

令和元年6月10日現在

機関番号：63905

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19467

研究課題名(和文) 大脳皮質の遠距離興奮性結合形成の細胞系譜依存性

研究課題名(英文) Lineage-dependent long-range excitatory connections in the cerebral cortex

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) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：大脳皮質の遠距離神経結合の特異性に、発生期の細胞系譜が関与する可能性を検討した。細胞系譜を標識するために、GFP遺伝子を導入したiPS細胞をマウス胚に移植し、キメラマウスを作製した。このマウスの大脳皮質において、離れた場所に位置する複数の発生カラムが蛍光標識されることを確認した。実験効率を上げる必要が生じたため、RFPと光感受性陽イオンチャネルChR2を発現するiPS細胞を樹立し、単一の発生カラム内にある神経細胞を局所光刺激法により活性化する実験に切り替えた。今後はこのiPS細胞を用いてキメラマウスを作製し、光刺激法とホールセル記録法を組み合わせ、細胞系譜と遠距離結合を対応付けて解析する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳類の大脳皮質が機能的に成熟するには、遺伝情報に基づいて初期的な神経回路が構築され、引き続き、生後の経験に依存した可塑的調整の2段階の機構が必要である。本研究は、胎生期に同じ神経幹細胞から発生した神経細胞が、生後に初期的神経回路を作りやすいかを明らかにする内容であり、脳の発達メカニズムを理解する上で重要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have investigated long-range synaptic connections in clonal or nonclonal neuron pairs residing in separated ontogenic columns with slice electrophysiology in mouse neocortex. To visualize clonal neurons, we generated chimeric mice using induced pluripotent stem (iPS) cells with the gene encoding green fluorescent protein (GFP). We found several ontogenic columns labeled with GFP in a postnatal neocortex of the chimeric mice. To improve efficacy of circuit analysis, we are generating chimeric mice using iPS cells with genes encoding RFP and channel rhodopsin 2. To examine cell-lineage-dependent long-range neural connections, we will conduct circuit analysis combined with photostimulation in slices prepared from the chimeric mice.

研究分野：神経科学

キーワード：大脳皮質 細胞系譜 神経結合特異性 遠距離神経結合 興奮性細胞

1. 研究開始当初の背景

哺乳類大脳皮質の機能的神経回路の成熟には、遺伝情報に基づいて初期的な神経回路が構築され、引き続き、生後の経験に依存した可塑的調整の2段階の機構が必要である。Yuらは、マウスにおいて胎生期に同じ神経幹細胞から発生したクローン細胞は、生後に選択的に神経結合を形成することを報告した(Yu et al., Nature 2009)。これまでに我々は蛍光蛋白遺伝子を組み込んだ人工多能性細胞(iPS細胞)をマウス胚に移植してキメラマウスを作製し、Yuらに比べて大脳発生早い段階で分化した神経幹細胞に由来する細胞群を標識することに成功した(Toyoda et al., Neuron 2014)。このキメラマウス大脳皮質の局所神経結合を解析したところ、4層内のごく近傍にあるクローン細胞同士は特異的に双方向性結合していることを見出した(Tarusawa et al., BMC biology 2016)。これらの細胞系譜に依存した神経結合は、初期の神経回路構築の重要な機構であると考えられる。我々が用いた細胞系譜可視化法では、大脳皮質内に複数の発生コラムがラベルされる。つまり、発生早い段階で生まれた神経幹細胞に由来する、離れたところにある神経細胞間の神経結合の解析が可能である。大脳皮質の組織化された機能発現には、それぞれの皮質領野で処理された情報が統合される必要がある。この統合には、個々の皮質領野をつなぐ遠距離神経結合が重要である。遠距離神経投射を大まかにガイドする分子機構はいくつか報告されているものの、投射先にあるすべての細胞と神経結合していないことから、さらに精緻な特異性を決める遺伝的機構があると推測される。しかしながら、その特異性についてはほとんど明らかにされていない。

2. 研究の目的

本計画では、大脳皮質の領野を連絡するような遠距離興奮性神経結合の特異性に、発生期の細胞系譜が関与する可能性を検討する。大脳皮質の比較的広い範囲で細胞系譜を可視化できるキメラマウスを用いて、同じ神経幹細胞から発生したニューロン間あるいは異なる神経幹細胞から発生したニューロン間の機能的神経結合を調べることで、胎生期に規定される新たな神経結合特異性を見出すことを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 生後の大脳皮質において、胎生期に同じ神経細胞から発生したニューロンを同定するために、緑色蛍光蛋白 GFP 遺伝子あるいは赤色蛍光蛋白 RFP を組み込んだ iPS 細胞を樹立する。この iPS 細胞をそれぞれ一個ずつマウス胚に移植してキメラマウスを作製する。
- (2) このキメラマウスを神経結合が形成大脳皮質よりスライス標本を作製する。スライス標本上にある複数の GFP 陽性ニューロンと RFP 陽性ニューロンから同時にホールセルパッチ記録を行う。同じ発生コラム内、別の発生コラム内に存在する GFP 陽性ニューロン同士、GFP 陽性ニューロンと RFP 陽性ニューロンペアの近距離・遠距離神経結合を解析し、細胞系譜に依存した遠距離神経結合が存在するかを調べる。細胞系譜に依存した長距離興奮性神経結合が存在した場合はその特性を近距離結合と比較する。
- (3) 上記が予定通り進まない場合は、赤色蛍光蛋白(RFP)と光感受性陽イオンチャンネル(ChR2)遺伝子をコードする iPS 細胞を樹立し、単一の発生コラムを形成するニューロン群を光刺激により活性化する実験を行う。光刺激する発生コラムと離れた場所にある発生コラム内の RFP 陽性ニューロンあるいは陰性ニューロンからホールセル記録を行い、光刺激により興奮性シナプス後電流 (EPSC) が誘発されるかを調べることで、発生カラ

ム間の神経結合特異性を明らかにする。EPSC の強度やタイムコースを調べ、細胞系譜に依存した遠距離興奮性神経結合を機能的に特徴づける。

4 . 研究成果

遺伝子工学的手法を用いて、緑色蛍光蛋白 GFP 遺伝子を組み込んだ iPS 細胞を樹立し、それをマウス胚に少数移植することで、キメラマウスを作製した。この標本を用いると、生後の大脳皮質において複数の発生カラムが蛍光蛋白により可視化されることを蛍光観察により確認した。さらに、同一の神経幹細胞由来の発生カラムと異なる神経幹細胞から発生したカラムを識別するために、赤色蛍光蛋白 RFP 遺伝子を導入した新たな iPS 細胞を樹立した。当初は、これら色違いの iPS 細胞を同時に移植することで、別個の神経幹細胞由来のクローン細胞群を色分けして標識し、その大脳皮質より作製した急性スライス標本上にある複数の細胞からの同時パッチクランプ法により興奮性神経結合を解析する計画であった。しかしながら、GFP と RFP によって標識された別々の発生カラムが電気生理学的に解析できる位置に存在する確率が低く、神経結合解析は困難であると考えられた。そこで、RFP と光感受性陽イオンチャネル ChR2 を発現する iPS 細胞を樹立し、それぞれの発生カラム内にある神経細胞を局所光刺激法により活性化することで神経結合を解析する実験に切り替えた。この方法を用いるとシナプス前細胞から記録する必要がなくなり、シナプス後細胞の候補となる単一細胞からのホールセル記録により解析が進められるので、実験効率が上がることが期待できる。現在、ChR2-RFP 遺伝子を導入した iPS 細胞の樹立がほぼ終わり、この iPS 細胞を用いたキメラマウスの作製を進めている。今後は、このマウスから作製した大脳皮質スライス標本を用いて、局所光刺激法とホールセルパッチクランプ法を組み合わせた解析を行い、遠距離興奮性結合形成における細胞系譜依存性について検討する予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Ishikawa AW, Komatsu Y, Yoshimura Y (2018) Experience-Dependent Development of Feature-Selective Synchronization in the Primary Visual Cortex. *J Neurosci*. 2018 Sep 5;38(36):7852-7869. (査読有り)
doi: 10.1523/JNEUROSCI.0027-18.2018.

Sugimura T, Yamamoto M, Yamada K, Komatsu Y, Yoshimura Y (2017) Visual experience regulates the development of long-term synaptic modifications induced by low-frequency stimulation in mouse visual cortex. *Neurosci Res*. 120:36-44. (査読有り)
doi: 10.1016/j.neures.2017.02.006.

〔学会発表〕(計 4 件)

Tarusawa E, Sanbo M, Hirabayashi M, Yagi T, Yoshimura Y (2018) Clustered protocadherins-regulated high reciprocal connectivity between clonal cortical neurons are selectively modified by short sensory deprivation in mouse barrel cortex. *Neuro2018*.

Yoshimura Y (2018) The roles of visual experience in the maturation of secondary visual cortex. The 95th Annual Meeting of the Physiological Society Meeting.

Yoshimura Y (2018) The roles of visual experience in the maturation of neural responses in the visual cortex. Cold Spring Harbor Asia “Latest Advances in Development & Function of Neuronal Circuits” .

Yoshimura Y (2017) The roles of visual experience in the maturation of neural circuits and functions in the visual cortex. McGill University-NIPS Symposium.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nips.ac.jp/vip/>