

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03322

研究課題名（和文）経験による大脳抑制性ニューロンの形態形成と機能分化メカニズムの解析

研究課題名（英文）Experience-dependent mechanisms for morphological and functional specification of cortical interneurons

研究代表者

杉山 清佳（Sugiyama, Sayaka）

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：10360570

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：子どもの脳には、経験に応じて回路が作られる「臨界期」がある。臨界期の異常は、発達障害など精神疾患を引き起こす一因になると考えられ、メカニズムの解明が求められている。本研究では、臨界期を活性化する大脳の抑制性ニューロンが、生後の経験により分化成熟することを示した。抑制性ニューロンの種類が偏ることによって、脳の機能に発達障害に似た凹凸（臨界期不全と認知能力向上）が検出された。さらに、経験によって抑制性ニューロンの種類に偏りをもたらす遺伝子の同定にも成功し、抑制性ニューロンの形態と機能が連携しながら、健全に偏ることなく発達することの重要性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、経験により活性化される新規遺伝子が、抑制性ニューロンの分化を最終的に決定し、大脳の回路機能を左右することを示した。これまでに、抑制性ニューロンの種類が生後に変化するという報告はなく、本結果は国内外に大きなインパクトを与えると予想される。一連の成果は、増加する発達障害や、社会不安に呼応して増大する精神疾患に対して、疾患の背景にある遺伝子や生活環境への理解を促し、症状を緩和するための治療法の開発につながると期待される。

研究成果の概要（英文）：The young brain experiences a unique window 'critical period' when neuronal circuitry is intensively remodeled based on individual experience. Since impairment of the critical periods is observed in developmental disorders and mental illnesses, it is priority issue to clarify the mechanisms. Here, we showed that unbalanced development in cortical interneuron subtypes induced the uneven development (with impairment of critical period and improvement of visual discrimination) as in autism spectrum disorders. We further identified experience-dependent molecular mechanisms to specify the interneuron subtypes and demonstrated that distinct dendritic morphology and function depending on subtypes tightly linked to sensory perception in behaving animals. Therefore, individual experience increased the heterogeneity of intracortical circuits to enable functional individuality.

研究分野：神経発達

キーワード：抑制性ニューロン 発達障害 臨界期 視覚弁別課題 細胞骨格因子 樹状突起

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

子どもの脳には、経験に応じて神経回路を集中的に形成する成長期（臨界期）があり、英語や音楽、スポーツなど早期教育を促す根拠となっている。一方で、臨界期の偏った経験は、例えば、片目に眼帯をすると視力が衰える（不同視弱視）など思わぬ疾患を引き起こす。同様に、臨界期における回路の形成異常を放置すると、自閉症や統合失調症などの精神疾患の一因となることが示唆されているが、疾患につながるメカニズムには不明な点が多い。

申請者は、大脳の特定の抑制性ニューロンと、そのニューロンの成熟を促す因子（Otx2）が、臨界期を誘導することを示してきた。因子の量を増減させると臨界期の始まりや終わりを人為的に操作することができる。一方で、大脳の抑制性ニューロンは形態・機能的な特徴から十種類以上のサブタイプに分類される。サブタイプの運命がどのように決定されるのかは未だ解明されておらず、サブタイプの運命決定および分化成熟の個体差が、脳の成長や疾患にどのような影響を与えるのかも分かっていない。

2. 研究の目的

抑制性ニューロンの多様なサブタイプは、それぞれ大脳の情報処理の分岐点として働くため、サブタイプの成熟のバランスは脳の成長に大きな影響を与える。それにも関わらず、近年、抑制性ニューロンのサブタイプのすべてが、神経上皮（幹）細胞において運命決定されることに疑問が呈されており、サブタイプの成り立ちには分からない点も多い。さらに、特定のサブタイプが、生後の神経活動に依存して細胞死を起こすなど、回路への組み込まれ方に個体差がうまれることが示唆されている。個体の神経活動の違いに応じて抑制性ニューロンサブタイプの運命決定や分化成熟が左右されるのであれば、様々な大脳の情報処理に影響を与えることが推測される。そこで本研究では、個体の経験によって大脳視覚野に運ばれ活性化される臨界期遺伝子（Otx2）の標的遺伝子に着目し、生後に抑制性ニューロンのサブタイプの運命が変化するか、さらに抑制性ニューロンの変化が、大脳皮質の回路形成と情報処理にどのような影響を与えるのかを解明する。

3. 研究の方法

(1) 生後抑制性ニューロンの形態形成メカニズムの解析

細胞種を特徴づける形態は、胎児期の運命決定に従うという考え方が一般的である。一方、大脳の抑制性ニューロンは、生後にサブタイプ毎に特徴的な形態を獲得するが、これまでに、サブタイプ特異的な形態形成因子は見つかっていない。そこで下記により、生後に抑制性ニューロンサブタイプの形態を決定づける、分子メカニズムを解析する。

Otx2-eIF4E/4G(翻訳制御因子)複合体を特定の抑制性ニューロンサブタイプ（PV細胞）の分化成熟を決定する仕組みの1つと捉え、複合体に結合する標的 mRNA を網羅的に同定する（RIP-seq 解析）。この際、Otx2 は翻訳制御因子の一部として作用すると同時に、転写因子としても標的遺伝子の発現を制御する。翻訳および転写における標的遺伝子の類似性と非類似性を解析する。

PV細胞に特徴的な多極性形態を形成する分子メカニズムを解析する。特に、Otx2-eIF4E/4G複合体の標的遺伝子として、細胞骨格因子群が推定されている。標的遺伝子の発現を増減させることでPV細胞をはじめとした抑制性ニューロンサブタイプの形態変化を観察する。

(2) 抑制性ニューロンの形態が機能に与える影響の解析

抑制性ニューロンの多様な形態と機能が、大脳の回路形成と情報処理にどのような影響を与えるのか解析する。

抑制性ニューロンサブタイプを特徴づける樹状突起の形態が、サブタイプの機能にどのような影響を与えるのか解析する。特に、多極性形態と双極性形態がもたらす細胞機能の違いを *in vitro* whole-cell バッチクランプ法により示す。

抑制性ニューロンサブタイプの機能変化が、大脳の回路機能および情報処理に与える影響を解析する。大脳視覚野から視覚刺激に対する細胞応答を記録し、臨界期が正常に活性化されるかを解析する。同時に、行動実験により視覚認知機能を観察する。

一連の解析から、抑制性ニューロンサブタイプの形態と機能の特徴が生後の経験により変化し得るのか、視覚の回路の柔軟性（臨界期の有無）と認知機能の特性（自閉症における感覚過敏や視覚優位・カメラアイに関連）が、サブタイプの変化によって影響を受けるのかを明らかにする。

4. 研究成果

(1) 生後抑制性ニューロンの形態形成メカニズム

Otx2-eIF4E/4G 複合体に結合する標的 mRNA を網羅的に探索すると、細胞骨格因子やシナプス分子、翻訳制御因子の活性に関わるシグナル分子などが有意に検出された(共同研究: 新潟大学、奥田修二郎教授、凌一葦助教)。さらに、活性型 eIF4E が PV 細胞に強く検出され、Otx2 欠損や暗所飼育マウスでは減少することが観察された。このことから Otx2 は、翻訳制御因子の活性化(リン酸化)に直接関与することが示唆された(Hou et al., 論文準備中, 学会発表 2020 年および 2021 年)。また、Otx2 のゲノム上での標的遺伝子には細胞骨格因子群は顕著に含まれないことから(Sakai et al., Front. Neurosci. 2017)、翻訳制御が抑制性ニューロンの形態形成において重要な位置をしめると推測された。

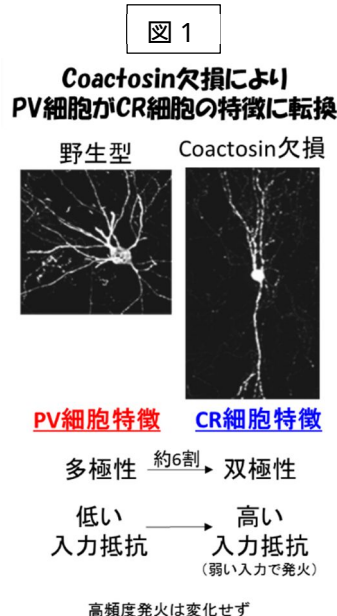
Otx2-eIF4E/4G 複合体の標的遺伝子として同定された細胞骨格因子群のなかでも、生後の経験により細胞特異的に翻訳誘導される分子として、アクチン結合因子 Coactosin に注目した。このアクチン結合因子については、免疫細胞や癌細胞における作用の報告はあったが、これまでに生後の脳における報告はない。我々はまず、Coactosin が神経細胞において神経突起先端でアクチンと結合し、アクチン重合を促して突起の伸長を誘導することを、超解像度顕微鏡を用いて明らかにした(Hou et al., Front. Cell. Dev. Biol. 2021)。次に、免疫組織化学染色法により大脳視覚野における Coactosin の発現を検出すると、Coactosin 蛋白質は、臨界期の開始とともに、視覚野の PV 細胞に強く局在することが観察された(抗体の特異性は欠損マウスにより確認済みである)。さらに、視覚経験を遮断した暗所飼育マウスや、Otx2 欠損マウスの視覚野では、PV 細胞における Coactosin 蛋白質の局在が有意に減少した。一方で、Coactosin mRNA は、視覚野の錐体細胞にも検出され、Otx2 欠損マウスにおいても減少しなかった。すなわち、Coactosin mRNA は、Otx2-eIF4E 複合体と結合することで、PV 細胞特異的に翻訳誘導されると考えられた。Otx2 は経験に依存して PV 細胞に運ばれるため、視覚経験がこのアクチン重合因子の翻訳に必要であった。

Coactosin は、新規の細胞骨格因子であり、経験依存的に PV 細胞に発現誘導される。そこで、Coactosin が、PV 細胞の形態形成因子として機能するのか解析を行った。抑制性ニューロンの細胞形態は、子宮内遺伝子導入法により GFP を発現させ、細胞形態をトレース解析することにより明らかにした。Coactosin 欠損マウスにおいて抑制性ニューロンの樹状突起形態を観察すると、PV 細胞の樹状突起の本数および分枝が有意に少なくなることが分った。さらに、樹状突起の分布を極座標ヒストグラムで表し、細胞間でクラスタリング解析を行うと、6 割以上の PV 細胞の形態特性(多極性の樹状突起)が、他の抑制性ニューロンサブタイプ(VIP/Calretinin(CR)細胞)の形態特性(双極性の樹状突起)に転換するのが観察された(図 1)。逆に、Coactosin を強制発現した VIP/CR 細胞の樹状突起は、本数と分枝を増やし、PV 細胞様の多極性形態へと変化した。この際、Coactosin は樹状突起の基部に局在してアクチン重合を促し、多極性形態を積極的に誘導することが示唆された。一連の結果から、Coactosin は生後の PV 細胞の分化方向を決定する形態形成因子であることが分った。視覚経験を遮断した暗所飼育マウスにおいて、Coactosin の量は著しく減少する。すなわち、PV 細胞が多極性形態を獲得して発達するためには、視覚経験が必要であると考えられた。この結果は、抑制性ニューロンの最終的な形態分化が神経活動によって決定されることを示唆する、初めての成果と考えられる(Hou et al., 投稿中)。

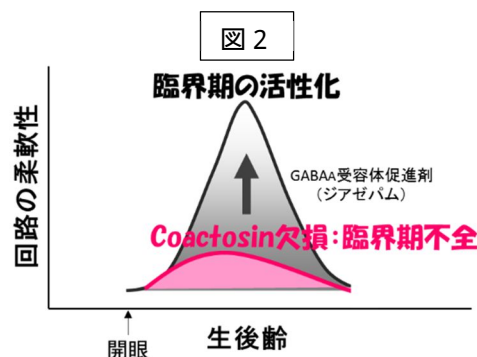
(2) 抑制性ニューロンの形態が機能に与える影響の解析

抑制性ニューロンの形態と機能の特性は、細胞種を判別する最終的な指標となる。一方で、形態と機能がどのように影響しあうのか不明な点も多い。今回、Coactosin を欠損した PV 細胞の半分以上が、多極性ではなく双極性の樹状突起を有した。生理学的特性を whole-cell パッチクランプ法により記録すると、双極性形態を示す PV 細胞では入力抵抗が有意に高く、より少ない興奮性入力で発火すると推測された(図 1, 共同研究: 自然科学機構、川口泰雄教授、森島美絵子助教)。この際、高頻度発火(FS)も観察されており、双極性 PV 細胞が PV 細胞の機能特性(FS)と、VIP/CR 双極性細胞の特性(高い入力抵抗)を併せもつと考えられた。

生後に生じた抑制性ニューロンの特性変化は、視覚の情報処理にどのような影響を与えるのであろうか。これまでに、暗所飼育マウスや Otx2 欠損マウスの視覚野では(いずれも Coactosin が減少する) 臨界期不全が観察されている。そこで、PV 細胞特異的な Coactosin 欠損マウス(Cotl1-flox/PV-cre)を用いて臨界期における Coactosin の作用を解析した。その結果、欠損マウス

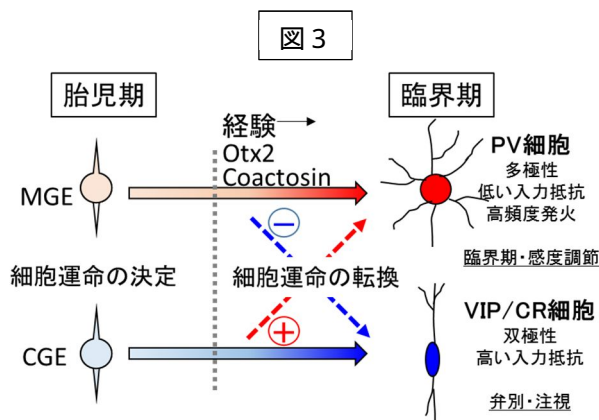


スでは片目を遮蔽しても視力が低下（弱視）せず、臨界期が観察されなかった（図2）。この際、抑制性ニューロンの機能を高める薬剤（GABA_A 受容体促進剤、ジアゼパム）を脳室投与すると、Coactosin 欠損マウスの臨界期が回復した。すなわち、PV 細胞の抑制性機能の減弱が、この欠損マウスの臨界期不全の主な原因であると考えられた。これらの結果から、Coactosin は Otx2 とともに臨界期に必要な「臨界期遺伝子」として機能すること、さらに、生後の経験による臨界期遺伝子の翻訳制御が、PV 細胞の機能発達と臨界期の活性化に必要であることが示唆された。



PV 細胞は、視床からの入力を受けて臨界期の皮質回路の形成を誘導する。一方、VIP/CR 細胞は臨界期には関与せず、むしろ抑制性ニューロンを局所的に抑制して空間解像度を向上させ、認知機能に関与することが報告されている（図3）。本研究の解析から、Coactosin 欠損マウスでは予想と一致して、弱視の臨界期が誘導されず（図2）さらに、空間解像度が有意に向上することが分かった。視覚の弁別課題を行うと、単純な弁別課題（go/no-go）においてはコントロールと欠損マウスの間に差はなかったが、難易度の高い弁別選択課題（two-choice test）においては欠損マウスに有意に正答率の向上が検出された。正答までにかかった時間と距離を比べると、コントロールマウスに比べて欠損マウスで有意に短く、判断に迷いが無いように見受けられた。すなわち、PV 細胞の樹状突起特性の変化によって、視覚の臨界期不全と認知機能の向上という発達障害に似た回路機能の凹凸が検出されたことから、経験による抑制性ニューロンサブタイプの最終分化の重要性が明らかになった（図3、Hou et al., 投稿中）。

我々は、経験依存的に翻訳発現誘導される新規の細胞骨格因子が、抑制性ニューロンの分化方向を最終的に決定し、視覚の情報処理（臨界期不全と認知向上）に作用することを明らかにした。近年、胎生期における抑制性ニューロンの運命決定に疑問が生じる一方、生後に運命が転換したという報告はない。この点で、Coactosin 欠如による PV 細胞の分化方向の転換は、国内外に大きなインパクトを与えると予想される。さらに、PV 細胞は、産生・形態・機能・分子の視点から双極性細胞（VIP/CR 細胞）とは対極の性質を持つと考えられている。それにも関わらず、我々の解析から生後に PV 細胞と VIP/CR 細胞の特性が交じり合い、分化方向の交錯が可能であることが分かった（図3）。



自閉症リスク因子には本研究で取り上げた翻訳制御因子や細胞骨格因子が多数含まれることを考慮すると、神経細胞の分化・発達を制御する新たな分子基盤として、経験依存的な翻訳の制御メカニズムに注目することが重要と考えられる。個体の経験の違いによって抑制性ニューロンの分化方向に変化が起きるのであれば、様々な大脳皮質の情報処理、例えば、自閉症で見られるような感覚過敏・鈍麻（PV 細胞に関連）、視覚優位や感覚統合不全（VIP/CR 細胞に関連）の一因になり得る。さらに、大脳皮質内の局所回路だけでなく、大脳皮質と辺縁系、あるいは視床や中脳との間に形成される回路にも影響が及ぶ可能性がある。そのため解析の準備として、脳深部（視床や中脳、辺縁系など）の単一細胞を可視化し、効率的に遺伝子導入ができる系を立ち上げ（Sugiyama et al., Front. Neural Circuits 2020）、大脳皮質と辺縁系（扁桃体）をつなぐ情動記憶回路の可視化も行った（Tsukano et al., Sci. Rep. 2019）。一連の成果は、増加する発達障害や、社会不安に呼応して増大する精神疾患に対して、疾患の背景にある遺伝子や環境への理解を促し、症状を緩和するための治療法の開発につながると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tsukano Hiroaki, Hou Xubin, Horie Masao, Kitaura Hiroki, Nishio Nana, Hishida Ryuichi, Takahashi Kuniyuki, Kakita Akiyoshi, Takebayashi Hirohide, Sugiyama Sayaka, Shibuki Katsuei	4. 巻 9
2. 論文標題 Reciprocal connectivity between secondary auditory cortical field and amygdala in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-56092-9	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 Sugiyama Sayaka, Sugi Junko, Iijima Tomoya, Hou Xubin	4. 巻 14
2. 論文標題 Single-Cell Visualization Deep in Brain Structures by Gene Transfer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Neural Circuits	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fncir.2020.586043	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 Hou Xubin, Nozumi Motohiro, Nakamura Harukazu, Igarashi Michihiro, Sugiyama Sayaka	4. 巻 9
2. 論文標題 Coactosin Promotes F-Actin Protrusion in Growth Cones Under Cofilin-Related Signaling Pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2021.660349	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 杉山清佳	4. 巻 873
2. 論文標題 子どもの臨界期と回路の個性化	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 新潟県医師会報	6. 最初と最後の頁 2-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 12件）

1. 発表者名 Hou X. Morishima M. Matohara N. Sugi J. Sakimura K. Kawaguchi Y. Sugiyama S.
2. 発表標題 Coactosin functions as a morphological determinant in developing cortical interneurons
3. 学会等名 Neuro2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sakai A. Nakato R. Peters H. Shirahige K. Sugiyama S.
2. 発表標題 Regulation of chromatin structure by cohesin during juvenile cortical development
3. 学会等名 Neuro2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koyama C. Iijima T. Hou X. Sugiyama S.
2. 発表標題 Effect of Otx2-expressing dopaminergic cells on development of fear memory
3. 学会等名 Neuro2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hou X. Morishima M. Matohara N. Sugi J. Sakimura K. Kawaguchi Y. Sugiyama S.
2. 発表標題 Cytoskeletal mechanisms underlying a morphological determinant in developing cortical interneurons
3. 学会等名 The 13th Biennial Conference of Chinese Neuroscience Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hou X. Ling Y. Sakai A. Okuda S. Sugiyama S.
2. 発表標題 Targetome profiling of Otx2-eIF4E dependent translation in cortical plasticity
3. 学会等名 The 43th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sakai A. Nakato R. Peters H. Shirahige K. Sugiyama S
2. 発表標題 Role of cohesin loader in experience-dependent development of interneuron in juvenile brain
3. 学会等名 The 43th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 酒井 晶子、中戸 隆一郎、Heiko Peters、白髭 克彦、杉山 清佳
2. 発表標題 幼若脳の経験依存的な抑制性介在ニューロン発達におけるコヒーシンローダーの役割
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 酒井 晶子、中戸 隆一郎、Heiko Peters、白髭 克彦、杉山 清佳
2. 発表標題 生後脳の経験依存的な抑制性ニューロン発達におけるコヒーシンローダーの役割
3. 学会等名 第38回染色体ワークショップ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hou X. Ling Y. Sakimura K. Okuda S. Sugiyama S.
2. 発表標題 Translation-dependent wiring of cortical local circuits in visual cortex
3. 学会等名 The 44th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sakai A. Nakato R. Oba GM. Peters H. Shirahige K. Sugiyama S.
2. 発表標題 Experience-dependent development of interneuron in juvenile brain requires cohesin-loader Nipbl
3. 学会等名 The 44th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hou X. Morishima M. Sugi J. Sakimura K. Kawaguchi Y. Sugiyama S.
2. 発表標題 Experience-dependent actin organization specifies dendritic properties in cortical interneurons
3. 学会等名 The 2021 Annual Meeting of the Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉山清佳
2. 発表標題 脳の柔軟性を科学する
3. 学会等名 新潟明訓高等学校キャリアパスセミナー (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sayaka Sugiyama
2. 発表標題 Visual experience specifies primary dendrites in cortical interneurons during the critical period
3. 学会等名 The 5th Annual Spring Meeting on Neurogenesis (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hou X. Kitayama E. Sakimura K. Sugiyama S.
2. 発表標題 Dendritic transdifferentiation of inhibitory neurons improved visual discrimination
3. 学会等名 The 45th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hou X. Kitayama E. Sakimura K. Sugiyama S.
2. 発表標題 Visual experience specifies primary dendrites in cortical interneurons for visual perception
3. 学会等名 The 2022 Annual Meeting of the Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉山清佳
2. 発表標題 こどもの脳が柔軟に成長する仕組み～経験依存の回路形成～
3. 学会等名 第18回名古屋大学ホームカミングデイ (招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

脳深部の単一神経回路の可視化に成功しました - 1細胞レベルで遺伝子进行操作する方法を開発 -
<https://www.niigata-u.ac.jp/news/2020/80659/>

脳の形成時に神経細胞の突起の伸ばし方を決める因子を発見
<https://www.niigata-u.ac.jp/news/2021/92593/>

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
研究 分 担 者	奥田 修二郎 (Okuda Shujiro) (00512310)	新潟大学・医歯学系・准教授 (13101)	
研究 分 担 者	高田 美絵子 (森島美絵子) (Morishima Mieko) (30435531)	東京慈恵会医科大学・医学部・講師 (32651)	

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. 本研究に関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
---------	---------