

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20300110

研究課題名（和文）神経活動依存的な視床皮質投射の形成機構

研究課題名（英文）The Mechanism Underlying the Formation of Activity-Dependent Thalamocortical Projection

研究代表者

山本 亘彦 (YAMAMOTO NOBUHIKO)

大阪大学・大学院生命機能研究科・教授

研究者番号：00191429

研究成果の概要（和文）：

神経回路の形成過程で、電気的活動が重要な役割を果たすことは古くから示唆されているが、そのメカニズムについては不明な点が多い。本研究では視床皮質投射の枝分かれ形成に着目し、その神経活動依存的な修飾機構を解明することを目指した。その結果、成長する軸索側と標的である皮質細胞の両方の活動が活発なときに枝分かれ形成が促進されることが明らかになり、さらに、それを担う分子機構の存在も示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Neural activity is well known to play an important role in neural circuit formation. However, the mechanism is largely unknown. We studied the role of neural activity in axonal branch formation, focusing on the thalamocortical projection in the mammalian brain. The result shows that both activities of growing thalamic axons (presynaptic) and their target cortical neurons (postsynaptic) promote axon branching. Evidence also suggests the underlying molecular mechanisms.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2009年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2010年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：軸索分岐、軸索誘導、神経活動、層特異性、視床、大脳

1. 研究開始当初の背景

過去10数年に及ぶ軸索誘導機構の研究により、軸索伸長に対して誘引・反発活性のある分子が次々に同定され、神経回路形成の原理的な理解は大いに深まった。しかしながら、これら誘引・反発の誘導機構だけで精緻な神経回路形成のメカニズムを説明することは困難である。実際、枝分かれ形成など標的細胞

との結合性を担う分子機構については不明な点が多い。さらに、感覚入力由来の神経活動や自発発火活動など神経細胞の電気的活動が回路形成に修飾的に働くことが古くから示唆されているが、現象論的な記載に留まっていると言っても過言ではない。この問題を明らかにするために、視床から大脳皮質への神経投射は適した系の一つである。発生期に感覚

性の視床核から発した軸索は大脳皮質の4層で主として枝分れを形成しシナプス結合を作るが、その結合性はそれらの電気的な活動状況に応じて変化するのである。

これまでに申請者らは、視床軸索の主たる標的である皮質第4層に発現する細胞外分子が視床軸索の伸長停止や分枝を引き起こすことを明らかにした(Yamamoto et al., 2000a, 2000b; Hanamura et al., 2004)。さらに、発生期大脳皮質における層特異的分子の網羅的な探索から、軸索動態に影響し得る候補分子として stem cell factor (SCF)、protocadherin-9 (pcdh9)、semaphorin-7a (sema7A)などが標的層に発現することを明らかにしている(Zhong et al., 2004; Maruyama et al., 2008; Matsui et al., 2007 年日本神経科学学会発表)。一方、これら層特異的な分子発現に加えて、視床線維や大脳皮質細胞の神経活動やその間のシナプス伝達が視床軸索の枝分かれ形成に必要であることが、視床—大脳皮質共培養系を用いた実験から明らかになってきた(Uesaka et al., 2007)。また、予備的な結果ではあるが、内向き整流特性を持つカリウムチャンネル KIR2.1 の過剰発現により、視床・大脳皮質両方の細胞の神経活動が、視床軸索の枝分かれ形成に必要であることを示唆する結果も得ている(Yamada et al., 2007 年日本神経科学学会発表)。これらの研究成果に基づいて、標的層に発現する軸索枝分かれ形成を制御する分子または視床軸索側に分布する受容体分子の発現レベルが、視床細胞と皮質細胞の活動によって調節される可能性が示唆されるに至っている(Uesaka et al., 2007)。

2. 研究の目的

以上を踏まえて、本研究では視床皮質投射をモデル系として、軸索の枝分かれ形成を含む神経回路形成における神経活動の果たす役割、神経活動依存的に発現調節される分子群による軸索分枝の制御機構、ならびにその分子発現の調節機構を明らかにすることを旨とする。第1に、視床皮質回路における神経活動のどのような側面が視床軸索の枝分かれ形成に必要なかを明らかにする。特に、Hebb 仮説で提唱されるシナプス前後の活動の相関性に着目し、視床軸索と皮質細胞の発

火頻度や同期性が視床軸索の枝分かれ形成に及ぼす役割を解析する。第2に、神経活動依存的に発現量を変化させる枝分かれ形成因子群(細胞外分子・分泌型分子)を同定するために、これまでの網羅的探索によって得た視床軸索の標的層に発現する遺伝子プールから細胞の電気的活動によって変動するものを探索し、それらの枝分かれ形成活性を明らかにする。同時に視床側の受容体分子についても同様な解析を行う。第3に、枝分かれ形成を担う分子が神経活動依存的に発現量を変化させるメカニズムを解明するために、神経活動依存的に転写活性が調節されることに着目し、CREB のコファクターである TORC1 やヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)などの活動依存的な枝分かれ形成に対する作用(Sugo et al., 投稿中)、ならびにそれらと候補分子との結合性を解析し、神経活動から軸索の形態変化が生ずるまでのシグナル伝達への布石を打つ。

3. 研究の方法

in vitro において KIR2.1 を用いて視床—大脳皮質の活動度のアンバランスを生じさせることによって、視床軸索の枝分かれ形成を解析する。そのために、視床皮質共培養において視

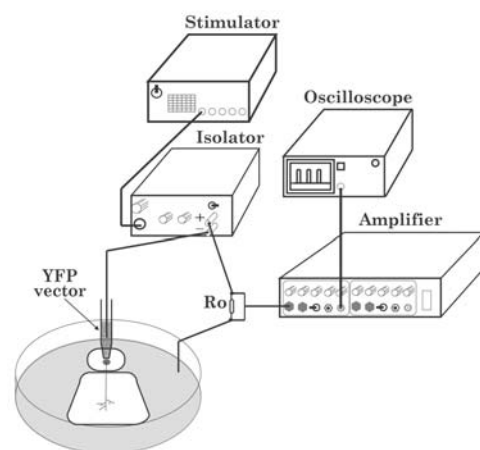


図1. 視床—皮質スライス培養で、視床軸索を標識するために蛍光タンパクのベクターを電気的に導入する。

床側あるいは大脳皮質側に電気穿孔法によって *kir2.1* を導入し(大脳皮質側は胎生期に

予め *in utero* 電気穿孔法によって導入)、培養2週後に EYFP で標識した視床軸索を観察する (図1)。自発発火は多電極培養皿を用いて記録する。さらに視床・大脳の活動状態と軸索分枝の関係性を定量的に解析する。

視床軸索の枝分かれ形成は最終的には皮質細胞側の細胞表面・細胞外マトリックス分子や分泌型因子と視床軸索に発現するそれらの受容体分子によって制御されていると考えられ、これまでの網羅的な探索からその候補分子として stem cell factor (SCF)、

protocadherin-9 (pcdh9)、semaphorin-7a (sema7A) など約10種類の分子を挙げるに至っている。まず、これらの中で神経活動依存的にその発現が変化する分子を同定する。そのために、視床皮質切片を通常の培養液中と TTX を含む培養液中で約2週間培養し、皮質切片から RNA を抽出し、それら標的層特異的分子の発現量を定量 RT-PCR 法により比較する。視床切片からも RNA を抽出し、それらの受容体あるいは受容体候補 (例えば、SCF に対しては c-kit、sema7A に対してはインテグリン) も定量 RT-PCR 法により比較する。さらに、正常な視覚環境と暗黒下で飼育したマウスまたはラットから大脳皮質視覚野切片を取出し、それぞれから RNA 抽出を行い、上述した候補分子に対して、定量 RT-PCR 法を適応する。予備的な結果から、神経活動によって発現量を変動させる分子が複数見出されつつあるので、それらを全て選出し、次にそれらの枝分かれ活性の有無を調べる。

4. 研究成果

視床軸索の枝分かれが形成される際、軸索側 (シナプス前) と標的細胞側 (シナプス後) における発火活動の相対的な役割を調べた。このために、内向き整流特性を持つカリウムチャネルの一つ Kir2.1 を視床細胞あるいは大脳皮質細胞に発現させることにより、どちらか一方の活動が抑制される状況を作り出し、その際の視床軸索の振る舞いを観察した。まず、視床細胞側の活動を Kir2.1 によって

抑制した場合、培養2週間が経過しても、視床軸索の枝分かれはコントロールに比べて顕著に減少した。次に、Kir2.1 を大脳側に導入して皮質細胞の活動を低下させた場合も、枝分かれ形成は著しく抑制された。以上の結果と、視床側と大脳側の両方の活動を薬理的に抑えた場合の結果とを考え合わせると、軸索の枝分かれ形成には、軸索側 (シナプス前) と標的細胞側 (シナプス後) の両方の神経活動が必要であることが強く示唆されたのである。これにより、軸索枝分かれという形態変化も同期的な神経活動に依存して強化されることが明らかになった (図2)。

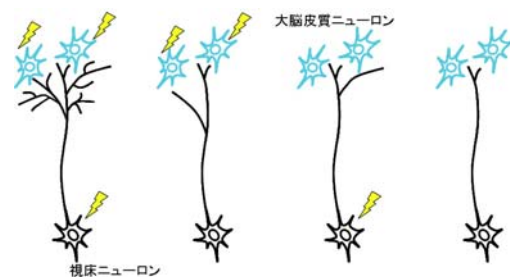


図2. 発達期の視床皮質投射において、軸索側 (シナプス前) と標的細胞側 (シナプス後) の両方の発火活動が活発なときに、軸索の分岐形成が促進される。

上述したように、視床軸索は皮質における層特異的な分子発現によって標的層で密な枝分かれを形成するが、視床細胞と標的細胞の神経活動度によってその程度は大きく変化する。このことは、層特異性といういわば先天的機構と思われていた特性も神経活動に依存することを示している。これには、幾つかの可能性が考えられるが、その一つに視床細胞および標的である皮質細胞における分子発現の神経活動依存性が挙げられる。皮質側では枝分かれ形成を促す分子が標的層に発現し、視床側ではその分子に対する受容体分子が発現し、これらが神経活動に依存することが想定される。この可能性を検討するために、標的層特異的かつ神経活動依存的にその発現量を変化させる遺伝子を探索した。その結果、上述した ephrin-A5 や SCF に加えて netrin-4 が一次感覚野の4層に特異的に発現し、しかもその発現が神経活動によって変化するを見出した。またスライス共培養法を用いて netrin-4 に軸索枝分

かれ形成を促進させる働きがあることも明らかになってきた。以上の結果から、神経活動が netrin-4 の遺伝子発現を介して視床軸索の層特異的な枝分かれ形成を制御することが示唆された。

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 8 件)

1. Zhao H, Maruyama T, Hattori Y, Sugo N, Takamatsu H, Kumanogoh A, Shirasaki R, Yamamoto N (2011) A molecular mechanism that regulates medially oriented axonal growth of upper layer neurons in the developing neocortex. **J Comp Neurol** 519: 834-848, 査読有
2. Yamada A, Uesaka N, Hayano Y, Tabata T, Kano M, Yamamoto N (2010) Role of pre- and postsynaptic activity in thalamocortical axon branching. **Proc Natl Acad Sci U S A** 107:7562-7567, 査読有
3. Sugo N, Oshiro H, Takemura M, Kobayashi T, Kohno Y, Uesaka N, Song WJ, Yamamoto N (2010) Nucleocytoplasmic translocation of HDAC9 regulates gene expression and dendritic growth in developing cortical neurons. **Eur J Neurosci** 31:1521-1532, 査読有
4. Yamauchi K, Mizushima S, Tamada A, Yamamoto N, Takashima S, Murakami F (2009) FGF8 signaling regulates growth of midbrain dopaminergic axons by inducing semaphorin 3F. **J Neurosci** 29:4044-4055, 査読有
5. Ohnami S, Endo M, Hirai S, Uesaka N, Hatanaka Y, Yamashita T, Yamamoto N (2008) Role of RhoA in activity-dependent cortical axon branching. **J Neurosci** 28:9117-9121, 査読有
6. Maruyama T, Matsuura M, Suzuki K, Yamamoto N (2008) Cooperative activity of multiple upper layer proteins for thalamocortical axon growth. **Dev Neurobiol** 68:317-331, 査読有
7. Uesaka N, Nishiwaki M, Yamamoto N (2008) Single cell electroporation method for axon

tracing in cultured slices. **Dev Growth Differ** 50:475-477, 査読無, 依頼執筆

8. Hayano Y, Yamamoto N (2008) Activity-dependent thalamocortical axon branching. **Neuroscientist** 14:359-368, 査読無, 依頼執筆

[学会発表] (計 25 件)

1. Yamamoto N. Activity-dependent thalamocortical axon branching. “**Development and Plasticity of Thalamocortical Systems**”, 2011.2.1-4. Arolla, Switzerland.
2. Yamamoto N. Activity-dependent thalamocortical axon branching. Japan-Australia-New Zealand “**Building a Functional Brain**” Symposium, 2011.1.29. Auckland, New Zealand
3. Hayano Y, Takemoto M, Maeda Y, Kitada K, Yamamoto N (2010) Netrin-4 promotes thalamocortical axon branching in a lamina-specific and activity-dependent fashion ‘**Axon Guidance, Synaptic Plasticity & Regeneration**’.9.21-25. in Cold Spring Harbor, New York
4. Sato H, Tatara E, Yamamoto Y, Fukutani Y, Takemoto M, Yamamoto N (2010) Thalamus-derived molecules promote survival and dendritic growth of developing cortical neurons Abstract in “**Axon Guidance, Synaptic Plasticity & Regeneration**’.9.21-25. in Cold Spring Harbor, New York
5. Yamamoto N. Molecular Mechanisms of Oriented Axon Growth of Cortical Projection Neurons. “**Construction and Reconstruction of the Brain**”, 2009.10.8-10. Awaji, Japan.
6. Nishiwaki M, Komatsu Y, Yamamoto N (2008) BDNF regulates activity-dependent axonal branching of cortical neurons. “**Axon Guidance, Synaptogenesis & Neural Plasticity**” 2008. 9. 10-14. Cold Spring Harbor, New York.
7. Sugo N, Kobayashi T, Yamamoto N (2008) Activity-dependent nucleocytoplasmic translocation of TORC1 regulates gene expression and dendritic growth in developing cortical neurons. “**Axon Guidance, Synaptogenesis & Neural Plasticity**”. 2008. 9. 10-14. Cold Spring Harbor, New York .

8. Yamamoto N, Hayashi A, Yamada A, Uesaka N, Hayano Y (2008) Pre-and post synaptic cell firing history regulates branch formation in thalamocortical. “**Axon Guidance, Synaptogenesis & Neural Plasticity**” 2008. 9. 10-14. Cold Spring Harbor, New York.
9. Zhao H, Maruyama T, Shirasaki R, Yamamoto N (2008) A molecular mechanism that regulates callosal axon growth. “**Axon Guidance, Synaptogenesis & Neural Plasticity**”. 2008. 9. 10-14. Cold Spring Harbor, New York .
10. Yamamoto N, Yamada A, Hayano Y, Uesaka N The role of pre-and post-synaptic cell activity in thalamocortical axon branching. “**Cortical Development**”, 2008. 5. 22, Chania, Greece.
11. Takemoto M, Hattori Y, Yamamoto N (2008) LAMINA-and area-specific expression of UNC5H4 and its role in cortical development. “**Cortical Development**”. 2008. 5. 22-25. Chania, Greece.

[図書] (計 1 件)

1. Uesaka N, Hayano Y, Yamada A, Yamamoto N (2009) Single cell electroporation method for mammalian CNS neurons in organotypic slice cultures. In: **Electroporation and Sonoporation in Developmental Biology** (Nakamura H, ed), pp 169-177: Springer.

[その他]

ホームページ URL:

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/neurobiol/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 亘彦 (YAMAMOTO NOBUHIKO)
大阪大学・大学院生命機能研究科・教授
研究者番号：00191429

(2) 研究分担者

菅生 紀之 (SUGO NORIYUKI)
大阪大学・大学院生命機能研究科・助教
研究者番号：20372625