

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26430029

研究課題名(和文) 一次視覚野 局所神経回路形成の分子メカニズム

研究課題名(英文) Molecular mechanisms underlying subnetwork formation in V1

研究代表者

宮下 俊雄 (Miyashita, Toshio)

帝京大学・医学部・講師

研究者番号：80415314

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、胚発生期に大脳皮質の神経前駆細胞において発現し、多くの遺伝子の発現を制御するDNAメチル基転移酵素Dnmt3bに着目し、機能的神経回路との関わりを探った。Dnmt3b KOマウスよりiPS細胞を樹立し、KO遺伝型と野生型細胞を併せ持つキメラマウスを作製した。このキメラマウスに様々な方位と空間周波数よりなる縞刺激を呈示し、一次視覚野より視覚応答を、in vivoカルシウムイメージングにより記録した。解析の結果、KO細胞群では方位選択性が野生型細胞群に比べて低かった。以上の結果は、神経前駆細胞でのゲノムDNAへのメチル化制御が一次視覚野神経細胞の反応特性に影響を与える可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：Specific neuronal connections (subnetworks) in the sensory cortex are thought to be fundamental for information processing. Some studies have suggested a cell lineage contribution to establish cortical subnetworks. That is, excitatory neurons arising from a same neural progenitor cell have shown higher synaptic connection probabilities and responses to similar sensory stimuli. However, little is known about the molecular mechanisms for subnetwork formation. We focused on the function of Dnmt3b, which regulates the expression of cPcdh isoforms, a family of adhesion molecules, in the neural progenitors. We recorded the visual neural responses from Dnmt3b-KO and wild-type neurons in V1 of mice using 2 Photon Ca<sup>2+</sup> imaging. We observed: (i) the response strengths of Dnmt3b-KO neurons were comparable to normal neurons, and (ii) lower orientation tuning (OSI) in Dnmt3b-KO neurons. These results suggest the involvement of Dnmt3b in the establishment of cortical neural network specifications.

研究分野：神経科学

キーワード：一次視覚野 in vivo カルシウムイメージング 微小神経回路 大脳皮質 2光子顕微鏡イメージング  
Cal590 Dnmt3b cPcdh

### 1. 研究開始当初の背景

大脳皮質局所神経回路には、特異的な神経結合により非常に微細なスケールの神経回路(サブネットワーク)を形成する神経細胞群が存在する。マウス一次視覚野(V1)では、これらサブネットワークを構成する神経細胞群が類似した刺激選択性を持つ事が知られている。特定の刺激選択性を持つサブネットワークが多数存在する事により、局所神経回路が処理する情報に多様性が生じ、脳の多様な機能の発現が可能になると考えられている。ではサブネットワークはどのような機構により生み出されるのか?最近、同じ神経前駆細胞から誕生した姉妹細胞群が異なる前駆細胞由来の細胞群と比較して、高い割合で神経結合を持ち、さらに類似した刺激選択性を示すことが報告された。つまり細胞系譜がサブネットワーク形成やその機能発現に関与していることが強く示唆されている。このようにサブネットワーク形成機構の一端は明らかになってきたが、そこに係わる分子メカニズムについては不明な点が多い。神経細胞の多様な個性は、その個性を規定するような遺伝子の発現パターンによって決まると考えられている。本研究ではサブネットワークを構成する個々の神経細胞の個性を規定する候補分子として、細胞接着分子クラスター型プロトカドヘリン(cPcdh)に着目した。cPcdhは58種類のアイソフォームを持つ遺伝子ファミリーであり、シナプス形成期に、ランダムな組み合わせで個々の神経細胞に10数種の異なったアイソフォームが発現する。シナプスに局在する4量体を形成したcPcdhがホモフィリックに結合することで、標的ニューロンの認識が可能となり、つまり、特異的な神経結合形成がcPcdhの発現パターンに依存する可能性が示唆されている。そこで同じ神経前駆細胞から誕生した姉妹細胞群が同じcPcdhアイソフォームを発現しているという作業仮説を立て、cPcdhの機能障害体等を用いてサブネットワークの機能解析を行い、cPcdhと機能的神経回路形成の関係を探る。

### 2. 研究の目的

高次脳機能を司る大脳皮質の神経細胞群は特異的な神経結合を形成し、構築された局所神経回路が情報をコードする一つの機能単位であると考えられる。この特異的な神経結合が多様性を持つ事で複雑かつ精密な神経回路を形成する。多様な特異的神経結合により構築される大脳皮質局所神経回路がどのようなメカニズムで形成されるかについて、知見は少ない。一つの可能性として、局所神経回路及びその構成素子である神経細胞の多様性が、その個性を決めるような遺伝子発現パターンによって決まると考えられる。そこで本研究では、マウス一次視覚野を対象とし細胞接着分子クラスター型プロトカドヘリン(cPcdh)の遺伝子発現パターンを念頭に

置き解析を試みる。cPcdhは58種類のアイソフォームを持つ遺伝子ファミリーであり、シナプス形成期にランダムな組み合わせで個々の神経細胞に10数種の異なったアイソフォームが発現することが知られる。その遺伝子発現パターンは胚発生期に神経前駆細胞においてcPcdhゲノムDNAのメチル化によって制御されると考えられており、関与するDNAメチル基転移酵素はDnmt3bであると考えられている。そこでDnmt3bに着目し、その機能がどのように生後の視覚野神経細胞の視覚反応特性の形成に関与し、局所回路の形成に係わるかを明らかにすることを旨とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) キメラマウスの作製

同一の神経前駆細胞より分化した姉妹細胞群を標識可視化するためにGFPを全身で発現する野生型マウス、またはDnmt3b欠損マウス(野生型Green mouseおよびDnmt3b KOマウス)の胎児線維芽細胞よりiPS細胞を樹立し、未分化のiPS細胞を野生型マウスの胚盤胞へ移植し、仮母マウスの子宮へ戻す事でキメラマウスを作製した。産仔は自然分娩により出産され以下の実験に用いるまで通常飼育により管理した。

#### (2) 蛍光二重 *in situ* hybridization

同一の神経前駆細胞より分化した姉妹細胞群におけるcPcdhアイソフォームの発現を調べるために蛍光二重 *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。cPcdhは標識されたりボプローブにより染色し、移植されたiPS細胞より分化した姉妹細胞群はGFPに対する抗体染色により標識した。

#### (3) 二光子励起顕微鏡による生体内カルシウムイメージング

野生型およびDnmt3b KOキメラマウスの右一次視覚野(深さ300マイクロメートル)へ赤色蛍光カルシウム指示薬Ca1590を微量注入し、一次視覚野の第2/3層の神経細胞を標識した。イソフルラン麻酔下のキメラマウスの左目より19センチのところへモニターを置き、30度ごとの異なる方位と異なる空間周波数よりなる縞刺激並びにブランク刺激を提示した。刺激に対する一次視覚野の各細胞の応答をカルシウムシグナルとして4ヘルツ、励起波長770nmでNikon A1 MP顕微鏡によりイメージングを行った。

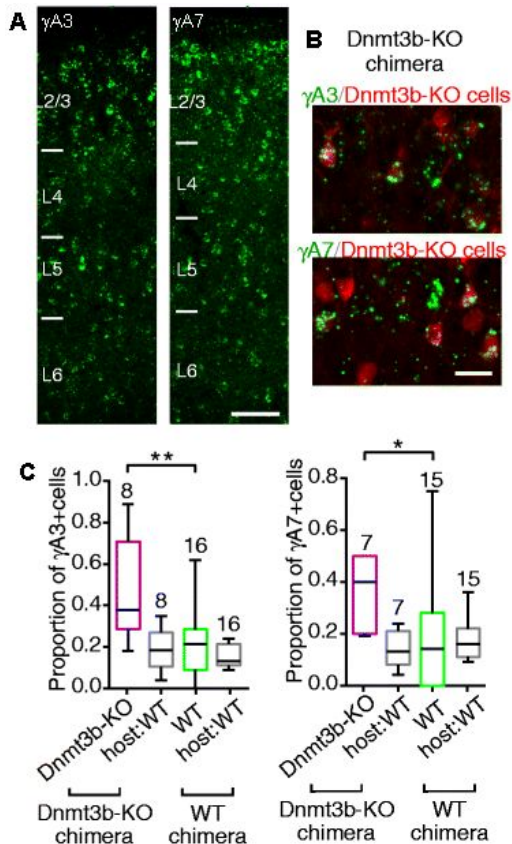
#### (4) 視覚反応解析

イメージングデータはImageJ及びMatlabにより解析を行った。各細胞の蛍光輝度変化値は刺激提示直前をF0としてdF/F0を計算した。ブランク刺激を含む全刺激に対する応答に対してANOVA解析を行い、視覚反応を示す細胞を同定し、これらの内でブランク刺激を除いた刺

激に対して ANOVA 解析を行い、刺激選択性のある細胞群を同定した。刺激選択性に関しては方位選択性 (OSI; Orientation Selective index) 及び方向選択性 (DSI; Direction Selective index) を指標に解析を行った。また、刺激選択性をもつ細胞群は、全方位に対する反応強度をスムージング処理することで、各細胞の至適角度を求めた。各細胞の至適角度の差分を計算し、姉妹細胞間と非姉妹細胞間における至適角度の類似性を検証した。

#### 4. 研究成果

本研究では、同一の神経前駆細胞に由来して分化した姉妹神経細胞間において、類似した刺激選択性を示すことが大脳皮質微小神経回路の機能を反映していると考えた。そこで、iPS 細胞の胚への移植によって作製したキメラマウスの一次視覚野において蛍光タンパクにより標識された姉妹細胞群を対象に機能解析を行った。



A; cPcdh  $\gamma A3$  及び  $\gamma A7$  の蛍光 in situ ハイブリダイゼーションの染色像  
B; cPcdh と移植された細胞が発現する GFP との二重染色。  
C; cPcdh アイソフォーム陽性細胞率。Dnmt3b KO 細胞ではどのアイソフォームも多くの細胞で発現している。(Tarusawa et al., 2016 より)

まず、姉妹細胞群が同じ cPcdh のアイソフォームを発現しているかを調べるために、蛍光二重染色により GFP と cPcdh アイソフォーム

の発現を精査した。その結果、特定の cPcdh アイソフォームが姉妹細胞群で多く発現する傾向も確認でき、微小神経回路の形成に cPcdh の発現パターンが重要である可能性が示唆された。

cPcdh の神経細胞群におけるランダムな発現パターンは胎生期に神経前駆細胞でのゲノムメチル化によって制御されていると考えられており、実際に小脳プルキンエ細胞ではメチル基転移酵素 Dnmt3b の機能を阻害すると、cPcdh 発現の特異性がなくなりほぼすべての cPcdh アイソフォームが発現するようになることが知られている。そこで大脳皮質においても同様の制御を受けているかを調べるために Dnmt3b ノックアウトマウスより樹立した iPS 細胞を用いて作製したキメラマウスにおける cPcdh の発現を検証した。その結果 Dnmt3b KO 細胞群では cPcdh 各アイソフォームの発現率が著しく高く (図 C)、小脳と同様に cPcdh の発現が Dnmt3b によるゲノム DNA のメチル化によって制御されていると考えられた。この結果を受けて、Dnmt3b KO 細胞群により構成される微小神経回路は cPcdh の発現特性を失った神経回路と考えた。そこで Dnmt3b KO キメラマウスを使い、一次視覚野を対象として微小神経回路の機能解析を行った。

麻酔下のキメラマウス左目前方に刺激提示用モニターを設置し、様々な方位と空間周波数よりなる縞刺激を呈示した。同一個体の右一次視覚野より GFP によって標識された iPS 細胞に由来する移植細胞、並びに宿主動物由来の野生型細胞を赤色蛍光カルシウム指示薬 Ca1590 により染色し、その視覚応答を二光子励起顕微鏡を用いた *in vivo* カルシウムイメージングにより記録した。

解析の結果、Dnmt3b KO 細胞と野生型細胞で視覚刺激に対する応答強度には差がなかった。KO 細胞群の空間周波数選択性は野生型細胞と同程度であったが、方位に関しては最適刺激以外の刺激に対する応答が高く、その結果として方位選択性 (OSI) が野生型細胞群に比べて低かった。以上の結果は、神経前駆細胞でのゲノム DNA へのメチル化制御が、生後の一次視覚野神経細胞の反応特性に影響を与える可能性を示唆する。

次いで姉妹神経細胞間における類似した刺激選択性の解析を行った。野生型細胞により構築される微小神経回路では、近傍の姉妹細胞群で似た視覚刺激に応答することが知られており、本実験においてもいくつかの動物で再現することができた。一方でノックアウトマウスではその傾向が弱く類似性は低かった。しかし、現在まで解析の終わった個体では移植細胞の比率が高いキメラマウス個体においては野生型であっても類似した刺激選択性を示さないものもあった。これは個体内で移植細胞の比率が高いゆえにイメージングの対象とする関心領域内に複数の微小神経回路が含まれるためであると考えて

いる。現在までにさらに実験例を増やしデータを集めた。現在は移植細胞の比率と刺激選択性に関して改めて解析を行っている。

#### 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 1 件)

1. Tarusawa E, Sanbo M, Okayama A, Miyashita T, Kitsukawa T, Hirayama T, Hirabayashi T, Hasegawa S, Kaneko R, Toyoda S, Kobayashi T, Kato-Itoh M, Nakauchi H, Hirabayashi M, Yagi T, Yoshimura Y (2016) Establishment of high reciprocal connectivity between clonal cortical neurons is regulated by the Dnmt3b DNA methyltransferase and clustered protocadherins. BMC Biol. 2016; 14: 103. (査読あり)  
doi:10.1186/s12915-016-0326-6

[学会発表](計 3 件)

1. Tarusawa E, Sanbo M, Okayama A, Miyashita T, Kitsukawa T, Hirayama T, Hirabayashi T, Hasegawa S, Hirabayashi M, Yagi T, Yoshimura Y. High reciprocal connectivity between clonal cortical neurons is based on epigenetic regulation. Society for Neuroscience 2016. 2016. 11. 16 (San Diego, USA)
2. 宮下俊雄、三宝誠、平林真澄、八木健、吉村由美子。Dnmt3b によるゲノムメチル化を介した一次視覚野神経細胞の機能発達  
名大生理研合同シンポジウム 2017. 9. 9 (愛知県岡崎市、生理学研究所)
3. 宮下俊雄、三宝誠、平林真澄、八木健、吉村由美子。大脳皮質神経細胞群の多様な個性の獲得における DNA メチル化の関与  
第 1 2 3 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2018. 3. 31 (東京都武蔵野市、日本医科大学武蔵境校舎・日本獣医生命科学大学)

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：

出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

宮下 俊雄 (Miyashita, Toshio)  
帝京大学・医学部・講師  
研究者番号：80415314

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )