

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21700350

研究課題名(和文) 大脳皮質の層特異的回路網構築における神経活動の役割

研究課題名(英文) Roles of neuronal activity in circuit formation of the mammalian cerebral cortex

研究代表者

田川 義晃(TAGAWA YOSHIKI)

京都大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号:50303813

研究成果の概要(和文)：本研究では、発達期のマウス大脳皮質の神経活動を操作する実験を行い、大脳皮質神経回路形成における神経活動の役割を明らかにした。大脳皮質 2/3 層神経細胞の活動抑制・再誘導の実験から、長距離軸索投射形成における神経活動の役割が明らかになった。また、遺伝性発達障害に関わるイオンチャネルの発現・機能を阻害すると、活動依存的メカニズムを介して、大脳皮質の回路構築が障害されることを見いだした。

研究成果の概要(英文)：This study aims to clarify the role of neuronal activity in circuit formation of the mammalian cerebral cortex. Levels and patterns of activity in mouse layer 2/3 cortical neurons during the perinatal period were manipulated in vivo, and their morphological development was assessed. Reducing activity in layer 2/3 neurons disturbed their long-range axonal projections. This defect was restored by increasing activity, suggesting that neuronal activity plays a pivotal role in their long-range axonal projections. In addition, repressing expression or function of an ion channel that is shown to be associated with an inherited mental retardation disturbed neuronal migration. Results suggest that control of neuronal activity is crucial for cortical circuit formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：大脳皮質、神経回路形成、神経活動、発達、脳梁、マウス、電気穿孔法、GFP

## 1. 研究開始当初の背景

認知、学習、行動などの高次脳機能を生み出す大脳皮質神経回路の形成過程では、発達期に、まずゲノム情報などの遺伝的プログラムによって大まかな配線がなされ、次に神経活動に依存して、より正確な回路網が形成される。発達過程の大脳皮質神経回路では、回

路として完成していないにも関わらず、すでに特徴的なパターンの神経活動が観察される。このような神経活動(自発的神経活動)は、大脳神経回路の形成に深く関わると考えられてきたが、どの過程でどのような役割を担うのか、その詳細はよくわかっていない。発達過程の自発的神経活動は、薬剤や胎

内・生後の環境要因に大きな影響を受けると考えられている。また、脳発達期の回路形成障害は、生育後の脳機能障害の一因になりうると考えられている。神経活動に依存した大脳皮質の回路構築メカニズムを理解することは、脳の正常・異常発達を理解する上で、重要な課題であると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、発達期の大脳皮質神経細胞の神経活動を操作する実験系を確立し、神経活動操作が回路構築のどの過程にどのような影響を及ぼすかを明らかにすることをめざした。発達期の大脳皮質では、神経幹細胞増殖、神経細胞への分化、移動、樹状突起形成、軸索投射などの一連の発生プログラムが進行する。本研究ではまず、神経活動を抑制する実験により、どの発達段階に神経活動が必要とされているかを検証することを試みた。さらに、ここに神経活動を戻すことにより、どのような神経活動パターンがあれば回路形成に十分なかを明らかにすることを試みた。また、発達期の神経活動の異常が大脳皮質回路構築異常を引き起こす可能性を検証するため、種々のイオンチャネルの発現・機能を阻害する実験を行い、活動依存的メカニズムを介して大脳皮質の回路構築に異常を示す疾患を明らかにすることを試みた。以上の3つの実験により、大脳皮質回路構築における神経活動の役割を明らかにすることをめざした。

## 3. 研究の方法

### (1) 神経活動の抑制実験:

発達期の大脳皮質神経細胞の活動抑制には、神経発火を抑制する分子ツールである $K^+$ チャネルの1つ Kir2.1 を用いた(Mizuno et al., J. Neurosci., 27, 6760-6770, 2007)。Kir2.1 発現ベクターの遺伝子導入には、子宮内電気穿孔法を用いた。遺伝子導入された皮質神経細胞の形態を蛍光蛋白(GFP 又は TurboRFP)によって可視化して、その形態発達を解析した。

### (2) 神経活動の再誘導実験:

任意のパターンで神経活動を誘導する実験では、光感受性チャネル channelrhodopsin2 (ChR2)を用いて、473nm の光刺激によって神経活動誘導を行った。子宮内電気穿孔法によって ChR2 を皮質 2/3 層神経細胞に発現させたマウスを作成し、その頭蓋骨に 473nm LED を取り付け、任意のパターンで光照射を行った。神経活動が誘導できているか否かを検証する実験では、473nm レーザー光で脳に光刺激を行い、脳に刺入した細胞外記録電極で光刺激に応じた神経発火を記録した。

### (3) 様々なイオンチャネルの発現・機能を抑制

する実験:

発達期の皮質神経細胞の膜電位調節に関与すると考えられる種々のイオンチャネルを標的に、その機能阻害変異体を子宮内電気穿孔法により遺伝子導入して、それぞれのチャネルの機能を阻害した。また、それぞれのチャネルの RNAi 発現ベクターを遺伝子導入することにより、標的のイオンチャネルの発現を抑制した。遺伝子導入された皮質神経細胞の形態を蛍光蛋白(GFP 又は TurboRFP)によって可視化して、その形態発達を解析した。

## 4. 研究成果

(1) 皮質 2/3 層神経細胞のどの発達段階に神経活動が必要とされているかを検証するため、神経活動を抑制する実験を行った。神経活動を抑制する分子ツール Kir2.1 を子宮内電気穿孔法により皮質 2/3 層興奮性細胞に発現させ、その形態発達を解析した。コントロール(未処置)の皮質 2/3 層神経細胞は、特徴的なパターンの長距離軸索投射(脳梁軸索投射)を反対側皮質へ伸ばすのに対して、神経活動を抑制された皮質 2/3 層細胞の軸索投射は顕著に障害された。それ以前の段階(神経細胞への分化、細胞移動等)への明らかな影響は見られなかった。活動依存的な長距離軸索投射の形成メカニズムをさらに明らかにするため、軸索1本1本を可視化し、シナプス前・後細胞の神経活動を抑制する実験を行った。シナプス前細胞の神経活動を抑制すると、生後9日目の段階で反対側皮質上層への軸索の到達に遅れが見られ、その後の軸索分枝発達も障害された。一方、シナプス後細胞の神経活動を抑制すると、生後9日目にはコントロールと同様に皮質上層に到達するが、それ以後の軸索分枝発達は障害された。以上の結果より、皮質 2/3 層細胞の長距離軸索投射において、まず軸索投射細胞自身の神経活動が必須であること、次に皮質上層に到達した後、シナプス前・後細胞両者の神経活動が重要な役割を担うことが示唆された(図1)。

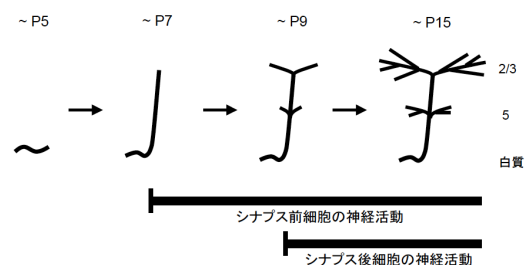


図1 脳梁軸索投射におけるシナプス前・後細胞の神経活動の役割

生後9日目までの軸索伸張には投射細胞自身の神経活動が必要。一方、生後9日目以降の軸索終末分枝形成・シナプス形成にはシナプス前・後両者の神経活動が必要(Mizuno et al., 2010 より改変)。

(2) 皮質 2/3 層細胞の長距離軸索投射にどのようなパターンの神経活動があれば十分かを検証するため、神経活動を再誘導して、神経活動抑制によって障害された軸索投射を回復させる実験を行った。実験では、神経活動抑制のための分子ツール Kir2.1、神経活動を誘導するための分子ツール ChR2、軸索可視化のために GFP/TurboRFP を皮質 2/3 層細胞に遺伝子導入して、生後13日目からLEDによって473nm 光刺激を行い、脳梁軸索投射を解析した(図2)。

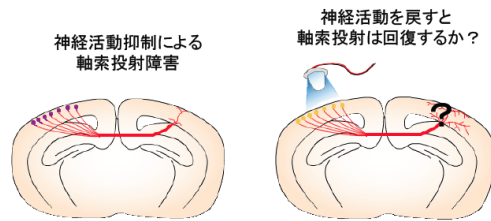


図2 神経活動再誘導による軸索投射の回復を調べる実験の概略図

まず、皮質 2/3 層細胞に ChR2 を発現させたマウスで、光刺激によって神経活動を誘導できることを確認した。麻酔をしたマウス(生後30日前後)の大腦皮質に金属製細胞外記録電極を刺入し、473nm レーザー光で刺激を行うと、光刺激に同期した神経発火が記録された(図3)

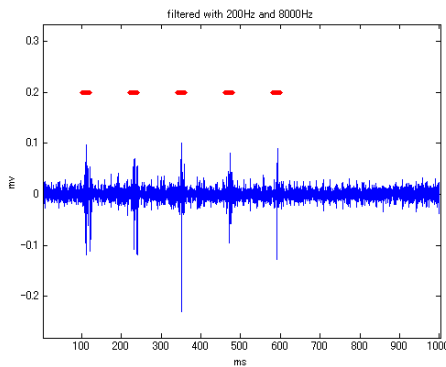


図3 光刺激に同期した神経発火の誘導

TurboRFP, Kir2.1, ChR2 を皮質 2/3 層細胞に発現させ、LED を脳表面に装着するが、光照射を行わない動物群(コントロール)では、RFP で標識された軸索は反対側皮質の下層(白質層)に留まり、皮質内へ侵入しなかった。一方、生後13日目から48時間10Hzの光刺激を行った群では、RFP で標識された軸索は白質層から皮質内へ侵入し、2/3層と5層に密に投射する層特異的パターンが回復しているのが観察された。皮質領域への軸索侵入を定量化した data と共に図4に示す。光照射なしの群に比べ、光照射ありの群で有意に軸索投射の回復が見られた( $p < 0.05$ : Mann Whitney's U test)。

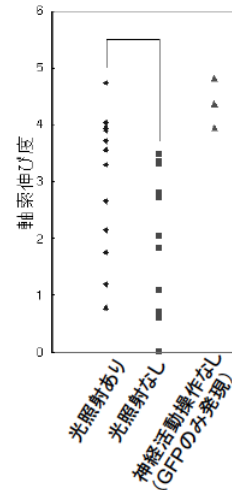
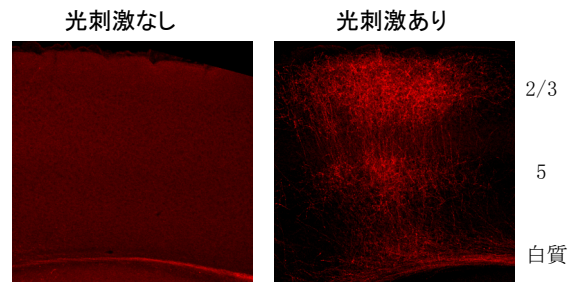


図4 光刺激による軸索投射の回復(上)とその定量(下)

光刺激なしでは RFP で標識された軸索は白質層に留まるのに対し、光刺激ありでは皮質内に侵入し、層特異的な終末分枝を回復した。皮質への軸索侵入を定量化すると、光刺激ありの群は、なしの群に比べて有意に高い値を示した。

(3) 発達期の皮質神経細胞の膜電位調節に関与すると考えられる種々のイオンチャンネルが、活動依存的メカニズムを介して回路構築に関与する可能性を検証する実験を行った。実験では、発達期大腦皮質に発現し、膜電位制御に深く関与することが想定されている HCN, Kir2.1, KCNQ2, KCNK2, 9, 10 を標的にした。まず、これらのチャンネルの機能阻害変異体や RNAi 配列を組み込んだ発現 vector (pCAG vector) を作製した。子宮内電気穿孔法により、それぞれの発現 vector を発達期大腦皮質の 2/3 層神経細胞に遺伝子導入して、チャンネルの機能・発現を阻害した。同時に遺伝子導入した GFP によって、細胞の移動・形態・樹状突起や軸索投射パターンを可視化し、コントロール(GFP のみを遺伝子導入したもの)と比較した。

HCN, Kir2.1, KCNQ2, KCNK2, 10 の機能・発現阻害では、コントロールと比較して大きな影響は見られなかった。一方、KCNK9

(TASK-3)の機能・発現を阻害すると、皮質2/3層神経細胞の radial migration に障害が生じた。具体的には、in vitro (HEK 細胞発現系)でKCNK9の蛋白発現を抑制することを確認したRNAi配列を組み込んだ発現 vector を発現させると、通常皮質2/3層に移動(radial migration)する細胞が、皮質のより深い層に留まっていた(図5)。また、KCNK9のチャネル機能を阻害する dominant negative 変異体を発現させると、同様の migration 異常を示した。同時に導入したGFPによる細胞形態の観察により、皮質の深い層で留まった細胞は、コントロールに比べて細胞の成熟(分化マーカーの発現や樹状突起の発達)が遅れること、しかしやがてその場で樹状突起を発達させ、深い層の神経回路に組み込まれることが明らかになった。

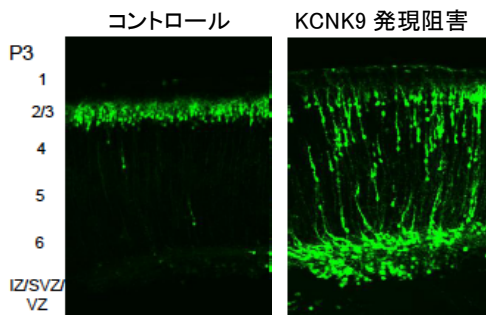


図5 KCNK9 発現阻害による細胞移動の異常

KCNK9は静止膜電位付近で活性をもつ $K^+$ チャネルであり、膜電位の制御に重要な役割を果たすと考えられる。また、Migration過程の神経細胞では、膜電位変化やそれに伴う細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度の変化によって移動が制御されると報告されている。本研究結果は、KCNK9が細胞興奮性の制御を介して、大脳皮質構築に関与することを示唆する。また、KCNK9は精神発達障害(mental retardation)の原因遺伝子の1つである。特に今回実験に用いた機能阻害変異体は、mental retardationの家系から見つかった遺伝子変異である。今後の研究によって、KCNK9機能阻害がmigration異常を引き起こす機序、migration異常によって深い層に取り残された神経細胞が皮質回路の機能に与える影響、そしてmigration異常とmental retardation発症の因果関係について明らかになることが期待される。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ①. Mizuno H, Hirano T, Tagawa Y. Pre-synaptic and post-synaptic neuronal activity supports the axon development of callosal projection neurons during different post-natal periods in the mouse cerebral cortex. *European Journal of Neuroscience*, 査読有、31, 410-424, 2010
- ②. Ageta-Ishihara N, Takemoto-Kimura S, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Suzuki K, Kamijo S, Fujii H, Mano T, Blaeser F, Chatila TA, Mizuno H, Hirano T, Tagawa Y, Okuno H, Bito H. Control of cortical axon elongation by a GABA-driven  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase cascade. *Journal of Neuroscience*, 査読有、29(43), 13720-13729, 2009

[学会発表] (計3件)

- ①. Bando Y, Hirano T, Tagawa Y. Involvement of leak potassium channels in migration of cortical neurons. *Society for Neuroscience annual meeting, San Diego, USA, 2010年11月15日*
- ②. Bando Y, Hirano T, Tagawa Y. A crucial role of leak potassium channels in neuronal migration. *日本神経科学大会、神戸国際会議場、2010年9月3日*
- ③. Bando Y, Hirano T, Tagawa Y. A role of leak potassium channel KCNK9 in neuronal migration. *日本分子生物学会、パシフィコ横浜、2009年12月10日*

[その他]

ホームページ等

<http://www.biophys.kyoto-u.ac.jp/hirano.php>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

田川 義晃(TAGAWA YOSHIAKI)  
京都大学・大学院理学研究科・助教  
研究者番号:50303813

### (2)研究分担者:なし

### (3)連携研究者:なし