

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06862

研究課題名(和文) 発達期視床におけるヒゲ経験依存的シナプス再編の神経活動依存性の解析

研究課題名(英文) Activity-dependent synaptic remodeling in the developing sensory thalamus.

研究代表者

河村 寿子(中山寿子)(Kawamura, Hisako (Nakayama Hisako))

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70397181

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マウスのヒゲ感覚情報経路の脳幹PrV2から視床VPmへのシナプス結合において、シナプス刈り込みとシナプス強化という2つの発達過程にPrV2とVPmニューロンの神経活動がどのように関与するかを明らかにするため、Kir2.1またはhM4D(Gi)を発現するAAVを用いてそれぞれの神経活動を抑制する実験を行った。その結果、先行研究でヒゲ経験依存的臨界期として知られていた生後12-15日目に加えて、生後8-11日目にもPrV2とVPmの神経活動抑制によって影響される過程が存在し、この時期のPrV2の活動はシナプス刈り込み、VPmの神経活動はシナプス強化に大きく関与することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PrV2-VPmシナプスの強化と刈り込みは生後2-3週目に渡り生じるが、先行研究では、P12-15という限られた期間の過程がヒゲ抜去で障害されることが明らかにされているものの、その前後の発達過程を制御する機構は不明であった。我々の研究は、PrV2-VPmシナプスの強化と刈り込み過程にP8-11とP12-15という2つの段階があり、それぞれ異なる細胞の神経活動によって制御されるという全く新しい知見であり、今後の制御機構解明に大きく貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We studied how neural activities eliminate and strengthen synapses from brainstem PrV2 to thalamic VPm neurons in the somatosensory pathway during postnatal development by using AAV expressing Kir2.1 or hM4D(Gi). Inhibition of PrV2 and VPm neuronal activities during P12-15 disturbed the elimination and strengthening of PrV2-VPm synapses, as in the case of plucking whiskers during P12-15. Inhibition of PrV2 activity during P8-11 impaired synapse elimination while inhibiting VPm activity diminished synaptic strength. Our results revealed that in addition to the whisker-experience-dependent critical period of P12-15, synapse elimination and strengthening during P8-11 differentially depend on the neural activity of PrV2 and VPm neurons.

研究分野：神経生理学

キーワード：体性感覚視床 シナプス刈り込み 神経活動依存性 臨界期 発達

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

神経回路は初め遺伝的プログラムに従って大まかに配線されたのち、生後の生育環境や経験依存的に再編されて外界からの刺激に対して適切な生理応答を示す機能的な神経回路になると考えられている。自閉スペクトラム症などの発達障害は、生後発達期の不適切な神経回路再編による脳機能障害であると考えられており、発達期の神経回路形成の制御機構を解明することは、それらの脳機能障害への介入方法の開発にも有用である。

齧歯類においてヒゲ情報は、三叉神経第二枝から脳幹の三叉神経主知覚核ヒゲ領域 (**PrV2**) に伝えられたのち内側毛帯線維 (**MLFs**) を経由して視床内側腹側核 (**VPm**) ニューロンに入り、さらに視床-皮質投射を介して大脳皮質一次体性感覚野に伝えられる。生後発達初期の **VPm** ニューロンは、**PrV2** 由来の他にも下顎などの体性感覚情報を運ぶ複数本の **MLFs** からシナプス入

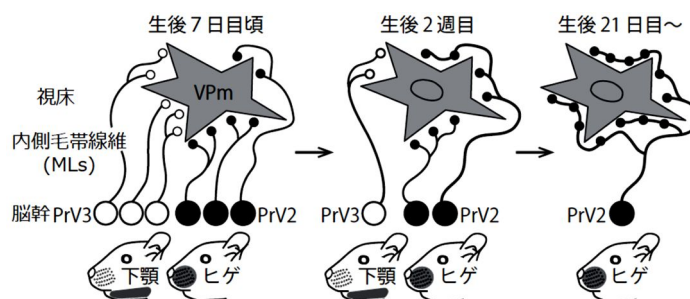


図1. 視床ヒゲ領域神経回路の生後発達

力を受けている。**VPm** ニューロンに競合入力するヒゲ経路 **PrV2-MLFs** とヒゲ以外由来のシナプスとは生後 7 日目 (**P7**) 頃には互いに同等の強度であるが、生後 2 週目になると「選別」され、ヒゲ経路シナプスのみが「強化」される。その間、ヒゲ以外由来のシナプスは刈り込まれて消失し、**P16-17** 頃には各々の **VPm** ニューロンは 1 本のヒゲ由来 **PrV2-MLF** から強力な興奮性入力を受ける単一支配が完成する (図 1)。これまでに、**P12-15** に頬ヒゲを抜かれて正常なヒゲ感覚が奪われたマウスや、グルタミン酸受容体遺伝子、アデニル酸シクラーゼ遺伝子などを欠損したマウスでは、生後 4 週目に残存するシナプスの応答振幅が小さく **PrV3-MLFs** を含む複数 **MLFs** が **VPm** ニューロンに投射し続けることが報告されている (Takeuchi et al., 2014, 2016, Zhang et al., 2006)。ことから、発達期の **MLF-VPm** シナプス結合における「選別」「強化」「刈り込み」には、**P12-14** のヒゲ入力依存的であると考えられているが、それらの受容体や分子がいつ、どんな神経活動によって駆動されるのか、その実態については明らかでない。

### 2. 研究の目的

上述の背景を踏まえ本課題で申請者は、生後発達期の **MLF-VPm** シナプス結合における「選別」「強化」「刈り込み」の各過程が、**VPm** ニューロンへの入力線維 (**PrV2**: ヒゲ由来) とシナプス後細胞である **VPm** ニューロンの神経活動にどのように依存するかを明らかにしたうえで、それらの神経活動を発達時期特異的に操作する実験を行い、シナプス結合の選択的強化と刈り込におけるシナプス前および後細胞の神経活動の役割を明らかにすることを目的として研究を行った。

### 3. 研究の方法

全ての実験は、東京女子医科大学の動物実験委員会、遺伝子組み換え実験安全委員会、バイオセーフティ委員会の承認を受けて実施した。実験には野生型マウス (**C57BL/6N**CrSlc, 三協ラボサービス)、**Krox20-Cre** マウス (遺伝学研究所・岩里琢治教授より分与) を用いた。

#### (1) ウイルスインジェクション

生後 1-2 日齢 (**P1-2**) の幼若マウスにヒーターで体温保持しながらイソフルラン吸入麻酔を施し、脳幹三叉神経核または視床 **VPm** を標的として **AAV** を接種した。用いた **AAV** は、**pAAV-EF1 $\alpha$ -F-FLEX-Kir2.1-T2A-tdTomato** (Addgene, #60661)、**pAAV-hSyn-DIO-hM4D(Gi)-mCherry** (Addgene, #44362)、**pAAV-Syn1 mCMV-Cre** (群馬大学・平井宏和教授より分与、革新脳 #GA-021) である。視床 **VPm** ニューロンに **Kir2.1** または **hM4D(Gi)** を発現させるためには、野生型マウス脳に または を と共に接種し、脳幹 **PrV2** ニューロンに対しては **PrV2** で **Cre** を発現する **Krox20-Cre** マウスの脳幹に または を接種した。**AAV** 接種後は、ヒーターを用いた体温保持下で十分に麻酔から覚醒したことを確認した後にホームケージに戻した。**hM4D(Gi)** を発現する操作を施したマウスには、**P10** 以降の特定の日齢で **CNO** を腹腔投与して神経活動を抑制した。これらのマウスは **P21** 以降まで通常飼育し、**PrV2-VPm** シナプスに生じる変化を電気生理学的に評価した。

#### (2) 急性脳スライス標本を用いたホールセルパッチクランプ記録

マウスはセボフルラン吸入麻酔を施してから断頭し、**VT1200S** (**Leica**) を用いて視床 **VPm** と脳幹からの入力線維束である **MLFs** を含む急性脳スライス (厚さ 300  $\mu$ m) を作成した。脳スライス上の **VPm** ニューロンからホールセル記録を行い、**MLFs** に設置した同心円電極で **MLFs**

を電気刺激した際に誘発される興奮性シナプス後電流 (EPSCs) を記録した。EPSCs 記録中、細胞外液にはピクロトキシン (100  $\mu$ M, Tocris) を添加し抑制性シナプス伝達を遮断した。記録中の細胞外液温度は 32 に保持した。

#### 4. 研究成果

先ず、**Kir2.1** 発現 AAV を用いて、**VPm** ニューロンの神経活動を **Kir2.1** 発現以降継続的に抑制するマウスを作製し実験を行った。AAV 接種から 8-9 日目の **P10** に **Kir2.1** の発現指標となる **tdTomato** を発現する **VPm** ニューロンと **tdTomato** を発現しない **VPm** ニューロンの膜興奮性を比較したところ、**P10** において **Kir2.1** 発現 **VPm** ニューロンの興奮性が優位に低下していた (図 2)。ゆえに、本実験系において **P1-2** で接種した **Kir2.1** 発現 AAV によって少なくとも **P10** 以降の **VPm** ニューロンの興奮性が優位に低下していると考えられた。このマウスを **P21** 以降まで飼育したのちにシナプス応答を調べたところ、脳幹/MLFs から **VPm** ニューロンへのシナプス伝達の振幅がコントロールに比べて優位に減弱していた (図 3)。しかしながら、投射線維本数はコントロールに対して増加しておらず、シナプス刈り込みは正常であることが分かった (図 3)。次に、脳幹 **PrV2** に **Kir2.1** を発現させたマウスの **MLF-VPm** シナプス伝達を解析したところ、**VPm** ニューロンに投射する **MLFs** 数がコントロールに比べて優位に増加しており、また、入力線維毎の **EPSC** 振幅が減弱しているという結果を得た (図 4)。すなわち、発達期の **VPm** と **PrV2** の神経活動の抑制が **MLF-VPm** シナプス結合のシナプス刈り込みに対して全く異なる影響を及ぼすことが示唆された。また、**VPm** ニューロンの神経活動を抑制した際に、維持された入力線維の **EPSC** 振幅が小さいままでシナプス刈り込みが正常であったことから、**PrV2-VPm** シナプス結合の強化と刈り込みは一続きの過程ではなく、発達時期ごとに異なる細胞の神経活動によって制御されることが考えられる。

先行研究から、**P12-P15** 頃は臨界期として知られており、この時期にヒゲを抜去するとシナプス強化と刈り込みが障害されることが知られている。そこで、この臨界期とその前後の時期の **VPm** と **PrV2** それぞれの神経活動の役割を調べるため、AAV を用いて抑制性 **DREADDs** (**hM4D(Gi)**) を **VPm** または **PrV2** に発現させ、**P8-19**、**P8-11**、**P12-15**、**P16-19** の各日齢に **CNO** を腹腔投与して活動抑制を行い、生後 21 日目以降でシナプス伝達を電気生理学的に解析した。その結果、**P8-19** に **CNO** 投与したマウスでは、先述の **Kir2.1** を発現させた時と同様の結果を得た。**P12-15** に **VPm** または **PrV2** の抑制性 **DREADDs** によって神経活動を抑制した場合には、臨界期のヒゲ抜去と同様に、多重支配が残存し入力毎のシナプス強度が減弱した。**P8-11** の神経活動抑制も多重支配とシナプス強度に影響を与えたが、影響の仕方は **VPm** と **PrV2** で異なっていた。概して、**PrV2** の活動抑制は刈り込みを障害し、**VPm** の活動抑制は入力毎のシナプス強度を減弱させた。また、野生型マウスでシナプス刈り込みがほぼ完了した以降の、**P16-19** の **VPm** と **PrV2** の神経活動抑制は何れもシナプス強度の減弱のみを引き起こした。これらの研究成果は現在論文として投稿準備中である。

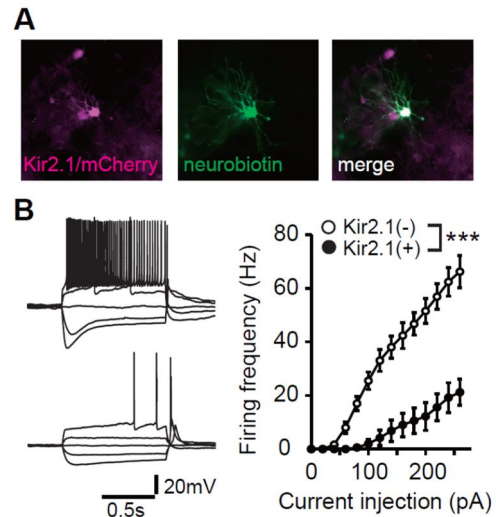


図 2. Kir2.1 発現による VPm ニューロンの興奮性の変化 (P10 で記録)

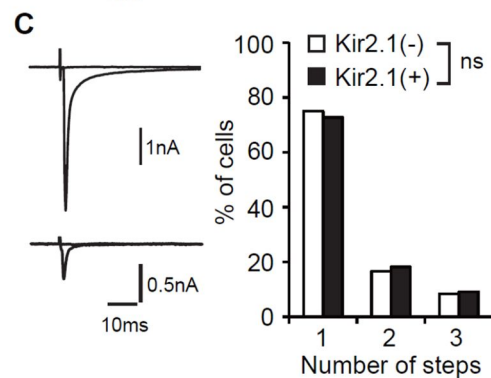


図 3. 発達期の VPm ニューロンに Kir2.1 を発現させた時の EPSCs と投射本数 (P21 以降で記録)

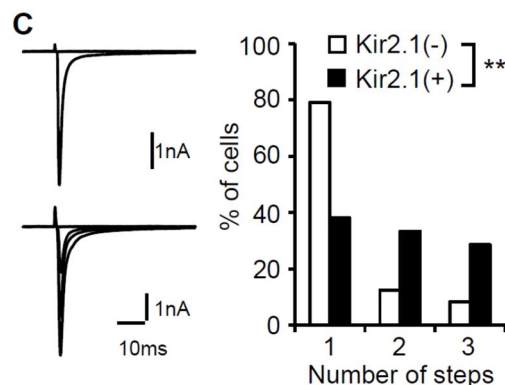


図 4. 発達期の PrV2 ニューロンに Kir2.1 を発現させた時の EPSCs と投射本数 (P21 以降で記録)

これらの研究成果は現在論文として投稿準備中である。

今回の研究から、これまでにヒゲ抜去に対して提示された臨界期より早い **P12** 以前にも **VPm** と **PrV2** の神経活動依存的なシナプス発達機構が存在することが示され、シナプス選択的強化および刈り込みが、前期と後期2つに分けられることが示唆された。**P8-11** の前期課程はヒゲ入力線維 **PrV2** の神経活動に大きく依存しており、**P12-15** の後期課程は **PrV2** と視床 **VPm** ニューロンの神経活動両方に依存していた。今後、前・後期課程それぞれに特有の分子メカニズムの解明に向けた研究に発展させたい。前期課程に関して、マウスの自発的なヒゲ探索行動の開始が **P12** 頃であることを考えると、**P8-11** の神経活動は受動的なヒゲ入力で駆動される可能性が考えられる。あるいは、**PrV2-VPm** シナプス伝達に関係しない自発活動を反映するのかもしれない。また、今回の研究によって、また、ヒゲ抜去に対する臨界期後 **P16-19** の神経活動はそれ以前に獲得したシナプス結合(強度)の維持に必要であることも示唆された。生後約 **3** 週間で獲得される **PrV2-VPm** シナプス結合のその後の維持機構に関しては殆ど研究されておらず今回得られた結果は大変興味深い。今後、発達期のシナプス刈り込み機構に加えて、完成後のシナプス結合の維持機構についても研究を展開していきたい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Hisako Nakayama, Taisuke Miyazaki, Manabu Abe, Maya Yamazaki, Yoshinobu Kawamura, Myeongjeong Choo, Kohtarou Konno, Shinya Kawata, Naofumi Uesaka, Hashimoto, Mariko Miyata, Kenji Sakimura, Masahiko Watanabe, and Masanobu Kano	4. 巻 -
2. 論文標題 Direct and indirect pathways for heterosynaptic interaction underlying developmental synapse elimination in the mouse cerebellum	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Communications Biology (in press)	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Harachi Mio, Masui Kenta, Shimizu Erika, Murakami Kumiko, Onizuka Hiromi, Muragaki Yoshihiro, Kawamata Takakazu, Nakayama Hisako, Miyata Mariko, Komori Takashi, Cavenee Webster K., Mischel Paul S., Kurata Atsushi, Shibata Noriyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 DNA hypomethylator phenotype reprograms glutamatergic network in receptor tyrosine kinase gene-mutated glioblastoma	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Acta Neuropathologica Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40478-024-01750-x	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 該当する

1. 著者名 Harachi Mio, Masui Kenta, Shimizu Erika, Murakami Kumiko, Onizuka Hiromi, Muragaki Yoshihiro, Kawamata Takakazu, Nakayama Hisako, Miyata Mariko, Komori Takashi, Cavenee Webster K., Mischel Paul S., Kurata Atsushi, Shibata Noriyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 DNA hypomethylator phenotype reprograms glutamatergic network in receptor tyrosine kinase gene-mutated glioblastoma	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Acta Neuropathologica Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40478-024-01750-x	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 該当する

1. 著者名 Teruyoshi Hirayama, Yuuki Kadooka, Etsuko Tarusawa, Sei Saitoh, Hisako Nakayama, Natsumi Hoshino, Soichiro Nakama, Takahiro Fukuishi, Yudai Kawanishi, Hiroki Umeshima, Koichi Tomita, Yumiko Yoshimura, Niels Galjart, Kouichi Hashimoto, Nobuhiko Ohno, Takeshi Yagi	4. 巻 Nov 29;10(1):172
2. 論文標題 CTCF loss induces giant lamellar bodies in Purkinje cell dendrites.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Acta Neuropathol Commun.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40478-022-01478-6.	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 該当する

1. 著者名 Lai Esther Suk King, Nakayama Hisako, Miyazaki Taisuke, Nakazawa Takanobu, Tabuchi Katsuhiko, Hashimoto Kouichi, Watanabe Masahiko, Kano Masanobu	4. 巻 15
2. 論文標題 An Autism-Associated Neuroigin-3 Mutation Affects Developmental Synapse Elimination in the Cerebellum	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Neural Circuits	6. 最初と最後の頁 676891
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncir.2021.676891	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 Hashimoto Kouichi, Yamawaki Yosuke, Yamaoka Kenji, Yoshida Takayuki, Okada Kana, Tan Wanqin, Yamasaki Miwako, Matsumoto-Makidono Yoshiko, Kubo Reika, Nakayama Hisako, Kataoka Tsutomu, Kanematsu Takashi, Watanabe Masahiko, Okamoto Yasumasa, Morinobu Shigeru, Aizawa Hidenori, Yamawaki Shigeto	4. 巻 3
2. 論文標題 Spike firing attenuation of serotonin neurons in learned helplessness rats is reversed by ketamine	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/braincomms/fcab285	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 Nagumo Yasuyuki, Ueta Yoshifumi, Nakayama Hisako, Osaki Hironobu, Takeuchi Yuichi, Uesaka Naofumi, Kano Masanobu, Miyata Mariko	4. 巻 31
2. 論文標題 Tonic GABAergic Inhibition Is Essential for Nerve Injury-Induced Afferent Remodeling in the Somatosensory Thalamus and Ectopic Sensations	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 107797 ~ 107797
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.107797	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8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中山寿子
2. 発表標題 思春期の社会的孤立はグルココルチコイド受容体の過剰活性化を介して視床神経回路を改編し感覚認知行動を変容させる
3. 学会等名 第9回曙橋神経懇話会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 中山寿子
2. 発表標題 思春期の社会的孤立はグルココルチコイド受容体の過剰活性化を介して感覚視床神経回路を改編し感覚認知行動を変容させる
3. 学会等名 東京女子医科大学 令和5年度ダイバーシティ環境整備事業 中間報告会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中山寿子、関野沙知絵、宮田麻理子
2. 発表標題 思春期ストレスによる視床ニューロンのグルココルチコイド受容体を介した神経回路改編
3. 学会等名 学術変革領域研究 A 「臨界期生物学 夏の領域班会議」
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nakayama Hisako, Sekino Sachie, Miyata Mariko
2. 発表標題 Activation of neuronal glucocorticoid receptors by adolescent social isolation reorganizes neural circuits in the sensory thalamus.
3. 学会等名 第46回 日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中山寿子、宮田麻理子
2. 発表標題 社会性ストレスによる視床シナプス結合の改編
3. 学会等名 NEURO2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中山寿子、宮田麻理子
2. 発表標題 思春期の社会隔離による視床神経回路の改編
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中山寿子、宮田麻理子
2. 発表標題 社会性ストレスによる視床神経回路の改編
3. 学会等名 第99回 日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中山寿子、宮田麻理子
2. 発表標題 発達期視床ヒゲ領域シナプス結合の選択的強化と単一支配の獲得における視床ニューロン神経活動の役割
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会 / 第1回CJK国際会議
4. 発表年 2021年



〔図書〕 計1件

1. 著者名 中山寿子、宮田麻理子（部分執筆）	4. 発行年 2024年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 9
3. 書名 Annual Review 神経 2024_感覚視床の発達	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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