

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年6月6日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2017

課題番号：26710002

研究課題名(和文) 大脳皮質視覚野における同一神経幹細胞由来機能相同性配列の発達の解析

研究課題名(英文) Analysis of the functional development of clonally-related neurons in the visual cortex

研究代表者

大槻 元 (Ohtsuki, Gen)

京都大学・白眉センター・特定准教授

研究者番号：60723278

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、大脳一次視覚野において由来する幹細胞を同一にする神経細胞群(クローン細胞群)で機能発達の仕組みを解明することを目的とした。その際、クローン細胞群を蛍光するように遺伝子改変したマウスを用いて、二光子顕微鏡による生体内でのCa²⁺神経活動記録と脳スライス標本下の神経細胞群からの多電極パッチクランプ記録により、クローン細胞間のシナプス伝達と可塑性誘導、およびそれに対する投射を調べ、機能構造の発達過程を明らかにすることを試みた。幼若期と成体での機能類似性がどのように変化するのか調べたところ、開眼後の幼若期に大脳皮質内で縦方向に並んだクローン細胞の機能が特に似ていることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Orientation preference among clonally-related cells from same cell-lineage is more similar than among unrelated cells in the rodents' primary visual cortex. While the similarity of orientation selectivity among the clonally-related neurons is moderate in adult mice, it could be stronger at immature stage with less visual experiences. Here, by using the combination of in vivo two-photon Ca²⁺ imaging and a cell-lineage tracing with transgenic mice, we examined visual responses of clonally-related neurons, progeny derived from a single cortical progenitor cell, in the course of maturation from eye opening to mature state. We found that while clonally-related cells are more similar in orientation preference through development, the functional similarity was higher in juvenile. Comparison of the similarity in vertically aligned cells revealed the functional similarity in narrower column is especially high in younger cortex.

研究分野：神経生理学、脳機能生理学、神経免疫学

キーワード：クローン細胞 遺伝子改変マウス 大脳皮質 一次視覚野 生体下Ca²⁺イメージング 細胞位置機能解析 機能発達

1. 研究開始当初の背景

視覚を担う大脳皮質一次視覚野では、網膜、外側膝状体を介した視覚情報を処理し、物体の傾きや動きの方向を感知する。視覚野の一つ一つの神経細胞は、動物に傾きを持つ物体を見せたり、物体をある方向に動かしたりすると活動電位を発生する。これらの機能はそれぞれ方位選択性と方向選択性と呼ばれるが、これまで、近い傾きに対する方位選択性を持った細胞が、視覚野の表層から深層にかけて縦状に配列することが分かっていた。しかしながら、どのような仕組みで機能配列が作られるのかは、半世紀近くの間、未知なままだった。

大脳皮質は胎生期において、神経幹細胞から分化した神経細胞が層状に並び、層が積み重なって出来上がる。一つの神経幹細胞から発生する細胞数は、げっ歯類の場合、600 個程度と考えられ、これらは神経幹細胞である放射状グリア細胞の持つ放射状グリア線維を薦って表層側へと移動する。私は自身が率先したプロジェクトにおいて、遺伝子改変マウス(TFC.09 系統; Magavi et al., 2012, J. Neurosci.) を用いて同一の神経幹細胞群から発生するすべての神経細胞を同定し、成体マウスの一次視覚野で、二光子顕微鏡を用いた Ca^{2+} イメージングによって生体内における視覚刺激に対する応答を比較した。すると、方位選択性に関し、同一の神経幹細胞群から発生した神経細胞群(以下、クローン細胞群)は異なる幹細胞から発生した他のクローン細胞群と比べ、より近い方位選択性を持つことがわかった(Ohtsuki et al., 2012, Neuron)。Yu ら(2008, Nature)は、ウイルスを用いてクローン細胞群を蛍光タンパク質で標識し、標識した同一の幹細胞由来の複数の神経細胞からパッチクランプ記録を行ったところ、幹細胞を同じくするクローン細胞同士がシナプス結合を持つ確率は、異なる神経幹細胞由来のもの比べて高いということを見出していた。このことから、我々の見出した結果は、クローン細胞群は成体マウスの脳内で互いに結合を持ち、機能を持った配列を形成していることを示唆する。

2. 研究の目的

大脳皮質一次視覚野において、機能の類似性を持った細胞は表層から深層にかけて縦状に並んで配列される。なぜ同じ幹細胞から分化した神経細胞群に機能の類似性があるのか、また、大脳の発達過程でどのような仕組みで機能配列が完成するのかは明らかではない。本研究では、二光子顕微鏡による生体内神経活動記録と脳スライス標本下の神経細胞群からの多電極パッチクランプ記録により、幹細胞を同一にする神経細胞のシナプス伝達と可塑性誘導、およびそれに対する投射を調べ、機能構築の発達過程を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、大脳皮質一次視覚野におけるクローン細胞群が形成する機能構築の発達過程を明らかにする。そのために、神経細胞が分化する時期にのみ少数の神経幹細胞にランダムに蛍光タンパク質を発現する遺伝子改変マウス(TFC.09 系統)を用いて、同一幹細胞に由来するすべてのクローン神経細胞群を標識する。二光子顕微鏡を用いた Ca^{2+} イメージングによって、生体内でクローン細胞群の活動記録を行い、視覚刺激に対する個々の細胞機能(方位選択性と方向選択性)を同定する。この時、方位選択性について、成体動物と幼若動物の間で機能的クローン細胞群(以下、F+細胞群)と蛍光タンパクを発現していない細胞群(以下、F-細胞群)の大脳皮質内での位置関係や、機能的類似度に違いが無いが精密に調べる。さらに、機能を同定した観察動物の脳切片標本を作成し、シナプス結合、シナプス伝達特性、シナプス可塑性誘導を発達段階を追って、多電極パッチクランプ記録により調べる。また、クローン細胞群に対する視床からの投射を電気刺激によりスライス標本下でも調べる。

4. 研究成果

発達に伴ったクローン細胞群の分布比較

実験には TFC.09 系統に Ai14 系統を掛け合わせたマウスを用いた。図 1 A に示すように、ランダムに選ばれた同一幹細胞に由来するすべてのクローン神経細胞群を標識できる。二光子顕微鏡を用いた Ca^{2+} イメージングす

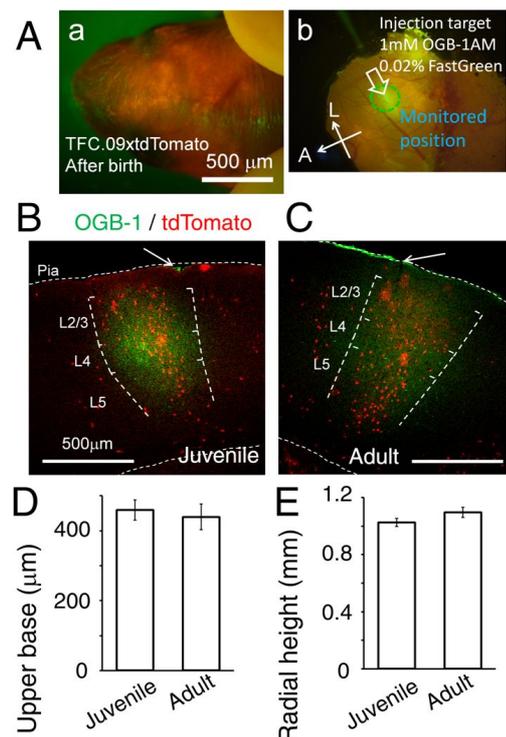


図1. 大脳皮質におけるクローン細胞群の同定と分布
A. 生後0日のクローン細胞群の蛍光(a)。クローン細胞群への Ca^{2+} 指示薬の注入(b)。B,C. 幼若期(Juvenile)と成体(Adult)の固定標本下のクローン細胞群。D,E. 幼若期と成体のクローン細胞分布の定量。

るために、クローン細胞群が位置する一次視覚野に Ca2+指示薬 (OGB-1AM) を複数回注入する (図 1 A b)。クローン細胞群の一次視覚野内での分布を固定標本で調べると、表層から第 6 層までの間で、幼若期 (開眼直後) と成体の間で顕著に分布が異なることはなかった (図 1 B - E)。げっ歯類の場合、1 - 2 日で神経細胞の発生、分化、移動は完了することから、この結果は妥当である。

発達にともなったクローン細胞群の方位選択性類似度の比較

生体下での Ca2+イメージングを行い、クローン細胞群の方位選択性を、開眼直後と成体動物の間で比較した (図 2)。方位選択的

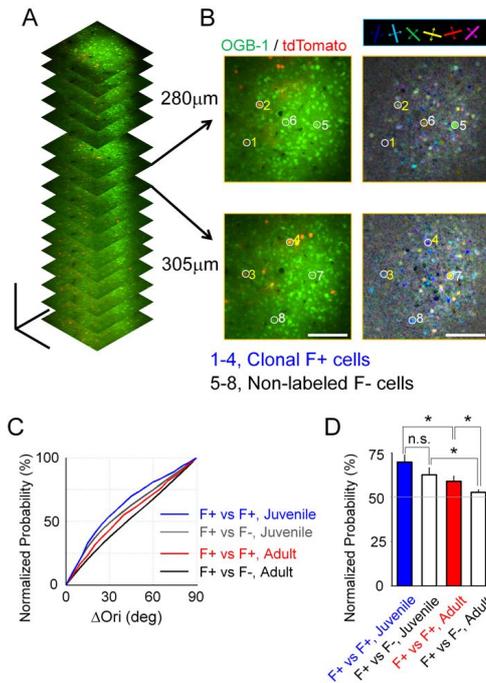


図2. 幼若期クローン細胞群の方位選択性マップと機能類似度の発達を追った比較
A,B. 開眼直後の一次視覚野での方位選択性細胞のカラーマップ。C. ΔOri の比較。累積確率は平均値を表す。D. 類似度の比較。類似度は $\Delta Ori = 45$ deg. の時の累積確率とした。

であった細胞について、最適方位の差 (ΔOri) を全ての F+間、F+F-間で計算し、 ΔOri の累積確率分布を、Juvenile F+ vs F+, Juvenile F+ vs F-, Adult F+ vs F+, Adult F+ vs F-、で求めた (図 2 C)。また、『類似度』として、 ΔOri が 45 度の時の累積確率をとって棒グラフにまとめた (図 2 D)。このような解析から、幼若期と成体ともに、クローン細胞群の間の類似度の方が、非クローン細胞群との間よりも高いことが分かった。つまり、クローン細胞群は互いに近い最適方位を持つことを示す。また、幼若期から成体にかけて、一次視覚野のクローン細胞群機能は類似度が下がることが分かった。

円柱領域でのクローン細胞群の機能類似度の比較

大脳皮質では発生に伴って、げっ歯類の場

合、一つの神経幹細胞から 600 程度程度の細胞が増える。これらの細胞は皮質の最深部から表層に向かって並ぶ。これまでに、哺乳類の視覚野で機能 (方位選択性) が近い細胞群が脳表に対して垂直に円柱状に並んでいるかどうかといった点の詳細は、不明であった。

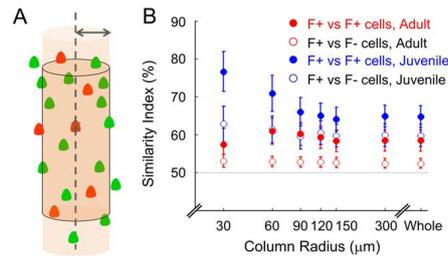


図3. 幼若期クローン細胞群の方位選択性マップと機能類似度の発達を追った比較
A,B. 開眼直後の一次視覚野での方位選択性細胞のカラーマップ。C. ΔOri の比較。累積確率は平均値を表す。D. 類似度の比較。類似度は $\Delta Ori = 45$ deg. の時の累積確率とした。

近年、根東らは一次視覚や神経細胞農直ちに機能が近い細胞が並んでいる傾向が高いことを示した (Kondo et al., 2016 Nat. Comm.)。そこで、クローン細胞群の中で、円柱状脳領域に機能の近い細胞が並ぶのか調べたところ、幼若期でのクローン細胞群は 30 μm 程度の半径を持つ円柱領域で特に機能が近い細胞が多いことが分かった。しかしながら、標識されるクローン細胞群のうち、方位選択的である細胞の数は高々数十細胞なので、クローン細胞集団の中で、半径の小さいミニコラムが形成されることはなかった (図 3)。追加の解析として、円柱半径を様々に変えたとき以外にも、リング状や円盤状、バームクーヘン状の領域でも、クローン細胞群と非クローン細胞群の機能類似性の比較をしたが、大きな差はなかった。

発達にともなったクローン細胞群ごとの最適方位分布の比較

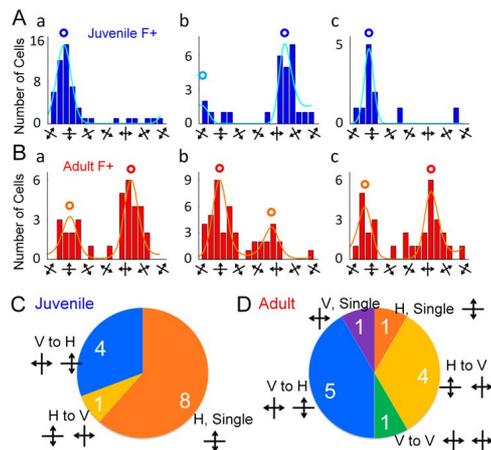
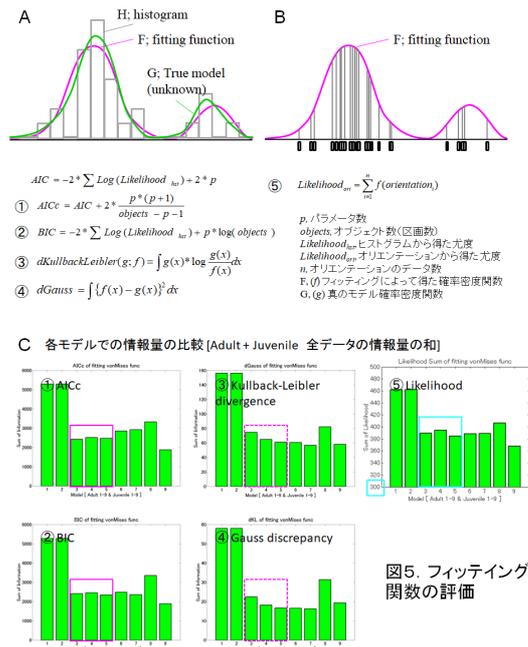


図4. 幼若期と成体のクローン細胞群の最適方位分布
A. 代表的な幼若期の個体のクローン細胞群の最適方位。横軸に方位 (10 deg 刻み)、縦軸に細胞数をとる。B. 代表的な成体のクローン細胞群の最適方位。C. 幼若期のクローン細胞群の縦横の割合。D. 成体のクローン細胞群の縦横の割合。説明は本文参照。

次に、クローン細胞群ごとに最適方位の分布を比較したところ、幼若期のクローン細胞群は水平方向の方位刺激に反応するものが多かった。また、その分布グラフを見ると、6割のクローン群が1峰性を示した(図4 AおよびC)。他方、成体のクローン群の最適方位の分布を調べると、水平方向へ最適方位が偏っているわけではなく、垂直方向の視覚刺激にも反応するクローン群が同程度あった。また、その分布グラフは2峰性を示す個体が8割以上を占めた(図4 BおよびD)。

しかし、後の解析で、クローン細胞群の方位分布を調べる際に、細胞毎の最適方位を10度ごとのビンに分けて棒グラフを書き、フィッティングカーブを近似させるといった解析を行ったが、フィッティング関数に依存して結果が変わってしまうことが分かった(図5 AおよびB)。

フィッティング関数に関して、様々な関数を採用して、5つの評価法で最適な近似関数を決めた。その際、近似関数には、2つの初期値探索用の関数(1)(2)とする、(3) vonMises 関数の2項積(一般化 vonMises 関数)、(4) vonMises 関数の2項線形和、(5) vonMises 関数の2項線形和+定数項、(6) vonMises 関数の3項線形和、(7) vonMises 関数の3項線形和+定数項、(8) vonMises 関数、(9) vonMises 関数+定数項の9種類を試した。また、真のモデルとの近さの評価法としてAICc(赤池情報量規準)とBIC(ベイズ情報量規準)、カルバック・ライブラー情報量(不一致)とガウス不一致、さらに得られた関数のOrientationでの尤度の検査を行った。



これらの評価によって、(3) vonMises 関数の2項積、(4) vonMises 関数の2項線形和、(5) vonMises 関数の2項線形和+定数項の三者が、不一致が小さかった。また、選ばれた3者の中で尤度が最も大きかったのは、

(4) vonMises 関数の2項線形和であった。しかしながら、いずれの評価法を用いても、決定的な評価とはみなせない。(3)-(5)のモデル関数が妥当と考えられた。

クローン細胞群機能発達のモデル

一次視覚野全体の細胞について、これまでに幼若期の錐体細胞は水平方向の方位刺激に反応するものの割合が多いことが分かっていた。私たちのデータによっても、そのことは確認できた(図6)。

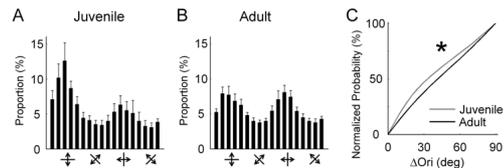


図6. 最適方位分布の幼若期と成体での比較
A, B. 幼若期と成体での最適方位分布の分布。開眼直後は水平方向に反応する細胞の割合が高い。C. ΔOri の比較。一次視覚野全体の最適方位は幼若期の方が偏っている。

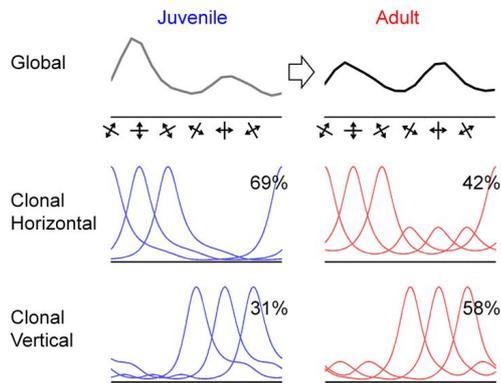


図7. クローン細胞群機能発達のモデル I

ここまでをまとめると、開眼後の発達過程で一次視覚野錐体細胞の最適方位は水平方向優位から、垂直方向へも応答するようになる(図7 “Global”)。クローン細胞群レベルで見ても、幼若期ではクローン細胞の間で水平方向に最適方向が偏っているが、発達にともなって、最適方向が垂直な細胞が優勢であるクローン群が増える(図7 “Clone”)。また、幼若期のクローン群は円柱状に最適方位が似た細胞が並ぶ(図10C)。

垂直方向に反応するクローン群が発達に伴って増えてくると、開眼直後に見られる円柱状の機能集団の関係を説明するモデルが必要となった。特に、成体でなぜ円柱領域の類似度が幼若期に比べて下がっているのか調べる必要がある。そこで、XY平面で見た最近接距離(NNd)を、クローン細胞のうち第1峰に含まれるものと第2峰に含まれるもので分けて調べた。結果、XY平面での最近接位置にある細胞種類($F+1^{st}$ 、 $F+2^{nd}$)に偏りがあるとは言えないことが分かった。つまり、 $F+$ 細胞のうち第1峰と第2峰に含まれるもので、塊(クラスター)になって位置しているわけではない。むしろ、単に $F+1^{st}$ と $F+2^{nd}$ の密度によって、NNdが決まるだけ

だった。したがって、F+ density の高いデータが、F+2nd を数多く持つと similarity が大きく下がる。このことから、Adult で 30 μ m 以内の XY 距離で、方位選択性の類似度を下げたのは、2 峰性の F+ が現れることが原因だった (図 8)。

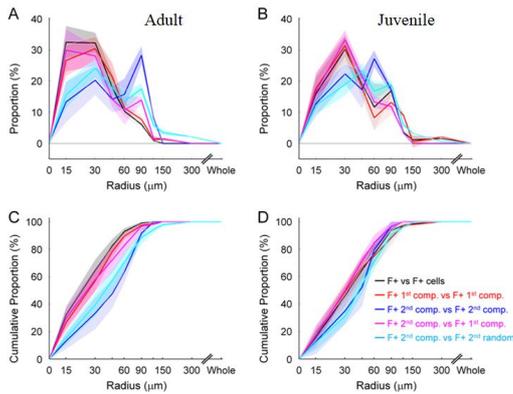


図8. 方位選択的F+細胞位置の比較
A,B. 成体(A)と幼若期(B)の最近接距離の割合。
C,D. 成体(C)と幼若期(D)の最近接距離の累積確率。

このように、発達が進むと2峰性が現れること、言い換えると、一番目のピークから外れた最適方位を持つF+細胞が、視覚感覚入力を受けて、発達過程で出現する理由は、如何なるものか? これの解析結果から、発達に伴う変化機序として、次の3つを考えている。

- 1) 方位が水平から垂直へ変わる。
- 2) 新しく垂直に反応する細胞が現れる。
- 3) 閾値が下がり、すべての細胞の方位選択性が強まる。(図9A)

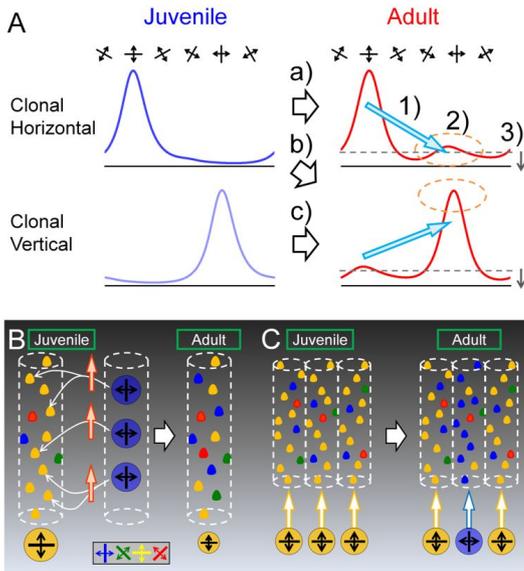


図9. クローン細胞群機能発達のモデル II
A. 幼若期から成体へと発達にともなう、クローン細胞群内での方位変化a)-c)と機序1)-3)。
B,C. 機能発達モデル。説明は本文参照。

また、円柱領域の類似度が発達にともなって、減少することに関して、開眼直後は水平方向に最適方位が偏っていたクローン群に、他の垂直に反応しやすいクローン群からの投射が行われる(図9B) または、視床から垂直に反応する投射が新たに行われる(図9

B) ことが考えられた。クローン細胞同士のシナプス結合を開眼直後でも、確かに、30 μ m 以内の領域でシナプス結合を持つF+ペアの割合が高かった(図10)。しかしながら、視床からの投射レベルでの方位選択性の同定は今回の研究では出来なかった。

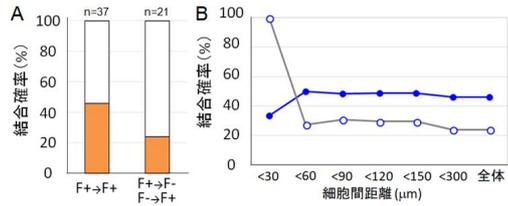


図10. クローン細胞間のシナプス結合確率
A. 幼若期F+同士、F+F-間のシナプス結合確率
B. 細胞間距離と結合確率の関係

クローン群の中にも最初期にわかれたクローン群は発達が進むと機能が離れるか、視床からの投射が進むとクローン内でも機能が異なる集団が現れるか、のいずれかと考察される。次の研究として、MADAM でクローン細胞群内で分裂時期による蛍光タンパク標識分けて機能を調べることや、クローン細胞群内での転写物質解析することが必要であると考えられた。

以上のように、蛍光タンパク標識されたクローン細胞群について、生体下での二光子顕微鏡観察で得た機能データを解析したところ、幼若期と成体のクローン細胞群で方位選択性に違いがあり、幼若期から成熟期にかけて機能の類似性が下がることがわかった。さらに3次元的位置解析を進めたところ、クローン細胞群の中でも、幼若期に大脳皮質内で30 μ m 半径の円柱領域で縦方向に並んだクローン細胞の機能が特に似ていることが明らかになった。発達に従って、その様な縦状に並ぶ機能的類似性は緩く解消されることがわかった。縦方向の機能領域の検討ののち、横方向に並んだクローン細胞群、環状領域にあるクローン細胞群の方位選択性の類似度も検討したところ、縦方向に比べて類似度の違いは見られなかった。今後も、何故、縦方向に位置する幼若期のクローン細胞同士の機能類似性が特に高く、成体では類似性が下がるのかを追求し、シナプス結合と投射様式を調べる。また、論文投稿の準備を行っている。しかしながら、現在、任期付き研究員の職に就いており(京都大学白眉プロジェクト特定准教授) 次の職を得るためには自身が責任著者の論文を執筆せざるを得ない。よって、本科研費申請とは異なるが、研究遂行過程で偶然に見出した現象に関する研究(『小脳の炎症時に誘導される過興奮と動物精神行動の鬱様症状の回復に関する研究』)を遂行することを優先せざるを得なくなり、本研究費支給期間内にクローンプロジェクトに関する論文を国際誌に発表することは出来なかった。今後もなるべく早期に研究データをまとめ、国際誌に発表できるように努力する。

最後に、本科研費採択により研究遂行の援助賜ったおかげで、私は自身の独立研究者としての研究を踏み出すことができ、また、支えていただいた研究者の方々のおかげで、数々の学会発表ならびに論文執筆を果たすことができました。一日も早く研究成果を公にして、国民の皆様へ知識として還元するとともに、ここに深く謝辞を申し上げたいと思います。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. 著者: Ohtsuki G, Hansel C
発表論文名: **Synaptic Potential and Plasticity of an SK2 Channel Gate Regulate Spike Burst Activity in Cerebellar Purkinje Cells.**

掲載誌: iScience (査読有り)
巻(号)、ページ、発表年: 1 (1), 49-54, 2018
[doi: 10.1016/j.isci.2018.02.001](https://doi.org/10.1016/j.isci.2018.02.001)

2. 著者: Grasselli G, He Q, Wan V, Adelman JP, Ohtsuki G, Hansel C
発表論文名: **Activity-Dependent Plasticity of Spike Pauses in Cerebellar Purkinje Cells.**

掲載誌: Cell Reports (査読有り)
巻(号)、ページ、発表年: 14 (11), 2546-2553, 2016
[doi: 10.1016/j.celrep.2016.02.054](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.02.054)

3. 著者名: Shih EK, Sekerková G, Ohtsuki G, Aldinger KA, Chizhikov VV, Hansel C, Mugnaini E, Millen KJ.

発表論文名: **The Spontaneous Ataxic Mouse Mutant Tippy is Characterized by a Novel Purkinje Cell Morphogenesis and Degeneration Phenotype.**

掲載誌: Cerebellum (査読有り)
巻(号)、ページ、発表年: 14 (3), 292-307, 2015
[doi: 10.1007/s12311-014-0640-x](https://doi.org/10.1007/s12311-014-0640-x)

〔学会発表〕(計 7 件)

1. ミニシンポジウム - 京都大学 理学研究科セミナーハウス

Wiring and Plasticity in the Brain

日時: 2015 年 7 月 24 日

発表者: Gen Ohtsuki* (Kyoto University, The Hakubi Project) 形式: 口演

タイトル: Functional diversification in clonal cells after eye-opening in mouse visual cortex

2. 第 38 回日本神経科学大会[神戸国際会議場、神戸国際展示場]

日時: 2015 年 7 月 28 日~7 月 31 日

発表者: Gen Ohtsuki, Carlos Lois, Kenichi Ohki 形式: ポスター

タイトル: Functional Diversification in Clonal Cells after Eye-Opening in Mouse Visual Cortex.

3. 第 39 回日本神経科学大会[パシフィコ横浜]

日時: 2016 年 7 月 20 日~7 月 22 日

発表者: Gen Ohtsuki* 形式: ポスター

タイトル: Microglial activation induces the excitability plasticity in CNS neurons.

4. Society for Neuroscience, Annual meeting [SfN2016 San Diego, CA, US]

日時: 2016 年 11 月 12 日~11 月 16 日

発表者: Gen Ohtsuki*, Minsoo Kim

形式: ポスター

タイトル: Microglial activation induces the excitability plasticity in CNS neurons.

5. Cell Symposium 2017 - Big Questions in Neuroscience -[San Diego, CA, US]

日時: 2016 年 11 月 10 日~11 月 11 日

発表者: Gen Ohtsuki* 形式: ポスター

タイトル: Bacterial endotoxin induces the excitability plasticity in cerebellar Purkinje neurons through microglial activation.

6. 第 40 回日本神経科学大会[幕張メッセ]

日時: 2017 年 7 月 20 日(木)~7 月 23 日(日)

発表者: Gen Ohtsuki*, Minsoo Kim,

Masamichi Yamamoto 形式: ポスター

タイトル: Induction mechanism for the bacterial endotoxin-triggered excitability plasticity in cerebellar Purkinje neurons through microglia.

7. Cell Symposium 2017 - Neuro-Immune Axis -[Sitges, Spain]

日時: 2017 年 9 月 17 日~9 月 19 日

発表者: Gen Ohtsuki*, Minsoo Kim,

Masamichi Yamamoto 形式: ポスター

タイトル: Bacterial endotoxin-induced cerebellar inflammation increases excitability of Purkinje neurons via MG.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕(計 0 件)

〔その他〕 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

大槻 元 (OHTSUKI, Gen)

京都大学・白眉センター/大学院理学研究科・特定准教授

研究者番号: 60723278

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

大木 研一 (OHKI, Kenichi)

東京大学・大学院医学系研究科・教授