

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：63801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640015

研究課題名(和文) 幼仔期大脳皮質発達メカニズムのin vivo二光子イメージングによる解析

研究課題名(英文) In vivo 2-photon imaging of the cerebral cortex in neonatal mice

## 研究代表者

水野 秀信 (Mizuno, Hidenobu)

国立遺伝学研究所・個体遺伝研究系・助教

研究者番号：00567159

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マウス大脳体性感覚野バレル皮質をモデルとし、視床皮質回路形成の分子・細胞メカニズムを明らかにすることを目指した。新規単一細胞標識法(Supernova system)、および新生仔期マウスの生体脳タイムラプスイメージング法を開発した。これらの手法を用い、新生仔期において、視床入力を受けるバレル皮質神経細胞であるバレル細胞の樹状突起が激しく伸縮していること、またバレル細胞樹状突起の正確な配置と伸縮の調節にNMDA型グルタミン酸受容体機能が必要であることを示した。以上の結果は、生きた動物個体で視床皮質回路形成過程とその分子メカニズムの一端を明らかにした、初めての例である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the mechanism for neuronal circuit refinement in developing cerebral cortex, using the thalamocortical circuits in the barrel cortex as a model system. We developed the "Supernova system" to label a sparse population of neurons in the brain and a method for in vivo time lapse imaging of developing barrel cortex. By using them, we found that cortical dendrites are highly motile during refinement of thalamocortical circuits, and that these dendritic dynamics are regulated by NMDA-type glutamate receptor functions.

研究分野：神経科学

キーワード：バレル 樹状突起 体性感覚野 大脳皮質 2光子イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

発達期の脳皮質神経回路は、視床を介する感覚入力により再編される。正確な視床大脳皮質間神経回路（視床皮質回路）の形成は感覚入力処理の基盤であり、その形成メカニズム解明は科学における最も重要な課題の一つである。しかしながら、生きた動物個体における視床皮質回路の経時的な形成過程、また動的な回路形成がどのような分子メカニズムにより制御されているかは、全く不明であった。

マウス大脳体性感覚野バレル皮質は、出生直後にヒゲからの入力を遮断すると視床皮質回路形成が阻害されることから、感覚入力依存性の神経回路形成メカニズムを明らかにする有効なモデルとして用いられている（図1）。バレル皮質第4層内には、視床皮質軸索終末のクラスターがヒゲの配置と対応するように並んでいる（図2左）。バレルは視床皮質軸索クラスターの周囲に配置するバレル細胞（視床入力を受けるバレル皮質第4層神経細胞）により構成されている。成体において、バレル細胞の樹状突起はバレルの内側により多く配置しており、対応するヒゲからの体性感覚を伝える視床皮質軸索より入力を受けている（バレル細胞の樹状突起方向性）。樹状突起方向性の形成は各ヒゲに由来する感覚入力の混線を防ぐために必須な要素である。

これらの知見は、固定標本を用いた形態解析により得られたものであった。そのため生体において、どのようにバレル細胞樹状突起方向性が形成されるかは明らかでなかった。

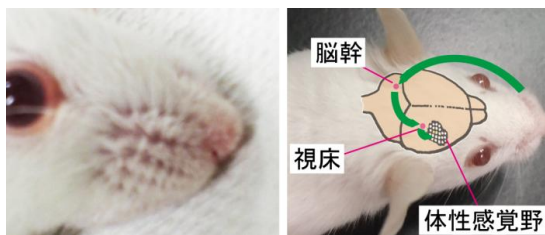


図1、マウスのヒゲ感覚の神経回路

(左) マウスのヒゲ

(右) ヒゲからの体性感覚は、脳幹と視床を介し、大脳皮質体性感覚野へ伝えられる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は『新生仔期大脳皮質神経回路の形成過程を *in vivo* タイムラプスイメージングする手法を開発し、その分子細胞メカニズムを明らかにする』ことであった。

具体的な目標は以下の2点であった。

- ①新生仔マウスにおいて、2光子顕微鏡により経時的にバレル皮質第4層の個々のバレル細胞を観察する方法を確立すること。
- ②新生仔マウスにおいて、野生型のバレル細胞と、NR1（記憶・学習・神経回路形成に関与する、NMDA型グルタミン酸受容体

の必須サブユニット)を欠損したバレル細胞の発達過程を比較すること。これによりNMDA受容体依存性の視床皮質回路の再編メカニズムを明らかにすること。

## 3. 研究の方法

本研究は、各種遺伝子組換えマウスに対し、分子生物学的手法・子宮内電気穿孔法・細胞培養法・薬理学的的手法・形態学的手法・生体二光子顕微鏡イメージング法等を組み合わせることで適用することで行った。

以下に目標達成のために独自開発した手法をまとめる。

### (1) バレル細胞の蛍光標識

独自開発のベクターシステム（Supernova system）を子宮内電気穿孔法により導入し、バレル細胞を高輝度かつ疎らに蛍光標識した（図2）。

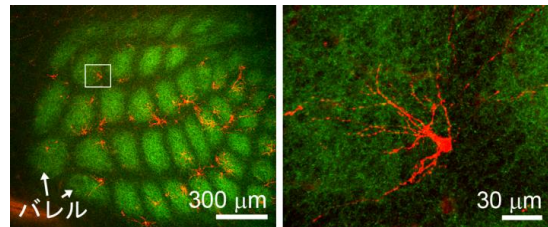


図2、Supernova systemによる、単一バレル細胞の可視化

(左) RFP（赤色）を一部のバレル細胞に発現させ、樹状突起を可視化した。バレルの分布パターンの可視化には、視床皮質軸索特異的に GFP を発現するマウスを用いた（緑色）。

(右) 左図白四角部の拡大図。赤色がバレル細胞である。

### (2) 新生仔マウスの生体脳イメージング

生後4日齢および5日齢のマウスに脳内観察用窓を作成した。また、2光子イメージング中のマウス保持のため、カスタムメイドの固定器具をマウス頭部に付けた（図3）。

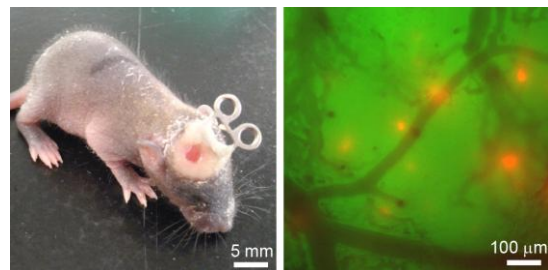


図3、新生仔マウスの脳内観察用窓の作製

(左) 脳内観察用窓と頭部固定用チタンバーを取り付けた生後4日齢マウス

(右) 脳内観察用窓から観察した大脳皮質表層の CCD カメラ画像

#### 4. 研究成果

**目標①、②は両者とも高い水準において達成した。**以下に詳細をまとめる。

生後5日齢においてバレル細胞を2光子タイムラプス観察した。その結果、樹状突起が激しく伸縮していることを見出した(図4)。

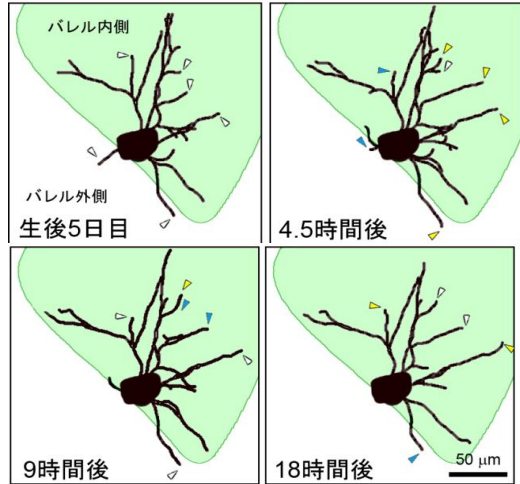


図4、バレル細胞の2光子タイムラプスイメージング

18時間の樹状突起の変化。黄矢頭は伸長した枝、青矢頭は退縮した枝、緑はGFPで見られる視床皮質軸索末端の分布(すなわちバレルの分布)を表している。

次に、NR1欠損(NMDA受容体欠損)細胞の樹状突起形成過程を観察した。その結果、NR1欠損細胞では樹状突起の伸縮が亢進していることを見出した(図5)。

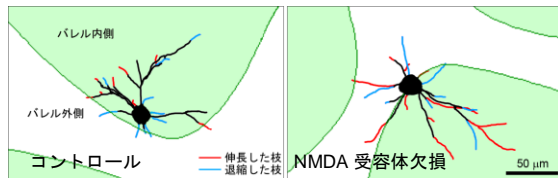


図5、NMDA受容体欠損バレル細胞樹状突起形成過程の、2光子タイムラプス解析

18時間イメージングの間の樹状突起の変化。赤は伸長した枝、青は退縮した枝、緑はバレルの分布を表している。

さらに、2光子観察下において、コントロールのバレル細胞は正常に樹状突起方向性を獲得していることを確認した(図6ab)。また、NR1欠損細胞では樹状突起方向性が獲得されないことを見出した(図6cd)。

上記を含む一連の研究により、視床皮質回路形成過程においてバレル細胞樹状突起がダイナミックに伸縮しながら方向性を獲得すること、またNMDA受容体がダイナミクスを制御することで、正確な視床皮質回路が形成されることを示した(図7)。

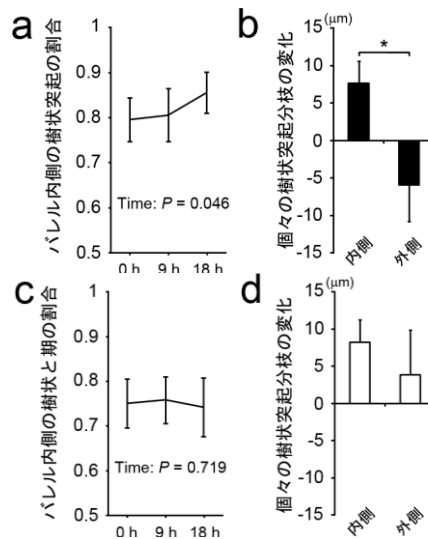


図6、バレル細胞樹状突起形態変化の定量

- (a) コントロール細胞における、バレル内側に配置する樹状突起の割合の変化
- (b) コントロール細胞における、18時間の間の個々の樹状突起分枝の長さの変化
- (c) NR1欠損細胞における、バレル内側に配置する樹状突起の割合の変化
- (d) NR1欠損細胞における、18時間の間の個々の樹状突起分枝の長さの変化

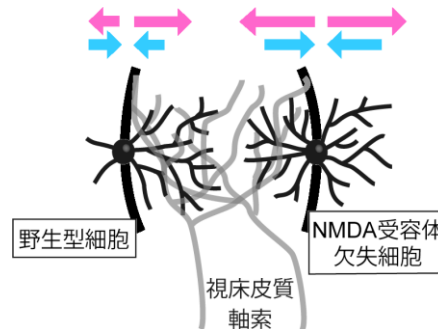


図7、バレル細胞樹状突起の精緻化における“ダイナミックモデル”

新生仔期のバレル細胞樹状突起はバレルの内外で大きく伸縮していたが、これはシナプスを形成する視床皮質軸索の終末を探しているためと考えられる。

一方、NMDA受容体欠損細胞の樹状突起はバレルの内外で大きな伸縮を示した。このことは、バレルの内側において視床皮質軸索とシナプスを形成した樹状突起がNMDA受容体のシグナルにより安定化されることを意味すると考えられる。

赤、青矢印は樹状突起伸縮の大きさを示す。

本研究は、生きた動物個体で視床皮質回路形成過程とその分子メカニズムの一端を明らかにした、初めての例である。

**以上の結果はNeuron誌に掲載され、同誌のIn this issueおよびResearch highlightに抜粋された**(Mizuno et al., Neuron, 2014)。

また、ヤフーニュース、静岡新聞、FMラジオかんなみ・みしま等で紹介頂いた。

## 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 2 件)

① Mita S, de Monasterio-Schrader P, Fünfschilling U, Kawasaki T, Mizuno H, Iwasato T, Nave KA, Werner HB, Hirata T Transcallosal Projections Require Glycoprotein M6-Dependent Neurite Growth and Guidance.

*Cerebral cortex*, in press

② Mizuno H, Luo W, Tarusawa E, Saito YM, Sato T, Yoshimura Y, Itohara S, Iwasato T NMDAR-Regulated Dynamics of Layer 4 Neuronal Dendrites during Thalamocortical Reorganization in Neonates.

*Neuron*, 82, 365-379, 2014

[学会発表] (計 13 件)

(講演 4 件)

### ① 水野秀信

マウス大脳皮質神経回路形成の生体イメージング (招待講演)

遺伝研研究会 哺乳類脳の機能的神経回路の構築メカニズム

国立遺伝学研究所 三島市 2014 年 12 月

### ② 水野秀信

神経活動依存的な大脳皮質神経回路形成の生体イメージング (招待講演)

京都大学理学研究科 生物物理学セミナー  
京都大学 京都市 2014 年 11 月

### ③ Mizuno H, Iwasato T

NMDAR-regulated dynamics of layer 4 neuronal dendrites during thalamocortical reorganization in neonates (招待講演)

“Novel developments on the study of life and biological systems based on genome engineering and imaging science”

International institute for advanced studies Kitsukawa City 2014 年 2 月

### ④ Mizuno H, Luo W, Saito YM, Itohara S, Iwasato T

In vivo imaging of NMDAR-dependent dendritic refinement of barrel cells in neonatal somatosensory cortex (一般口演)

日本神経科学大会 Neuro2013

国立京都国際会館 京都市 2013 年 6 月

(ポスター発表 9 件)

### ① Mizuno H, Luo W, Tarusawa E, Saito YM, Sato T, Yoshimura Y, Itohara S, Iwasato T

NMDAR-regulated fluctuating dynamics in refinement of barrel cell dendrites (査読有)

Cell symposia 2013 San Diego, USA

2013 年 11 月

(他、計海外 4 件、国内 5 件)

[図書] (計 1 件)

### ① 岩里琢治、水野秀信

細胞と回路の形成制御・神経回路の形成機構  
哺乳類大脳皮質神経回路の生後発達 (頁 71-76 : 総頁数 169)

脳神経系の再生医学-発生と再生の融合的新展開 (監修: 井村裕夫・高橋淳 編集: 河崎洋志) 診断と治療社 2015 年 1 月

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

水野秀信 (MIZUNO HIDENOBU)

国立遺伝学研究所・個体遺伝研究系・助教  
研究者番号: 00567159

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者