

令和 5 年 5 月 2 日現在

機関番号：14401
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2020～2022
課題番号：20K06873
研究課題名（和文）細胞系譜に既定された神経結合が感覚入力の影響を選択的に受けるメカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism by which neural connections predetermined in cellular lineages are selectively affected by sensory input

研究代表者
足澤 悦子（Tarusawa, Etsuko）

大阪大学・大学院生命機能研究科・助教

研究者番号：00446262
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：脳における神経回路形成には出生前の発生プログラム、出生後の経験依存性の両方が関わるということが知られている。本研究課題の目的は、生後の感覚遮断がクローン性神経細胞間特異的に双方向性結合形成を阻害する分子メカニズムを明らかにすることである。本研究では、クローン性神経細胞間選択的にサイレントシナプスが形成されているかをパッチクランプダブルホールセル記録法により検証した。その結果、サイレントシナプスの頻度は低く、ほとんどのシナプスにAMPA受容体が発現している可能性が考えられた。また、freeze-fractureレプリカラベリング法により、cPcdhはシナプス後膜のPSD95と共局在することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
大脳皮質に存在する個々の神経細胞は、同じ細胞系譜の神経細胞が特異的な神経回路を形成していることが明らかになってきている。本研究では、皮質体性感覚野第4層に存在する同一細胞系譜の神経細胞が高い双方向性結合をしていること、また、この結合性にクラスター型プロトカドヘリン（cPcdh）が関与していることを明らかにした。更に、cPcdhタンパク質がシナプスに存在すること、サイレントシナプス形成に関わることを明らかにすることに成功した。これらの結果は、個々の神経細胞の個性に関わるcPcdhタンパク質のシナプスでの役割を明らかにするものであり学術的意義が高いと考えている。

研究成果の概要（英文）：It is known that neural circuit formation in the brain involves both prenatal developmental programs and postnatal experience-dependent processes. The purpose of this research project is to elucidate the molecular mechanisms by which postnatal sensory deprivation inhibits the formation of bilateral connections specifically between clonal neurons. In this study, we examined the formation of silent synapses selectively between clonal neurons by patch-clamp double Whole-cell recording. The results showed that silent synapses were infrequent, suggesting that AMPA receptors may be expressed at most synapses. Freeze-fracture replica labeling revealed that cPcdh co-localized with PSD95 in the postsynaptic membrane.

研究分野：神経科学

キーワード：クラスター型プロトカドヘリン シナプス 細胞系譜 大脳皮質 神経回路

1. 研究開始当初の背景

脳における神経回路形成には出生前の発生プログラム、出生後の経験依存性の両方が関わることが知られている。しかし、これまでに、これら発生プログラムと経験依存性との相互関係による神経回路形成メカニズムについては明らかにされていない。私はこれまでにマウス大脳皮質パレル野 4 層において、同一神経幹細胞由来の神経細胞間では高い双方向性結合が形成されることを明らかにし、個々の神経細胞間の結合性が発生プログラムにおける神経細胞系譜依存性(クローン性)を持つことを明らかにしてきた(Tarusawa et al., 2016)。更に解析した結果、この発生プログラムによるクローン性神経細胞間での高い双方向性結合が、出生後の経験にも依存していることを新たに発見した。すなわち、ヒゲの感覚遮断によって、同一神経幹細胞由来の神経細胞間における高い双方向性結合の形成が阻害されることを見出した(図1)。この結果は、発生プログラムにより決定された同一神経幹細胞由来の回路形成に、出生後の感覚入力が必要であることを示している。また、これまでに、この同一神経幹細胞由来のクローン性神経細胞間での高い双方向性結合には、発生初期過程の DNA メチル化、クラスター型プロトカドヘリン(cPcdh) 遺伝子群の発現が分子メカニズムとして関わっていることが明らかとなっている(Tarusawa et al., 2016)。双方向性神経結合のような閉回路は、大脳皮質や海馬を含む脳の様々な領域に存在し、行動、短期記憶、意思決定に重要な逐次の神経活動を生み出すと考えられている重要な神経回路である。よって、本研究課題では、生後の感覚入力が一細胞系譜の神経細胞間結合特異的に影響を与える分子メカニズムを明らかにする。

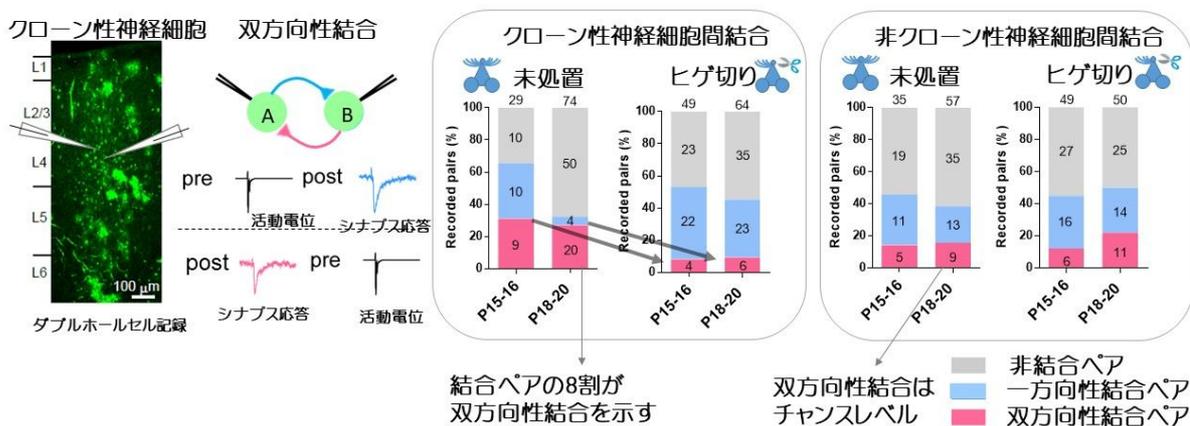


図1. 神経幹細胞由来のクローン性神経細胞間結合と感覚遮断の影響
 左写真: 生後 18 日齢マウス大脳皮質パレル野におけるクローン性神経細胞集団(GFP 陽性)とダブルホールセル記録。右図: クローン性神経細胞間に高頻度に形成された双方向性シナプスがヒゲ切りの影響を特異的に受け減少した。一方非クローン性神経細胞間の結合様式は変化しない。

2. 研究の目的

神経回路形成には出生前の発生プログラムと出生後の経験依存性の両方が関わることが知られている。例えば大脳皮質視覚野の神経細胞は視覚経験以前からすでに刺激選択性を持つことや、クローン性の神経細胞は類似した刺激選択性を示すことが知られており、発生プログラムによる神経回路形成メカニズムの存在が示唆されている。一方で、臨界期として知られるように生後特定の期間の経験によって大脳皮質の神経細胞は外界に適応した刺激選択性を獲得することが知られており、神経回路形成は経験の影響を受けて完成する。しかし、なぜ発生プログラムによりあらかじめ決められた神経回路が必要で、それに対して生後の経験はどこまで影響力を持つのかは不明であり、機能的な神経回路形成メカニズムの全貌は依然として明らかになっていない。そこで本研究課題では、生後の感覚遮断がクローン性神経細胞間特異的に双方向性結合形成を阻害する分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

これまでに私は、クローン性神経細胞間結合を検証するために、キメラマウスを用いた解析方法を樹立した。すなわち、GFPを発現するiPS細胞1細胞を野生型マウスの胚盤胞へ移植しキメラマウスを作製することで、同一神経幹細胞から分化したクローン性神経細胞を可視化する(図2)。この方法はクローン性のある神経細胞を可視化するだけでなく、遺伝子欠損マウスからiPS細胞を樹立することで、iPS細胞のキメラマウス作製により、これまで実現不可能であった致死となる遺伝子欠損神経細胞間のシナプス結合の解析を可能にした画期的な方法であり、我々が独自に開発した手法である。クローン性神経細胞間に形成される双方向性結合に関わるcPcdhもまた致死性遺伝子だが、この手法を用いることで初めて生後のクローン性神経細胞間結合への

遺伝子欠損の影響を明らかにすることができた (Tarusawa et al., 2016)。

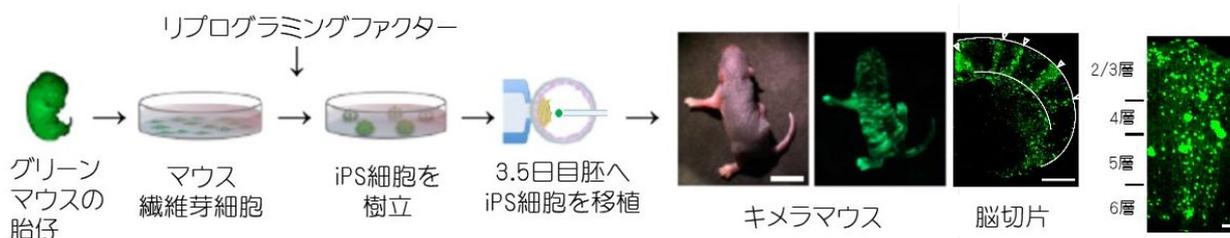


図 2. 神経幹細胞由来のクローン性神経細胞の可視化技術

全身の細胞で GFP を発現するトランスジェニックマウスの胎仔からマウス繊維芽細胞を培養する。リプログラミング因子発現によって iPS 細胞を樹立する。胚盤胞へ 1 つの iPS 細胞をインジェクションし、母体へ移植する。iPS 細胞が寄与したキメラマウスの脳切片において、カラム状に分布するクローン性神経細胞が可視化される。* 致死性分子欠損胎仔からも iPS 細胞を樹立し野生型マウス胚盤胞へ移植可能である。

発達期の脳皮質には、AMPA 型グルタミン酸受容体ではなく、NMDA 型グルタミン酸受容体だけが発現するサイレントシナプスが存在することが知られている。NMDA 型グルタミン酸受容体は脱分極時に開く性質があるため神経細胞が非活動状態の静止膜電位ではプレシナプスからのグルタミン酸放出には応答しない。そのためこのシナプスで伝達が起きるためには、神経細胞自体が興奮性シナプス入力によって活動し脱分極することが必要である。脱分極期間に NMDA 型グルタミン酸受容体が活性化され、細胞内シグナル系の伝達を経て AMPA 型グルタミン酸受容体がサイレントシナプス内へ移行し活性型シナプスとなる。本研究では、クローン性神経細胞間にこのサイレントシナプスが選択的に形成されているために、感覚入力によるシナプス可塑性が選択的にクローン性神経細胞間結合を誘導することができるのではないかと仮説を立て、以下のことを検証する。

1) クローン性神経細胞間選択的にサイレントシナプスが形成されているかをパッチクランプダブルホールセル記録法により検証する。

2) cPcdh がサイレントシナプス選択的に発現し、サイレントシナプス形成に関わるかどうかを freeze-fracture レプリカラベリング法により検証する。

4. 研究成果

1) クローン性神経細胞間選択的にサイレントシナプスが形成されているかをパッチクランプダブルホールセル記録法により検証した。クローン性神経細胞を可視化するために GFP を発現する iPS 細胞を野生型マウスの胚盤胞へ 1 細胞移植しキメラマウスを作製した。生後 14 日齢のキメラマウス大脳皮質バレル野 4 層のクローン性のある興奮性神経細胞からダブルホールセル記録を行い、サイレントシナプスの有無を検証した。その結果、AMPA 受容体応答がまったくなく NMDA 受容体応答だけ検出されるサイレントシナプスの頻度は低く、ほとんどのシナプスに AMPA 受容体が発現している可能性が考えられた。そのため電気生理学的なサイレントシナプスの定義は、AMPA 受容体応答・NMDA 受容体応答比として示す必要性があることが明らかとなった。

2) cPcdh が神経細胞において PSD95 や NMDA 型グルタミン酸受容体と共局在し興奮性シナプスに発現していること、またその局在は約 30% のシナプスに限られることを免疫電顕法の freeze-fracture レプリカラベリング法により明らかにした(図 3)。その結果、cPcdh は興奮性シナプスに発現する PSD95 と共局在することがわかった (Tarusawa et al. Biorxiv 2023)。

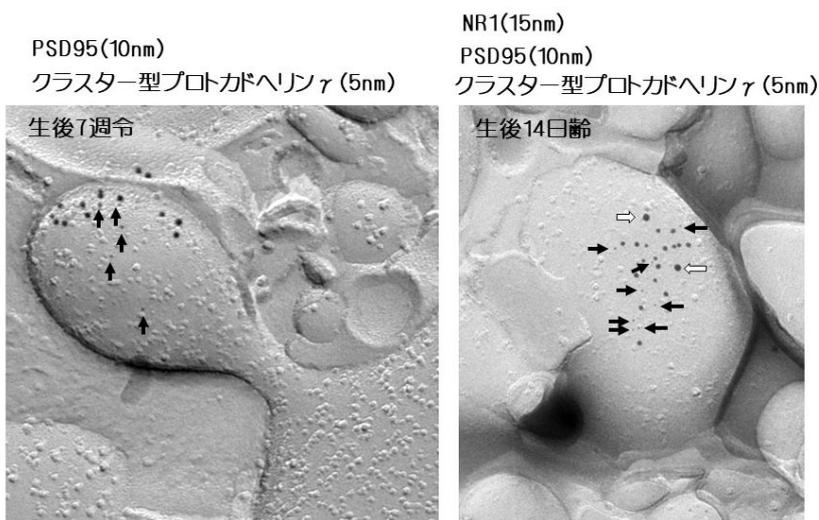


図 3. Freeze-fracture レプリカラベリング法により可視化された海馬 CA1 錐体細胞興奮性シナプスにおける cPcdh の局在
左写真: 生後 7 週令のスパイン像。cPcdh (⇨) と PSD95 陽性の共局在。右写真: 生後 14 日齢のスパイン像。cPcdh (⇨)、PSD95 および NR1 () の共局在。異なるサイズの金標識抗体でラベル。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 1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 Hirayama Teruyoshi, Kadooka Yuuki, Tarusawa Etsuko, Saitoh Sei, Nakayama Hisako, Hoshino Natsumi, Nakama Soichiro, Fukuishi Takahiro, Kawanishi Yudai, Umeshima Hiroki, Tomita Koichi, Yoshimura Yumiko, Galjart Niels, Hashimoto Kouichi, Ohno Nobuhiko, Yagi Takeshi	4. 巻 10
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 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/s40478-022-01478-6	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 -

1. 著者名 Hoshino Natsumi, Kanadome Takashi, Itoh Mizuho, Kaneko Ryosuke, Inoue Yukiko U., Inoue Takayoshi, Hirabayashi Takahiro, Watanabe Masahiko, Matsuda Tomoki, Nagai Takeharu, Tarusawa Etsuko, Yagi Takeshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Visualization of trans homophilic interaction of clustered protocadherin in neurons	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 biorxiv	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) 10.1101/2023.04.14.536980	査読の有無 無
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 Tarusawa Etsuko, Hasegawa Saki, Noda Daisuke, Kawamura Nanami, Fukazawa Yugo, Watanabe Masahiko, Hirabayashi Takahiro, Yagi Takeshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Imbalanced expression of clustered protocadherins in pre- and post-synaptic compartments of CA1 pyramidal cells during hippocampal development	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 biorxiv	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) 10.1101/2023.04.15.536995	査読の有無 無
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 Akari, Kawamura Nanami, Tarusawa Etsuko, Takeda Ikuko, Aoyama Yuki, Ohno Nobuhiko, Inoue Mio, Kagamiuchi Mai, Kato Daisuke, Matsumoto Mami, Hasegawa Yoshihiro, Nabekura Junichi, Schaefer Anne, Moorhouse Andrew J., Yagi Takeshi, Wake Hiroaki	4. 巻 -
2. 論文標題 Microglia enable cross-modal plasticity by removing inhibitory synapses	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 112383 ~ 112383
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2023.112383	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 足澤悦子
2. 発表標題 Uneven distribution of clustered protocadherins in pre and post synaptic sites of CA1 pyramidal cells during hippocampal development
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 八木 健、増田 風子、梅田 茉奈、芳村 美佳、林 哲太郎、三宝 誠、木津川 尚史、平林 真澄、二階堂 愛、足澤 悦子
2. 発表標題 神経細胞におけるクラスター型プロトカドヘリン遺伝子群の組み合わせ発現は細胞系譜と神経回路に依存する
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 樋口 流音、星野 七海、足澤 悦子、三宝 誠、平山 晃斉、小林 裕明、八木 健
2. 発表標題 生体内におけるPcdhgC4の役割の解明を目的とした機能ドメイン欠損マウスの作製
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河村 菜々実、足澤 悦子、吉村 由美子、八木 健
2. 発表標題 マウス視覚野における錐体細胞-PV陽性抑制性神経細胞間結合関係はクラスター型プロトカドヘリン発現の制御を受ける
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 星野 七海、京 卓志、足澤 悦子、松田 知己、永井 健治、八木 健
2. 発表標題 FRETを利用したクラスター型プロトカドヘリンのホモフィリック相互作用可視化
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高杉 朋実、星野七海、足澤悦子、八木健
2. 発表標題 Visualization of homophilic interaction of clustered protocadherin in cultured hippocampal neurons
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 星野 七海、京卓志、足澤悦子、金子涼輔、井上（上野）由紀子、井上高良、松田知己、永井健治、八木健
2. 発表標題 クラスター型プロトカドヘリンの相互作用可視化
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 河村 菜々実、足澤悦子、吉村由美子、八木健
2. 発表標題 パルプアルブミン陽性神経細胞におけるクラスター型プロトカドヘリン の欠損が大脳皮質神経回路形成に与える影響
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 足澤 悦子
2. 発表標題 Developmental integration of clonally-related cortical neural assemblies
3. 学会等名 NEURO2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------