

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06876

研究課題名(和文) 新生仔生体イメージングによる大脳皮質回路形成における自発的同期活動の役割の解明

研究課題名(英文) In vivo imaging of neonatal brain to elucidate the role of spontaneous synchronous activity in cortical circuit formation

研究代表者

水野 秀信 (MIZUNO, Hidenobu)

熊本大学・国際先端医学研究機構・特任准教授

研究者番号：00567159

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)：新生仔期大脳皮質体性感覚野第4層ではパッチワーク状の自発的同期活動(パッチワーク活動)が認められる。本研究の目的はパッチワーク活動がどのように神経回路形成に関与するかを解明することである。研究では第4層神経細胞の樹状突起形成に関わるNMDA型グルタミン酸受容体に焦点を当てた。実験では第4層の疎らな細胞においてNMDA受容体をノックアウトし、生後6日齢マウスの生体カルシウムイメージングを行った。その結果、NMDA受容体ノックアウト細胞では同期レベルが低下することを見出した。すなわちNMDA受容体がパッチワーク活動の制御に作用することを示唆するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトの大脳が司る認知や思考等の高次脳機能は社会的な生活を営む上で重要であり、その機能不全は認知症や発達障害といった脳疾患に代表されるように、日常生活に支障をきたす。これらの機能獲得には大脳皮質神経回路の形成が前提となるが、新生仔の発達期における神経回路形成の詳細な機構は多くが未解明である。大脳皮質の体性感覚野ではパッチワーク状の自発的同期活動が観測され、回路形成に関わる事が示唆されており、本研究ではこのパッチワーク活動の制御にNMDA受容体に関わるという結果を導き出した。したがってNMDA受容体が神経回路形成に与える作用、ひいては分子機序の研究が今後さらに進むと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to elucidate the mechanisms of how the patchwork-like spontaneous synchronous activity observed in layer 4 of the somatosensory cortex in the neonatal period is involved in the formation of neural circuits. In this study, we focused on NMDA-type glutamate receptors involved in dendrite formation in layer 4 neurons. We found by intravital imaging of 6-day-old mice with sparse knockout of NMDA receptors in layer 4 that NMDA receptor knockout neurons showed decreased synchronization levels. This suggests that NMDA receptors play important roles in regulation of patchwork activity.

研究分野：神経科学

キーワード：2光子イメージング カルシウムイメージング 大脳皮質 樹状突起ダイナミクス 同期活動 NMDA型グルタミン酸受容体

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

ヒトを含む哺乳類に特有の構造である大脳皮質は、認知等の高次機能に重要な役割を果たす。成体の大脳皮質神経回路は精密かつ複雑だが、新生仔では未成熟である。新生仔期の神経活動は大脳皮質神経細胞の軸索・樹状突起形成など回路成熟の様々な過程に関与する。そのメカニズム解明は、効率的学習や発達障害改善等につながるため、神経科学における最も重要な課題の一つである。近年、生体新生仔の大脳皮質に同期的自発活動が存在すること、回路形成に関わることが報告された (Ackman et al., Nature 2012; Antón-Bolaños et al., Science, 2019 など)。しかし生体動物における同期活動の発生に関わる分子細胞機序の多くは不明である。

これまでの研究で、新生仔大脳皮質深部の 2 光子顕微鏡タイムラプス観察法の開発に携わった (Mizuno et al., Neuron 2014; J Vis Exp 2018)。近年これを用いることで、大脳皮質において感覚入力をはじめに受け取る第 4 層神経細胞を、単一細胞レベルでカルシウムイメージングすることに成功した。その結果、体性感覚野の第 4 層神経細胞がパッチワーク状の自発同期活動 (パッチワーク活動) を示すことを見出した。この同期活動は第 4 層の神経回路が形成される生後 1 週齢に選択的に観察されたため、回路形成への関与が強く示唆された (Mizuno et al., Cell Rep, 2018)。しかしながら、パッチワーク活動がどのような分子細胞メカニズムで神経回路形成に関与するかは不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、独自に発見したパッチワーク状同期活動という知見を元にし、この活動がどのような分子細胞メカニズムで回路形成に関わるかを調べる事によって、神経活動依存的な回路形成のメカニズムを明らかにする事であった。具体的には、パッチワーク状同期活動の発生に関わる分子メカニズムの同定を目指した。以前の研究で体性感覚野第 4 層神経細胞の樹状突起形成に NMDA 型グルタミン酸受容体 (NMDA 受容体) が関与することを見出しており (Mizuno et al., Neuron 2014)、パッチワーク活動にも関わる可能性が高かった。よって NMDA 受容体阻害による活動変化に着目した。

3. 研究の方法

本研究は、各種遺伝子組換えマウスに対し、分子生物学的手法・子宮内電気穿孔法・細胞培養法・薬理学的手法・形態学的手法・生体二光子顕微鏡イメージング法等を組み合わせることで行った。以下に本研究で用いた独自手法についてまとめる。

大脳皮質第 4 層の疎らな細胞の標識と標識細胞での遺伝子ノックアウト

パッチワーク活動がどのような分子メカニズムで回路形成に関わるかを解析するためには、細胞を二光子観察可能な輝度で標識し、かつ標識細胞で遺伝子阻害する必要がある。これまでに、生体内において疎らかつ高輝度に細胞を標識し、さらに任意遺伝子の floxed マウスと組み合わせることで標識細胞で遺伝子ノックアウトが可能なベクターシステム Supernova 法を報告している (図 2C、Luo et al., Sci Rep 2016)。これを用い、新生仔の第 4 層細胞において NMDA 受容体をノックアウトした。

新生仔マウスの生体脳カルシウムイメージング

生後 6 日齢のマウスに脳内観察用窓を作成した。また、2 光子イメージング中のマウス固定のため、カスタムメイドの小型金属器具をマウス頭部に付けた。新生仔脳の神経活動は麻酔により低下するため、カルシウムイメージングの解析にはイソフルランガス麻酔停止 10 分以降のデータを使用した。

4. 研究成果

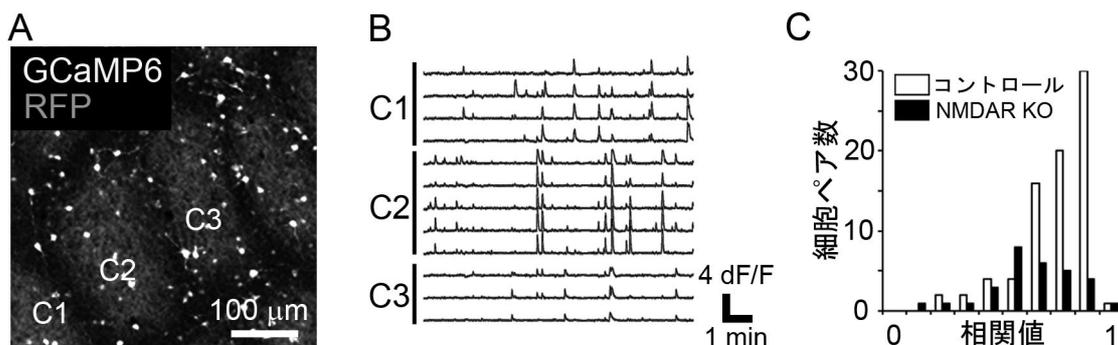
大脳皮質第 4 層の疎らな細胞における NMDA 受容体ノックアウトは視床皮質軸索終末のパレル様の配置の形成に影響を与えない

大脳皮質特異的 NMDA 受容体ノックアウトマウス (Emx1-Cre;Grin1 floxed マウス) ではパレル構造と視床皮質軸索終末構造の形成が阻害される (Iwasato et al., Nature 2000)。パッチワーク活動はパレルの配置に対応する活動であり、パッチワーク活動と NMDA 受容体の関連を調べるためには、パレル構造が保たれた状態で NMDA 受容体の機能を阻害する必要がある。この目的を達成するため、大脳皮質体性感覚野第 4 層の一部の細胞で NMDA 受容体をノックアウトした。第 4 層の一部で NMDA 受容体をノックアウトしたマウスとコントロール (NMDA 受容体ヘテロ) マウスの視床皮質軸索終末構造を比較したところ、視床皮質軸索終末の配置および個々の終末の幅と長さには差は確認されなかった。以上の結果は、大脳皮質第 4 層の疎らな細

胞における NMDA 受容体ノックアウトは視床皮質軸索終末のバレル様の配置の形成に影響を与えないことを示す。

NMDA 受容体ノックアウト細胞における自発的同期活動の同期レベルの低下

大脳皮質体性感覚野第 4 層の疎らな細胞で NMDA 受容体をノックアウトした生後 6 日齢においてマウスの生体カルシウムイメージングを行った (図)。同一バレルに属する細胞ペアの GCaMP6s 蛍光変化の同期レベルを解析したところ、NMDA 受容体ノックアウト細胞ペアでは、コントロール (NMDA 受容体ヘテロ) 細胞ペアと比べ同期レベルが低かった。以上の結果は NMDA 受容体がパッチワーク活動の同期レベルの強化に関わることを示している。



図、NMDA 型グルタミン酸受容体をノックアウトした細胞ペアでは自発的同期活動の同期レベルが低下する。

A、体性感覚野第 4 層の疎らな興奮性細胞にカルシウムインディケータ GCaMP6s を発現させた (高輝度シグナル)。体性感覚野内のバレルの配置は視床皮質軸索で RFP を発現するマウスを用い可視化した (低輝度シグナル)。C1、C2、C3 は対応するヒゲからの情報を処理する領域 (バレル) を示す。

B、個々の細胞における GCaMP6s 蛍光変化の例。野生型細胞では同じバレルに配置する細胞は同期的な蛍光変化 (パッチワーク活動) を示す。

C、コントロール細胞 (NMDA 受容体ヘテロ細胞) ペアと比較し、NMDA 受容体ノックアウト細胞ペアでは同期レベルが低下する ($p=0.004$)。

研究の位置づけと今後の展望

発達期における同期的神経活動は大脳皮質神経回路形成に関わると考えられるが、同期活動を制御する分子メカニズムはいまだに多くが不明である。今回体性感覚野に存在するパッチワーク活動の制御に NMDA 受容体に関わることを新しく見出したことは、分子メカニズム解明の一助となる点で意義深い。

今後の展望としては NMDA 受容体依存的なパッチワーク活動が体性感覚野神経回路形成にどのように関わるかを解明することが考えられる。

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 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Mizuno Hidenobu, Rao Madhura S., Mizuno Hiromi, Sato Takuya, Nakazawa Shingo, Iwasato Takuji	4. 巻 41
2. 論文標題 NMDA Receptor Enhances Correlation of Spontaneous Activity in Neonatal Barrel Cortex	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1207 ~ 1217
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.0527-20.2020	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 Rao Madhura S., Mizuno Hidenobu	4. 巻 167
2. 論文標題 Elucidating mechanisms of neuronal circuit formation in layer 4 of the somatosensory cortex via intravital imaging	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 47 ~ 53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2020.10.007	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 Rao Madhura S., Mizuno Hiromi, Iwasato Takuji, Mizuno Hidenobu	4. 巻 16
2. 論文標題 Ras GTPase-activating proteins control neuronal circuit development in barrel cortex layer 4	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 901774
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2022.901774	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 Curia Giulia, Estrada-Camarena Erika, Manjarrez Elias, Mizuno Hidenobu	4. 巻 16
2. 論文標題 Editorial: In vivo investigations on neurological disorders: From traditional approaches to forefront technologies	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1052089
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2022.1052089	査読の有無 無
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3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 水野秀信
2. 発表標題 発達期大脳皮質第4層における神経細胞動態と活動様式のイメージング（兼シンポジウムオーガナイザー）
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会 [1S02a] 神経活動依存的なネットワーク形成：細胞間コミュニケーションから細胞内分子シグナルまで
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Madhura Subba Rao, Hiromi Mizuno, Takuya Sato, Takuji Iwasato, Hidenobu Mizuno
2. 発表標題 Role of Ras-GAP During Neuronal Circuit Development in the Barrel Cortex Layer IV
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 水野秀信
2. 発表標題 大脳皮質神経回路形成の生体2光子イメージング
3. 学会等名 第64回日本顕微鏡学会九州支部集会学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

水野研究室ホームページ https://mizunolab.com/ 熊本大学国際先端医学研究機構・水野秀信 http://ircms.kumamoto-u.ac.jp/research/hidenobu_mizuno/
--

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	玉川 直 (中川直) (TAMAGAWA NAKAGAWA Nao) (20611065)	鹿児島大学・医歯学域医学系・助教 (17701)	

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			
スイス	EPFL			