

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：63905

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14325

研究課題名(和文)細胞系譜に依存した皮質内神経結合形成におけるNMDA受容体の役割

研究課題名(英文)Role of NMDA receptors in the establishment of cell-lineage specific cortical connections

研究代表者

吉村 由美子 (Yoshimura, Yumiko)

生理学研究所・基盤神経科学研究領域・教授

研究者番号：10291907

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)：大脳皮質において胎生期と同じ神経前駆細胞から発生したクローン神経細胞は、生後に選択的に神経結合する。そこで、iPS細胞技術を利用したキメラマウス標本により発生期と同じ神経幹細胞から生まれた細胞を標識し、興奮性神経結合の細胞系譜依存性を解析した。大脳皮質バレル野4層において、クローン細胞ペアは、非クローン細胞ペアに比べて、高い割合で双方向性結合を形成していることを見出した。また、生後発達期に末梢からの感覚入力を遮断すると、細胞系譜特異的な双方向性神経結合の形成が阻害されていた。以上の結果は、クローン細胞群が生後にシナプス結合を形成する過程に、経験依存的なメカニズムが関与することを示唆する。

研究成果の概要(英文)：In the neocortex, the specificity of synaptic connections is fundamental for neural circuits to function properly. In this study, we show that cortical excitatory neurons that arise from the same neural stem cell and reside within layer 4 in mouse barrel cortex preferentially establish reciprocal synaptic connections during postnatal development. We observed a transient increase in synaptic connections between clonal but not nonclonal neuron pairs postnatally, followed by selective stabilization of the reciprocal connections between clonal neurons. The transient increase in synaptic connections and establishment of cell-lineage dependent reciprocal connections were impaired in clonal cells, when sensory inputs were deprived during postnatal development. Our findings suggest that the postnatal sensory inputs enables clonal neurons to establish cell-lineage-specific reciprocal connections.

研究分野：神経生理学

キーワード：大脳皮質 細胞系譜 経験依存的発達 局所神経回路 シナプス結合特異性

1. 研究開始当初の背景

大脳皮質のニューロンは特定の細胞と選択的に神経結合し、情報処理の基盤となる神経回路を形成する。これまでに Yu らはレトロウイルスを用いて細胞系譜を可視化し、胎生期に同じ神経前駆細胞から発生した姉妹細胞は、生後に選択的に神経結合を形成することを報告した。最近我々は、蛍光蛋白遺伝子を組み込んだ iPS 細胞をマウス胚に移植してキメラマウスを作製し、Yu らに比べて発生の早い段階で分化した神経幹細胞に由来する細胞群をラベルすることに成功している。早い時期の神経幹細胞からは結果的に多くのニューロンが生まれるため、特定の大脳皮質領野や層に存在する細胞群を対象に、同じ神経幹細胞由来のクローン細胞間の神経結合を解析することができる。我々は、上述のキメラマウスの大脳皮質バレル野から切片標本作成し、ホールセルパッチクランプ法を用いて、同じ神経幹細胞から発生したクローン細胞間とクローンでない細胞間の興奮性シナプス結合の解析を開始した。予備実験により、4 層バレル内のクローン細胞ペアは、非クローンペアと比べて、双方向性シナプス結合の割合が高いことを見出している。4 層バレル内のニューロンは末梢にある単一のヒゲからの感覚入力を共有するため、機能的には類似した性質を示すと考えられており、同じ機能を有する細胞間での細胞系譜の解析はこれまで報告がない。また、この双方向性結合は生後 3 週という比較的発達後期にみられたことから、細胞系譜に依存した神経結合形成に、感覚入力に伴う神経活動が関与している可能性が考えられるが、このような解析も全く報告がない。

2. 研究の目的

本計画では、大脳皮質の 4 層バレル内の興奮性シナプス結合細胞系譜依存性を調べ、胎生期に規定される新たな神経結合特性を見出すとともに、その結合形成に生後の神経活動依存性なシナプス可塑性が関与するかを明らかにすることを目的とする。具体的には、細胞系譜を可視化したキメラマウスの大脳皮質バレル野から作製した切片標本を用いて、4 層興奮性細胞間のシナプス結合を対象に、クローン細胞間と非クローン細胞間の神経結合を比較し、細胞系譜に依存した神経結合特性とその発達過程を明らかにする。生後の感覚入力を遮断されたクローン細胞間および NR1 受容体を欠損したクローン細胞間において同様の解析を行い、細胞系譜に依存した特異的な神経結合の形成に、神経活動に依存した可塑性メカニズムが関与するかを解明する。

3. 研究の方法

- (1) 同一の神経幹細胞から発生した細胞がラベルされるマウスを作成する。全身の体細胞に蛍光蛋白 GFP を発現する野生型 Green マウスの線維芽細胞を用いて iPS 細胞を作成する。この iPS 細胞を野生型マウス胚に移植してキメラマウスを作成する。
- (2) 上記マウスのバレル野の切片標本作製し、GFP 発現を指標に、同じ神経幹細胞から発生したクローン細胞ペア、非クローン細胞ペアから同時ホールセル記録を行い、結合様式を踏まえた細胞系譜依存性を調べる。
- (3) 様々な週齢のマウスを解析し、細胞系譜に依存した神経結合の生後発達過程を調べる。
- (4) 細胞系譜と感覚入力依存性なシナプス形成メカニズムを関連付けるために、感覚入力遮断の影響を調べる。上記で見出された細胞系譜に依存した神経結合特異性が、発達期にヒゲを除去して末梢からの感覚入力を遮断したキメラマウスにおいてもみられるかを解析する。
- (5) NMDA 受容体のサブユニットの一つである NR1 受容体ノックアウトした iPS 細胞からキメラマウスを作製し、シナプス結合を解析する。NR1 を欠損したクローン細胞ペアに細胞系譜特異的なシナプス結合が形成されるかについて調べる。
- (6) 以上により、細胞系譜に依存した新たな神経結合特性を見出し、その生後発達過程を明らかにするとともに、その神経結合形成に、生後の感覚入力に伴う神経活動ならびに NMDA 受容体が関与するかを明らかにする。

4. 研究成果

GFP 遺伝子を含む iPS 細胞を野生型マウス胚に移植したキメラマウスの大脳皮質バレル野より切片標本作製し、シナプス結合の細胞系譜依存性を解析した。まず、キメラマウスが細胞系譜の解析に利用できるかを検証するために、iPS 細胞由来のニューロンの分

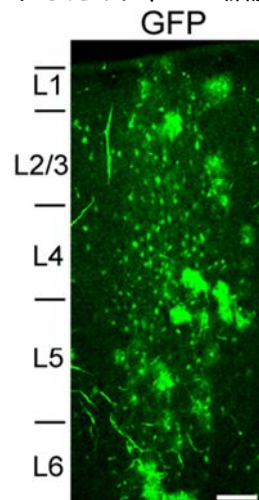


図 1、生後 21 日齢のキメラマウスのマウスバレル野における GFP 陽性細胞の分布。iPS 細胞由来の細胞がコラム状に分布している。左側は DAPI 染色から同定した層の境界を示す。

布と形態学的・電気生理学的特性を調べた。コラム状に分布した GFP 陽性細胞数をカウントしたところ、コラム空間にある細胞の内、約 10%が GFP 陽性細胞であった（図 1）。この結果は、胎生 10 日目の単一神経幹細胞から発生したニューロンの割合と示した先行研究の結果と一致しており、我々の標本では、胎生 10 日齢の幹細胞に由来する細胞群が GFP により標識されていると考えられる。また、4 層の有棘星状細胞の樹状突起の長さ、分岐数、広がりを解析したところ、GFP 陽性細胞とコントロールの間に差異は認められなかった。また、ニューロンの静止膜電位、発火閾値、入力抵抗においても差がなかった。従って、iPS 細胞由来の神経細胞は正常に発達していると考えられる。

次に、4 層の単一パレル内にある複数のニューロンから同時ホールセル記録を行い、シナプス結合の有無を評価した。記録細胞は GFP 発現を指標に、細胞系譜が同じであるクローンペアおよび非クローンペアに分類した。シナプス結合の形成が始まる時期の生後 9-11 日齢では、クローン細胞ペア、非クローン細胞ペア共に約 40%のペアでシナプス結合が観察された。双方向性結合は稀であった（図 2、図 3）。生後 13-16 日齢では、クローン細胞ペアは一方方向性結合、双方向性結合共に著しく増加した。このような顕著な増加は非クローン細胞ペアではみられなかった。生後

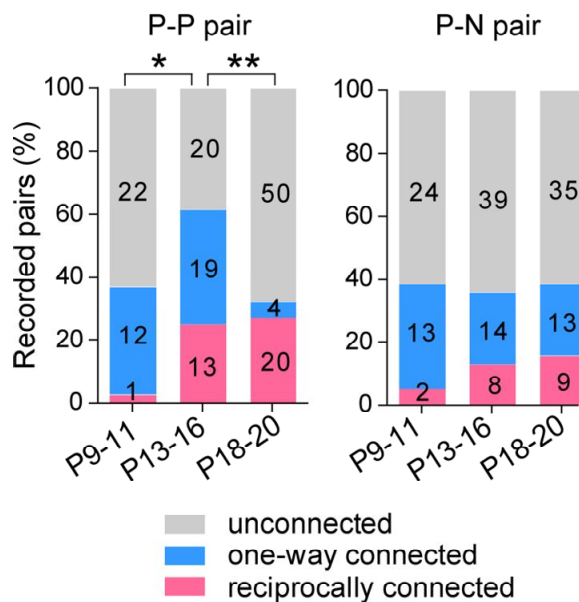


図 2、大脳皮質パレル野 4 層における、細胞系譜に依存した興奮性シナプス結合の発達。左が GFP 陽性細胞ペア (P-P pair、クローン細胞ペア)、右は GFP 陽性-陰性細胞ペア (P-N pair、非クローン細胞ペア)の結果。各年齢において、シナプス結合がなかったペア (灰色)、一方方向性にシナプス結合がみられたペア (青)、双方向性に結合していたペア (マゼンダ)の割合を示す。パーの中の数字は記録細胞ペア数。

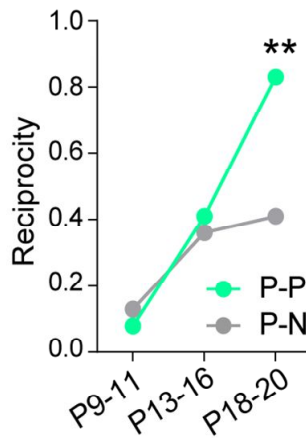


図 3、双方向性シナプス結合の年齢依存的発達。シナプス結合がみられたペアの内、双方向性に結合があった割合を示す。緑が GFP 陽性細胞ペア (クローン細胞ペア)、灰色は GFP 陽性-陰性細胞ペア (非クローン細胞ペア)の結果を示す。

18-20 日齢の標本を用いて同様の解析を行ったところ、クローン細胞ペアでは一方方向性にシナプス結合していたペアが選択的に低下し、その結果、シナプス結合しているクローン細胞ペアのほとんどすべてが双方向性に結合していた。一方、非クローン細胞ペアでは、一方方向性シナプス結合、双方向性シナプス結合共に、生後 13-16 日と生後 18-20 日のグループで有意な差は見られず、双方向性結合はほぼチャンスレベルの確率で観察された。これらの結果は、細胞系譜が同一のクローン細胞間には、生後発達期に一過性にシナプス結合が形成され、その後双方向性シナプス結合のみが残されることを示す。このような発達過程におけるシナプス結合特異性の変化は非クローン細胞ペアではみられず、パレル野 4 層の興奮性神経結合の特異性は細胞系譜に規定されることが示唆された。

細胞系譜に依存した神経結合形成は末梢からの感覚入力が強くなる時期と一致するので、感覚入力に細胞系譜依存性神経結合の形成に必要なかどうかを調べた。シナプス結合が増加する生後 13-14 日目の 2 日間、キメラマウスのヒゲをカットしてヒゲからの感覚入力を遮断した。このマウスから切片標本作製し、先述した方法でクローン細胞ペアのシナプス結合を調べた。その結果、クローン細胞ペア特異的に見られた、一過性のシナプス結合の増加が観察されなかった。また、引き続き感覚遮断を継続し、生後 18-20 日齢で解析すると、クローン細胞ペア特異的な双方向性神経結合の形成も阻害されていた。また、非クローン細胞間の神経結合は、感覚入力を遮断しても、入力を遮断しないコントロールとほぼ同様に観察された。これらの結果は、胎生期の細胞系譜に規定されたニューロン結合の形成には、生後発達期の感覚入力が必要であることを示唆する。従って、大脳皮質の局所神経結合の特異性には、遺伝的

ロプログラムと生後の経験依存的なメカニズムの両方の相互作用が重要であると考えられる。

さらに、細胞系譜依存的神経結合がどのような神経活動依存的メカニズムにより調節されるかを明らかにする目的で、グルタミン酸受容体のうち、神経活動依存的なシナプス可塑性に重要であることが知られている、NMDA受容体に着目した解析を開始した。現在、NR1 flox マウスより、NMDA 受容体のサブユニットの一つである NR1 を欠損した iPS 細胞の樹立に取り組んでいる。NR1 受容体を欠損したマウスは致死であることが報告されている。これまでに、様々な致死遺伝子を欠損した iPS 細胞を野生型マウス胚に移植すると、細胞系譜の標識に適した程度の割合で iPS 細胞由来の細胞が存在するキメラマウスは生存することを確認している。従って、NR1 受容体を欠損したニューロンを含むマウスにおいても、生後の神経回路解析が可能であると考えられる。引き続き、この解析を進めることで、遺伝的プログラムと経験依存的メカニズムの相互作用について、明らかにする予定である。

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)

1. Tarusawa E, Sanbo M, Okayama A, Miyashita T, Kitsukawa T, Hirayama T, Hirabayashi T, Hasegawa S, Kaneko R, Toyoda S, Kobayashi T, Kato-Itoh M, Nakauchi H, Hirabayashi M, Yagi T, Yoshimura Y. (2016) Establishment of high reciprocal connectivity between clonal cortical neurons is regulated by the Dnmt3b DNA methyltransferase and clustered protocadherins. BMC Biol. 2016 Dec 2;14(1):103. (査読有)
doi: 10.1186/s12915-016-0326-6

[学会発表](計 2 件)

1. Tarusawa E, Sanbo M, Okayama A, Miyashita T, Kitsukawa T, Hirayama T, Hirabayashi T, Hasegawa S, Hirabayashi M, Yagi T, Yoshimura Y. High reciprocal connectivity between clonal cortical neurons is established under the guidance of epigenetic regulation. Society of Neuroscience 2016. 2016.11.16 (San Diego, USA)
2. Yoshimura Y. Experience-dependent maturation of neural circuits and functions in the secondary visual cortex of rats. The 39th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society.

2016.7.21 (PACIFICO Yokohama, Yokohama, Kanagawa)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉村 由美子 (Yoshimura, Yumiko)

生理学研究所・基盤神経科学研究領域・教授

研究者番号：10291907