

令和 6 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06409

研究課題名（和文）大脳皮質領野間の三重並行回路による感覚運動統合機構の解明

研究課題名（英文）Analysis on three-layered inter-areal circuit in the cerebral cortex for sensorimotor integration

研究代表者

岡 雄一郎 (Oka, Yuichiro)

大阪大学・大学院連合小児発達学研究所・講師

研究者番号：30614432

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、大脳皮質の一次体性感覚野S1から一次運動野M1へ投射する回路は、運動調節に関わる皮質-基底核ループと感覚運動連合学習に関わる皮質-視床高次核ループをつなぐ機能回路と考え、その回路構造を解析した。dual-eGRASP法により、S1からM1に入力するシナプスを可視化する系を構築し、M1の細胞タイプごとのシナプス入力を解析している。また、経シナプストレーサー分子を用いた解析から、S1の2/3層と5a層のニューロンはM1とM2のような隣接する2つの投射領域に異なる強度で投射することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

随意運動の調節や感覚と運動の連合学習には、運動野を起点とした皮質-基底核-視床-皮質ループと感覚野を起点とした皮質-視床高次核-皮質ループが重要な役割を果たしているが、2つのループ回路がどのように連関して統合的な感覚運動調節を行っているかはよくわかっていない。本研究では、2つのループをつなぐ機能回路と考えられる、一次体性感覚野S1から一次運動野M1に投射する回路の構造を解析する系を確立した。この回路の乱れは自閉スペクトラム症にみられる運動機能の低下との関連が指摘されており、その回路構造と機能の解明は、その病態理解につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）： The inter-areal projections from the primary somatosensory area (S1) to the primary motor area (M1) is thought to connect the cortico-basal ganglia loop involved in motor regulation and the cortico-higher thalamic loop involved in sensorimotor association learning. In this study, we examined the projection patterns and synaptic connections of cortical neurons in three different layers of S1 to M1. We established the system to visualize the synaptic connections which axons of S1 neurons make on M1 neurons and have been analyzing the synaptic inputs onto different types of M1 neurons. Using trans-synaptic tracers, we found that neurons in layer 2/3 and those in layer 5a of S1 showed difference in innervation strength of axons in the two neighboring target regions such as M1 and M2.

研究分野：神経解剖学

キーワード：神経回路形成 大脳皮質 領野間回路 感覚運動統合

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### (1) 感覚運動統合に関わる2つのループ回路をつなぐ大脳皮質領野間回路

大脳皮質の感覚野と運動野は相互に情報を伝達しあい感覚情報をその他の情報と統合して適切な運動指令を出力する。感覚野から運動野へ伝達される情報に関しては、例えば、マウス大脳皮質の1次体性感覚野(S1)でヒゲからの入力进行处理するバレル野の2/3層から1次運動野(M1)への投射は対象物の検知や位置の知覚に關与する(Yamashita et al., *Neuron*, 2013 など)。我々を含む数グループにより、M1へ投射するS1バレル野の連合ニューロンは2/3層に加え5a層と6b層にも存在が示されている(Tiong, Oka et al., *Front. Neuroanat.*, 2019; Mao et al., *Neuron*, 2011 など)。さらに、感覚野と運動野の間の連合回路の大部分は三重層の並列回路となっており(Minamisawa et al., *Cell Rep.*, 2018; Manita et al., *Neuron*, 2015)、少なくとも感覚運動統合に関わる領野間回路においては三層並列構造が基本的な回路構造であると考えられる。しかし、三層の並行連合回路において、各層からの投射がそれぞれどのような情報成分の伝達を担っているのかはまだ不明である。最近、視床POm核後部からS1バレル野の5a層への入力が、ヒゲ刺激を用いた行動学習課題で可塑性を示すことが報告された(Audette et al., *Neuron*, 2019)。POm核などの視床高次核は大脳皮質感覚野と双方向的なループ回路を形成し皮質の機能を調節していると考えられる領域で、近年、注目されている視床領域である。5a層でPOm後部の入力を受ける細胞がM1へ投射する連合ニューロンならば、2/3層からの1次的な感覚情報が学習や経験により修飾された2次的情報をM1に伝達している可能性がある。運動制御や運動学習に関わる皮質-基底核ループはM1の主に5a層に分布する皮質線条体投射ニューロンを起点とする。このニューロンは線条体のD1R型およびD2R型のmedium spiny neuronへの出力に加え、より強い出力をfast-spiking interneuronに送っている(Johansson & Silberberg, *Cell Rep.*, 2020)。一方、皮質-基底核ループへの感覚入力は主にS1からの投射であると考えられ、確かにM1の5a層のニューロンはS1の連合ニューロンから入力を受けている(Mao et al., *Neuron*, 2011)が、この5a層のニューロンが実際に線条体に投射しているのか、S1のどの層の連合ニューロンから入力を受けているのかは明らかではない。5a層への入力を含め、S1の連合ニューロンの層特異性とM1の後シナプス細胞の細胞種の対応関係はまだ回路モデルを構築できるほど詳細には解明されていない。

#### (2) 大脳皮質領野間の連合回路を標識するツールの開発

我々は大脳皮質機能領野間を結ぶ連合回路の構造、形成、および機能に興味を持ち研究を行ってきた。マウス大脳皮質S1からM1への投射をモデルに、連合回路標識・操作のための分子ツールを開発しながら連合回路の形成過程解析を進めてきた。S1からM1へ投射する連合ニューロンの2/3層、5a層および6b層への分布を示した後、*Plxnd1*が2/3層および5a層に発現することに着目し、そのプロモータ領域を用いて*Plxnd1-Cre*を作製した。*Cre/loxP*システムとIUEによる独自の高感度低頻度ラベリング法を確立し、連合ニューロンの全軸索構造を単一ニューロンレベルで解析した。S1バレル野の単一の*Plxnd1*発現2/3層ニューロンは、M1と対側S1への投射を持つ多重投射ニューロンであり、M1への投射は先に伸びた交連性の主軸索から分岐する軸索側枝であった(Oka et al., *Cereb. Cortex*, 2021)。これと並行して、DNAマイクロアレイによるスクリーニングから、6b層に特徴的な発現を示す*Kcnab1*遺伝子を同定し、この遺伝子がS1バレル野6b層の連合ニューロンに発現すること、それらのニューロンは交連性の投射を持たないこと、常に6b層特異的な*Ctgf*遺伝子に対して、*Kcnab1*は生後に2-6層にも発現することを報告した(Tiong, Oka et al., *Front. Neuroanat.*, 2019)。これらの結果を踏まえ、さらに成体での連合回路の構造と機能を解析するため、重層する3つの回路を個別に標識・操作するためのノックイン・マウス(*Plxnd1-tTA* および *Ctgf-CreERT2*)を新たなゲノム編集法を開発して独自に作製した(Yoshimi et al., *Hum. Genet.*, 2020)。

### 2. 研究の目的

本研究では、S1からM1への重層並行連合回路が皮質-基底核ループと皮質-視床高次核ループを結ぶ機能回路との仮説を置き、重層並行連合回路の回路構造を明らかにする。具体的には、S1の連合ニューロンへの入力細胞を明らかにして各層が伝達する情報成分を解明し、また、M1の局所回路との接続様式の解明を通じてこの仮説を検証することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) S1連合ニューロンへの入力細胞の同定

5a層連合ニューロンへの視床POm核後部からの入力を確認するため、*Plxnd1-tTA*マウスのPOm後部に経シナプス性のAAV1-hSyn-Creを、S1にAAV-flex-tdTomatoとAAV-TRE-mEGFPを注入して、EGFP陽性のニューロンとtdTomato陽性のニューロンの分布と軸索投射

を比較した。

#### (2) 三層の連合回路の軸索投射パターンの比較解析

2/3層+5a層と6b層の連合ニューロンの軸索投射を比較するため、Plxnd1-tTA: Ctgf-CreERT2マウスのS1にAAV-TRE-mEGFPとAAV-flex-tdTomatoを注入して軸索の分布を解析した。また、2/3層と5a層の連合ニューロンの軸索投射を比較するため、Plxnd1-tTA: Ai14マウスに胎生13日目で子宮内電気穿孔法を行って5a層にpTRE-EGFPとpTRE-TAT-WGA-Creを導入し、EGFP陽性の軸索と経シナプス性に運ばれたWGA-Cre依存的にtdTomatoを発現する2/3層の軸索の分布を解析した。

#### (3) M1での後シナプス細胞の同定

M1のニューロンへのシナプス入力にはdual-eGRASP法を用いて検出した。Plxnd1-tTAマウスのS1にTRE-yellow-pre-eGRASPを、M1にはTRE-post-eGRASPを注入し、M1のニューロンの樹状突起上で再構成されたYFPのシグナル分布を解析した。また、Plxnd1-tTA: Ai14マウスのS1にAAV-TRE-TAT-WGA-Creを注入し、S1およびそれ以外の脳領域でのtdTomato発現細胞の分布を解析した。

#### (4) M1でのシナプス構造の電子顕微鏡解析

後シナプス細胞への入力の微視的構造を解析するため、S1の連合ニューロンに異なる細胞内局在性のペルオキシダーゼdAPEX2を発現させる系を構築した。イタリアのトリノ大学との共同研究で、広域連続電顕(SBF-SEM)による解析を行うことになり、そのための条件検討を開始した。

### 4. 研究成果

#### (1) 視床POm核からS1の5a層の連合ニューロンへの入力について

Plxnd1-tTAマウスの視床POm核に経シナプス的に2次細胞に感染するAAV1-hSyn-iCreを、S1にAAV-TRE-mEGFPおよびAAV-Flex-tdTomatoを注入したところ、tdTomato陽性のニューロンはEGFP陽性の5a層のみならず、2/3層や5b層にも分布していた。これはPOmからの軸索が5a層だけでなく1層にも投射していることにより、1層に樹状突起を伸ばすこれらの層のニューロンにAAV1-hSyn-iCreが感染したためと考えられる。現在、AAV-TRE-DIO-mEGFPを用いてPOmから入力を受ける5a層のニューロンをより特異的に標識できる系を用いて解析を行っている。

#### (2) 三層からの連合ニューロンの投射パターンについて

Plxnd1-tTA: Ai14マウスに胎生13日目で子宮内電気穿孔法を行って5a層にpTRE-EGFPおよびpTRE-TAT-WGA-Creを導入したところ、5a層に加えて2/3層でもtdTomato陽性細胞が検出された。EGFP陽性の5a層の軸索とtdTomato単陽性の2/3層の軸索の分布は、ほぼ同じような領域で検出されたが、たとえばM1とM2ではその量的分布に顕著な差が認められた。これは同じ領域の異なる層の持つ情報がそれぞれ適切な運動野に伝達されていることを意味している。今後は、遅れている6b層の投射パターンとの比較解析と合わせて、S1からの領域間回路がもつ機能的意義を明らかにする実験を進める予定である。

#### (3) M1での後シナプス細胞について

Plxnd1-tTA: Ai14マウスのS1にAAV-TRE-TAT-WGA-Creを注入したところ、投射先であるM1、M2、対側のS1、S2などでtdTomato陽性細胞が検出された。これらは5a層でS100A10陽性の皮質線条体ニューロンなどの終脳投射型(Intra-telencephalic, IT)ニューロンであった。現在、AAVretroを用いたdual-eGRASPによりM1の後シナプス細胞の投射タイプを同定しつつシナプス入力を検出する解析を進めている。

#### (4) dAPEX2を利用した電子顕微鏡解析について

各層の連合ニューロンに細胞内局在の異なるdAPEX2を発現させる系を構築したので、今後はM1でのシナプス微細構造の解析を進めていく。SBF-SEMを用いたトリノ大学との共同研究では、これに加えて、回路形成過程における連合性の軸索側枝の出芽メカニズムに迫る研究も進めている。

#### <引用文献>

- Audette NJ, Bernhard SM, Ray A, et al., (2019) Rapid Plasticity of Higher-Order Thalamocortical Inputs during Sensory Learning. *Neuron*. **103**(2):277-291.e4.
- Johansson Y, Silberberg G. (2020) The Functional Organization of Cortical and Thalamic Inputs onto Five Types of Striatal Neurons Is Determined by Source and Target Cell Identities. *Cell Rep*. **30**(4):1178-1194.e3.
- Manita S, Suzuki T, Homma C, et al., (2015) A Top-Down Cortical Circuit for Accurate Sensory Perception. *Neuron* **86**(5):1304-16.

- Mao T, Kusefoglu D, Hooks et al., (2011) Long-range neuronal circuits underlying the interaction between sensory and motor cortex. *Neuron* **72**(1):111-23.
- Minamisawa G, Kwon SE, Chevée M, et al., (2018) A Non-canonical Feedback Circuit for Rapid Interactions between Somatosensory Cortices. *Cell Rep.***23**(9):2718-2731.e6.
- Oka Y, Doi M, Taniguchi M, et al., (2021) Interstitial Axon Collaterals of Callosal Neurons Form Association Projections from the Primary Somatosensory to Motor Cortex in Mice. *Cereb. Cortex* **31**(11):5225-5238.
- Tiong SYX, Oka Y, Sasaki T, et al., (2019) *Kcnab1* Is Expressed in Subplate Neurons With Unilateral Long-Range Inter-Areal Projections. *Front Neuroanat.* **13**:39.
- Yamashita T, Pala A, Pedrido L, et al., (2013) Membrane potential dynamics of neocortical projection neurons driving target-specific signals. *Neuron* **80**(6):1477-90.
- Yoshimi K, Oka Y, Miyasaka Y, et al., (2021) Combi-CRISPR: combination of NHEJ and HDR provides efficient and precise plasmid-based knock-ins in mice and rats. *Hum Genet.* **140**(2):277-287.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Taniguchi Manabu, Iwahashi Misaki, Oka Yuichiro, Tiong Sheena Y. X., Sato Makoto	4. 巻 17
2. 論文標題 Fezf2-positive fork cell-like neurons in the mouse insular cortex	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0274170
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0274170	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
1. 著者名 Oka Y., Doi M., Taniguchi M., Tiong S.Y.X., Akiyama H., Yamamoto T., Iguchi T., Sato M.	4. 巻 31(11)
2. 論文標題 Interstitial Axon Collaterals of Callosal Neurons Form Association Projections from the Primary Somatosensory to Motor Cortex in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cerebral Cortex	6. 最初と最後の頁 5225-5238
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/cercor/bhab153	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
1. 著者名 Doi M., Oka Y., Taniguchi M., Sato M.	4. 巻 159(4)
2. 論文標題 Transient expansion of the expression region of Hsd11b1, encoding 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1, in the developing mouse neocortex	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 778-788
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jnc.15505	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Iguchi T., Oka Y., Yasumura M., Omi M., Kuroda K., Yagi H., Xie M.-J., Taniguchi M., Bastmeyer M., Sato M.	4. 巻 41(22)
2. 論文標題 Mutually repulsive EphA7-EfnA5 organize region-to-region corticopontine projection by inhibiting collateral extension	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 4795-4808
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI.0367-20.2021	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Yoshimi K., Oka Y., Miyasaka Y., Kotani Y., Yasumura M., Uno Y., Hattori K., Tanigawa A., Sato M., Oya M., Nakamura K., Matsushita N., Kobayashi K., Mashimo T.	4. 巻 140(2)
2. 論文標題 Combi-CRISPR: combination of NHEJ and HDR provides efficient and precise plasmid-based knock-ins in mice and rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Human Genetics	6. 最初と最後の頁 277-287
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00439-020-02198-4	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 -

〔学会発表〕 計18件(うち招待講演 1件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Yuichiro Oka, Takuto Yamamoto, Kensei Seki, Murtala Hamza Yahaya, Manabu Taniguchi, Takeru Kurose, Makoto Sato
2. 発表標題 Comparative analysis on axon projection patterns of multi-layered inter-areal projections in the mouse cerebral cortex
3. 学会等名 NEURO 2022
4. 発表年 2022年~2023年

1. 発表者名 Takuto Yamamoto, Yuichiro Oka, Makoto Sato, Shigeru Kitazawa
2. 発表標題 Inhibitory effects of static magnetic fields on spontaneous activations of primary mouse cortical neurons in culture: a Ca2+ imaging study.
3. 学会等名 NEURO 2022
4. 発表年 2022年~2023年

1. 発表者名 Yuichiro Oka
2. 発表標題 Inter-areal axon projections of cortical neurons in the mouse primary somatosensory cortex develop as interstitial axon collaterals
3. 学会等名 OIST Nervous System Assembly Workshop (国際学会)
4. 発表年 2022年~2023年

1. 発表者名 瀬木健生、岡雄一郎、佐藤真
2. 発表標題 RAM systemを用いたS1, S2のパレル領域の標識
3. 学会等名 The 128th Annual Meeting of the Japanese Association of Anatomists
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 Murtala Hamza Yahaya, Yuichiro Oka, Makoto Sato.
2. 発表標題 Cortical layers receive kcnab1-expressing neurons from the subplate
3. 学会等名 the 44th Annual Meeting of the Japanese Neuroscience Society the 1st CJK international meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Shigeno S, Sampathkumar. V, Oka Y, Vescovi R, Hanyu L, Uram T, Ferrier N, Sato M, Kasthuri NB
2. 発表標題 A multi-scale APEX electron tag 3D-electron microscopy and synchrotron X-ray analyses of the mouse cortico-striatal circuits
3. 学会等名 the 44th Annual Meeting of the Japanese Neuroscience Society the 1st CJK international meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Miyuki Doi, Yuichiro Oka, Manabu Taniguchi, Makoto Sato
2. 発表標題 The transient expansion of Hsd11b1-expression region in the eveloping mouse neocortex
3. 学会等名 The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Murtala Hamza Yahaya, Yuichiro Oka, Makoto Sato.
2. 発表標題 Characteristics and Distribution of Subplate-derived Kcnab1-expressing Cortical Neurons
3. 学会等名 The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Yuichiro Oka
2. 発表標題 行動選択機能回路ループをつなぐ皮質領野間連合回路
3. 学会等名 The 127th Annual Meeting of the Japanese Association of Anatomists (招待講演)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Tokuichi Iguchi, Yuichiro Oka, Misato Yasumura, Minoru Omi, Manabu Taniguchi, Makoto Sato
2. 発表標題 Mutually repulsive EphA7-EfnA5 signaling organize region-to-region corticopontine projection by inhibiting axon collateral extension
3. 学会等名 The 127th Annual Meeting of the Japanese Association of Anatomists
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Murtala Hamza Yahaya, Yuichiro Oka, Makoto Sato.
2. 発表標題 Origin, distribution, and morphological features of Kcnab1-expressing cortical neurons
3. 学会等名 The 127th Annual Meeting of the Japanese Association of Anatomists
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 谷口 学、岡 雄一郎、服部 美咲、Sheena Y. X. Tiong、佐藤 真
2. 発表標題 マウス島皮質において新たに見出したフォークセル様ニューロンの形態学的観察
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 瀬木 健生、岡 雄一郎、佐藤 真
2. 発表標題 RAM systemを用いたS1, S2のパレル領域の標識
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 Yuichiro Oka
2. 発表標題 Inter-areal axon projections of cortical neurons in the mouse primary somatosensory cortex develop as interstitial axon collaterals
3. 学会等名 OIST Nervous System Assembly Workshop (国際学会)
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 Yuichiro Oka, Yuka Lin, 安村 美里、Kensei Seki, Takuto Yamamoto, Murtala Hamza Yahaya, Manabu Taniguchi, Makoto Sato
2. 発表標題 Cortico-cortical projections of the intra-telencephalic (IT)-type neurons in layers 2/3 and 5a in the mouse cerebral cortex are formed as an interstitial collateral from callosal projections
3. 学会等名 The 46th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 Yuichiro Oka, Misato Yasumura, Kensei Seki, Takuto Yamamoto, Manabu Taniguchi, Makoto Sato
2. 発表標題 Development of cortico-cortical projections as an interstitial collateral from callosal projections of the intratelenchephalic (IT)-type neurons in the mouse somatosensory cortex
3. 学会等名 IBRO 2023 (11th IBRO World Congress of Neuroscience) (国際学会)
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 濱田 航平、岡 雄一郎、佐藤 真
2. 発表標題 マウス脳梁膨大後部皮質第4層神経細胞 におけるHSD11 1とSCNN1Aの共発現について
3. 学会等名 第99回日本解剖学会近畿支部学術集会
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 岡 雄一郎、安村 美里、松本 臨、瀬木 健生、佐藤 真
2. 発表標題 マウス大脳皮質5a層連合ニューロンによる回路形成の解析
3. 学会等名 第129回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年～2024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
研究 分担 者	佐藤 真	大阪大学・大学院連合小児発達学研究所・教授	
	(Sato Makoto)		
	(10222019)	(14401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	滋野 修一  (Shigeno Shuichi)  (90360560)	大阪大学・大学院医学系研究科・助教   (14401)	削除：2022年6月30日
研究分担者	谷口 学  (Taniguchi Manabu)  (30397707)	大阪大学・大学院医学系研究科・技術専門職員   (14401)	追加：2022年6月30日

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			
イタリア	トリノ大学			