

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870544

研究課題名(和文) 視床軸索投射により制御される大脳皮質領野の層構造特異化メカニズム

研究課題名(英文) The mechanism of laminar specification of cortical areas regulated by thalamic afferent projection

研究代表者

佐藤 晴香 (Sato, Haruka)

熊本大学・学内共同利用施設等・特別研究員 (PD)

研究者番号：70625780

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)：本研究では、哺乳類大脳皮質の領野形成過程で層構造が領野ごとに特異化する現象に着目し、大脳皮質への主な入力線維である視床軸索が外的因子としてそれを制御する可能性を検討した。遺伝子改変マウスを用いた視床軸索除去により標的領野において視床軸索投射層である第4層のニューロン数が減少したことから、視床軸索が標的領野のニューロン数を制御することで層構造を特異化することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this research, we focused on the laminar specification during cortical area formation in mammalian brain, and examined how an extrinsic factor, thalamic afferents, play a role in this step. By analyzing mutant mice in which thalamic afferents are ablated, we found the neuronal number was decreased in layer 4, the target layer of thalamic afferents, of the target area. It is suggested that thalamic afferents refine area-specific laminar structure by regulating neuronal number.

研究分野：神経発生

キーワード：大脳皮質 層 領野 視床軸索

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の大脳皮質には情報の種類に応じて機能を分担する領野構造がある。その形成過程では、生後すぐに大脳皮質全体を通じて均一であった6層構造が、一週目には領野により厚みが異なるようになる。層構造が領野ごとに特異化する過程にはどのような因子が働いているのだろうか？領野特異的に発現し細胞の増殖や生存を制御する内在因子が存在する可能性があるが、そのような因子は未だ発見されていない。一方、大脳皮質外の組織である視床から伸長してくる視床軸索は大脳皮質に情報を伝える主要な入力線維であるが、その投射は領野の層特異化と時空間的に一致することから、視床軸索が外的因子として領野形成を制御している可能性が考えられる。実際、申請者らのこれまでの研究において、視床軸索の末端に発現する分子をスクリーニングして大脳皮質ニューロンの発達に対する作用を調べたところ、大脳皮質ニューロンの生存と突起成長を促進する分子が同定された。さらに、これら分子は大脳皮質の感覚野に投射する感覚性視床核に特異的に発現していることから、感覚野の層構造の形成に関与する可能性が考えられた。そこで申請者は、領野形成において層構造が特異化する過程には外的因子である視床軸索の投射が重要な役割を果たすのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、視床軸索投射に依存した層構造の特異化メカニズムを解明するために、以下の2つを目的とした。

(1) 視床軸索投射が領野特異的な層構造の形成に果たす役割の解明

(2) 作用実体となる視床軸索由来分子の同定

まず、(1)を達成するために、まず感覚野への視床軸索投射量を変化させたときに生じる感覚野の層構造の変化、特に第4層の変化を解析することで、視床軸索が層構造特異化に及ぼす作用を探る。

次に、(2)に取り組む上で、申請者らのこれまでの研究で見出された視床軸索末端に発現する分泌タンパク質である NRN1 と VGF に着目する。これらを欠損または異所発現させたときに、視床軸索投射を変化させた場合と同様の変化が起こるか、またはこれら分子により視床軸索の変化により誘導された層構造の変化が回復されるかを解析する。

これらの実験により視床軸索による層構造の特異化メカニズムを解明することで、領野形成を明らかにする。

3. 研究の方法

視床軸索が領野の層構造の特異化に果たす役割と、その作用実体を明らかにするために、胚操作と遺伝学的手法を用いて以下の点について調べる。

(1) 視床ニューロン数の増減により視床軸索の量を変化させたときの層構造の変化

(2) 視床軸索末端から分泌されるタンパク質の層形成における機能

(3) 視床軸索ガイダンスの変化により視床軸索の投射パターンを変化させたときの層構造の変化

(4) 末梢の感覚ニューロン数が増加したときの層構造の変化

これらにより、視床軸索の投射によって制御される領野特異的な層構造の形成メカニズムを明らかにする。

4. 研究成果

(1) 視床ニューロン数の増減により視床軸索の量を変化させたときの層構造の変化

視床軸索の量を変化させたときの投射先領野における層構造の変化を解析するために、効率的かつ再現性よく視床軸索を除去できる遺伝子改変マウスと毒素投与を組み合わせた系を主に用いた。視床特異的に Cre を発現する 5HTT-Cre マウス(国立遺伝学研究所 岩里琢治教授より譲与)と Cre 活性下でジフテリア毒素受容体を発現する ROSA-DTR マウスを掛け合わせた二重変異マウスを作製し、視床軸索が皮質板に侵入する生後直にジフテリア毒素を腹腔内投与し、視床ニューロンを死滅させて視床軸索を除去した。領野の層構造の違いが明瞭になる生後7日目に脳を回収し、凍結切片の作製、免疫染色を行い、変異を二重に持たない同腹仔の視床軸索非除去マウスと比較した。まず、感覚性視床核マーカーである ROR と視床軸索マーカーである 5HTT-Cre の免疫染色により、視床のニューロンの除去と視床軸索の除去が成功していることをそれぞれ確認した。特に、5HTT-Cre の発現が強い腹側基底核 (VB) 核がほぼ完全に欠失していた(図1)。

その投射先領野である一次体性感覚野 (S1) の層構造を調べると、視床軸索の標的層であり本来 S1 で厚く発達している第4層において、マーカーの ROR を発現する細胞数が顕著に減少していた(図2)。これにより、一次体性感覚野と二次体性感覚野の層構造の違いがなくなり、境界が不明瞭になった。一方、視床軸索の標的層でない第5層の細胞数はあまり変化なかった。

さらに、第4層マーカー陽性細胞数が減少した原因を探るために第4層が産まれる時期に Edu を腹腔内投与して第4層ニューロンをラベルして上と同じ生後7日目にその数を解析したところ、視床軸索除去マウスでは Edu 陽性細胞の数が優位に減少していた(図3)。これより、視床軸索がなくなるとその標的領野において標的層である第4層細胞数が減少することがわかった。

逆に、視床軸索を増加させたときの領野層構造への影響を調べるため、視床ニューロン数を増大させることを試みた。これまでの研

究により簡便に遺伝子機能解析ができるニワトリ胚への in ovo エレクトロポレーションを用いたスクリーニングによって、Wnt シグナルを活性化させると視床ニューロン数が増大することを見出していた。領野を持たないニワトリの代わりに in utero エレクトロポレーションによってマウス胚に Wnt リガンドまたは恒常活性型 カテニンを過剰発現させ、視床ニューロン数の変化を解析した。その結果、ニワトリの場合と異なりマウスでは Wnt シグナルの活性化は視床ニューロン数の増大を引き起こさなかった。視床軸索増大による領野の変化を解析するには、マウスの視床ニューロン数を増加させる因子をスクリーニングする必要がある。

(2) 視床軸索末端から分泌されるタンパク質の層形成における機能

申請者らのこれまでの研究において視床軸索末端に発現する分泌タンパク質として NRN1、VGF を同定し、大脳皮質ニューロンの生存と樹状突起形成を促進することを見出した。視床軸索除去マウスではこれら分子が欠失していると考えられるため、in utero エレクトロポレーションにより片側の大脳皮質の第 4 層に過剰発現させて遺伝子導入されていない対側と比較した。その結果、対側と比べてエレポレ側で ROR 陽性の第 4 層ニューロン数が増加する傾向が見られた。視床軸索除去により減少した第 4 層ニューロン数が NRN1、VGF の過剰発現により回復する可能性が示唆された。

また、NRN1 と VGF を本来発現の見られない運動性視床核に異所発現させてその投射先である運動野の層構造の変化を解析した。比較的早い時期のマウス胚への in utero エレクトロポレーション技術を必要とする手法のためサンプルを十分数集めることは困難であったが、いくつかのサンプルでは運動野において感覚野の第 4 層マーカーである ROR の発現がエレポレされていない対側に比べて上昇する傾向が見られた。

(3) 視床軸索ガイダンスの変化により視床軸索の投射パターンを変化させたときの層構造の変化

視床軸索投射が正常な領野に投射するためには、軸索ガイダンス分子が適切な濃度勾配で伸張経路に発現する必要があるため、その 1 つである ephrin-A5 を in utero electroporation により本来発現の低い終脳腹側の吻側に過剰発現させることにより濃度勾配を乱して領野への視床軸索投射を変化させることを試みた。終脳腹側に ephrin-A5 をエレポレすることには成功したが、効率的に視床軸索投射パターンを大きく変化させることは困難であった。視床軸索投射を変化させるには (1) の遺伝子改変マウスを用いた視床軸索除去の方が効率的であ

ると判断した。

(4) 末梢の感覚ニューロン数が増加したときの層構造の変化

動物種が依存する感覚系の感覚器は大きくそれに対応する領野も大きいことから、感覚ニューロン数の変化によって視床などの中継地点の組織の大きさの変化を伴いながら、大脳皮質の領野の大きさが影響を受ける可能性が考えられる。これを検討するために、網膜神経節細胞数が増加する Ptf1a-KO マウスの領野を解析することにした。まず初めに Ptf1a 遺伝子が Cre で置換されている Ptf1a-CreKI マウス (熊本大学 大村谷昌樹准教授より譲与) の E18.5 における視神経の増大を確認した。視覚系視床核である外側膝状体 (dLGN) の大きさの変化を解析したところ、E18.5 での顕著な変化は見られなかった。このマウスは Ptf1a の膵臓での発現の影響で生後致死であるため、生後脳を得ることは不可能である。そこで網膜特異的に Ptf1a を欠損させるために、網膜特異的 Fgf15-nCre マウス (京都大学 趙蘭英研究員より譲与) と Ptf1a-flox マウス (精神・神経医療研究センター 星野幹雄教授より譲与) を掛け合わせている。今後、視神経が増大したマウスの生後 1 週目における領野の大きさの変化の有無を解析することで、領野の大きさの決定に感覚ニューロンが関与する可能性を検証できると考える。

以上の研究成果について、必要な部分については実験を追加し、論文発表する予定である。

<引用文献>

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 0 件)

[学会発表](計 2 件)

佐藤晴香

大脳皮質の発生において外的要因である視床軸索が果たす役割の解析

熊本シンポジウム 2013 -神経発生を多角的に討論する会-

2013 年 6 月 25-26 日, 熊本県熊本市

招待講演 口頭発表

Haruka Sato, Nobuhiko Yamamoto, Kenji Shimamura

The role of thalamic afferent-derived extrinsic factors in cortical development.

Neurogenesis 2013 in Matsushima

2013 年 10 月 16-18 日, 宮城県松島町

ポスター発表

〔その他〕

ホームページ等

http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/bunya_top/brain_morphogenesis/

6．研究組織

(1)研究代表者

佐藤 晴香 (SATO, Haruka)

熊本大学・発生医学研究所・特別研究員

研究者番号： 70625780