

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14831

研究課題名（和文）マウス一次視覚野の細胞タイプ特異的な神経回路構造と回路形成機構の解明

研究課題名（英文）Cell type specific neural circuit structures and circuit formation mechanisms in mouse primary visual cortex

研究代表者

酒井 誠一郎 (SAKAI, Seiichiro)

公益財団法人東京都医学総合研究所・脳・神経科学研究分野・研究員

研究者番号：40709747

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：大脳新皮質には遺伝子発現の異なる多くの種類のニューロンサブタイプが存在し、規則的な神経回路を構成していると考えられている。本研究では、マウスの一次視覚野を対象に、軸索投射先の異なる興奮性ニューロンが構成する神経回路の構造と機能を調べた。マウスの大脳新皮質では、皮質外へ軸索投射するニューロンと皮質内へ軸索投射するニューロンがサブタイプごと微小カラム状のクラスターを形成しており、それぞれの微小カラム内で同期した神経活動を示すことを発見した。一方で、視覚刺激に対する微小カラムの応答はニューロンサブタイプによって異なることを見出した。本研究により、大脳新皮質における情報処理原理の一端が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大脳新皮質では多くのニューロンによって複雑な神経回路網が形成されているが、ニューロンサブタイプごと規則的な軸索投射や神経機能を有することが近年の研究で明らかになりつつある。本研究成果は、大脳新皮質5層において軸索投射先の異なる興奮性ニューロンが規則的な神経活動を示す機能単位を構成していることを示しており、複雑な神経回路網を規則的で比較的単純な機能単位に分解して理解することを可能にする。本研究の成果を基に、大脳新皮質における情報処理の解明が今後さらに進むと期待される。

研究成果の概要（英文）：The neocortex contains many different neuronal subtypes with different gene expression, which are thought to constitute a regular neural circuit. In the present study, we investigated the structure and function of neural circuits composed of excitatory neurons with different axonal projections in the primary visual cortex of mice. In the mouse neocortex, we found that neurons that project axons extracortically and neurons that project axons intracortically form subtype-specific microcolumn clusters, and that neuronal activity is synchronized within each microcolumn. On the other hand, we found that the responses of microcolumns to visual stimuli differed depending on the neuronal subtype. This study has revealed a part of the principle of information processing in the neocortex.

研究分野：神経科学

キーワード：大脳新皮質 マウス 細胞タイプ 視覚野 組織透明化 カルシウムイメージング 遺伝子発現

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) マウスの一次視覚野のニューロンは遺伝子発現の違いによって数十種類に分類できることが報告されているが (Tasic et al., *Nat Neurosci* 2016)、遺伝子発現による細胞タイプ分類と神経機能の関係は未解明である。一次視覚野には、高い空間分解能で応答するニューロンや速い動きに反応するニューロンなど機能的に様々なニューロンが存在しており、二次視覚野の異なるサブ領域にそれぞれ投射していることが報告されている (Glickfeld et al., *Nat Neurosci* 2013; Murakami et al., *J Neurosci* 2017)。異なる神経機能や軸索投射を有するニューロンが特異的な神経回路を構築するために、遺伝子の発現もニューロンごと異なっていると予想される。神経機能と遺伝子の両面から細胞タイプを詳細に分類することができれば、一次視覚野の精密な神経回路構造を解明することができ、視覚情報処理の理解が深まる。

(2) 我々はこれまでに、大脳新皮質の広い領野において5層の興奮性および抑制性ニューロンがサブタイプごと微小カラム状のクラスターを形成していることを報告している (Maruoka, Sakai et al., *Science* 2017)。さらに皮質下投射する興奮性ニューロンの微小カラムは、微小カラム単位で同期した神経活動や共通の視覚応答特性を示す機能単位として働くことを発見した。しかし、他のニューロンサブタイプも同様に微小カラムを機能単位として同期活動や共通の感覚情報の処理を行っているのかは不明であった。複雑な大脳新皮質の神経回路構造と機能を機能単位に分割して理解するためには、各ニューロンサブタイプがどのような神経回路を形成し、どのような情報処理様式によって特異的な機能を担っているか解明することが必要である。

(3) 細胞タイプ特異的に発現している遺伝子には、細胞タイプの分化や神経回路形成において重要な役割を担う分子が含まれると予想される。これまでの細胞タイプ分類研究で明らかになった遺伝子で機能が分かっているものは未だ少なく、細胞タイプ特異的な神経回路構造がどのような分子機構で形成されるのかは未解明である。細胞タイプの分化や回路形成においては遺伝子発現と神経活動依存的な可塑性の双方の連関が重要であると考えられる。一次視覚野では生後発達期に眼優位性や方位選択性といった視覚応答特性が神経活動依存的に形成されることが知られているが、可塑性と細胞タイプ特異的な遺伝子発現の相互作用を明らかにすることが、細胞タイプ特異的な神経回路の形成機構を解明するために必要である。

2. 研究の目的

本研究では、マウス一次視覚野の興奮性ニューロンを機能と遺伝子発現の双方から統合的に分類し、細胞タイプ特異的な神経回路構造とその形成機構の解明を目指す。大脳新皮質の神経回路構造は領野や動物種を超えて良く保存されているので、一次視覚野をモデルとして皮質神経回路に普遍的な神経回路構築の基本原則に迫ることができる。蛍光ラベルしたニューロンを単離し遺伝子発現解析を行う分子生物学の実験技術と、神経活動計測や軸索投射パターンの解析といった生理学や形態学の実験技術を融合させることで、機能的な細胞タイプ分類と遺伝子発現を直接結びつけ、皮質ニューロンの詳細な細胞タイプ分類と神経回路構造を解析する。

3. 研究の方法

(1) マウス

大脳新皮質5層の興奮性ニューロン特異的にCreを発現するRbp4-Creマウスあるいは皮質間投射する5層興奮性ニューロン特異的にCreを発現するTlx3-Creマウスと、Cre依存的に蛍光タンパク質tdTomatoを発現するAi9 (Rosa26-CAG-loxP/STOP-tdTomato)マウスを交配して、軸索投射先の異なる興奮性ニューロンのサブタイプをそれぞれ蛍光標識した。

(2) ウイルスインジェクション・神経トレーサーインジェクション

Cre依存的にカルシウム感受性蛍光タンパク質GCaMP6sを発現するアデノ随伴ウイルスベクター(AAV-CAG-DIO-GCaMP6s)をCre発現マウスの一次視覚野にインジェクションし、3週間後に二光子カルシウムイメージングを行った。軸索投射先は逆行性神経トレーサー(CTB-Alexa)を用いて蛍光標識し、反対側の一次視覚野に神経レーザーをインジェクションすることで反対側に軸索投射する興奮性ニューロンと一次視覚野内の両眼視領域の同定を行った。

(3) 3次元細胞配置の解析および3次元免疫組織染色

tdTomatoまたはGCaMP6sのZスタック蛍光画像から皮質5層興奮性ニューロンの3次元細胞配置を取得し、各ニューロンサブタイプが微小カラム状のクラスターを形成しているか細胞同士の相対位置関係を解析した。また、還流固定後の脳をSca/eS法(Hama et al., *Nat Neurosci* 2015; Yoneda, Sakai et al., *JoVE* 2018)を用いて透明化し、皮質下投射する興奮性ニューロンのマーカーであるCtip2の抗体染色を行った。In vivo二光子顕微鏡画像とSca/eS画像を照

らし合わせ、細胞配置解析や神経活動解析を行ったニューロンのサブタイプを Ctip2 の発現を基に同定した。

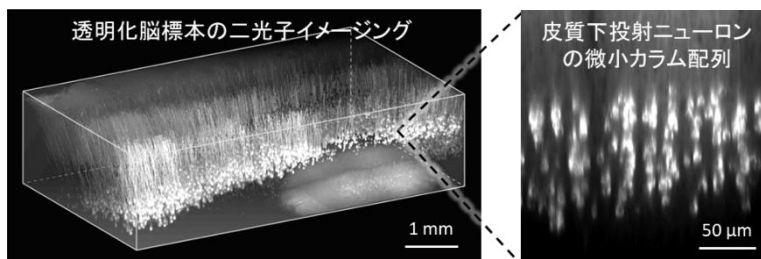
(4) In vivo 二光子カルシウムイメージング

一次体性視覚野を開頭してカバーガラスを設置し、二光子顕微鏡を用いて GCaMP6s 蛍光を観察することにより、覚醒下における 5 層興奮性ニューロンの神経活動を計測した。暗黒条件下における自発神経活動を計測し、ニューロン同士の活動同期性を解析した。また、モニタ上に表示したグレーティング刺激に対する個々のニューロンの視覚応答を計測し、各ニューロンの眼優位性や方位選択性といった視覚応答特性を解析した。

4. 研究成果

(1) 一次視覚野における神経細胞サブタイプ特異的な微小カラム構造の解析

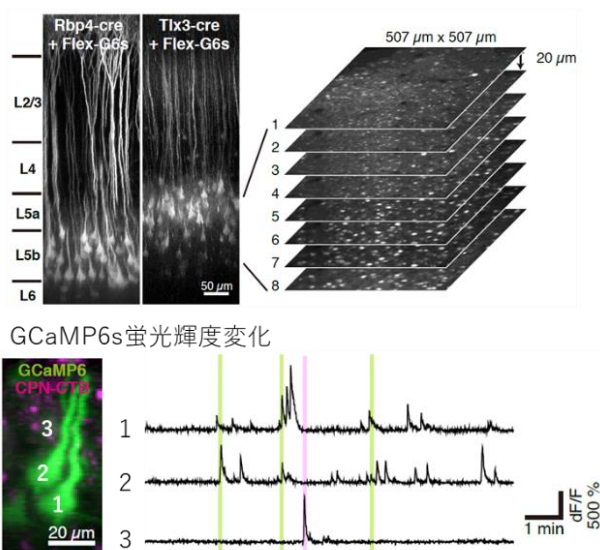
皮質下投射する興奮性ニューロンおよび皮質間投射する興奮性ニューロンの 3 次元細胞配置を解析した結果、我々の以前の報告 (Maruoka, Sakai et al., Science 2017) と同様に、一次視覚野においても興奮性ニューロンはサブタイプごと微小カラム状のクラスターを形成していた。また、微小カラムは格子状に規則的に整列しており、他の皮質領野と同様に微小カラムの規則的な配列によって一次視覚野の 5 層が構成されていることが明らかになった。



(2) 神経細胞サブタイプ特異的な神経活動のパターンの解析

皮質下投射する興奮性ニューロンおよび皮質間投射する興奮性ニューロンの各サブタイプについて、暗黒条件下の自発神経活動の相関を解析した結果、いずれのニューロンサブタイプに関しても微小カラム内で同期した神経活動が見られた。以上の結果は、皮質 5 層の興奮性ニューロンは、軸索投射先の異なるニューロンサブタイプごと微小カラム状の機能単位を形成している可能性を示している。視覚応答特性を解析した結果においては、我々が以前に報告した (Maruoka, Sakai et al., Science 2017) 通り、皮質下投射する興奮性ニューロンは微小カラム内で共通した眼優位性や方位選択性といった視覚応答特性を示した。一方で、皮質間投射する興奮性ニューロンにおいては微小カラム内でこれらの共通した視覚応答特性が見られなかった。以上の結果から、軸索投射の異なる皮質 5 層の興奮性ニューロンは、微小カラムを単位とする感覚情報処理の様式がサブタイプごと異なっている可能性を示している。

軸索投射先の異なる皮質 5 層興奮性ニューロンの神経活動をカルシウムイメージングで計測



(3) 神経活動依存的蛍光標識法および遺伝子発現解析方法の確立

上記研究成果の他に、神経活動依存的にニューロンを蛍光標識する方法、蛍光標識したニューロンを FACS で単離する方法、単離したニューロンを RNA-Seq やシングルセル RNA-Seq を用いて遺伝子発現解析する方法を確立した。具体的には、神経活動および紫外線照射依存的に蛍光波長が変化する蛍光タンパク質 CaMPARI2 (Moeyaert et al., Nat Communi 2018) を用いて視覚刺激に応答したニューロンを選択的に蛍光標識し、蛍光標識されたニューロンを FACS によって単離することに成功した。また、FACS で単離したニューロンの遺伝子発現を RNA-Seq やシングルセル RNA-Seq で解析する方法を確立した。今後、これら実験技術を活用して、大脳新皮質のニューロンサブタイプ特異的な神経回路構造や神経機能、そして神経回路形成メカニズムの研究をさらに展開する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 SAKAI Seiichiro, SHICHITA Takashi	4. 巻 130
2. 論文標題 Inflammation and neural repair after ischemic brain injury	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 130
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuint.2018.10.013	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 YONEDA Taisuke, SAKAI Seiichiro, MARUOKA Hisato, HOSOYA Toshihiko	4. 巻 139
2. 論文標題 Large-scale Three-dimensional Imaging of Cellular Organization in the Mouse Neocortex	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 e58027
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3791/58027	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 NAKAMURA Koutarou, SAKAI Seiichiro, TSUYAMA Jun, NAKAMURA Akari, OTANI Kento, KURABAYASHI Kumiko, YOGIASHI Yoshiko, MASAI Hisao, SHICHITA Takashi	4. 巻 19
2. 論文標題 Extracellular DJ-1 induces sterile inflammation in the ischemic brain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS Biology	6. 最初と最後の頁 e3000939
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pbio.3000939	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4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 酒井 誠一郎, 七田 崇
2. 発表標題 Remodeling of neuronal connectivity in the neocortex after ischemic stroke
3. 学会等名 第11回 光操作研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 酒井 誠一郎, 七田 崇
2. 発表標題 脳梗塞後における大脳新皮質領野間結合の再編
3. 学会等名 次世代脳プロジェクト冬のシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 酒井 誠一郎
2. 発表標題 脳梗塞後における大脳新皮質広域神経回路の再編
3. 学会等名 生理学研究所研究会「認知脳神経科学の先端」
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 酒井 誠一郎, 七田 崇
2. 発表標題 脳梗塞後における大脳新皮質広域の神経回路再構築と遺伝子発現変化
3. 学会等名 第43回 日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京都医学総合研究所ホームページ
<http://www.igakuken.or.jp/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------