

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26430047

研究課題名(和文) 知覚機能向上に伴う大脳皮質微小神経回路の形成基盤の解明

研究課題名(英文) To reveal the mechanisms of cell-lineage dependent cortical neural circuits formation during postnatal development

研究代表者

足澤 悦子 (TARUSAWA, Etsuko)

大阪大学・生命機能研究科・助教

研究者番号：00446262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞系譜に規定される微小神経回路の発達過程を検証するためマウス大脳皮質バレル野の4層の興奮性神経細胞間シナプス結合を対象とした。生後9日から20日のマウスを用いて、興奮性細胞二つから同時ホールセル記録を行い、シナプス結合関係を検証した。その結果細胞系譜が同じ細胞間結合においてのみ、発達に伴う結合関係の変化が見られたが、細胞系譜の異なる細胞間結合は、発達を通してその結合関係に大きな変化は観察されなかった。細胞系譜に規定される神経細胞結合が、発達に伴って形成されていることが明らかになり、マウスの飼育環境の変化がどの段階の細胞系譜依存的神経細胞結合関係に影響を与えるかを調べるのが可能となった。

研究成果の概要(英文)：We analyzed developmental establishment of the cell-lineage-dependent neural connections in mouse barrel cortex using chimeric mice which is generated by injection of GFP-expressing mouse-derived iPS cells.

There was no significant difference in the connection probability between clonal and non-clonal pairs at P9-11. The probability increased significantly from P9-11 to P14-16, then decreased only in clonal pairs, resulting in the same connection probability in clonal and non-clonal pairs at P18-20. The proportion of reciprocally connected pairs among connected pairs was not significantly different between clonal and non-clonal neuron pairs at P9-11. Then the reciprocity continued to increase significantly in clonal pairs until P18-20, whereas it showed only an insignificant increase in non-clonal pairs during that period. These results suggest that cell lineage dependent reciprocal connections are formed accompanied with cell lineage specific reconstruction of synaptic connectivity.

研究分野：神経回路形成

キーワード：神経回路

1. 研究開始当初の背景

動物は、生後の知覚経験を通して個体の生存に重要な知覚能力を向上させ、環境に適応している。特に、動物が直面している状況に応じて変動する脳の状態 (brain state) が影響していると考えられる。たとえば動物が身の危険を感じている時や食物の取得時など、動物の覚醒レベルが上がった状況において、記憶学習が成立し易いことが分かっている。マウスは、豊かな環境 (enriched environment:EE) で飼育され (EE 飼育) 探索知覚行動が増加すると、知覚機能の向上が生じると報告されている (Bourgeon et al., 2004)。EE 飼育は知覚経験の増加をもたらすだけでなく、脳の覚醒レベルも変化させている。これまでの研究により、EE 体験中のマウス脳内では、アセチルコリンやノルアドレナリンの放出量が増えていることが分かっている (Por et al., 1982, Rosenzweig and Bennett, 1996, Soares et al., 1999)。これら神経修飾物質は脳の覚醒レベルを変化させるだけでなく、大脳皮質におけるシナプス可塑性誘導に重要であることは、発達期視覚野の眼優位可塑性や急性脳切片標本を用いた解析などにより明らかにされている (Bear and Singer, 1986, Gu and Singer, 1995, Inaba et al., 2009, Yamada et al., 2006)。これらの知見から、EE 飼育マウスの探索行動中に放出される神経修飾物質が大脳皮質神経回路を変化させる可能性が高い。また EE 飼育したマウスにおいて、大脳皮質バレル野の神経細胞の受容野サイズの縮小や (Polley et al., 2004, Frostig, 2006)、刺激応答性の向上が観察されており (Coq and Xerri, 1998, Polley et al., 2004)、知覚機能向上に伴い、神経回路に変化が起きている可能性が高い。これまで EE 飼育によりシナプス可塑性が起き、シナプスの強弱に変化が起きていることは報告されている。しかし情報の処理過程の理解に不可欠な神経回路そのものに与える影響は、これまで神経回路の実体が明らかになっていなかったために、検証することができなかった。

私たちは、大脳皮質視覚野において微小神経回路が存在することを明らかにし (Yoshimura et al., 2005)、複雑な情報処理が行われる神経回路網が微小神経回路の集合として成り立っている可能性を提唱した。また近年の研究により、同じ幹細胞由来の神経細胞同士がシナプス結合を形成しやすいこと (細胞系譜依存性) が明らかにされた (Yu et al., 2009)。それを踏まえて、私たちは予備的な実験により、細胞系譜を可視化できるキメラマウスを用い、バレル皮質に形成される神経結合関係を電気生理学的に調べたところ、4層の星状細胞間において細胞系譜依存的に微小神経回路が形成されていることを明らかにした。同じ細胞系譜の神経細胞において、シナプス結合を形成する細胞ペアのうち、約7割が双方向性シナプス結合を形成しており、異なる細胞系譜間の双方向性結合確率よりもはるかに高かった。さらに私たちは、生後1日目から毎日ヒゲを切り、感覚遮断を施したマウスを用いて同様の解析を行ったところ、細胞系譜依存的な双方向性結合が減少していることを見出している。これは、細胞系譜依存的なシナプス結合が感覚入力の影響を受ける可能性を示唆している。そこで、本課題では、マウスバレル皮質における細胞系譜依存的に形成される微小神経回路を指標とし、EE 飼育により細胞間シナプス結合関係が変化するかどうかを明らかにするとともに、探索行動中の神経修飾物質放出を抑制することにより、知覚機能および微小神経回路形成に与える影響を調べる。

2. 研究の目的

新奇で豊かな環境 (Enriched Environment:EE) において飼育された動物では、探索行動が増加し知覚機能が向上する。しかし、その神経回路形成機構はわかっていない。私たちは、マウスバレル皮質4層の星状細胞間に、細胞系譜依存的シナプス結合により形成される微小神経回路を見出した。この微小神経回路が EE 飼育による知覚機能向上に与える影響を明らかにするために、本課題では、EE 飼育による知覚経験

の増加と探索中の大脳皮質の状態 (brain state) に着目し、これらが細胞系譜に規定される微小神経回路形成に与える影響を電気生理学的に解明する。

3. 研究の方法

本研究は、EE 飼育が微小神経回路に与える影響を検証するため、EE 飼育後にヒゲ依存的弁別課題により知覚機能の向上を確認し、同マウスから急性脳スライス標本作製し、微小神経回路の結合様式を検証する。

キメラマウスの作製

野生型マウスから iPS 細胞を樹立し、緑色蛍光タンパク遺伝子を導入したものを野生型マウスの 3.5 日目胚に移植する。

電気生理学的解析

実験対象期間は生後 9 日から 20 日までとする。キメラマウスから大脳皮質の急性脳切片標本作製し、3 つの神経細胞に同時にホールセル記録を行い、以下の三つの結合確率を調べる。

1. 一方向性結合確率
2. 双方向性結合確率
3. 同時記録したペア細胞が三つ目の星状細胞から共通入力を受ける確率。

また、細胞系譜依存性を明確にするために、蛍光タンパク陽性細胞と陰性細胞からも同時に記録を行い、結合関係を比較する。単一幹細胞に由来する神経細胞から記録をするために、iPS 細胞の寄与率の低いマウスから急性スライス標本作製し、カラム状に単離され分布する蛍光タンパク陽性細胞群から記録を行う。iPS 細胞は複数のラインを用いることにより、iPS 細胞固有の影響ではないことを確認する。

4. 研究成果

(1) 細胞系譜依存的シナプス結合の発達に伴う変化の検証

まず、細胞系譜に規定される微小神経回路がどのように発達するかを解析した。解析対象

には、マウス大脳皮質バレル野の 4 層における興奮性神経細胞間シナプス結合を選択した。この領域におけるシナプス形成初期 (生後 9 - 11 日目)、中期 (生後 14 - 16 日目) および後期 (生後 18 - 20 日目) に、バレル皮質 4 層の興奮性細胞二つから、同時ホールセル記録を行い、シナプス結合関係を検証した。細胞系譜の可視化には、緑色蛍光タンパク (GFP) を発現する iPS 細胞を野生型マウスの胚盤胞に移植することにより行った。このキメラマウスにおいて、GFP を発現する細胞群は細胞系譜が同じ可能性が高く、また GFP を発現する細胞と発現しない細胞は、異なる細胞系譜で生まれた細胞である。GFP 発現細胞間シナプス結合確率と GFP を発現する細胞と発現しない細胞間シナプス結合確率を比較したところ、生後 9 - 11 日では、細胞系譜が同じ細胞間結合と異なる細胞間結合の結合確率には差が見られなかった。しかし、生後 14 - 16 日には細胞系譜が同じ細胞間結合は有意に高くなった。生後 18 - 20 日には、細胞系譜が同じ細胞間結合確率は下がり、細胞系譜が異なる細胞間結合と同じくらいになった (図 1)。つまり、細胞系譜が同じ細胞間結合においてのみ、発達に伴う結合関係の変化が見られたが、それに比べて、細胞系譜の異なる細胞間結合は、発達を通して、その結合関係に大きな変化は観察されなかった。以上の結果から、細胞系譜に規定される神経細胞結合が、発達に伴って形成されていることが明らかになり、マウスの飼育環境の変化がどの段階の細胞系譜依存的神経細胞結合関係に影響を与えるかを調べるのが可能となった。

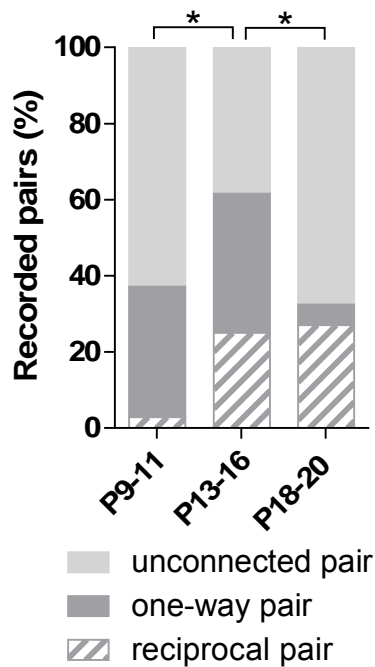


図1 発達に伴う同一細胞系譜細胞間結合様式の変化
 χ^2 -test, *: $p < 0.05$

(2) 複数の iPS 細胞ラインを用いた細胞系譜依存的な神経細胞間結合の検証

大脳皮質バレル野4層において、同一細胞系譜の星状細胞間には、異なる細胞系譜の星状細胞間に比べて有意に高頻度な双方向性結合が形成されていることを見出した。その大脳皮質興奮性神経細胞の細胞系譜の可視化には、野生型グリーンマウスから樹立した iPS 細胞を用いて、野生型マウスから得られた胚盤胞に移植することでキメラマウスを作製した。近年、iPS 細胞樹立において遺伝子変異が起きている可能性を示唆する研究が報告された。そこで、複数の iPS 細胞のラインを用いることで、これまで観察されていた細胞系譜依存的な双方向性シナプス結合が、iPS 細胞のどのラインにおいても観察されるかを検証した。その結果、いずれのラインにおいても、細胞系譜特異的に形成される双方向性結合が観察され、この現象は iPS 細胞におきる遺伝子変異が原因ではなく、細胞系譜に依存したシナプス結合であることが

証明された(図2)。また、同一細胞系譜間、異なる細胞系譜の神経細胞間、それぞれに形成されるシナプス結合強度にも違いが見られるかを検証した。その結果、まず一方向性シナプス結合および双方向性結合の二つの結合様式間において比較したところ、シナプス応答の振幅に有意な差は見られなかった。また、同一細胞系譜、および異なる細胞系譜に神経細胞間に形成されるシナプス応答について比較したところ、シナプス応答の振幅に有意な差は見られなかった。以上の結果から、神経細胞間の特異的なシナプス結合には細胞系譜が関係しているが、形成されるシナプス応答の強度には、細胞系譜に関係ないことが明らかになった。

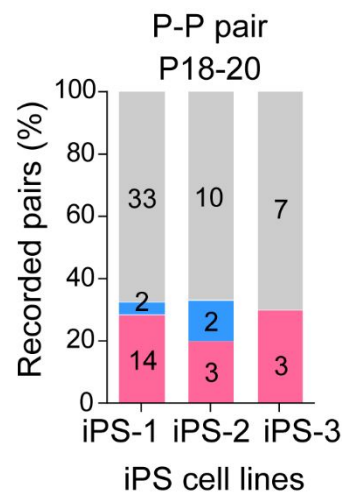


図2 複数の iPS 細胞ラインを用いた細胞系譜依存的な神経細胞結合
 グレー : unconnected pair ブルー : one-way pair, ピンク : reciprocal pair

5. 主な発表論文等
 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

足澤 悦子 (TARUSAWA, Etsuko)

大阪大学大学院・生命機能研究科・助教

研究者番号 : 00446262