

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06374

研究課題名（和文）大脳の投射先特異的な神経回路構築機構の解明

研究課題名（英文）Mechanisms underlying formation of projection-specific circuits in the cerebral cortex

研究代表者

田川 義晃（Tagawa, Yoshiaki）

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：50303813

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）：本研究では大脳の代表的な長距離投射である脳梁投射細胞をモデルとして、投射先特異的な神経回路の形成機構、特に神経活動依存的な回路形成機構を明らかにすることをめざした。（1）回路形成期に脳梁投射細胞同士が特異的なサブネットワークをつくり、その同期活動を使って投射先特異的な回路が形成される可能性を検証した。（2）活動依存的な脳梁投射に依る自発神経活動の分子基盤として、イオンチャンネルに注目し、どのイオンチャンネルが関わるか、そのチャンネルの機能操作は活動依存的メカニズムを介して脳梁投射を阻害しうるかを検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

時期特異的な神経活動操作実験から、マウスの脳において生後10日以降の自発神経活動が脳梁投射に重要な役割を担うこと、発達期特有の自発神経活動パターンが活動依存的回路形成に重要な役割を担うことを示した。また、その基礎としてCav1.2やNav1.2などのイオンチャンネルが働いており、その機能亢進変異は活動依存的メカニズムを介して大脳初期回路形成を阻害しうることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Callosal axon projections are among the major long-range axonal projections in the mammalian brain. In this study, we aimed to elucidate the mechanisms of neural circuit formation, especially activity-dependent circuit formation, using callosal projections as a model. (1) We tested the possibility that during the circuit formation period, callosal projection neurons make specific subnetworks and use their synchronous correlated activity to form projection-specific circuits. (2) Focusing on ion channels as the molecular basis for spontaneous neural activity involved in activity-dependent callosal projections, we examined which ion channels are involved and whether functional manipulation of these channels can inhibit callosal projections through activity-dependent mechanisms.

研究分野：神経科学

キーワード：大脳 神経回路形成 発達 神経活動 脳梁

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の脳をマクロな視点で見ると、様々な領域・領野からなり、その間には特異的なパターンでつながれている。一方、局所では、同一の層であっても様々な投射先をもつ神経細胞が混在している。投射先の異なる神経細胞がどのように運命決定され、局所で配置され、それぞれが正しく軸索を投射し、それぞれの領域に特徴的な情報を送るのかは明らかになっていなかった。本研究では脳の代表的な長距離投射である脳梁投射細胞をモデルとして、投射先特異的な神経回路の形成機構、特に神経活動依存的な回路形成機構を明らかにすることをめざした。

### 2. 研究の目的

(1) 回路形成期に脳梁投射細胞同士が特異的なサブネットワークをつくり、その同期活動を使って投射先特異的な回路がつくられる可能性を検証する。

(2) 活動依存的な脳梁投射に係わる自発神経活動の分子基盤として、イオンチャンネルに注目し、どのイオンチャンネルが関わるか、そのチャンネルの機能操作は活動依存的なメカニズムを介して脳梁投射を阻害しうるかを検証する。

### 3. 研究の方法

(1) 神経活動を操作する手法として、Tet-off システムを利用した時期特異的な神経活動抑制系、また光遺伝学・化学遺伝学を用いた。神経活動を抑制する分子ツール Kir2.1 (Mizuno et al., Journal of Neuroscience, 2007) を Tet-off システムのプラスミドに組み込み、子宮内電気穿孔法を用いて発達初期のマウス脳へ遺伝子導入して、DOX 投与の時期を操作することで発達時期特異的な神経活動操作実験を行った。また、化学遺伝学実験では、Kir2.1 発現プラスミドとともに神経活動を誘導するための hM3DGq 発現プラスミドを子宮内電気穿孔法を用いて導入し、リガンドである CNO を用いて発達時期特異的な神経操作実験を行った。光遺伝学実験では Kir2.1 発現プラスミドとともに ChR2 発現プラスミドを子宮内電気穿孔法を用いて導入し、脳に小型 LED を装着して光照射によって神経活動を誘導することで、発達時期特異的な神経操作実験を行った。いずれの神経活動操作実験においても、実験後に脳を取り出して切片を作成し、蛍光タンパク質で標識された脳梁軸索投射を観察、定量化した。また、脳の自発神経活動の評価は、in vivo 脳に観察用の窓をあけて 2 光子顕微鏡を用いた  $Ca^{2+}$  イメージングを行った (東京大学医学研究科生理学教室・大木研一研究室との共同研究)。

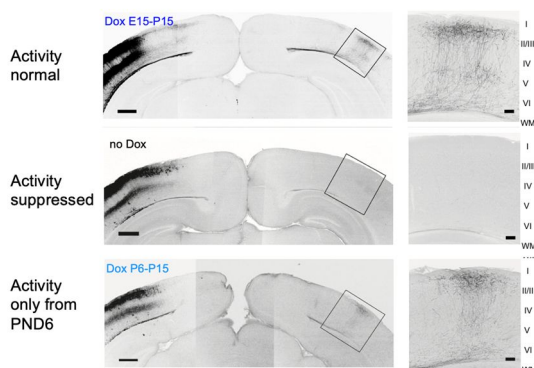
(2) 神経細胞の神経活動を制御する分子である  $K^+$  チャンネル、 $Ca^{2+}$  チャンネル、 $Na^+$  チャンネルに注目し、特に生後初期脳で発現する Cav1.2、Nav1.2 に注目した研究を進めた。これらの機能亢進変異体 (多数) を発現するプラスミドを作成し、子宮内電気穿孔法を用いて生後初期マウス脳に発現させて、細胞移動や脳梁投射を形態学的方法で評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) 発達期の自発神経活動が脳梁投射形成に果たす役割

##### Tet-off システムを利用した時期特異的な神経活動抑制実験

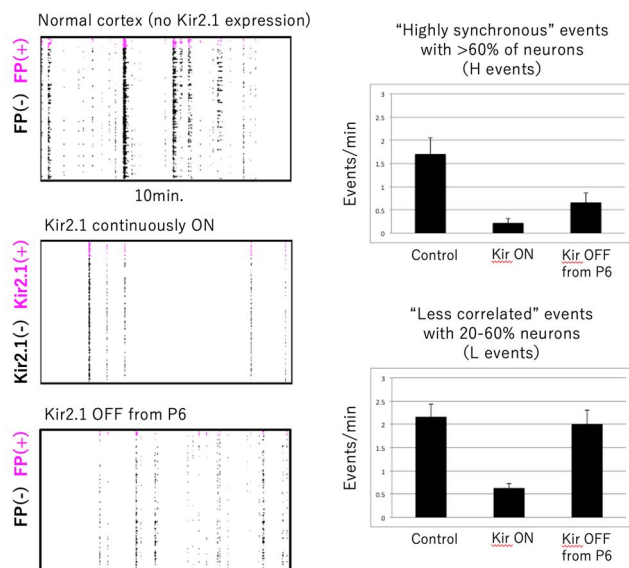
子宮内電気穿孔法を用いて蛍光タンパク質で脳梁軸索を可視化する実験系を用いた (Mizuno et al., Journal of Neuroscience, 2007)。蛍光タンパク質とともに pCAG-tTA と pTRE-Kir2.1 を導入して、遺伝子導入後から常時 DOX を投与する条件 (神経活動を抑制しない条件) では、脳梁投射は予想通り正常に形成された。一方、遺伝子導入から常時 DOX を投与しない条件 (生後 2 週間神経活動を抑制した条件) では、先行研究 (Mizuno et al., Journal of Neuroscience, 2007) と同じく脳梁投射形成が障害された。DOX を生後 6 日目から投与して神経活動を回復させる条件にすると、脳梁投射が回復した (下図)。さらに、化学遺伝学の方法を用いて生後 10 日目以降の神経活動を回復させても、脳梁投射が部分的に回復した。したがって、生後 2 週のうち、生後 6 日目以降の神経活動が脳梁投射の形成に重要であることが示唆された。



発達期の生後2週間のマウス大脳では、この時期に特有の様々なパターンの神経活動(自発的同期的神経活動)がみられ、パターンは成長に伴って変化する。DOXの投与を3日ずつずらして生後6日、9日、12日からDOXを投与すると、9日と12日の群では脳梁投射の回復がみられなくなることがわかった。すなわち、脳梁投射形成が神経活動を必要とする時期は限られていること、つまり活動依存的な脳梁神経回路の形成に「臨界期」があることが示唆された。

### 自発神経活動記録実験

生後6日目から神経活動を回復させて脳梁投射が回復した条件において、大脳でどのようなパターンの自発神経活動が回復しているのかをin vivo Ca<sup>2+</sup>イメージングの手法で解析した。この時期の正常の大脳では、Hイベント(>60%以上の神経細胞が参加する大規模同期自発活動)とLイベント(20%-60%の神経細胞が同期するまばらな同期活動)という特徴的な神経活動パターンがみられる(Siegel et al., Current Biology, 2012)。生後6日目から神経活動を回復させて脳梁投射が回復した条件においては、Hイベントはあまり回復しておらず、Lイベントはほぼ回復していた(下図)。以上の結果から、脳梁投射の形成には特に生後6日以降の神経活動が必要であること、脳梁投射形成の活動依存性には臨界期があること、発達期特有の自発同期活動(特にLイベント)が脳梁投射に深く関与すること、が示唆された。Lイベントは脳梁投射細胞同士がつくるサブネットワーク同期活動の可能性がある(Hagihara et al., Cerebral Cortex, 2021)。今後、Hイベント、Lイベントがそれぞれ活動依存的な脳梁投射に果たす詳細な役割を明らかにする必要がある。以上の結果を論文に発表した(Tezuka, Hagihara et al., eLife, 2022)。

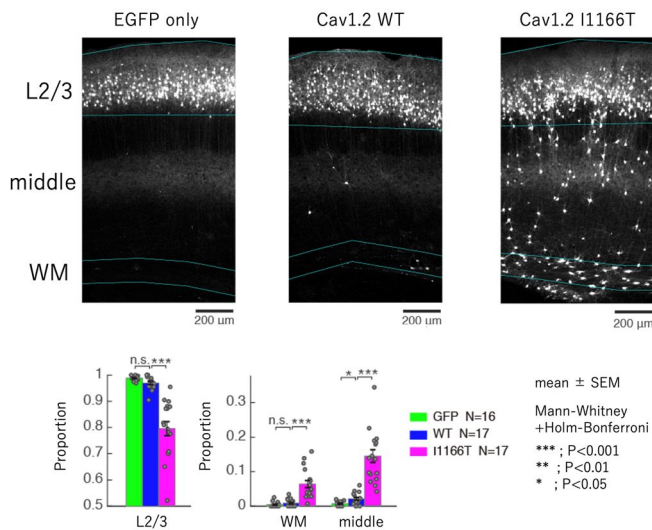


### 光遺伝学実験

の神経活動操作実験に加えて、光遺伝学を用いた神経活動操作実験も行った。Kir2.1発現プラスミドとともにChR2発現プラスミドを子宮内電気穿孔法を用いて導入し、脳に小型LEDを装着して光照射によって神経活動を誘導して、脳梁投射の形成が回復するか否かを検証した。生後2週間のマウスは哺乳期であり、脳もまだ成長過程で、安定して数日間LEDを装着して光刺激を行う実験は困難であった。しかし、生後12日目から2日間光刺激を行うことに成功し、部分的ではあるが脳梁投射が回復することを確認した。現時点では0.2 Hzの光刺激で投射回復効果を確認しており、他の刺激照射パターンの効果を確認する必要がある。

### (2) 活動依存的な脳梁投射に関わる自発神経活動の分子基盤

Cav1.2は発生発達初期の大脳神経細胞の活動に関わる重要なイオンチャネルである。その機能亢進変異はTimothy症候群(遺伝性神経発達症)の原因である。Cav1.2の複数の機能亢進変異(特にG406RとI1166T)を子宮内電気穿孔法を用いてマウス大脳に発現させたところ、脳梁投射異常、及び細胞移動の異常がみられた。Cav1.2機能亢進により細胞内に過剰なCa<sup>2+</sup>流入が起こり、細胞移動や軸索投射の障害が引き起こされたと考えられたため、Ca<sup>2+</sup>流入を阻害するL745P変異を追加すると障害が回復した。また、Cav1.2のβサブユニットとの相互作用阻害変異やCaM相互作用阻害変異の追加でも障害の回復がみられ、Cav1.2I1166T変異の下流で障害を引き起こす細胞内伝達経路の一端が明らかとなった。以上の結果を論文に発表した(Tamagawa et al., Front. Neurosci., 2022)。今後はCav1.2以外のイオンチャネル、特に活動電位に最重要なNav1.2の変異を用いた研究を進め、チャネルの機能操作が活動依存的なメカニズムを介して大脳初期回路形成過程を阻害するかどうかを検証する。



さらに、Cav1.2I1166T 変異の下流で障害を引き起こす細胞内伝達経路を明らかにする目的で、コントロール（蛍光タンパク質のみ）と Cav1.2I1166T 変異を導入したマウス大脳神経細胞から scRNAseq 解析を行い、遺伝子発現パターンを比較した。Cav1.2I1166T 変異導入により多数の遺伝子が発現上昇または抑制されており、過剰な Ca<sup>2+</sup>流入が遺伝子発現パターンを変化させ、細胞移動や脳梁軸索投射が障害されたことが示唆された。その中で、大脳皮質の層特異的転写因子である Cux1、Cux2、Brn2、Fezf2 の発現が変化していることがわかり、Cav1.2I1166T 変異導入による細胞移動と脳梁軸索投射の障害がこれらの転写調節因子発現の異常である可能性が示唆された。今後の実験でこの可能性を検証する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yuta Tezuka, Kenta M Hagihara, Kenichi Ohki, Tomoo Hirano, Yoshiaki Tagawa	4. 巻 11
2. 論文標題 Developmental stage-specific spontaneous activity contributes to callosal axon projections	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.72435.	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 Nao Nakagawa-Tamagawa, Emi Kirino, Kohtaroh Sugao, Hidetaka Nagata, Yoshiaki Tagawa	4. 巻 15
2. 論文標題 Involvement of Calcium-Dependent Pathway and Subunit-Interaction in Neuronal Migration and Callosal Projection Deficits Caused by the Cav1.2 I1166T Mutation in Developing Mouse Neocortex	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2021.747951.	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 田川義晃	4. 巻 89
2. 論文標題 In utero 遺伝子導入法について	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 LAB1021	6. 最初と最後の頁 8-10
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 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8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 玉川(中川) 直、菅生 厚太郎、永田 英孝、田川 義晃
2. 発表標題 ティモシー症候群関連Cav1.2変異とDEE11関連Nav1.2変異はマウス大脳皮質において異なる様式で回路形成を障害する
3. 学会等名 日本神経科学大会（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 玉川(中川) 直、菅生 厚太郎、永田 英孝、田川 義晃
2. 発表標題 Cav1.2とNav1.2の機能亢進変異はマウス大脳皮質において異なる様式で回路形成を障害する
3. 学会等名 西日本生理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshiaki Tagawa
2. 発表標題 Disease-causing ion channel mutations and cortical development
3. 学会等名 Symposium "Circuit Construction in the Mammalian Brain" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 玉川(中川) 直、桐野 恵美、菅生 厚太郎、永田 英孝、田川 義晃
2. 発表標題 ティモシー症候群に関連するCav1.2のI1166T変異は発達期のマウス大脳皮質において神経細胞の移動と脳梁投射を障害する
3. 学会等名 第72回西日本生理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中川 直、水野 秀信、田川 義晃
2. 発表標題 脳梁投射軸索の発達ダイナミクスのタイムラプス・イメージング
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 玉川(中川) 直, 菅生 厚太郎, 永田 英孝, 田川 義晃
2. 発表標題 ティモシー症候群に関連するCav1.2のI1166T変異は発達期のマウス大脳皮質において神経細胞の移動と脳梁投射を障害する
3. 学会等名 第15回桜ヶ丘地区基礎系研究発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 玉川(中川) 直, 桐野 恵美, 菅生 厚太郎, 永田 英孝, 田川 義晃
2. 発表標題 ティモシー症候群に関連するCav1.2のI1166T変異は発達期のマウス大脳皮質において神経細胞の移動と脳梁投射を障害する
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会(国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 玉川(中川) 直, 菅生 厚太郎, 永田 英孝, 田川 義晃
2. 発表標題 Ca <sup>2+</sup> による軸索の樹状突起化誘導
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会(国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ホームページ <a href="https://www3.kufm.kagoshima-u.ac.jp/physiol2/">https://www3.kufm.kagoshima-u.ac.jp/physiol2/</a> 研究成果発表 <a href="https://www.kagoshima-u.ac.jp/topics/2022/09/post-1950.html">https://www.kagoshima-u.ac.jp/topics/2022/09/post-1950.html</a> 研究成果発表 <a href="https://www2.kufm.kagoshima-u.ac.jp/topics/contents/1679-2022-08-26-06-32-29.html">https://www2.kufm.kagoshima-u.ac.jp/topics/contents/1679-2022-08-26-06-32-29.html</a> <a href="https://www3.kufm.kagoshima-u.ac.jp/physiol2/index.html">https://www3.kufm.kagoshima-u.ac.jp/physiol2/index.html</a>
---

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