

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500388

研究課題名(和文)活動依存的メカニズムに基づく大脳皮質長距離軸索投射の再建

研究課題名(英文)Reconstruction of long-range axonal projections by restoring neuronal activity

研究代表者

田川 義晃(Tagawa, Yoshiaki)

京都大学・理学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：50303813

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では脳の代表的な長距離軸索である脳梁軸索の投射をモデルとして、神経活動依存的メカニズムによって軸索投射を再建することを試みた。マウスにおいては、脳梁軸索投射は生後2週で完成する。その期間、脳梁投射細胞の神経活動を抑制すると、軸索投射が途中で障害される。Tet off system、optogeneticsを用いた実験によって、生後10日目以降の特徴的な自発的神経活動パターンが脳梁軸索投射に重要であり、その期間に神経活動を補うことによって軸索投射を回復させることが可能であると示唆された。また、成熟過程にある皮質神経細胞では、各成熟段階に適した神経活動レベル・パターンがあることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Brain circuits are formed by activity-independent and -dependent mechanisms. In this project, we found that long-range axonal projections in the mouse cerebral cortex rely on neuronal activity, and that impaired axonal projections caused by activity reduction can be recovered by restoring neuronal activity. The involvement of specific patterns of activity was suggested. In addition, we found that neurons at each developmental stage require an appropriate level of neuronal activity for their maturation. Neurons in the course of migration showed spontaneous calcium transients at a low frequency, and an experimental increase of the activity impeded migration. After neurons completed migration, however, they showed more frequent calcium transients which supported their maturation such as dendrite formation.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：大脳皮質 回路形成 神経活動 軸索投射 再生

1. 研究開始当初の背景

脳の神経回路の形成には、神経活動依存的・非依存的メカニズムの両者が重要である。従って、脳の神経回路の修復をめざす神経再生技術においても、活動非依存的メカニズムに基づく技術とともに、活動依存的メカニズムに基づく技術も役立つ可能性が考えられる。

活動非依存的メカニズムに基づくものとしては、軸索再生に対する種々の液性因子・成長因子・軸索ガイダンス分子や、軸索再生阻害分子の機能を抑制する技術等が研究されている。しかし、活動依存的メカニズムに基づく神経再生技術は、まだ確立されていない。

私達の研究グループはこれまで、哺乳類大脳皮質の長距離軸索投射の形成過程における神経活動の役割を明らかにしてきた。具体的には、哺乳類大脳皮質の代表的な長距離軸索投射である脳梁軸索をモデルとして用いて、その領域特異的・層特異的な投射形成に神経活動依存的な発達段階があることを明らかにしてきた (Mizuno et al., J. Neurosci., 2007; Tagawa et al., Rev. Neurosci., 2008; Mizuno et al., Eur. J. Neurosci., 2010)。回路形成期の軸索投射細胞の神経活動を実験的に抑制すると、軸索投射形成が阻害された。

では、ここに何らかのパターンの神経活動を戻すと、軸索投射は回復するであろうか？ どんないくつかのパターンの神経活動が、軸索投射の回復に有効であろうか？ 神経活動を戻すことによって軸索投射を回復できれば、活動依存的メカニズムに基づいて長距離軸索投射を再建する、新しい神経再生技術へつながる可能性があると考え、以下の研究を行った。

2. 研究の目的

本研究では、独自の実験系を用いて、哺乳類大脳皮質の長距離軸索投射を活動依存的メカニズムに基づいて再建する、新しい神経再生技術の開発に向けた基礎研究をめざした。

具体的には、私達が確立してきた、神経活動を抑制したために軸索投射形成が阻害された実験系を用いて、そこに神経活動を戻すことで、軸索投射を再建できるかを検証することをめざした。さらに、実験動物 (マウス) の大脳皮質神経細胞を長期間、任意のパターンで刺激できる実験系を確立し、脳刺激が大脳皮質の長距離軸索投射を再建するのに役立つか否かを検証することをめざした。また、発達初期の神経活動の誘導・亢進が、大脳皮質の神経回路構築に及ぼす影響も検証した。

3. 研究の方法

神経活動を抑制したために軸索投射形成が阻害されたマウスに対して、以下の2つの方法で神経活動を誘導して、軸索投射が回復するか否かを検証した。

- (1) Tet off gene expression system により、神経活動を抑制する分子ツール (Kir2.1) を時期特異的に発現オフし、神経活動を回復させる。
- (2) Optogenetics の手法で、光照射によって神経活動を誘導する。

いずれの実験においても、子宮内電気穿孔法を用いて、まず脳梁軸索投射を蛍光蛋白質で可視化した (Mizuno et al., J. Neurosci., 2007)。次に、神経活動を抑制するための分子ツール Kir2.1 を用いて脳梁投射細胞の神経活動を抑制した (Mizuno et al., J. Neurosci., 2007)。そして、(1)では Tet off system を使って Kir2.1 の発現を時期特異的に制御し、神経活動を回復させた時に脳梁軸索投射が回復するか否かを検討した。(2)では、神経活動誘導のための分子ツール channelrhodopsin (ChR2) を発現させて、光照射によって時期特異的に神経活動を誘導して、軸索投射が回復するか否かを検討した。

4. 研究成果

(1) Tet off system を用いた実験

Tet off system を用いて Kir2.1 を脳梁投射細胞に発現させ、生後 15 日目まで神経活動を抑制したままにしたところ、脳梁軸索投射が阻害された。また、遺伝子導入時 (胎生 15 日齢) から doxycycline (Dox) を投与して Kir2.1 の発現を初期から抑制すると、正常と変わらない軸索の投射が観察された。Kir2.1 の代わりに蛍光蛋白質を用いた同様の実験からも、Dox の投与により遺伝子発現をオン・オフできることが確認された。

次に、Dox 投与を生後 3 日齢、6 日齢、12 日齢から開始した。蛍光蛋白質を用いた実験から、Dox 投与後 3-4 日で遺伝子発現がほぼ完全にオフになることが示唆された。生後 3 日齢、6 日齢から Kir2.1 の発現をオフにすると、生後 15 日齢で軸索投射はほぼ正常になることが観察された。一方、生後 12 日齢から Kir2.1 発現をオフにすると、生後 21 日目において、軸索投射は阻害されたままで回復しないことが観察された。すなわち、脳梁軸索が正常に投射するためには、生後 10 日前後に神経活動があることが必要であり、その時期以後に神経活動が回復しても軸索投射は回復しないことが示唆された。

では、生後 10 日目前後の大脳皮質では、どのような神経活動パターンが見られるのであ

ろうか。九州大学医学研究院・分子生理学教室・大木研一研究室との共同研究で、生後10-12日の大脳皮質の神経活動パターンを *in vivo* Ca²⁺ imaging の手法で記録する実験を行った。正常の大脳皮質では、10分間に数回、多数の神経細胞が同期する特徴的な神経活動パターンが記録された。このような神経活動は、Kir2.1 を発現させたままの大脳皮質では大きく抑制されていた。さらに、生後6日齢から Dox を投与した大脳皮質では、正常とほぼ同じパターンの同期的神経活動が観察された。以上の結果は、この神経活動が、脳梁軸索投射の形成に重要な役割を担うことを示唆する。

(2) Optogenetics を用いた実験

脳梁軸索投射にどのようなパターンの神経活動が関わるかをさらに追求するため、optogenetics の手法を用いた実験を行った。蛍光蛋白質（軸索の可視化のため）、Kir2.1（神経活動抑制のため）とともに、ChR2 を脳梁投射細胞に発現させて、生後11-13日齢で光照射によって神経活動を誘導する実験を行った。光照射には473nmの小型LEDを用い、それをマウスの脳表に装着して10Hzの刺激パターンで神経活動を誘導した。この条件で神経活動が誘導されていることは、細胞外記録電極を用いたマルチユニット記録によって確認した。

生後11-13日に光照射を行うと、光照射を行わなかった動物群に比べ、軸索投射が有意に回復した。従って、この実験からも、生後10日前後の神経活動が脳梁軸索投射に重要であることが示唆される。しかし、軸索投射の回復は部分的であり、正常の投射パターンほどの回復は見られていない。今後、10Hz以外のパターンの検討、より長期間の光照射などの実験が必要である。

(3) 神経活動の誘導・亢進が生後初期大脳皮質の回路構築に及ぼす影響

生後初期の大脳皮質の神経細胞は、皮質下層から上層に向かって移動し、目的の層に到達すると樹状突起形成・軸索投射・シナプス形成を行い、成熟した神経回路を形成する。上記の実験結果から、神経回路形成後期に神経活動を抑制すると脳梁軸索投射が阻害されること、神経活動を回復させると軸索投射も回復することが示された。一方、神経活動レベルが低いと想定される回路形成初期に神経活動を誘導すると、どのような影響が生じるであろうか。2つの方法でこの点を検証した。

まず、神経細胞の静止膜電位の制御に関わる KCNK チャネルを阻害する実験を行っ

た。生後初期の大脳皮質では、KCNK2, 9, 10 が発現していることを *in situ* hybridization 法により確認し、それぞれのタンパク発現を RNAi 法によって抑制した。そして、KCNK9 の発現抑制が皮質神経細胞の細胞移動を特に顕著に阻害することを明らかにした。KCNK9 の発現を抑制された皮質神経細胞は、静止膜電位がコントロール細胞より脱分極し、より多くの Ca²⁺ transient が生じていた。RNAi の効かない cDNA を用いたレスキュー実験等により、KCNK9 が膜電位の制御を介して細胞移動を調節していること、皮質興奮性細胞の移動には、Ca²⁺ transient が比較的低いレベルで保たれていることが重要であることが示唆された。

KCNK9 は Birk Barel 型遺伝性発達障害の原因遺伝子として報告されている。上記の結果は、KCNK9 の機能不全が発達期の大脳皮質回路構築を障害し、それが発達障害の一因となっている可能性も示唆する。以上の結果を *Cerebral Cortex* 誌で報告した (Bando et al., 2014)。

また、Na⁺ チャネルを発現させて細胞興奮性を高める実験も行った。原核生物の Na⁺ チャネル NaChBac を細胞移動中の皮質神経細胞に発現させたところ、細胞移動に障害が見られた。NaChBac を発現した皮質神経細胞は、コントロールの細胞より Ca²⁺ transient が顕著に増加していた。従って、この実験からも、皮質興奮性細胞の移動には Ca²⁺ transient が比較的低いレベルで保たれていることが重要であることが示唆された。さらに、NaChBac 発現細胞では、細胞移動の途中に樹状突起形成が始まることが観察された。この結果は、神経活動の亢進が細胞の成熟（樹状突起形成）を促進することを示唆する。すなわち、成熟過程にある皮質神経細胞には、各過程に適した神経活動レベル・パターンがあることが示唆される。この結果は現在論文に投稿中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

1. Bando Y, Hirano T & Tagawa Y*. Dysfunction of KCNK potassium channels impairs neuronal migration in the developing mouse cerebral cortex. *Cerebral Cortex*, 査読有、bhs387, 2012 (DOI:10.1093/cercor/bhs387)
2. Tagawa Y* & Hirano T. Activity-dependent callosal axon projections in neonatal mouse

cerebral cortex. *Neural Plasticity*, 査読有、
2012 Article ID 797295, 2012
(DOI:10.1155/2012/797295)

3. Hayashi Y*, Tagawa Y, Yawata S,
Nakanishi S, & Funabiki K.
Spatio-temporal control of neural activity
in vivo using fluorescence microendoscopy.
European Journal of Neuroscienc, 査読
有、36, 2722-32, 2012
(DOI:10.1111/j.1460-9568.2012.08181.x)

[学会発表](計16件)

1. 田川義晃. 大脳皮質神経回路形成にお
ける神経活動の役割 **第119回日本解
剖学会総会、自治医科大学(栃木)**
2014.03.27.
2. 萩原賢太 田川義晃 吉田盛史 村上
知成 大木研一、大脳皮質視覚野にお
ける非活動依存的機能形成と活動依
存的機能再編成、**第91回日本生理学会大
会、鹿児島**、2014.03.16.
3. 手束勇太 萩原賢太 平野丈夫 大木
研一 田川義晃 Neural activity in
P10-15 is critical for callosal axon
projections in the mouse cerebral cortex.
NIG シンポジウム「哺乳類脳の機能的
神経回路の構築」、三島(遺伝研)、
2013.12.19.
4. Hagihara KM, Tagawa Y, Yoshida T,
Murakami T, & Ohki K. Silencing activity
of individual neurons throughout
development does not prevent maturation
of orientation and direction selectivity in
mouse visual cortex. **43rd Annual Meeting,
Society for Neuroscience**, poster, San
Diego, November 2013
5. Bando Y, Irie K, Kushida Y, Shimomura T,
Fujiiyoshi Y, Hirano T, & Tagawa Y.
Regulation of neural activity is critical for
the control of neural migration and
dendrite formation of cortical layer 2/3
neurons in vivo. **43rd Annual Meeting,
Society for Neuroscience**, poster, San
Diego, November 2013
6. Hagihara K, Tagawa Y, Yoshida T, Ohki K.
Silencing activity of individual neurons
throughout development does not prevent
maturation of orientation selectivity in
mouse visual cortex. **第36回神経科学学
会大会、京都**、2013.6.20.
7. Bando Y, Irie K, Kushida Y, Shimomura T,
Fujiiyoshi Y, Hirano T, Tagawa Y.
Regulation of excitability is critical for the
control of migration and dendrite formation
in the developing cerebral cortex. **第36
回神経科学学会大会、京都**、2013.6.21.

8. Tagawa Y. Activity-dependent circuit
construction in neonatal mouse cerebral
cortex. **NIG symposium: Circuit
construction in the mammalian cerebral
cortex: Genetic and imaging approaches**
遺伝学研究所(三島) 2012.12.16.
9. Murakami T, Yoshida T, Tagawa Y, Ohki K.
Overexpression of ephrin-A2 abolished visual
response of local neurons in mouse primary
visual cortex. **第35回日本神経科学大会、
名古屋**、2012.9.19
10. Hagihara KM, Tagawa Y, Yoshida T, Ohki K.
Complete silencing of visual activity and
partial silencing of spontaneous activity did
not affect maturation of orientation and
direction selectivity. **Circuit construction in
the mammalian cerebral cortex: Genetic
and imaging approaches**、三島、2012.12.15.
11. Bando Y, Hirano T, Tagawa Y. Regulation of
excitability is critical for the control of
migration and dendrite formation in the
developing cerebral cortex. **Circuit
construction in the mammalian cerebral
cortex: Genetic and imaging approaches**、
三島、2012.12.15.
12. Bando Y, Hirano T, Tagawa Y. Regulation of
cellular excitability is critical for neuronal
migration. **包括脳夏のワークショップ**、仙台、
2012.7.26.
13. Tagawa Y. Activity-dependent circuit
construction in neonatal mouse cerebral
cortex. **Neocortical Organization 1st
international symposium**、生理学研究所
(岡崎) 2012.03.12.
14. Bando Y, Irie K, Kushida Y, Shimomura T,
Fujiiyoshi Y, Hirano T, Tagawa Y. Regulation
of cellular excitability is critical for neuronal
migration. **Neocortical Organization 1st
international symposium**、生理学研究所
(岡崎) 2012.03.12.
15. Tagawa Y. Regulation of cellular excitability
is critical for neuronal migration. **IIAS
research conference 2011**、国際高等研究所
(京都) 2011.12.08.
16. Bando Y, Irie K, Kushida Y, Shimomura T,
Fujiiyoshi Y, Hirano T, Tagawa Y. Regulation
of cellular excitability is critical for neuronal
migration. **第34回神経科学学会大会、名
古屋**、2011.9.16.

[図書](計1件)

1. 田川義晃 生き物たちのつづれ織り 第
5巻、表題:脳を正しく配線する、p105-110、
京都大学大学院理学研究科グローバルCOE、
2011年

[産業財産権]
出願状況(計0件)

取得状況（計 0 件）

〔その他〕ホームページ等

<http://www.biophys.kyoto-u.ac.jp/hirano.php>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

田川 義晃（TAGAWA, Yoshiaki）
京都大学・大学院理学研究科・講師
研究者番号：50303813