

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830027

研究課題名(和文) 大脳皮質ニューロンのサブタイプ依存的な軸索投射機構の解明

研究課題名(英文) Subtype-dependent circuit formation mechanisms of cortical neurons

研究代表者

岡 雄一郎 (OKA, Yuichiro)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30614432

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)：脳内の多様なニューロンがそのタイプに応じた軸索投射パターンを形成する機構の解明に向けて、まずは神経回路を可視化するため、投射パターンの異なる2つの大脳皮質ニューロン群の遺伝子発現を比較し、それぞれに特異的な遺伝子の候補を得た。これらの遺伝子のプロモータ領域を利用してマウス大脳皮質のニューロンにGFPを発現させ、回路の可視化ができるようになった。その結果、あるプロモータで標識されたニューロンは、同側半球内の別の領野に投射するだけでなく、対側の大脳皮質にも軸索を投射することが明らかになった。一方、ニューロンのタイプを決定する転写因子を発現させてタイプ変換実験による軸索投射パターンの変化も解析した。

研究成果の概要(英文)：Towards understanding the underlying mechanisms how a neuron projects its axon to appropriate targets based on its neuronal subtype, we compared gene expression profiles of two cortical neuronal populations with distinct axon projection patterns and obtained candidate genes specific for each. We are establishing the circuit visualization system expressing GFP under the control of the promoters of these candidates. With one of the promoters, we successfully visualized neurons that project their axon both to the target area in the ipsilateral hemisphere and to the one in the contralateral hemisphere through the corpus callosum. We also tried to convert the neuronal subtype by forced expression of a subtype-determining transcription factor, and analyzed the resulted changes in their axon projection patterns.

研究分野：神経科学

キーワード：神経回路網 神経回路形成 領野間回路 長連合線維 脳梁形成

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 大脳皮質ニューロンのサブタイプと神経回路網

脳内の複雑精緻な神経回路は、多様なニューロンが各々適切な相手と接続することで成り立っている。しかし、各ニューロンがその個性に応じてそれぞれに固有の神経回路を形成する機構は未解明な部分が多い。大脳皮質の興奮性ニューロンは、その軸索投射パターンのタイプによって6層構造内での分布する層が決まっている。第IV層のニューロンが感覚野で視床からの入力を受けるのに対し、第II/III層のニューロンが皮質内の神経回路を形成し、また、第Vおよび第VI層のニューロンが皮質下に出力する。一方、大脳皮質の平面的な広がり様々は機能分化した領野で区画されている。これらの領野の相対的な位置は発生段階を通じて大きく変化することはない。従って、同一領野の同一層の中には、同じような軸索投射パターンを持つニューロンのタイプが分布していることになるが、厳密には、軸索投射パターンの異なる複数のサブタイプが混在していることもよく知られている。例えば、マウスの一次体性感覚野(S1)のII/III層には、反対側のS1(cS1)に軸索を伸ばす交連ニューロンと、同側の別の領野(ここでは一次運動野(M1))に接続する連合ニューロンが混在している。発生の過程で両者がそれぞれの個性に応じて適切な軸索投射パターンを作り上げる機構に関しては、ほとんど明らかになっていない。2013年に、転写因子 *Lmo4* 遺伝子の欠損マウスにおいて、M1に存在するニューロンの大部分が、交連ニューロンにサブタイプ変換されることが報告された(Cederquist et al 2013 *J Neurosci*)。しかし、研究開始の時点では2つのサブタイプを区別できる分子マーカーが存在しなかったため、各々の回路を研究するためには、まず、サブタイプ特異的に発現するマーカー遺伝子を同定し、これらのプロモータを用いてレポータータンパク質を発現させることでサブタイプごとに神経回路を可視化する必要があった。

### (2) サブタイプ特異的プロモータの同定

大脳皮質ニューロンへの外来性遺伝子導入法としてよく用いられる子宮内電気穿孔法により単純にレポーター遺伝子を導入しても、同一領野の同一層内に混在する異なるニューロン群を選択的に標識するには不十分であり、各サブタイプに特異的なプロモータを利用する必要がある。本研究開始時点までに、マウスS1に存在する交連ニューロンと連合ニューロンの遺伝子発現プロファイルを用いてDNAマイクロアレイ法により比較し、連合ニューロンに高い発現を示した遺伝子に関して、M1からの逆行性トレーシングと *in situ* ハイブリダイゼーションを組み合わせた2重染色により、連合ニューロンに発現している遺伝子を5種類に絞り込んでいた。

また、別のアプローチとして、すでに層特異的であることが報告されている遺伝子の中に連合ニューロンに発現するものがあると考え、再びM1からの逆行性トレーシングと *in situ* ハイブリダイゼーションを組み合わせた2重染色により、連合ニューロンに発現している遺伝子を探索したところ、*plxnd1* 遺伝子が連合ニューロンに発現していることを明らかにしていた。これらの候補遺伝子のプロモータを用いてEGFPを発現させるコンストラクトを作成し、子宮内電気穿孔法で大脳皮質ニューロンに導入することで、連合ニューロンとその軸索を可視化する系の構築を進め、本研究開始時点までに、*plxnd1* プロモータを用いてS1の連合ニューロンとそのM1への投射を可視化できていたが、*plxnd1* は交連ニューロンにも発現しており、両サブタイプに共通なプロモータとして有用であることがわかっていった。一方で、交連ニューロンに特異的な遺伝子についてはまだ解析を行っていなかったが、マイクロアレイのデータを再解析することで候補遺伝子が得られると考えられた。

## 2. 研究の目的

(1) 連合ニューロンと交連ニューロンの各々に特異的な遺伝子を同定し、続いて、(2) この特異的プロモータの系を利用して各回路を可視化してその形成過程を明らかにする。さらには、(3) サブタイプ変換実験を行って、回路構造の変換を誘導できるか確認し、サブタイプ依存的な軸索投射機構を解析する。

## 3. 研究の方法

### (1) ニューロンサブタイプ特異的遺伝子の同定

連合ニューロンに関してはマイクロアレイ解析からすでに5種類の候補遺伝子が得られているので、交連ニューロン特異的な遺伝子を得るために、マイクロアレイデータの再解析を行い、cS1からのトレーシングと *in situ* ハイブリダイゼーションを組み合わせた2重染色による絞込みを行う。

### (2) 特異的プロモータを用いたサブタイプ神経回路可視化と回路形成過程の解析

連合ニューロン特異的な5遺伝子と(1)で得られた交連ニューロン特異的な候補遺伝子について、各遺伝子座を含むBACクローンを改変して、特異的プロモータの下流にEGFPあるいはCreの配列をつないだトランスジーン(プラスミド)を作製、子宮内電気穿孔法により大脳皮質ニューロンに導入し、ニューロン及びその軸索が蛍光標識できるか確認する。上記で得られたプロモータおよび *plxnd1* 遺伝子のプロモータにより、それぞれのニューロンを同様に標識し、経時的にサンプリングして軸索投射過程を詳細に解析する。

### (3) *Lmo4* 強制発現によるサブタイプ変換実験

(2) で得られたプロモータ下流に *Lmo4* 遺伝子を導入したコンストラクトを作製して大脳皮質に導入してサブタイプを変換させ、それによって起こる回路構造変化を解析する。

## 4. 研究成果

### (1) 交連ニューロン特異的遺伝子の同定

連合ニューロンと交連ニューロンの比較を行ったマイクロアレイのデータを、交連ニューロンに着目して再解析し、交連ニューロンで発現量のより高い候補遺伝子を 18 種類選抜した。これらについて、*in situ* ハイブリダイゼーションにより大脳皮質での発現を調べたところ、4 種類の遺伝子に関して明瞭なシグナルが得られた。これら 4 種類の遺伝子について、さらに、cS1 からの逆行性トレーシングと *in situ* ハイブリダイゼーションの 2 重染色を行ったが、現在までに 2 重陽性を示すものは得られなかった。

### (2) 特異的プロモータを用いたサブタイプ神経回路可視化と回路形成過程の解析

#### 連合ニューロン特異的プロモータ

5 種類の候補遺伝子のうち、第 V 層に特異的に発現している 3 種類について、BAC クローンの改変により各遺伝子座に EGFP を導入し、大腸菌内での DNA 組み換えによりプラスミドベクターを得た。これらを第 V 層ニューロンが産生される胎生 13 日目のマウス側脳室に注入し、子宮内電気穿孔法で大脳皮質ニューロンに導入した後、生後 3 日目に脳組織を摘出して蛍光を観察したが、EGFP 陽性のニューロンは得られなかった。

#### plxnd1 プロモータ

Plxnd1 プロモータの下流に DNA 組換え酵素 Cre の遺伝子を配置したベクターと組換え依存的に EGFP が発現するベクターを、第 II/III 層ニューロンが産生される胎生 15 日目に子宮内電気穿孔法を行って導入し、生後 21 日目に脳組織を摘出してビプラトーム切片を作製して観察すると、S1 のニューロンと M1 および cS1 に投射する軸索が標識される。しかし、この方法では 1 つのニューロンが両領域に投射しているのかどうかは判別できない。そこで、子宮内電気穿孔法に用いる plxnd1-Cre のベクターの濃度を下げて低密度標識を行い、さらに、切片の観察と再構築を行わなくても回路全体を観察できるように、SeeDB 法および SeeDB2 法により脳組織の透明化を行った。透明化したサンプルを 2 光子顕微鏡あるいは共焦点顕微鏡で観察したところ、1 つのニューロンが M1 と cS1 に投射していることが分かった。また、この時、胎生期には cS1 に伸びる交連性の軸索が伸長し、生後になって M1 に伸びる軸索が主軸索から分岐してくることが分かった。

現在、異なる発生段階で脳組織をサンプリングすることで、S1 から M1 に伸びる軸索の伸長過程を詳しく解析している。

### (3) *Lmo4* 強制発現によるサブタイプ変換実験

Plxnd1-Cre によって *Lmo4* 遺伝子の発現が誘導するため、pCALNL-*Lmo4*-HA ベクターを作製した。pCAG-Cre と共に HEK293T 細胞に導入して *Lmo4*-HA が発現することをウエスタンブロッティングで確認した後、plxnd1-Cre および pCALNL-GFP と共に子宮内電気穿孔法により第 II/III 層ニューロンに導入した。生後 15 日目に脳組織を摘出して軸索の投射パターンを観察したところ、*Lmo4* の有無にかかわらず同様の投射パターンを示した。この結果、plxnd1 プロモータ依存的な *Lmo4* の発現ではサブタイプ変換あるいはその結果として期待される軸索投射パターンの変化は起こらないことが明らかとなった。

## 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 1 件)

Yagi H, Oka Y, Komada M, Xie MJ, Noguchi K, Sato M.  
Filamin A interacting protein plays a role in proper positioning of callosal projection neurons in the cortex.  
*Neurosci Lett*. 2016 Jan 26; 612:18-24.  
doi: 10.1016/j.neulet.2015.11.049.  
(査読あり)

[学会発表](計 5 件)

岡雄一郎 他、マウス大脳皮質長連合ニューロンの軸索投射、第 37 回日本神経科学大会、平成 26 年 9 月 11 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)、ショートトーク及びポスター発表

岡雄一郎 他、マウス大脳皮質領野間の軸索投射の解析、第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会・第 92 回日本生理学会大会、平成 27 年 3 月 23 日、神戸国際展示場(兵庫県・神戸市)、ポスター発表

岡雄一郎 他、皮質ニューロン軸索側枝による領野間結合の発達、第 38 回日本神経科学大会、平成 27 年 7 月 30 日、神戸国際展示場(兵庫県・神戸市)、口頭発表

岡雄一郎 他、Development of axon collaterals as the inter-areal connections in the cerebral cortex、第 58 回日本神経化学学会大会、平成 27 年 9 月 12 日、大宮ソニックシティ(埼玉県さいたま市)、口頭発表

Oka Y. 他、A new method to amplify the reporter expression in the Cre/loxP system applicable to cortical development study, 21st Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience、平成28年5月11日、Antibes Juan les Pins (フランス)、口頭発表

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.anat2.med.osaka-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡 雄一郎 (OKA, Yuichiro)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30614432