わると考えられる。本研究成果は、子供の脳発達理解の基盤になることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Correlated spontaneous neuronal activity is involved in the development of nervous systems; however, the nature of correlated activity during the circuit formation is still obscure in living animals. In this study, we used the thalamocortical circuit formation in mouse barrel cortex layer 4 as a model. By in vivo two-photon calcium imaging of the barrel cortex during the first postnatal week, we found that layer 4 neurons within the same barrel fire synchronously in the absence of peripheral stimulation, creating a 'patchwork' pattern of spontaneous activity corresponding to the barrel map. The patchwork activity pattern largely disappeared during postnatal week 2, and layer 4 neurons within the same barrel tended to fire asynchronously. This spontaneous layer 4 activity pattern has features suitable for the thalamocortical circuit formation in neonatal barrel cortex.

研究分野：神経科学

キーワード：生体イメージング 新生仔イメージング 2光子イメージング 活動依存的回路形成 単一細胞標識 モ
サイクノックアウト解析 大脳皮質 視床皮質回路

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大脳皮質神経回路の正確な形成は、認知などの高次機能に必須である。成体の大脳皮質神経回路は精密かつ複雑だが、新生仔では未成熟である。大脳皮質の神経細胞は新生仔期においても活動しており、これらの活動は正確な神経回路に与与することが、申請者を含む研究者により示されていた。しかし、生きた新生仔の大脳皮質においてどのような神経活動が存在するか、神経活動がどのような分子細胞メカニズムにより神経回路形成に関わるかは、適切な解析方法が存在せず、未だに多くが不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、マウス体性感覚野第4層の視床皮質神経回路形成をモデルとし(図1)、独自の新生仔脳深部2光子顕微鏡イメージング法を用いる事で、発達期大脳皮質における神経活動の実態、およびその回路形成における役割を明らかにすることであった。具体的な目標は以下3点であった。

(1) 新生仔大脳皮質第4層の活動様式の実態解明

これまでの先行研究により、新生仔体性感覚野表層(第2/3層)の活動様式が報告されていた。しかしながら、視床を経由した感覚情報の主要な入力層は第4層であるため、感覚情報が大脳皮質にどのように伝わるかを調べるためには第4層の活動様式を調べる必要があった。新生仔第4層の個々の神経細胞を2光子カルシウムイメージングする方法を開発することで、これを明らかにする。

(2) 新生仔大脳皮質第4層の活動様式に関わる分子細胞メカニズムの解明

上記の研究で同定された第4層の活動様式は、何らかのメカニズムにより発生すると考えられる。第4層の活動の由来、活動に関わる分子の同定、の2つを解明する。

(3) 新生仔大脳皮質第4層の活動様式と回路形成の関連の解明

同定された活動様式と神経回路形成の関連を調べるためには、カルシウムイメージングした細胞形態を解析する必要がある。活動様式と細胞形態を同時解析する手法を開発することで、これを明らかにする。

3. 研究の方法

本研究は、各種遺伝子組換えマウス(新規作成を含む)に対し、分子生物学的手法・子宮内電気穿孔法・形態学的手法・生体2光子顕微鏡イメージング法などを組み合わせて適用することで行った。以下に研究で用いた独自手法をまとめる。なお研究に用いた手法は熊本大学および国立遺伝学研究所の動物実験委員会において審査および承認されており、倫理面の配慮がなされている。

(1) 生体内の疎らな細胞を遺伝子導入可能なベクターシステム **Supernova** 法

第4層の個々の神経活動の活動様式を可視化するため、子宮内電気穿孔法により大脳皮質神経細胞に緑色蛍光カルシウムインディケータ **GCaMP6s** を導入した。なお研究期間内に **Supernova** 法についてまとめた論文を **Scientific Reports** 誌で発表した(Luo, Mizuno et al., 2016)。

(2) 体性感覚野マップが **RFP** 標識されたマウス

2光子イメージング中にバレル皮質のどの部位をイメージングしているかを確認するために、視床皮質軸索終末で赤色蛍光タンパク質 **RFP** を発現する組換えマウスを作成した。

(3) 視床皮質軸索で **GCaMP** を発現するマウス

視床神経細胞の神経活動を観察するために視床皮質軸索終末で **GCaMP6s** を発現する組換えマウスを作成した。なお(2)(3)の組換えマウスは **Cell Reports** 誌で発表した(Mizuno et al., 2018a)。

(4) 新生仔大脳皮質の2光子顕微鏡カルシウムイメージング

活動様式を観察するため、生体において大脳皮質神経細胞を2光子顕微鏡カルシウムイメージングした。具体的には、新生仔マウスの頭部に2光子観察用窓および頭部を固定するための金具を取り付けた。術後はマウスを保温し回復させた。回復したマウスを用い、無麻酔下にお

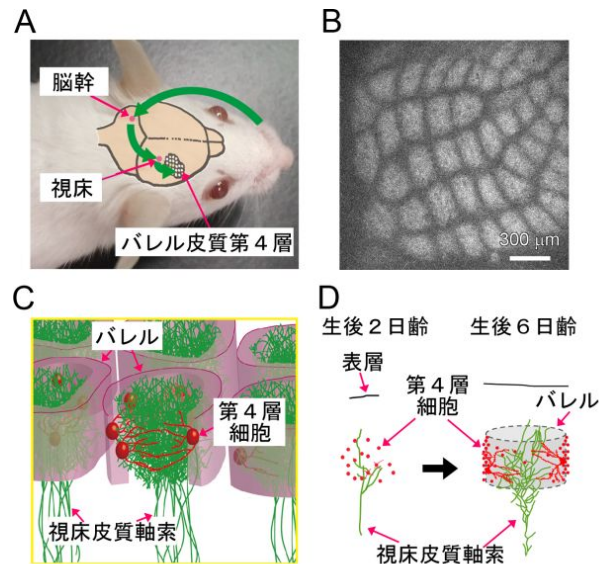


図1、体性感覚野バレル皮質神経回路

A、ヒゲ入力(感覚情報)は脳幹と視床を経由して皮質へ伝わる。

B、視床皮質軸索終末で見たバレルの配置。

C、視床皮質軸索はバレル内側で第4層細胞とシナプスを作る。

D、バレルは生後一週(生後6日齢)の間に形成される。

いて2光子顕微鏡で神経細胞の活動パターンを観察した。なお研究期間内にイメージング法をまとめたプロトコル論文を **Journal of Visualized Experiments** 誌に発表した(**Mizuno et al., 2018b**)。

4. 研究成果

(1) 新生仔期において体性感覚野第4層細胞はパッチワーク状の自発同期活動を示す。

生後1週齢マウス的大脑皮質体性感覚野を2光子カルシウムイメージングすることで、第4層細胞がパッチワーク状の自発同期活動パターンを示す事を見出した(図2)。

一方、生後2週齢においては自発同期活動の同期が低下していた。パッチワーク状活動が存在する時期は、バレル皮質神経回路が形成される時期と一致しているため、パッチワーク状活動が神経回路形成に関わる可能性が強く示唆された。

(2) 自発活動は末梢に由来するが、自発的なヒゲの動きとの相関は少ない。

視床においてパッチワーク状同期活動が存在するか否かを調べるため、視床皮質軸索終末で **GCaMP6s** を発現する組換えマウスを作成した。このマウスの第4層を生後1週齢において2光子カルシウムイメージングし、パッチワーク状の自発同期活動が存在する事を確認した。よってパッチワーク状自発同期活動は視床に由来することが明らかになった。

さらに、活動の由来が末梢であるか否かを調べるため、ヒゲ毛根にナトリウムチャンネル阻害剤リドカインを投与したマウスの第4層細胞をカルシウムイメージングした。投与されたマウスでは活動が観察されなかったため、活動の由来が末梢であることが示された。

マウスは出生直後においても自発的にヒゲを動かすため、ヒゲの動きが活動の由来である可能性がある。カルシウムイメージングと同時にヒゲの動きを観察したところ、ほとんどのパッチワーク活動はヒゲの動きと一致していなかった。以上の結果は、ヒゲの動きに依存しない末梢由来の自発同期活動が、大脑皮質第4層の活動の由来であることを示している。(1)(2)の結果は **Cell Reports** 誌に報告した(**Mizuno et al., 2018b**)。

(3) 自発同期活動を生み出す分子メカニズムの探索。

新生仔体性感覚野第4層細胞の同期活動パターンに関わる分子を探索した。その結果、**NMDA**型グルタミン酸受容体の必須サブユニット **NR1** をノックアウトした第4層細胞において、同期確立が低下することを示す結果を得た。現在までに一連のデータをまとめ、論文投稿を行い追加実験中である。

(4) 自発同期活動の第4層神経回路形成における役割の解析。

パッチワーク状自発同期活動の神経回路形成における役割を解明するためには、活動パターンを観察した細胞の形態を調べる実験系が必要である。申請時には **GCaMP6s** 発現細胞に **LacZ** を同時発現し、2光子カルシウムイメージング後に **LacZ** に対する抗体染色を行う事で細胞形態を解析する方法を提案した。しかしながら、この方法では樹状突起ダイナミクスの変化など細胞形態の動的パラメータを解析することができないという問題があった。研究期間中に実験条件の検討を行ったところ、**GCaMP6s** と **RFP** の蛍光シグナルを2光子イメージングで分離することが可能であることを見出した。そのため、この新しい手法を用い活動パターンと細胞形態の解析を行うこととした。現在実験を進めており、データがまとまり次第論文発表する予定である。

以上、筆頭著者論文1報と責任著者論文2報の発表、責任著者論文1報の投稿、国内外の複数の招待講演やシンポジウム口演における発表など、本研究は一定の研究成果を得た。

参考文献は発表論文リストを参照とする。

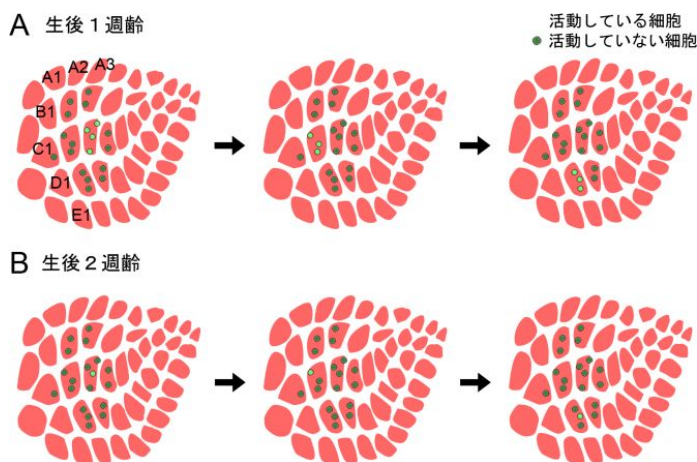


図2. バレル皮質におけるパッチワーク状同期活動

A、生後1週齢マウスでは、同一バレル内の第4層細胞が同発同期活動を示す。A1、A2などはバレルの名前を示す。パッチワーク状活動は、それぞれのバレルで約1分おきに見られた。

B、生後2週齢では自発同期活動は低下した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Mizuno H*, Nakazawa S, Iwasato T (* correspondence)	4. 巻 140
2. 論文標題 In Vivo Two-photon Imaging of Cortical Neurons in Neonatal Mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 e58340
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3791/58340	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mizuno H* , Ikezoe K, Nakazawa S, Sato T, Kitamura K, Iwasato T* (* correspondence)	4. 巻 22(1)
2. 論文標題 Patchwork-Type Spontaneous Activity in Neonatal Barrel Cortex Layer 4 Transmitted via Thalamocortical Projections.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell reports	6. 最初と最後の頁 123-135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2017.12.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Luo W#, Mizuno H#, Iwata R, Nakazawa S, Yasuda K, Itohara S, Iwasato T (# co-first)	4. 巻 6
2. 論文標題 Supernova: A Versatile Vector System for Single-Cell Labeling and Gene Function Studies in vivo.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 35747
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep35747.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakazawa S, Mizuno H, Iwasato T	4. 巻 9
2. 論文標題 Differential dynamics of cortical neuron dendritic trees revealed by long-term in vivo imaging in neonates.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature communications	6. 最初と最後の頁 3106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-05563-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 14件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Hidenobu Mizuno
2. 発表標題 In vivo imaging of the developing cerebral cortex to elucidate the mechanism of circuit refinement
3. 学会等名 University of Zurich, Brain Research Institute, Zurich, Switzerland (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hidenobu Mizuno
2. 発表標題 In vivo two-photon imaging of developing neuronal circuits in the cerebral cortex
3. 学会等名 KU-KAIST Joint Symposium, Daejeon, Korea (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 水野 秀信
2. 発表標題 ミクロとマクロの生体同時イメージングを目指して
3. 学会等名 新潟大学脳研究所・新潟脳神経研究会特別例会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 水野 秀信
2. 発表標題 生体マルチスケールイメージングによる脳神経回路形成機構の解明
3. 学会等名 大阪大学・Frontier Bioscience Seminar (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 水野秀信
2. 発表標題 発達期脳の生体イメージングによる、脳神経回路形成と脳病態の解明
3. 学会等名 熊本大学 第14回生命資源研究・支援センターシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hidenobu Mizuno
2. 発表標題 In vivo 2-photon imaging of neuronal activity in developing cerebral cortex
3. 学会等名 National Taiwan University medical campus (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hidenobu Mizuno
2. 発表標題 Imaging the mouse barrel cortex in vivo to analyze the mechanism of cortical circuit
3. 学会等名 National Taiwan University main campus (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hidenobu Mizuno
2. 発表標題 In vivo imaging of the developing mouse somatosensory cortex for elucidating the mechanism of neuronal circuit refinement
3. 学会等名 Circuit construction in the mammalian brain, NIG symposium (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 水野秀信
2. 発表標題 生体イメージングによる発達期の脳神経回路形成機構の解明
3. 学会等名 新潟大学脳研究所・新潟脳神経研究会特別例会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 H. MIZUNO, T. SATO, T. IWASATO
2. 発表標題 In vivo 2-photon imaging of neuronal activity in layer 4 of the neonatal somatosensory cortex
3. 学会等名 Cell symposia (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 H. MIZUNO, T. SATO, T. IWASATO
2. 発表標題 In vivo 2-photon imaging of neuronal activity in layer 4 of the neonatal barrel cortex
3. 学会等名 Society for Neuroscience annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 水野秀信（兼シンポジウム企画者）
2. 発表標題 ミクロとマクロのイメージングの統合による新分野の開拓
3. 学会等名 日本発生物学会 秋季シンポジウム2016（招待講演）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Hidenobu Mizuno
2. 発表標題 Patchwork-type spontaneous activity in developing neocortex
3. 学会等名 京都大学・iCeMS: International conference on interdisciplinary life sciences (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hidenobu Mizuno
2. 発表標題 In vivo imaging of the developing cerebral cortex to elucidate the mechanism for activity-dependent circuit maturation
3. 学会等名 IBRO 2019 (The 10th IBRO World congress of Neuroscience): Symposium (Development and plasticity of brain connectivity) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hidenobu Mizuno
2. 発表標題 Elucidating the mechanisms for activity-dependent neuronal circuit formation by in vivo imaging.
3. 学会等名 Korea Advanced Institute for Science and Technology (KAIST) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 In vivo imaging of the developing cerebral cortex to elucidate the mechanisms for activity-dependent circuit formation
2. 発表標題 水野 秀信
3. 学会等名 九州大学・医学研究院 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

熊本大学国際先端医学研究機構・水野秀信
http://ircms.kumamoto-u.ac.jp/research/hidenobu_mizuno/
水野研究室ウェブサイト
<https://mizunolab.com/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----