

令和 6 年 4 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06405

研究課題名(和文) 大脳皮質における機能的秩序構造の3次元発生機構

研究課題名(英文) 3D development of functional ordered structure in the neocortex

研究代表者

丸岡 久人 (Maruoka, Hisato)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・助教

研究者番号：60443032

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)：近年、我々はマウス大脳皮質第5層の主要なニューロンがサブタイプ特異的にカラム状のクラスター(以下、微小カラム)を形成していることを見出したが、その発生機構を不明である。本研究課題では微小カラムの発生機構を明らかにするため、透明化された胎生17日齢終脳の全脳サンプルから、皮質下投射ニューロンと推定されるCTIP2(+)ニューロンの三次元座標を解析し、胎生17日齢ですでに細胞タイプ特異的微小カラムが存在することを明らかにした。また放射状グリア細胞を蛍光標識することで特定の放射状繊維近傍にCTIP2(+)ニューロンが局在していることも明らかにした。現在、これらの結果をまとめた論文を投稿準備中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

意思決定や言語など高次な脳機能を司る大脳皮質がどのような原理で神経回路を構成しているかは未だ不明である。大脳皮質は脳表に垂直な方向に層構造を有し、機能的に入力層、中間層、出力層に大別される。我々はこれまでに出力層が少数個の神経細胞で構成される機能単位回路の繰り返しで構成されていることを見出した。本研究課題では、出生前からその機能単位回路が細胞タイプ特異的に既に形成されていることを見出し、大脳皮質回路の形成機構の一端を明らかにした。自閉症などの神経発達疾患ではこの機能単位回路の構造異常も指摘されているため、今後、自閉症の精密診断法確立へ貢献することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Although we recently found that major subtypes of neurons form subtype-specific columnar clusters named microcolumns in the neocortical layer 5, the mechanism of microcolumn development remains unknown. Here, we tested whether microcolumns are already present in mouse embryonic brains at embryonic day 17.5 (E17.5) when layer 5 excitatory neurons have completed their migration. Analysis of 3D cytoarchitecture using the AbScale method revealed that CTIP2(+) cells, which are presumptive subcerebral projection neurons, form microcolumns. Furthermore, the quantification revealed that subcerebral projection neurons are localized in the vicinity of specific radial fibers, suggesting neural subtype-specific migration via specific radial fibers. We are currently preparing to submit a paper regarding our findings.

研究分野：神経科学

キーワード：大脳発生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

100億個以上の多種多様なニューロンにより構成されるヒト大脳皮質は機能と対応した精緻な細胞構築を有することがわかってきたが、その機能的細胞構築の発生機構はいまだ不明な点が多い。近年、我々はマウスをモデルとして大脳皮質の様々な領野で第5層の主要なニューロンがサブタイプ特異的にカラム状の細胞クラスター(以下、微小カラム)を形成することを見出した(Maruoka et al., J. Neurosci., 2011; Maruoka et al., Science, 2017)。第5層興奮性ニューロンのサブタイプの1つである皮質下投射ニューロン(以下、SCPN)が形成する微小カラムにおいて、微小カラムは脳表に平行な2次元平面上で六方格子状に配列していた。また生理学的解析から同一の微小カラムに属する興奮性ニューロンは、(1)出生直後では一過性にgap結合を介した電氣的結合を形成する、(2)成獣期では共通の入力を受ける、(3)覚醒状態の成獣マウス脳で類似した刺激応答性および同期活動を示す、ことから、格子状に配置するサブタイプ特異的な機能的微小カラムとして大脳皮質第5層が高度に構造化されていることが示された(Maruoka et al., Science, 2017)。微小カラムはヒト言語野第5層でも報告されており(Kwan et al., Cell, 2012)、種を越えて普遍的な構造である。非常に重要な機能的細胞構築と考えられるサブタイプ特異的な微小カラムが大脳発生過程でどのように形成されるのかは依然として不明である。

2. 研究の目的

大脳発生では脳室帯の神経幹細胞である放射状グリア細胞から新生した興奮性ニューロンは放射状グリア細胞が脳表まで伸ばす線維(以下、radial fiber)を登り、最終的に配置される皮質層まで脳表側に向かって脳表に垂直な方向に移動する(以下、radial migration)。微小カラムの発生機構について同一の微小カラムに属するニューロンはそれぞれ異なる放射状グリア細胞から新生したニューロンで構成されている(Maruoka et al., J. Neurosci., 2011)。よって同一の放射状グリア細胞由来のニューロン群がradial migrationにより集合して微小カラムを形成するという単純なモデルは否定される。申請者らは最近、第5層興奮性ニューロンのradial migrationが完了した時期であるマウス胎生17.5日齢(E17.5)において、既にSCPNが微小カラム構造を形成しており、また複数のSCPNが接触しているradial fiberと全く接触がみられないradial fiberが存在する事を示唆する結果を得た。一方、細胞のクラスタリングやgap結合の形成(Mellitzer et al., Nature, 1999)、radial migration途中の一過性の脳表に平行な方向(以下、tangential方向)における興奮性ニューロンの移動(Torii et al., Nature, 2009; Dimidschstein et al., Neuron, 2013)に重要な役割を果たすEph receptorの1つであるEphA7が胎生期にSCPN特異的に発現している可能性が他のグループから示された(Pietri et al., Cerebral cortex, 2012)。これらの結果は興奮性ニューロンが自身のサブタイプに応じて特定のradial fiber(ルール)を認識し、またradial fiberを伸ばす放射状グリア細胞集団にも「ニューロン/ルール」ペアに対応するサブタイプのような不均一性が存在する、というモデルで説明が可能である。もしこのモデルを実験的に検証できれば、これまで不明であった、興奮性ニューロンのradial migration途中での一過性のtangential方向への移動の機能的意義の一端が明らかになり、また放射状グリア細胞の新たな役割の発見ともなる。さらに精緻な機能的細胞構築を示す大脳皮質の構築原理について新たな概念的進歩を付与することにもなる。そこで本研究課題では「1つのradial fiber(ルール)上に集合する同一サブタイプのニューロン群が1つの微小カラムを形成する」という仮説の検証を通じて、機能的な微小カラムの発生機構、さらに大脳皮質の精密な3次元発生過程における放射状グリア細胞の新たな機能的意義を明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

(1)放射状グリア細胞の細胞周期フェイズとそのradial fiberに接着するニューロンのサブタイプに相関性はあるか?

E17.5マウス大脳皮質を固定する16時間前と24時間前それぞれに子宮内エレクトロポレーション法(以下、EP)により異なる蛍光タンパク質(EGFPとDsRed2)の発現ベクターを同一半球に導入し、細胞周期上異なる分布を示す放射状グリア細胞を標識し、また固定後AbScale法による免疫染色により第5層皮質下投射ニューロン(以下、SCPN)をラベルした。標識された放射状グリア細胞のradial fiberの近傍に局在するSCPNの数を定量し、異なる細胞周期フェイズにある放射状グリア細胞のradial fiber近傍に局在するSCPNの数が有意に異なるのかを検討した。

(2)特定の細胞周期フェイズを示す放射状グリア細胞の3次元配置に規則性はあるか?

E17.5マウス大脳皮質においてEdu蛍光標識(固定の1~1.5時間前投与)、FlashTag蛍光標識(固定の3~4時間前投与)、およびAbScale法を用いたpH3に対する免疫染色などで特定の細胞周期フェイズと推定される細胞を蛍光標識した。MATLABなどを用いた画像解析により蛍光標識さ

れた脳室帯に局在する放射状グリア細胞の3次元座標を取得し、数理科学的手法を用いて3次元細胞配置の規則性を検討した。

4. 研究成果

(1) 先行研究(Stancik E.K. et al., 2010)で報告されているより、EPによる発現ベクター導入の細胞周期フェイズ特異性は低かったが、数理科学的手法により、細胞周期上異なる2つの放射状グリア細胞集団では radial fiber 近傍に局在する SCPN の数に有意な差がある可能性が示唆された。

(2) EdU で標識された細胞(S期とG2期の放射状グリア細胞と推定される)とFlashTagで標識された細胞(G1期の放射状グリア細胞と新生ニューロンと推定される)は tangential 平面上で交互に局在している可能性が数理科学解析から示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 1件）

1. 著者名 Endo Masaaki, Maruoka Hisato, Okabe Shigeo	4. 巻 15
2. 論文標題 Advanced Technologies for Local Neural Circuits in the Cerebral Cortex	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroanatomy	6. 最初と最後の頁 757499
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnana.2021.757499	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7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Hisato Maruoka, Seiichiro Sakai, Taisuke Yoneda, Quingri Liu, Toshihiko Hosoya, Shigeo Okabe
2. 発表標題 Functionally ordered structure of the neocortical output layer revealed by in vivo two-photon imaging techniques
3. 学会等名 第129回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 張旻、丸岡久人、細谷俊彦、岡部繁男
2. 発表標題 Development of microcolumns based on radial glial fibers during corticogenesis
3. 学会等名 Neuro2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Maruoka H., Zhang Min, Hosoya T, Okabe S
2. 発表標題 Development of functional units in neocortical layer 5
3. 学会等名 Development and Plasticity of the Brain（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 丸岡 久人、張 旻、細谷 俊彦、岡部 繁男
2. 発表標題 大脳皮質第5層の機能的秩序構造
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 丸岡 久人、張 旻、細谷 俊彦、岡部 繁男
2. 発表標題 大脳皮質出力層の機能的秩序構造とその発生
3. 学会等名 生理研シナプス研究会2021
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Hisato MARUOKA, Seiichiro Sakai, Taisuke Yoneda, Toshihiok Hosoya
2. 発表標題 Canonical functional units of the neocortical output layer
3. 学会等名 EMBO EMBL Symposium: Seeing is Believing (国際学会)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 丸岡 久人、酒井 誠一郎、米田 泰輔、細谷 俊彦
2. 発表標題 大脳皮質出力層の機能的秩序構造
3. 学会等名 可視化情報シンポジウム
4. 発表年 2021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
---------	---------