

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月4日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K06992

研究課題名(和文) 同期・非同期の自発神経活動による大脳皮質神経回路の形成とその障害

研究課題名(英文) Neural circuit formation of the cerebral cortex by spontaneous neuronal activity

研究代表者

田川 義晃 (Tagawa, Yoshiaki)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：50303813

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、哺乳期マウスの大脳神経回路形成の過程において、自発神経活動が脳梁投射形成に果たす役割を明らかにすることをめざした。時期特異的な神経活動操作と記録実験から、脳梁軸索投射の形成において、自発的神経活動が生後2週に必須であること、この時期の特に L event と呼ばれる自発神経活動パターンが重要であることを見出した。さらに、この L event という比較的同期性の低い神経活動パターンが脳梁投射細胞群のサブネットワーク同期活動なのではないかという仮説に基づき、脳梁投射細胞群が他の投射細胞とは違った機能的サブネットワークを形成している可能性を検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、大脳の代表的な長距離神経回路である脳梁神経回路の形成における神経活動の役割を明らかにすることを目的とした。脳梁神経回路は右脳と左脳をつなぎ、左右の脳の情報の統合という重要な情報処理に関わる神経回路であり、発達期にどのように形成されるのかを明らかにすることは高次脳機能に関わる疾患の研究につながる重要な研究課題である。本研究により、左右の脳は脳発達期の自発神経活動によってつながること、形成と再形成には臨界期があること(特定の時期に形成されることが必要であること)、発達時期特有の自発神経活動パターンが重要であることが明らかになった。本研究の結果は、今後の疾患研究に重要な情報を提供する。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to clarify the role(s) of spontaneous neuronal activity in callosal axon projections in mouse cerebral cortex during development. Using temporally controlled activity manipulation and recordings, we found that spontaneous cortical network activity during the second postnatal week plays key role in callosal axon projections. The network activity can be classified as highly synchronous and less synchronous events: callosal axon projections could be formed when the less-synchronous network activity was present. Further studies suggested that callosal projection neurons form functional subnetworks in the cortical circuits. These findings suggest that callosal projection neurons form functional subnetworks during development, and that the correlated activity of such subnetworks plays important role on their axonal projections.

研究分野：神経科学

キーワード：神経回路形成 大脳 神経活動 脳梁 神経活動操作

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳の神経回路は、入力がなくとも自発的に活動する。回路形成初期の大脳皮質では、発達期特有の活発な自発的神経活動が観察され、皮質神経回路の形成に重要な役割を担う。私はこれまで、自発的神経活動がマウス大脳皮質の重要な回路構築過程に必須の役割を担うことを示してきた (J Neurosci, 2007; Eur J Neurosci, 2010; Nat. Neurosci, 2015; Cerebral Cortex, 2016)。さらに、ヒト疾患原因遺伝子である K⁺チャネル KCNK9、Kir2.1、KCNQ2 の変異が、神経細胞の膜電位や自発神経活動の調節異常を介して、活動依存的に皮質神経回路の構築を障害する可能性を報告した (Neural Plasticity, 2012; Cerebral Cortex, 2014)。脳発達期の神経活動の異常は、回路形成異常を介して発達障害などの脳疾患の一因になると想定される。脳発達期の自発的神経活動の役割とその異常に伴う疾患を明らかにすることは、極めて重要である。

これまでの研究で、生後 1 週のマウス大脳皮質では、多数の神経細胞が同期して活動するネットワーク神経活動 (同期的活動、cortical wave) が観察される一方、生後 2 週になると、非同期ネットワーク活動にパターンが遷移することが観察された。この発達に伴う皮質ネットワーク活動の遷移が、皮質回路構築にどのように貢献するかは明らかではない。前者の同期的活動は、細胞内 Ca²⁺シグナリングを介した同調した神経細胞成熟 (樹状突起形成や大まかな軸索投射形成) に関与し、後者の非同期神経活動は、皮質の精緻なシナプス形成と局所回路構築に関与するのではないかという仮説があるが、これまで実験で確かめられたことはなかった。

2. 研究の目的

本研究では、大脳皮質の活動依存的長距離軸索投射 (脳梁軸索投射) をモデルに、独自の哺乳期マウスの神経活動操作・記録技術を駆使して上記仮説の検証をめざした。具体的には、同期・非同期自発的神経活動を操作する実験を行い、脳梁軸索投射への影響を調べることで、同期・非同期自発神経活動が活動依存的な大脳長距離軸索投射形成に果たす役割を検証することをめざした。さらに、自発活動パターンに影響を与える疾患原因遺伝子変異の同定をめざした。

3. 研究の方法

(1) 神経活動の操作実験 (時期特異的な神経活動抑制・回復実験)

生後 1 週、2 週の特定期に神経活動を抑制し、同期、非同期自発神経活動を特異的に阻害する実験を行う。また、特定期のみ神経活動を回復させて、いつ、どのような活動パターンが回復すると軸索投射が回復するかを明らかにする。方法には時期特異的 Kir2.1 発現法、DREADD 法、optogenetics 法を用いる。脳梁軸索投射形成 (J Neurosci, 2007; Eur J Neurosci, 2010) に対するこれらの神経活動操作の影響を調べ、同期、非同期自発神経活動がそれぞれどの過程に必須の役割を担うのかを明らかにする。

(2) 自発神経活動パターンに影響を与える疾患原因遺伝子変異の同定

疾患原因の遺伝子変異体を皮質神経細胞に発現させて、同期・非同期自発神経活動パターンを変化させるものを同定する。この自発活動パターンの変化が脳梁軸索投射を障害する可能性を検証する。自発神経活動パターンの変化と軸索投射障害の関係を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 神経活動の操作実験 (時期特異的な神経活動抑制・回復実験)

時期特異的な神経活動操作の実験を行い、発達時期のいつ、どのようなパターンの自発神経活動パターンが脳梁軸索投射形成に関わるかを明らかにする研究を進めた。子宮内電気穿孔法を用いて神経活動を抑制する分子ツール Kir2.1 を皮質興奮性神経細胞に発現させ (Mizuno et al, JNS, 2007) Tet system によってその発現を時期特異的に制御することで (Hagihara et al, Nature Neurosci, 2015) 生後 2 週自発神経活動を時期特異的に制御した。生後 2 週の間、継続的に Kir2.1 を発現させて神経活動を抑制し続けると脳梁軸索投射は阻害されるが、生後 2 週のみ Kir2.1 の発現をオフにして神経活動を回復させると軸索投射の回復が見られた。また、生後 3 週以降に神経活動を回復させても軸索投射の回復が見られなかったことから、軸索投射の形成・回復には臨界期があることが明らかになった。生後 2 週神経活動の重要性は、別の神経活動操作技術である DREADD 法を用いた実験からも示唆された。生後 2 週に回復させた神経活動パターンを in vivo Ca²⁺ imaging によって記録する実験を行うと、この時期に特有の L event と呼ばれるネットワーク自発神経活動が回復していることが示され、このパターンの自発神経活動が脳梁軸索投射に深く関わることを示唆された。

L event とは、皮質神経細胞の 20-60% が参加する同期活動である。なぜ、この活動パターンが回復すれば、脳梁軸索投射の回復に十分なのであろうか。1つの可能性として、回復した L event は脳梁軸索投射細胞 (群) の同期活動なのではないかと考えられた。脳梁軸索投射細胞は大脳皮質神経回路において、一部を構成する神経細胞群である。その同期活動があれば、活動依存的な自身の軸索投射に十分なのではないかと考えられた。この可能性を検討するには、脳梁軸索投射細胞のみを選択的に標識して、記録される L event が標識された脳梁軸索投射細胞の同期活動であることを検証すればよい。しかし、脳梁軸索投射細胞をこの発達期に選択的に可視化することは困難が予想されたため、まず成獣マウスを用いて、脳梁軸索投射細胞を選択的に標識して機能的なサ

ブネットワークを作っているかを検証する実験を行った。

脳梁投射細胞を可視化するため、反対側大脳皮質に逆行性トレーサーを注入し、標識される脳梁投射細胞を同定した。視覚応答特性を調べる実験から、標識細胞（脳梁投射細胞）と非標識細胞（脳梁投射細胞以外の細胞）の間で性質に違いがあること、また脳スライスを用いた電気生理学解析から、標識細胞同士が有意に高い確率で特異的なシナプス結合をもつことが明らかになった。この結果は、複数の投射細胞が混在する大脳皮質 2/3 層において、脳梁投射細胞が特異的な機能的サブネットワークを形成して可能性を示唆する。今後、このような脳梁投射細胞群のサブネットワークが発達時期のいつから形成されているか、その同期活動が自身の軸索投射に必要な十分かを検証する研究を進める。

(2) 自発神経活動パターンに影響を与える疾患原因遺伝子変異の同定

生後初期の大脳皮質で発現し、自発神経活動パターンに影響を与える可能性のある分子（種々のイオンチャネルやその発現を直接制御する転写調節因子、疾患関連分子など）を候補として、その遺伝子操作により活動依存的な脳梁軸索投射の形成に異常が生じるものを同定する実験を進めた。Na⁺ channel, K⁺ channel の発現を制御し Pitt-Hopkins 症候群の原因遺伝子である TCF4 の発現阻害が脳梁軸索投射を障害する可能性を示唆する結果を得ており、今後さらに検証を進める。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

田川義晃 自発神経活動と視覚系神経回路のスクラップ&ビルド 生体の科学 70(1) 23-27, 2019 査読なし

〔学会発表〕(計 11 件)

Tagawa Y. Activity-dependent formation and restoration of callosal axon projections in developing neocortex. 9th FAOPS Congress, 2019.3.29, 神戸、ポスター発表

Tagawa Y. Activity-dependent callosal axon projections in the developing neocortex. 国立遺伝学研究所研究会「哺乳類脳の機能的神経回路の構築メカニズム」, 2018.12.21, 三島、講演

Tagawa Y. Activity-dependent callosal axon projections in the developing neocortex. 新学術領域「スクラップアンドビルドによる脳機能の動的制御」班会議, 2018.11.21, 箕面、口頭発表

Tagawa Y. Activity-dependent formation and restoration of callosal axon projections in developing neocortex. Cold Spring Harbor Asia symposium, 2018.9.26, 淡路、ポスター発表

Tagawa Y. 自発神経活動による大脳神経回路の形成機構 生理学研究所研究会「情動の神経回路機構とその破綻」, 2018.9.19, 岡崎、講演

Tagawa Y. マウス大脳のマクロな領域間投射と局所回路をつなぐ構築ロジック 鹿児島神経科学研究会, 2018.6.24, 指宿、講演

Tagawa Y. 神経活動による大脳神経回路の形成 鹿児島神経科学研究会 2017 年 9 月 9 日 鹿児島大学 招待講演

Tagawa Y. Activity-dependent formation and restoration of callosal axon projections in the developing mouse neocortex. 「スクラップ&ビルドによる脳機能の動的制御」班会議 2017 年 8 月 26 日 ネオオリエンタルリゾート八ヶ岳高原（山梨県北杜市） 口頭発表

Tagawa Y. Activity-dependent formation and restoration of callosal axon projections in the developing mouse neocortex. 第 40 回日本神経科学大会、千葉（幕張メッセ） 2017 年 7 月 21 日 招待講演

Tagawa Y. 大脳神経回路の形成・可塑性・再生 - 脳の神経回路の作られ方・作り方 - 鹿児島大学セミナー、鹿児島大学、2017 年 5 月 9 日

Tagawa Y. Activity-dependent circuit construction in neonatal mouse cerebral cortex.

“Circuit construction in the mammalian brain”、大阪、2016年8月9日 招待講演

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~physiol2/index.html>

<http://www.neurosci.biophys.kyoto-u.ac.jp/main.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：萩原 賢太

ローマ字氏名：Kenta Hagihara

研究協力者氏名：中川 直

ローマ字氏名：Nao Nakagawa

研究協力者氏名：手束 勇太

ローマ字氏名：Yuta Tezuka

研究協力者氏名：飯國 修司

ローマ字氏名：Shuji Iiguni

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。