

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽

研究期間：2011-2012

課題番号：23650207

研究課題名（和文）可塑性期における大脳皮質視覚野の軸索伸長・分岐のダイナミクス

研究課題名（英文）Dynamics of thalamocortical axon growth and branching in the developing visual cortex

研究代表者

山本 亘彦 (YAMAMOTO NOBUHIKO)

大阪大学・大学院生命機能研究科・教授

研究者番号：00191429

研究成果の概要（和文）：

発達期の脳における神経回路は、感覚由来の神経活動や自発発火活動によって変化することが知られているが、そのメカニズムについては不明な点が多い。本研究では、視床から大脳皮質への軸索投射に着目して、軸索のライブイメージングを行い、その動態から細胞レベルのメカニズムを明らかにすることを目指した。特に *in vivo* での視床軸索の解析を目標とし、2光子顕微鏡により、マウス脳表面から視床軸索の分岐形態を3次的に捉えることができ、また *in vitro* における解析から、軸索分岐に対する作用が発達期に依存して異なることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Neural circuits in the developing brain are remodeled by sensory-evoked and spontaneous firing activity, but the underlying mechanisms are largely unknown. In the present study, we attempted to reveal the cellular mechanism, by performing live imaging of thalamocortical axons *in vivo* and *in vitro*. As a result, thalamocortical axon arbors were observed in a three-dimensional fashion in the developing rodent brain. *In vitro* studies further demonstrated that neuronal activity in the early and late postnatal developmental stages gives a different influence on thalamic axon branching.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：挑戦的萌芽研究

科研費の分科・細目：

キーワード：大脳、視床、軸索、神経活動、イメージング

1. 研究開始当初の背景

神経回路の基本構造は遺伝的要因により構築されるが、その細部は発火活動やシナプス活動により修飾される。さらに一旦回路が

完成した後も、神経活動によって回路の再編が生ずることが知られている。発達期の大脳皮質においては、このような神経活動依存的な現象がよく記述されている。特に、大脳皮

質視覚野では、片眼遮蔽により遮蔽眼由来の外側膝状体 (lateral geniculate nucleus, LGN) 軸索の枝分かれは萎縮するのに対し、非遮蔽眼由来の LGN 軸索の分枝は複雑化し、その支配領域も拡大する。しかしながら、最近のイメージングによる研究では、げっ歯類においても生後1ヶ月 (片眼遮蔽による再編が生ずる時期) には突起の動きはほとんど生じなくなるが示されている。従って、片眼遮蔽による変化が生み出されるためには、細胞外環境または軸索自体に劇的な変化が起こっていることが予想される。この変化を説明する分子機構として、軸索成長に対する抑制因子を取り除くことなどが挙げられているものの、この再編にあたって細胞レベルで実際どのような軸索動態の変化が生じているのか全く知られていない。したがって、この脳内再編機構を明らかにするためには、まず、視床軸索のダイナミクスを詳らかにすることが必須である。その上で、自然刺激だけでなくサイレンシングを外的に与えて、その効果を調べる必要があると考えられる。

2. 研究の目的

以上を踏まえて、本研究では、発達期齧歯類の大脳皮質感覚野で軸索の成長・枝分かれのダイナミクスを *in vivo* で観察する系を構築し、神経活動依存的な回路形成の機構を明らかにすることを目指す。このために、少数の視床細胞だけを標識し、軸索分枝の動態を法と2光子レーザー顕微鏡により、タイムラプス観察を行う。さらに、視床細胞の神経活動を抑制させ、それに対する視床軸索の動態を解析する。また、*in vitro* の実験系においても、異なる発達時期で視床軸索の動態、神経活動依存性についても解析を行う。

3. 研究の方法

・視床軸索の大脳での *in vivo* 観察

視床軸索の成長・分枝形成を *in vivo* で調べるために、蛍光タンパクにより標識した視床軸索をマウス大脳皮質体性感覚野において経時的に観察した。この実験のために、まず胎生

10-11日マウスの視床に蛍光タンパク質の遺伝子を含む発現ベクター (CAGGS-Enhanced Yellow Fluorescent Protein, EYFP) を子宮内電気穿孔法によって導入した。神経活動を抑制するためには、内向整流型カリウムチャンネル Kir2.1 遺伝子配列を含む CAGGS-Kir2.1 ベクターを CAGGS-EYFP と共に導入した。標識軸索を観察するためには、生後に頭蓋骨越しあるいは硬膜越しに、2光子顕微鏡を用いた。ただし、通常の子宮内電気穿孔法で遺伝子導入を行った場合、多数の視床細胞が標識されるために、軸索が混在し個々の軸索の成長・枝分かれの動態を観察することは困難であることが予想される。この問題点を克服するためには、pCAG-loxp-neo-loxp-EYFP と pCAG-Cre の2種類のプラスミドを適当な比率で混合して遺伝子導入した。

・培養下視床軸索の観察

培養下に視床軸索を観察するためには、生後1日目のラットから切り出した厚さ約 300 μm の大脳皮質の切片と、胎生15日目のラットの視床切片を、視床が大脳皮質の腹側に来るように配置して、コラーゲンを塗布したミリセル上で培養した。軸索形態を観察しやすいように少数の視床軸索を可視化するために、シングルエレクトロポレーション法 (Uesaka et al., 2008) を用いた。視床軸索を蛍光標識するためには、培養1日目の視床細胞に EYFP 発現ベクターを導入した。さらに、神経活動を低下させるためにはテトロドトキシン (100 nM) を培養液中に加えた。観察のためには、共焦点レーザー顕微鏡を用いた。

4. 研究成果

まず胎生期マウス (胎生10-11日) の背側視床に蛍光タンパク質 EYFP の遺伝子を子宮内電気穿孔法により導入し、生後数日で *in vivo* で標識された視床皮質軸索の観察を行った。その結果、頭蓋骨越しでの観察は達成されなかったが、硬膜越しには標識軸索が捕らえられ、主として体性感覚野で標識軸索が4層近傍で分岐

を形成することが見いだされた。さらに、個々の軸索の形態・動態を観察するために、pCAG-loxp-neo-loxp-EYFPとpCAG-Creの2種類のプラスミドを導入することにより、数少ない軸索標識を得ることができた。Kir2.1の遺伝子導入も達成された。

これら幼若動物においては手術後の結合組織の出現などが観察を阻害し、タイムラプス観察には至っていないものの、これまでの2光子顕微鏡での観察では、基本的に1層から2/3層での細胞動態の観察に限られていることを考えると、4層付近で繊細な軸索観察が可能になったことは今後の軸索動態の解析に展望が開けた。

次に、再編成が起こっている時期の視床皮質軸索の枝分かれに対する神経活動の役割を調べることを目的に、視床皮質共培養を用い、視床軸索がある程度枝分かれを形成し、再編成が起こっていると考えられる培養14日目に神経活動を阻害し、その後の視床軸索の形態変化を1-2日ごとにタイムラプス観察した。

視床軸索がある程度枝分かれを形成した培養14日目前後で軸索形態の変化を調べるため、EYFPで標識された視床軸索を培養14日目から1-2日ごとに共焦点顕微鏡を用いて、タイムラプス観察を行った。枝を付加（前の観察では見られなかったが、次の観察で新しく出てきた枝）、除去（前の観察では見られたが、次の観察では消失していた枝）、伸長（前の観察と比べて5 μ m以上伸びた枝）、退縮（前の観察と比べて5 μ m以上縮んだ枝）に分類した。培養14日目までを対象とした先行研究（Uesaka et al., 2007）の結果と比べると、付加・伸長した枝の数の割合は、培養14日目以前に比べると小さくなり、除去・退縮した枝の数もあまり大きな差が見られず、培養14日目前後で枝分かれの変化の仕方にモード変化があると考えられる。次に、培養14日目にナトリウムイオンチャネル阻害剤であるテトロドトキシン

(TTX, 100nM)を培養液中に投与することで神経活動を阻害したことによる軸索の形態変化を観察した。培養14日以前と異なり、神経活動を阻害した場合においても、神経活動が活発な場合（コントロール）と同様に枝の付加・除去が常に起こっており、総枝分かれ数、軸索成長のどちらともやや増大する傾向が見られた。すなわち、神経活動の役割は枝形成時と異なり、分岐形成に対して抑制的に作用することが示唆される。

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 7 件）

1. Arnoux I, Hoshiko M, Mandavy L, Avignone E, Yamamoto N, Audinat E (2013) Adaptive phenotype of microglial cells during the normal postnatal development of the somatosensory "barrel" cortex, *Glia*, in press, 査読有
2. Sato H, Fukutani Y, Yamamoto Y, Tatara E, Takemoto M, Shimamura K, Yamamoto N (2012) Thalamus-derived molecules promote survival and dendritic growth of developing cortical neurons. *J Neurosci* 32:15388-15402, 査読有
3. Hoshiko M, Arnoux I, Avignone E, Yamamoto N, Audinat E (2012) Deficiency of the microglial receptor CX3CR1 impairs postnatal functional development of thalamocortical synapses in the barrel cortex. *J Neurosci* 32:15106-15111, 査読有
4. Yamamoto N, Lopez-Bendito G (2012) Shaping Brain connections through spontaneous neural activity. *Eur J Neurosci* 35: 1595-604, 査読有
5. Fukunishi A, Maruyama T, Zhao H, Tiwari M, Kang S, Kumanogoh A, Yamamoto N (2011) The action of Semaphorin7A on thalamocortical axon branching. *J Neurochem* 118: 1008-15, 査読有

6. Zhao H, Maruyama T, Hattori Y, Sugo N, Takamatsu H, Kumanogoh A, Shirasaki R, Yamamoto N (2011) A molecular mechanism that regulates medially oriented axonal growth of upper layer neurons in the developing neocortex. *J Comp Neurol* 519: 834-48, 査読有
7. Takemoto M, Hattori Y, Zhao H, Sato H, Tamada A, Sasaki S, Nakajima K, Yamamoto N (2011) Laminar and Areal Expression of Unc5d and Its Role in Cortical Cell Survival. *Cereb Cortex* 21: 1925-1934, 査読有

[学会発表] (計 15 件)

1. 山本 亘彦 神経活動依存的な軸索分岐のリモデリング、第 90 回日本生理学会大会、2013.3.27-29、東京
2. 山本 亘彦 「神経活動依存的な軸索分岐の制御機構」神経組織の成長・再生・移植研究会.第 27 回学術集会、2012.10.26-27、東京
3. Hayano Y, Sasaki K, Takemoto M, Maeda Y, Yamashita T, Ohmura N, Hata Y, Kitada K, Yamamoto N Activity-dependent expression of Netrin-4 regulates thalamocortical axon branching, Society for Neuroscience 42nd annual meeting, 2012.10.13-17, New Orleans, USA
4. Malyshevskaya O, Shiraishi Y, Tanabe Y, E.S. Ruthazer, Yamamoto N The role of neuronal activity in cortical axon growth: A time-lapse study using optogenetic control, Society for Neuroscience 42nd annual meeting, 2012.10.13-17, New Orleans, USA
5. Yamamoto N, “Molecular mechanisms of thalamocortical axon branching: Nature and nurture programs” The 35th Annual Meeting of the Japan Neuroscience society, 2012.9.18-21, Nagoya
6. 松本 直之、山本 亘彦 : 視床皮質軸索の枝分かれ形成に対するシナプス形成の役割、第 35 回日本神経科学大会、2012.9.18-21、名古屋
7. 佐藤-竹本 晴香、畠山 淳、山本 亘彦、嶋村 健児 : マウス大脳皮質における入力線維依存的な領野特異的細胞構築、第 35 回日本神経科学大会、2012.9.18-21、名古屋
8. Matsumoto N, Kotera M, Yamamoto N : Involvement of synapse formation In thalamocortical axon branching, 第 34 回日本分子生物学会、2011.12.13-16, 横浜
9. Shiraishi Y, Malyshevskaya O, Yamamoto N : Role of neuronal activity in cortical axonal growth: A study using a photostimulation technique with Channelrhodopsin-2, 第 34 回日本分子生物学会、2011.12.13-16, 横浜
10. 早野 泰史, 竹本 誠, 前田 有里枝, 北田 一博, 山本 亘彦: 感覚入力によって発現する Netrin-4 が視床皮質投射における軸索枝分かれ形成を制御している、第 34 回日本神経科学大会、2011.9.14-17、横浜
11. Alchini R, Sugo R, Yamamoto N, Nucleocytoplasmic translocation of the histone deacetylase 9(HDAC9) regulates thalamocortical axon branching, Cortical Development Meeting 2011.5.19-22, Crete, Greece

[その他]

ホームページ等

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/neurobiol/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本亘彦 (YAMAMOTO, NOBUHIKO)

大阪大学・大学院生命機能研究科・教授

研究者番号 : 00191429

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし