

156. 発達期大脳皮質の細胞種特異的な集団同期活動制御

玉川 (中川) 直

鹿児島大学 大学院医歯学総合研究科 神経筋生理学分野

Key words : 大脳皮質, 神経活動制御, ギャップ結合, 回路形成

緒言

大脳皮質の興奮性細胞には多くの種類が存在し、それぞれ独自の回路を持つ。分布パターンや主要な投射先は、主に遺伝子プログラムによって出生頃までにおおむね決定される。一方、その後の発達期の詳細な投射パターンや皮質内局所回路などの精密な回路の形成には、細胞集団の自発的な同期活動による活動依存的なメカニズムが関わってくると考えられている [1]。この機能の破綻は自閉症やてんかんなどの精神疾患につながる可能性がある。近年著者らは、マウス急性脳スライスを用いた実験で、発達期の興奮性細胞がギャップ結合による精密なネットワークを持ち、ギャップ結合を持つ細胞同士の活動を適切なレベルに調節することで発達期の神経回路形成を制御している可能性を明らかにした [2, 3]。しかし、生体内で第 5 層の神経細胞集団はどのような同期活動を行っていて、そこにギャップ結合はいかに関わるか？神経活動レベルの調節はいかに神経回路形成に重要か？など大きな問いが残っている。このような背景から、本研究では第 1 に第 5 層神経細胞の集団同期活動の解析を試み、第 2 に神経活動レベルを人為的に操作した際の発達期大脳皮質の回路形成への影響を解析した。

方法および結果

1. 発達期大脳皮質の集団同期活動の解析

生体マウス脳の単一細胞レベルイメージングには二光子顕微鏡が必要である。本実験は、共同研究者の水野秀信特任准教授が熊本大学で持つ二光子顕微鏡を私が使用して、水野らが近年報告した論文に習って行い [4]、まずは技術習得の目的で第 4 層の細胞から計測を行った。胎生 14 日のマウス胎児に子宮内電気穿孔法で、神経活動を光に変換する Ca^{2+} 指示緑色蛍光タンパク質 GCaMP の発現プラスミドを右脳の第 4 層細胞に導入した。生後 5 日のマウスから頭皮を切開し、頭蓋骨越しに GCaMP 蛍光を蛍光実体顕微鏡で観察し、ヒゲに触れた際の GCaMP 蛍光輝度上昇を確認する方法で仔の選別を行った。良い発現が見られたマウスにおいて、カミソリの刃で右脳一次体性感覚野バレル皮質（ヒゲの感覚を司る脳領域）上の頭蓋骨に穴を開け、直径 3 mm の円形のカバーガラスを載せ、アガロースゲルで周囲を覆った後にデンタルセメントで固定した。左脳には軽量のチタンバーを固定した。麻酔下でチタンバーを固定して頭部固定した状態でマウスを二光子顕微鏡下に置き GCaMP イメージングを開始し、麻酔濃度を下げていくと、バレル皮質の脳表から 250 μm 深部に当たる第 4 層から、水野らが報告したのと同様に個々のバレルで散発的なパッチワーク状同期活動が観察された (図 1) [5]。

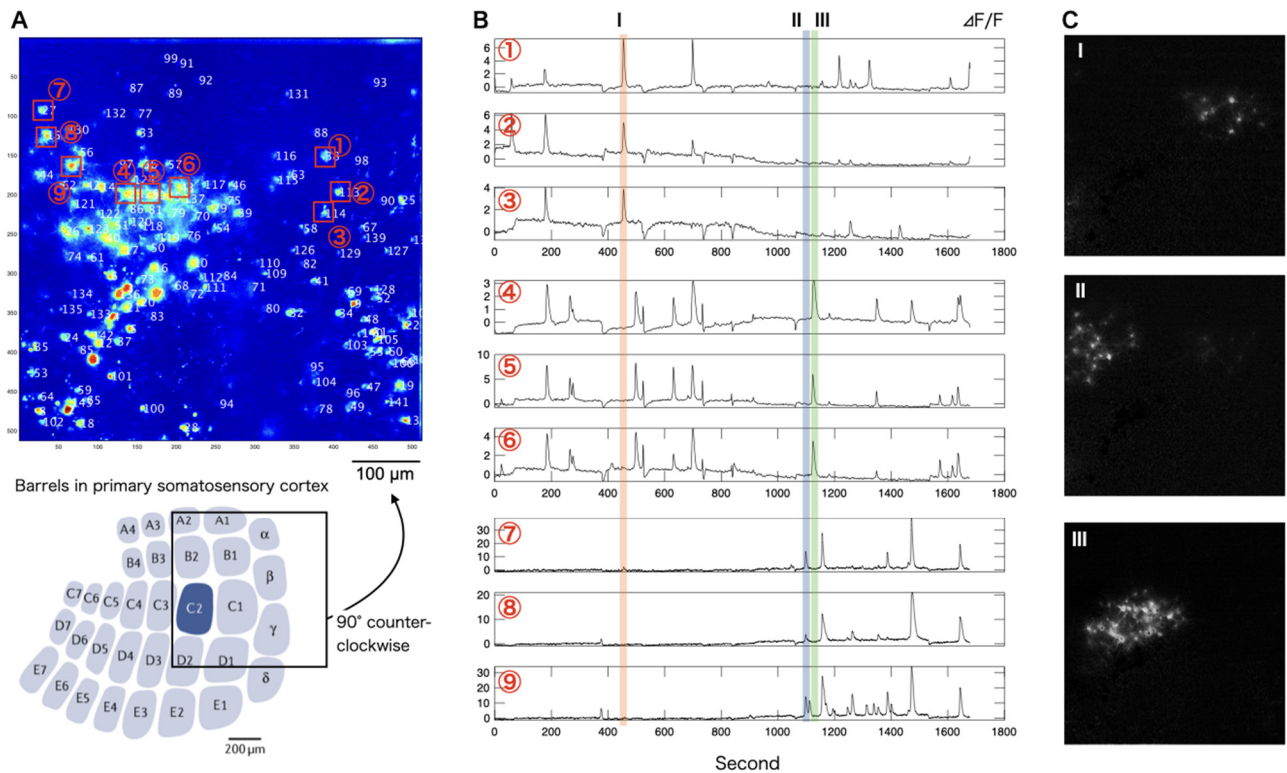


図1. 新生児マウスのバレル皮質における自発的パッチワーク状同期活動

- A) 上：二光子顕微鏡で取得した生体マウスにおける第4層細胞のGCaMP蛍光画像。下：バレル配置と予想されるイメージング位置。
- B) Aで示した、3つずつの近接する細胞間で同期したGCaMP輝度上昇。
- C) BにI、II、IIIで示した時間の平均画像からバックグラウンド画像を引いた画像。個々のバレルに対応すると想定される限局した細胞集団で同期活動が見られた。

次に、第5層で同期活動を調べるため、胎生12日のマウス胎児に子宮内電気穿孔法でGCaMPを導入した。8匹の妊娠マウスから計36匹の仔の出産を得られた。胎生12日の脆弱な胎児への子宮内電気穿孔法では、発生の停止や母マウスへのストレスによる喰殺といったリスクがあるため、この産子数の多さは優秀だと考えられる。生後2~3日で逆行性赤色蛍光トレーサーであるalexa fluor 555結合コレラ毒素Bサブユニットを脳幹に投与して第5層皮質下投射細胞をラベルした。ギャップ結合ネットワークが見られた生後6~7日において、前述と同様の手術を行い、第5層においてイメージングを行い無麻酔下で自発的に生じる集団同期活動の観察を試みた。しかし、以下に述べる理由から、この実験方法では目的の解析を行うのに効率が悪く不適切であることがわかり、実験には成功しなかった。1) 子宮内電気穿孔法では脳の局所にしかGCaMPが導入されず、その位置にイメージング窓を作る必要があるが、第5層では頭蓋骨越しにGCaMP蛍光が見られず、遺伝子導入された個体の選別や発現位置の特定ができなかった。2) 新生児への逆行性トレーサー投与では、頭皮を切開して頭蓋骨越しにガラス針を刺入して注入し生体用アロンアルファで頭皮を接着する方法がよく使われるが、頭蓋骨にもアロンアルファが付くため頭蓋骨の発達が阻害され、頭蓋骨に穴を開けるときに頭蓋縫合部が開いてしまい脳脊髄液の漏出や出血という問題が生じた。3) 第5層細胞のうち子宮内電気穿孔法で目的遺伝子が導入される確率は10%以下と考えられ、細胞間の活動同期性を調べるには効率が悪かった。今回明らかになった問題点は、特に1)と2)は試して初めて判明したことであり、現在、新生児マウスからのGCaMP生体イメージングによる自発活動計測の方法をまとめ学術雑誌に投稿する予定であり、そこに盛り込むことを検討している。

2. 発達期大脳皮質の神経活動レベル操作による回路形成への影響の解析

マウスにおいて細胞集団の同期活動が見られる胎児期から生後 2 週の発達期には、大脳皮質の回路形成が急速に進む。この時期に進む回路形成プロセスとして、神経前駆細胞から生まれた細胞が正しい位置に移動するプロセスと、異なる脳領域を正しく結ぶ長距離軸索投射プロセスがある。本研究では、第 2/3 層神経細胞を対象に、これら 2 つの回路形成プロセスをモデルにして、神経活動レベルの調節がいかに重要なかを検討した。電位依存性ナトリウムチャンネル Nav1.2 およびその機能獲得型変異であり発達性およびてんかん性脳症 11 (Developmental and epileptic encephalopathy 11 : DEE11) 原因変異でもある T773I 変異体を [6]、赤色蛍光タンパク質 RFP とともに胎生 15 日のマウス胎児に子宮内電気穿孔法で第 2/3 層細胞に強制発現させ、神経活動を亢進させた。細胞移動および脳梁軸索投射パターンが完成する生後 2 週で脳を固定し、脳切片を共焦点顕微鏡で撮影して形態学的に画像を解析した。細胞移動は一次体性感覚野 (S1) バレール皮質で解析し、脳梁軸索投射は一次体性感覚野と二次体性感覚野の境界 (S1/S2) で解析した。結果、Nav1.2^{T773I} の強制発現は一部の細胞で細胞移動を障害した (図 2a)。また脳梁投射軸索の白質における伸長を顕著に減少させ、反対側皮質への軸索投射を完全に消失させた (図 2b)。これらの影響は、ナトリウムイオン流入亢進による神経活動亢進が遺伝子発現変化やその他の影響を引き起こした結果だと考えられる。

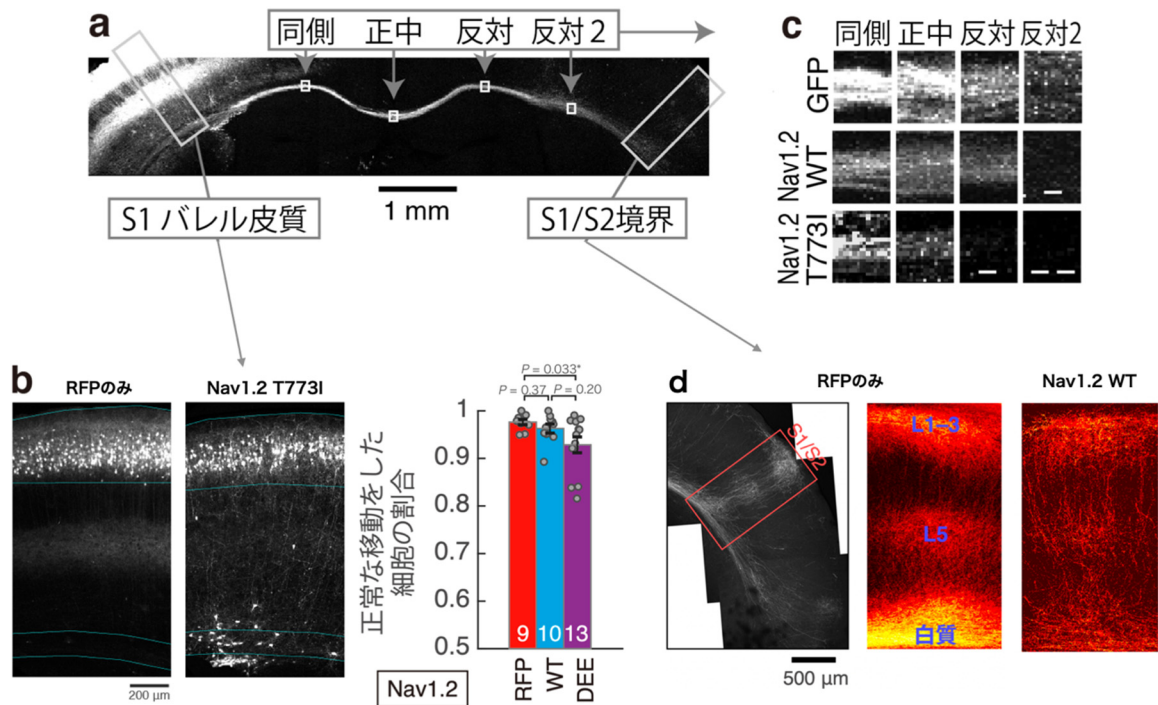


図 2. Nav1.2 およびその機能獲得型変異体 T773I 導入による皮質回路形成への影響

- 第 2/3 層細胞に RFP のみ導入したマウス個体の生後 2 週における脳冠状断切片の共焦点画像。
- RFP のみおよび Nav1.2^{T773I} を導入したマウス脳の同側 S1 バレール皮質の画像および正常な移動を示した細胞の割合のグラフ。RFP のみまたは野生型 Nav1.2 を遺伝子導入した細胞は、ほぼすべてが正常に脳表近くの第 2/3 層まで移動した。一方、Nav1.2^{T773I} を導入した場合には全体の約 9% の細胞で移動に障害が見られた。エラーバー：標準誤差。マン・ホイットニーの U 検定。
- 脳梁における軸索の伸長は、野生型 Nav1.2 を遺伝子導入した個体では部分的に低下し、Nav1.2^{T773I} を導入した個体では反対側皮質までの伸長が完全に消失した (c)。結果、通常は S1/S2 境界に集中する脳梁投射軸索が野生型 Nav1.2 導入個体では減少し、Nav1.2^{T773I} 導入個体では消失した (d、Nav1.2^{T773I} 導入個体ではシグナルが皆無のため表示せず)。

考 察

本研究は、新生児期の脳皮質でどのような神経活動が生体脳内で実際に起きているかを調べ、神経活動調節が回路形成にいかに関与しているかを検討した。

前者は、難技術である新生児マウスからの生体脳活動イメージングに成功したが、方法論の問題から第5層での検討はできなかった。この研究の成功には、1. 特定の細胞種が組換え酵素 Cre を発現する遺伝子改変マウスに、Cre 依存的に GCaMP 発現を誘導するウイルスを導入する方法で、広範囲のより多数の特定の神経細胞に GCaMP を導入すること（この方法では逆行性トレーサー投与による細胞種特定も不要になる）、2. ピエゾ素子による対物レンズ操作で高速に観察面を上下させ三次元的にイメージングする二光子顕微鏡の使用、が望まれる。1. に関しては、新生児期において皮質下投射細胞で選択的に Cre を発現する *Rbp4-Cre* マウス、もう1種の第5層細胞である反対側投射細胞で Cre を発現する *Tlx3-Cre* マウスをそれぞれ導入することで、2種類の第5層細胞でそれぞれ同期活動を観察する準備を行っている。二光子顕微鏡は鹿児島大学に近く入る予定のものの使用を想定している。イオンや小分子を通ず細胞間結合であるギャップ結合は、神経活動を調節することで脳皮質の回路発達を活動依存的に制御することが示唆されている [7]。同期活動を計測できた後にギャップ結合の機能をドミナント・ネガティブ体コネクシンなどによって操作することで、第5層ギャップ結合ネットワークの細胞種特異的な集団同期活動および神経回路形成における関与を明らかにしていく。

後者では DEE11 の原因となる *Nav1.2* の機能獲得型変異 T773I 導入による神経活動亢進を用いて、細胞の配置と軸索の長距離投射に障害が起きることを明らかにした。内向き整流性カリウムチャンネル *Kir2.1* の導入による神経活動抑制が軸索伸長を低下させることが過去に報告されており [8]、神経活動亢進も同様に伸長抑制するという結果は意外であった。同じ変異を持つ DEE11 患者でもこうした回路異常が起きている可能性を示唆する。現在、DEE11 の他の原因変異による影響を同様に解析しており、回路異常が起きるメカニズムを追究する。また、第5層でも神経活動の亢進と抑制が同様の回路異常を引き起こすか否かを今後明らかにし、ギャップ結合ネットワークによる神経活動レベル調節の重要性を探っていく。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、熊本大学国際先端医学研究機構の水野秀信特任准教授である。多大な協力にこの場を借りてお礼申し上げます。

文 献

- 1) Tagawa Y, Hirano T. Activity-dependent callosal axon projections in neonatal mouse cerebral cortex. *Neural Plast.* 2012;2012:797295. Epub 2012 Nov 19. PMID: 23213574. doi: 10.1155/2012/797295.
- 2) Maruoka H, Nakagawa N, Tsuruno S, Sakai S, Yoneda T, Hosoya T Lattice system of functionally distinct cell types in the neocortex.. *Science.* 2017 Nov 3;358(6363):610-615. PMID: 29097542. doi: 10.1126/science.aam6125.
- 3) Nakagawa N, Hosoya T. Slow Dynamics in Microcolumnar Gap Junction Network of Developing Neocortical Pyramidal Neurons. *Neuroscience.* 2019 May 15;406:554-562. Epub 2019 Feb 20. PMID: 30794844. doi: 10.1016/j.neuroscience.2019.02.013.
- 4) Mizuno H, Nakazawa S, Iwasato T. In Vivo Two-photon Imaging of Cortical Neurons in Neonatal Mice. *J Vis Exp.* 2018 Oct 18;(140):58340. PMID: 30394388. doi: 10.3791/58340.

- 5) Mizuno H, Ikezoe K, Nakazawa S, Sato T, Kitamura K, Iwasato T. Patchwork-Type Spontaneous Activity in Neonatal Barrel Cortex Layer 4 Transmitted via Thalamocortical Projections. *Cell Rep.* 2018 Jan 2;22(1):123-135. PMID: 29298415. doi: 10.1016/j.celrep.2017.12.012.
- 6) Relationship of electrophysiological dysfunction and clinical severity in SCN2A-related epilepsies. Lauxmann S, Verbeek NE, Liu Y, Zaichuk M, Müller S, Lemke JR, van Kempen MJA, Lerche H, Hedrich UBS. *Hum Mutat.* 2018 Dec;39(12):1942-1956. Epub 2018 Sep 13. PMID: 30144217. doi: 10.1002/humu.23619.
- 7) Gap junctions in developing thalamic and neocortical neuronal networks. Niculescu D, Lohmann C. *Cereb Cortex.* 2014 Dec;24(12):3097-106. Epub 2013 Jul 10. PMID: 23843439. doi: 10.1093/cercor/bht175.
- 8) Activity-dependent development of callosal projections in the somatosensory cortex. Wang CL, Zhang L, Zhou Y, Zhou J, Yang XJ, Duan SM, Xiong ZQ, Ding YQ. *J Neurosci.* 2007 Oct 17;27(42):11334-42. PMID: 17942728. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3380-07.2007.