

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K01976

研究課題名(和文) 大脳皮質の興奮性と抑制性の神経細胞がつくる機能的回路形成の分子基盤

研究課題名(英文) Molecular basis of functional neural circuits of excitatory and inhibitory neurons in the cerebral cortex

研究代表者

平山 晃斉 (HIRAYAMA, Teruyoshi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・准教授

研究者番号：40437398

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：大脳皮質の抑制性神経細胞特異的にCTCFを欠損させるマウス(CTCF-cKO)を作製し、解析をおこなった。CTCF-cKOマウスは、てんかん様の症状を呈し、生後1ヶ月以内に死亡することが分かった。生理学的解析により、刺激に反応する体性感覚野の領域に有意な広がり確認された。これらの結果から、抑制性神経細胞においてCTCFが欠損すると抑制性神経細胞が興奮性の神経活動を正常に抑えられないことが示唆された。抑制性神経細胞の大脳皮質における分布を調べた結果、コントロール群と比べて違いが認められた。c-Pcdh遺伝子群でも同様の解析をおこない、同様の結果を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大脳皮質の興奮性細胞と抑制性細胞は別々の場所で産生され、大脳皮質で統合されて機能的神経回路として働くことが知られているが、その分子基盤は不明である。また、抑制性の神経細胞は、大脳皮質では散在的に分布するが、その分子基盤も不明である。本研究結果は、これらの分子基盤としてc-Pcdh 遺伝子群とその発現制御分子であるCTCFが働いていることを示唆する。興奮性細胞と抑制性細胞のバランスは機能的な神経回路形成に重要であり、バランスが崩れると様々な神経疾患の原因となり得るため、本研究結果は、これらの分子メカニズムを解明するのに重要な知見を与える。

研究成果の概要(英文)：I generated and analyzed mice lacking CTCF (CTCF-cKO) specifically in inhibitory neurons in the cerebral cortex. CTCF-cKO mice exhibited epileptic-like symptoms and died within the first month after birth. Physiological analysis revealed a significant expansion of the response area of somatosensory cortex in response to stimuli. These results suggested that inhibitory neurons in CTCF-cKO were unable to adequately suppress excitatory activity. In addition, the distribution of inhibitory neurons in the cerebral cortex showed differences compared to the control mice. The same analysis was performed for the c-Pcdh gene group, and we found similar results.

研究分野：神経科学

キーワード：大脳皮質 神経回路 抑制性神経細胞

1. 研究開始当初の背景

脳には、莫大な数の神経細胞が個性をもちながら存在し、複雑な神経回路網を形成して統合的に活動している。これらの神経細胞が適切な回路網を形成して協調的に働くことが、神経回路が機能的であるためには重要であり、その破綻は様々な神経疾患の原因となる。しかし、その分子基盤は不明な点が多い。神経細胞は、主に興奮性と抑制性に分類することができる。大脳皮質では、興奮性神経細胞は脳室側で産生されて放射状に移動してカラム構造を形成する(図1)。一方、抑制性神経細胞は大脳基底核原基で産生されて大脳皮質を接線方向に移動して皮質内に散りばめられる。このように別々の場所で産生された異なる種類の神経細胞が、大脳皮質で統合されて機能的神経回路として働く発生様式は、神経回路形成の基本原理を解くうえで重要かつ有用な解析系となり得る。

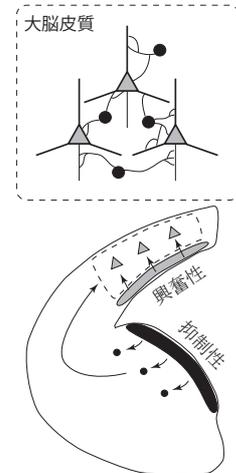


図1 大脳皮質の興奮性(△)と抑制性神経細胞(●)がつくる神経回路の模式図とその発生経路

研究代表者は、クラスター型プロトカドヘリン(*c-Pcdh*)遺伝子群、およびその制御を担う CCTCC(CTCF)結合因子に注目してこれまで研究をおこなってきた。*c-Pcdh* 遺伝子群は、*Pcdh* α 、 β 、 γ の3つのクラスターからなり、マウスでは計58種類のアリソフォームからなる(図2)。一つの神経細胞には数種類の *c-Pcdh* アリソフォームが Stochastic に発現しており、多量体を形成して Homophillic な接着活性を示す。また、*Pcdh* γ 欠損マウスの解析から、小脳プルキンエ細胞や網膜アマクリン細胞で、樹状突起が互いに反発することなく交差してしまう dendritic self-avoidance の異常が見つかり、神経細胞の自己と非自己の認識に関与する可能性が報告されている。

Stochastic and combinatorial gene expression in individual neurons

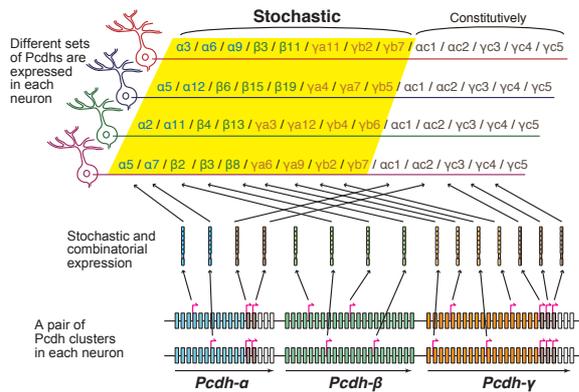


図2 *c-Pcdh* の遺伝子構造と個々の神経細胞における発現 Stochastic な発現を示すアリソフォームは、個々の神経で発現している種類が異なる。

研究代表者は、個々の神経細胞で発現する *c-Pcdh* の種類が異なることに着目し、その発現制御機構の解析から高次染色体構造形成に関わる CTCF 結合因子が *c-Pcdh* の発現のうち Stochastic な発現様式を示すアリソフォームにのみ必須であることを世界に先駆けて明らかとした(図2)。また、興奮性神経細胞特異的に CTCF を欠損させたマウスの解析から、体性感覚野のバレル構造が全く形成されないこと、樹状突起やシナプスの発達に異常が認められることを見出した。さらに、予備的知見として興奮性神経細胞の *c-Pcdh* がバレル形成に働くこと、抑制性神経細胞の分布、シナプス形成、バレルの神経活動に CTCF と *c-Pcdh* が共に関わることが分かってきた。これらの結果は、*c-Pcdh* の多様性が大脳皮質の興奮性と抑制性とがつくる機能的神経回路の形成に働いている可能性を強く示唆する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、これまでの研究成果に基づき *c-Pcdh* 遺伝子群および *Ctcf* の遺伝子発現を操作することで、大脳皮質の興奮性と抑制性の神経細胞が形成する神経回路がどのように変化するかを解析をおこない、*c-Pcdh* の Homophillic な細胞接着と CTCF による Stochastic な遺伝子発現制御が機能的神経回路形成の分子基盤として働いていることを示すことにある。

3. 研究の方法

これまでの解析結果に基づき CTCF-cKO および Pcdh γ -cKO マウスを中心に解析をおこなう。解析には、遺伝子操作技術、行動学的、免疫組織化学的、生理学的手法等を駆使して解析をおこなった。

4. 研究成果

大脳皮質の抑制性神経細胞における CTCF の役割を解析するため、大脳基底核原基の幹細胞から産生される抑制性神経細胞特異的に発現する遺伝子の下流で Cre を発現するマウスと交配することで、抑制性神経細胞特異的に CTCF を欠損したマウスを作製した (CTCF-cKO)。CTCF-cKO マウスは予測されるメンデル比通りに生まれてくるが、その後てんかん様の症状を呈し、生後1ヶ月以内に死亡することが分かった。ペンチレンテトラゾール (PTZ) 投与により、てんかんを誘発することができるが、PTZ 投与量に対する反応をみると CTCF-cKO の方がコントロールマウスと比較して少量でてんかん様の症状を呈することが分かった。

次に、フラビンイメージング法を用いて、ヒゲからの興奮性の刺激の伝わり方を大脳皮質体性感覚野で測定した。マウス左側のヒゲ C2, C3 を piezo 素子に固定し、30 Hz の振動を3秒間与え、右側の体性感覚野から記録を取得した。その結果、最大の amplitude になるまでの時間が増加するとともに、刺激に反応する体性感覚野の面積に有意な広がり確認された。これらの結果から、抑制性神経細胞において CTCF が欠損すると抑制性神経細胞が興奮性の神経活動を正常に抑えられないことが示唆された。

抑制性神経細胞は大脳基底核原基で産生されて大脳皮質を接線方向に移動して皮質内に入り分散して配置されるが、CTCF-cKO では大脳皮質における抑制性神経細胞の分布に異常が認められないかを免疫組織科学的手法により調べた。抑制性細胞のマーカーである GABA に対する染色の結果、大脳皮質における分布にコントロール群と比べて違いを認めた。さらに、GABA 陽性の抑制性細胞のうち、パルブアルブミン、ソマトスタチン、カルレチニン陽性細胞の分布を解析し、どの細胞群に分布の異常を認めるかの結果を得た。以上の解析より、CTCF による発現制御機構が大脳皮質抑制性神経細胞の分布に影響を与え、興奮性神経細胞の異常な活動の結果、てんかん様の症状を示すことが示された。

中枢神経系で CTCF の発現制御を受ける遺伝子として c-Pcdh 遺伝子群が知られている。c-Pcdh 遺伝子群の抑制性の神経細胞での役割を明らかにするため、Pcdh α 、Pcdh β 、Pcdh γ の3つある遺伝子クラスターのうち、Pcdh γ を CTCF-cKO と同様に抑制性神経細胞特異的に欠損させたマウス (Pcdh γ -cKO) を作製し、解析をおこなった。Pcdh γ -cKO マウスでも CTCF-cKO ほどでは無いが、てんかん様の症状を示し、生後1ヶ月以内に死亡することが分かった。フラビンイメージング法で CTCF-cKO と同様の解析をおこなった結果、最大の amplitude になるまでの時間が増加するとともに、刺激に反応する体性感覚野の面積に有意な広がり確認された。CTCF-cKO 同様に抑制性神経細胞において Pcdh γ が欠損すると抑制性神経細胞が興奮性の神経活動を正常に抑えられないことが示唆された。

次に、GABA 陽性の抑制性細胞の分布を大脳皮質の体性感覚野で調べた結果、コントロール群と比べて違いを認めた。さらに、GABA 陽性の抑制性細胞のうち、パルブアルブミン、ソマトスタチン、カルレチニン陽性細胞の分布を解析し、どの細胞群に分布の異常を認めるかの解析をおこなった。また、Pcdh γ が欠失した細胞を蛍光タンパク質で可視化できるマウスを作製して、細胞数の解析をおこなったところ、生後1週間ほどで抑制性の神経細胞数が減少していることがわかった。

Pcdh γ 欠損によりどのような遺伝子の発現が変化しているのかを次世代シーケンサーで解析した。Pcdh γ を欠損した細胞を蛍光タンパク質で可視化できるマウスを用いて、セルソーターにより蛍光タンパク質を発現している細胞のみを回収した。また、コントロールとして、蛍光タンパク質を発現しているが Pcdh γ を欠損していない抑制性神経細胞も同様にセルソーターで回収した。回収した神経細胞から RNA 抽出をおこない、次世代シーケンサーによる網羅的な解析をおこなった。その結果、cPcdh γ が欠損した抑制性神経細胞で発現が変動している遺伝子を同定することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Uyeda A, Onishi K, Hirayama T, Hattori S, Miyakawa T, Yagi T, Yamamoto N, Sugo N.	4. 巻 40
2. 論文標題 Suppression of DNA Double-Strand Break Formation by DNA Polymerase in Active DNA Demethylation Is Required for Development of Hippocampal Pyramidal Neurons	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Neurosci.	6. 最初と最後の頁 9012-9027
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.0319-20.2020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Alvarez-Saavedra M., Yan Keqin, De Repentigny Yves, Hashem Lukas E., Chaudary Nidhi, Sarwar Shihab, Yang Doo, Ioshikhes Ilya, Kothary Rashmi, Hirayama Teruyoshi, Yagi Takeshi, Picketts David J.	4. 巻 12
2. 論文標題 Snf2h Drives Chromatin Remodeling to Prime Upper Layer Cortical Neuron Development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 243
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnmol.2019.00243	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Asai H, Ohkawa N, Saitoh Y, Ghandour K, Murayama E, Nishizono H, Matsuo M, Hirayama T, Kaneko R, Muramatsu S, Yagi T, Inokuchi K	4. 巻 13
2. 論文標題 Pcdhb deficiency affects hippocampal CA1 ensemble activity and contextual fear discrimination	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-020-0547-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Shao Z, Noh H, Kim WB, Ni P, Nguyen C, Cote SE, Noyes E, Zhao J, Parsons T, Park JM, Zheng K, Park JJ, Coyle JT, Weinberger DR, Straub RE, Berman KF, Apud J, Ongur D, Cohen BM, McPhie DL, Rapoport JL, Perlis RH, Lanz TA, Xi S, Yin C, Huang W, Hirayama T, et al.	4. 巻 22
2. 論文標題 Dysregulated protocadherin-pathway activity as an intrinsic defect in iPSC-derived cortical interneurons from patients with schizophrenia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Neurosci.	6. 最初と最後の頁 229-242
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41593-018-0313-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Onishi K, Uyeda A, Shida M, Hirayama T, Yagi T, Yamamoto N, Sugo N.	4. 巻 37
2. 論文標題 Genome Stability by DNA polymerase in Neural Progenitors Contributes to Neuronal Differentiation in Cortical Development	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Neurosci.	6. 最初と最後の頁 8444-8458
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.0665-17.2017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Jiang Y, Loh YE, Rajarajan P, Hirayama T, Liao W, Kassim BS, Javidfar B, Hartley BJ, Kleofas L, Park RB, Labonte B, Ho SM, Chandrasekaran S, Do C, Ramirez BR, Peter CJ, C W JT, Safaie BM, Morishita H, Roussos P, Nestler EJ, Schaefer A, Tycko B, Brennand KJ, Yagi T, Shen L, Akbarian S.	4. 巻 49
2. 論文標題 The methyltransferase SETDB1 regulates a large neuron-specific topological chromatin domain	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nat Genet.	6. 最初と最後の頁 239-1250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/ng.3906	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Hirotaka Asai, Noriaki Ohkawa, Yoshito Saitoh, Khaled Gandour1, Hirofumi Nishizono, Mina Matsuo, Teruyoshi Hirayama, Shin-ich Muramatsu, Takeshi Yagi, and Kaoru Inokuchi
2. 発表標題 Deletion of cPcdhs affects cell ensemble activities in the hippocampus
3. 学会等名 NEURO2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本間 貴裕、平山 晃斉、三宝 誠、平林 真澄、八木 健
2. 発表標題 嗅神経回路形成におけるクラスター型プロトカドヘリンの機能解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 李奈、平山 晃斉、足澤 悦子、河村 菜々実、熊谷 牧子、有賀 理瑛、吉武 講平、吉村 由美子、澁木 克栄、八木 健
2. 発表標題 クラスター型プロトカドヘリン は抑制性神経細胞の生存に關与する
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に關連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
カナダ	Ottawa Hospital Research Institute		
米国	McLean Hospital/Harvard Medical School		