

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16281

研究課題名（和文）単一神経細胞の動態追跡による神経回路モジュール構築機構の解明

研究課題名（英文）Visualization of the spatial remodeling of cortical neurons during postnatal module formation

研究代表者

中川 直樹（Nakagawa, Naoki）

国立遺伝学研究所・遺伝形質研究系・助教

研究者番号：30835426

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：感覚情報処理に重要な役割を担う大脳皮質第4層神経細胞は、独立したモジュール（単位回路）を形成し情報の並列処理を可能にする。生後発達期のモジュール構築に寄与する細胞動態の解明を目的として、マウス体性感覚野においてヒゲ触覚情報処理を担う「バレル」モジュールをモデルとしてイメージング手法の開発を行った。単一神経細胞の動態を生きたマウス脳内で追跡する長期生体イメージング実験系を構築し、同一細胞を3日間にわたり経時的に追跡することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大脳皮質感覚野における機能的モジュールは、感覚情報の混線を防ぎ、精緻な情報識別を可能にする。モジュールの構築不全や機能障害は、ヒトでの発達障害に伴う感覚失調につながる可能性が示唆されている。本研究で開発した神経細胞動態追跡のための生体イメージング技術は、生後発達期の大脳皮質内で、各神経細胞がそれぞれのモジュールに適切に組み込まれていく仕組みの解明に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Layer 4 neurons in the mammalian sensory neocortex form functional modules for efficient sensory information processing. To understand the dynamics of the spatial remodeling of neurons involved in module formation during the postnatal development, we used the barrel module in the mouse somatosensory barrel cortex as a model. We have developed a long-term in vivo imaging system to track the movement of single layer 4 neurons during module formation in the neonatal mouse brain.

研究分野：神経科学

キーワード：神経科学 神経回路形成 生体イメージング 単一細胞動態追跡 バレル皮質

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

視覚や聴覚、体性感覚など感覚情報の処理を担う大脳皮質の各領野では、情報を受ける第4層(L4)の神経細胞において類似の刺激応答性をもつグループが存在し、入力する視床皮質軸索とともに一対の神経回路モジュール(単位回路)として機能する。モジュール単位での刺激応答性の違いによって、感覚情報の特性(聴覚情報における周波数など)を高い分解能で識別・処理することが可能となる。神経回路モジュールは、視床皮質軸索からの神経伝達によって新生児期に神経活動依存的に構築される。しかし、類似の刺激応答性をもつ一群のL4神経細胞が、どのようなメカニズムで、対となる視床皮質軸索の近傍に整列し、モジュールを形成するののかについては不明であった。

### 2. 研究の目的

本研究では「一様に分布するL4神経細胞がモジュールごとにグループ化し、機能的・空間的に独立した単位回路を形成する仕組み」の解明を目的とした。機能的にも細胞構築学的にも明確な構造を有するマウス体性感覚野バレル皮質のバレル型モジュールをモデルとして、L4神経細胞が出生直後の一様な分布から個別のバレル型モジュールへと分布再編される細胞動態の解明を目指した。具体的にはまず、生きたマウスの大脳皮質内でL4神経細胞の細胞動態を追跡するための生体イメージング手法を確立することを目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) バレル皮質L4神経細胞の標識

大脳皮質における個々のバレルモジュール(視床皮質軸索のクラスター)を可視化するため、視床皮質軸索にGFPを発現するTCA-GFPトランスジェニックマウス(Mizuno et al. Neuron 2014)を用いた。このTCA-GFPマウスのL4神経細胞に対し、子宮内電気穿孔法(IUE)を用いて核局在型RFPを導入し、細胞核をRFP標識した。

#### (2) 組織学的解析

4%パラホルムアルデヒドを用いてマウスを灌流固定した後に脳を摘出した。冠状断あるいは接線方向の大脳皮質切片を作製し、共焦点顕微鏡で観察した。

#### (3) タイムラプス生体イメージング

生後3日齢(P3)のマウス頭部に、観察窓と頭部固定用のチタンバーを取り付けた。麻酔下のマウスを顕微鏡ステージに固定し、二光子励起顕微鏡を用いてL4神経細胞(RFP)とバレル(TCA-GFP)を可視化し、L4を含むZスタック画像を取得した。バレル形成時期であるP3-6にかけて、同一個体について24時間間隔でイメージングを行った。イメージング中はヒーターで体温を保持し、イメージング後は仔マウスを母親マウスの元に戻して養育させた。

### 4. 研究成果

#### (1) 生体イメージングに向けたバレル皮質L4神経細胞標識法の確立

バレル皮質L4神経細胞は、生後第1週のバレル構築過程でバレル型の空間配置へと分布再編されるが、それと同時に樹状突起を顕著に発達させる。したがって、細胞形態解析に使用される通常の蛍光標識法では、他のL4神経細胞の樹状突起と重なるため、詳細な細胞位置の解析が困難となる。そこで本研究では、各局在型のRFP(nls-RFP)を使用し、細胞核を標識することとした。また、TCA-GFP蛍光でおおよそのL4深度は特定できるものの、L4に限定した神経細胞標識を行うことが効率的な解析に重要であるため、標識の層特異性についても検討した。

IUEのタイミングや電圧設定、プラスミド濃度などを検討した結果、バレル皮質全域かつL4にほぼ特異的にnls-RFPを発現させることが可能となった(図1)。

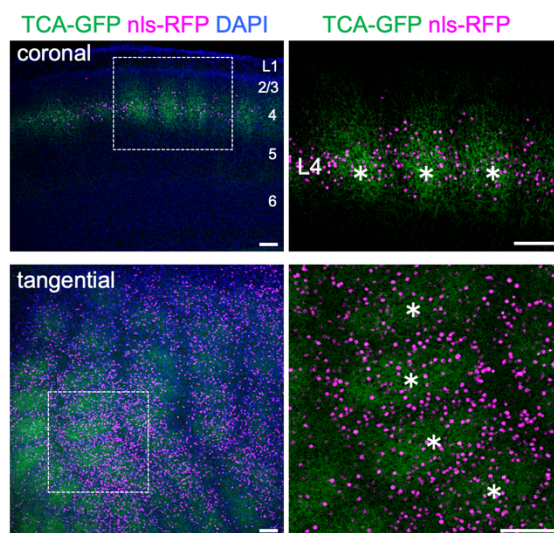


図1. バレル皮質L4神経細胞の蛍光標識

TCA-GFPマウスのバレル皮質L4神経細胞にnls-RFPを発現させ、P5で冠状断切片(上段)と接線方向切片(下段)を作製し、共焦点顕微鏡で解析した。波線部分の拡大図を右側に示した。アスタリスクはバレルを示す。スケールバー: 100  $\mu$ m

## (2) タイムラプス生体イメージング

マウスバレル皮質 L4 では、バレルモジュールの組織学的構造（視床皮質軸索のクラスタリングと L4 神経細胞のバレル型配置）が P3-6 にかけて徐々に構築される。バレル領域における L4 神経細胞の移動パターンを明らかにするため、上記の方法で視床皮質軸索と L4 神経細胞をそれぞれ GFP と RFP で標識したマウスを用いて、P3-6 にかけて 24 時間間隔で、二光子励起顕微鏡を用いたタイムラプス生体イメージングを試みた。TCA-GFP 蛍光から、視床皮質軸索が徐々にクラスタリングしていく過程が観察された。この TCA-GFP 蛍光をもとにバレル皮質 L4 を特定し、各タイムポイントで同一の nls-RFP 標識 L4 神経細胞を同定することに成功した（図 2）。

観察終了後、組織学的解析によってイメージングした領域を確認したところ、バレルの組織学的構造に大きな異常は認められなかったことから、複数回の二光子レーザー照射による細胞へのダメージはほとんどないと考えられた。また、生後 1 週目のマウスは脆弱で、授乳を含めた母親からのケアが必須であるが、イメージングのために頭部に施術する観察窓が正常な発達を阻害する可能性が考えられた。この点について、観察終了時点で、観察窓を施術しイメージングを行った仔マウスの体重は手術をしていない同腹仔と同等であったことから、イメージングを行った仔マウスは母親からのケアを受け正常に成長したと考えられた。

以上より、L4 神経細胞の動態追跡のためのイメージング実験系を確立することができた。本手法により、一視野あたり 5-6 個のバレルを観察することが可能となり（図 2）、同一個体の複数のバレルモジュールについて、L4 神経細胞の空間位置データを取得することが可能となった。

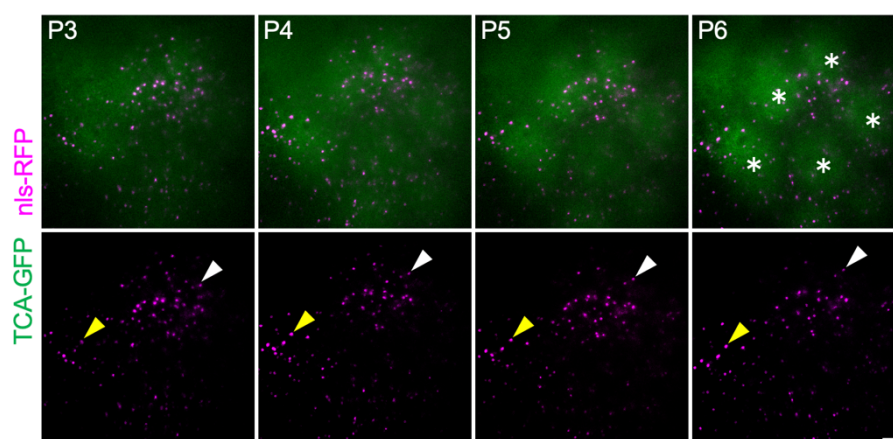


図2. タイムラプス生体イメージング

P3-6にかけて24時間間隔で、二光子顕微鏡を用いて生体イメージングを行った。アスタリスクはバレルを示す。白矢印・黄色矢印はそれぞれ、各タイムポイントにおける同一の神経細胞を示す。スケールバー:50  $\mu\text{m}$

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakagawa N, Plestant C, Yabuno-Nakagawa K, Li J, Lee J, Huang CW, Lee A, Krupa O, Adhikari A, Thompson S, Rhynes T, Arevalo V, Stein JL, Molnar Z, Badache A, Anton ES.	4. 巻 103
2. 論文標題 Memo1 mediated tiling of radial glial cells facilitates cerebral cortical development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuron	6. 最初と最後の頁 836-852
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuron.2019.05.049	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 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Naoki Nakagawa, Takuji Iwasato
2. 発表標題 Developmental dynamics of the Golgi apparatus regulate dendritic refinement in the mouse barrel cortex
3. 学会等名 第44回 日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Naoki Nakagawa
2. 発表標題 Activity-regulated positioning of the Golgi apparatus facilitates dendritic refinement in the neonatal mouse barrel cortex
3. 学会等名 Symposium "Circuit Construction in the Mammalian Brain"
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Naoki Nakagawa, Shingo Nakazawa, Takuji Iwasato
2. 発表標題 Long-term in vivo imaging of spatial remodeling of cortical L4 neurons for the barrel module formation
3. 学会等名 第43回 日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Naoki Nakagawa
2. 発表標題 Spatial remodeling and organelle dynamics of L4 neurons during thalamocortical module formation in the mouse barrel cortex
3. 学会等名 NIG Symposium "Circuit Construction in the Mammalian Brain" (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中川直樹
2. 発表標題 ゴルジ体ダイナミクスによる大脳皮質神経細胞の樹状突起精緻化
3. 学会等名 第14回 神経発生討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Naoki Nakagawa, Takuji Iwasato
2. 発表標題 Long-term in vivo imaging of neuronal spatial remodeling during the barrel column formation
3. 学会等名 New Frontier in Neuroscience 2020 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

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
---------	---------