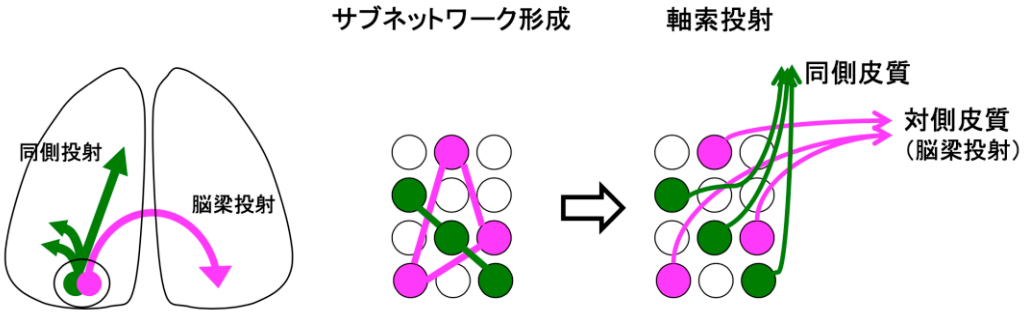
38　哺乳類大脳の広域・局所神経回路構築ロジックの解明	田川　義晃

【目的】高次脳機能を生む哺乳類大脳の神経回路は、複雑な神経ネットワークからなる。大脳をマクロな視点でみると、様々な領域・領野からなり、その間は特異的なパターンでつながれている。一方、局所に目を向けると、同一の層に様々な投射先をもつ神経細胞が混在している。投射先が異なる神経細胞は、発生発達期にどのように配置され、どのようにして配線（それぞれの投射先へ正しく軸索を伸ばして回路を形成）するのであろうか？本研究では、大脳の代表的な長距離神経回路である脳梁投射をモデルとして用いて、その形成機構を明らかにする研究を行った。具体的には、1．活動依存的な脳梁軸索投射に重要な自発神経活動パターンを明らかにすること、2．脳梁軸索発達過程のダイナミックな形態変化とその制御機構を明らかにすることを目的とした。

【方法】目的 1 に対しては、時期特異的な神経活動操作技術を用いた。神経活動を抑制する分子ツール Kir2.1、子宮内電気穿孔法、Tet-off 遺伝子発現システムを組み合わせて、脳梁投射形成過程の目的の時期に神経活動を操作する実験を行った。目的 2 に対しては、新生仔マウスの大脳において、蛍光標識した脳梁軸索を数日間 *in vivo* タイムラプスイメージングする実験を行った。

【結果】神経活動を抑制する分子ツール Kir2.1 イオンチャネルを脳梁投射細胞に E15 から P15 まで発現させると、P15 において脳梁軸索投射が阻害される。Tet-off 遺伝子発現システムを組み合わせた実験系を用いて、P6 から Dox を投与することで Kir2.1 発現を P10 からオフにすると、P15 において脳梁投射の回復が見られた。Kir2.1 発現オフによって回復した神経活動パターンを解析したところ、活動記録した領域の大多数（>60%）の細胞が参加する同期活動（H event とよばれる）ではなく、参加細胞の割合がより少ない同期活動（L event：参加細胞の割合は 20〜60%）が回復していた。この結果は、脳梁軸索投射の形成・回復には、L event とよばれる同期自発活動があれば十分であることを示唆する。さらに、大脳皮質スライス標本で脳梁投射細胞同士、または脳梁投射細胞とそれ以外の投射細胞の間でのシナプス形成の確率を比較する実験を行ったところ、脳梁投射細胞同士の方がより高い確率でシナプス形成しているという結果が得られた。これらの結果を合わせて考えると、脳梁投射細胞同士は回路形成期に機能的なサブネットワークを作っており、L event の一部はその脳梁投射細胞群の同期活動であり、この同期神経活動が投射先特異的な軸索投射パターン形成に重要な役割を担う可能性が示唆された。また、*in vivo* 脳における脳梁軸索のタイムラプスイメージング実験からは、軸索の伸長と縮退、分枝の形成と消失というダイナミックな形態変化を観察することができた。特に P11 から P13 の間で、1 日 100 μm 以上の軸索分枝の伸長と縮退が観察された。どの軸索分枝が伸長して定着しやすくどの枝が縮退、消失しやすいのか、軸索発達ダイナミクスを制御するルールを明らかにする解析を現在進めている。

活動依存的な脳梁軸索投射のメカニズム（仮説）



38. 哺乳類大脳の広域・局所神経回路構築ロジックの解明

田川　義晃

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：神経回路形成，軸索投射，神経活動，脳梁，サブネットワーク

緒　言

高次脳機能を生む哺乳類大脳の神経回路は、複雑な神経ネットワークからなる。大脳をマクロな視点でみると、様々な領域・領野からなり、その間は特異的なパターンでつながれている。一方、局所に目を向けると、同一の層に様々な投射先をもつ神経細胞が混在している。投射先が異なる神経細胞は、発生発達期にどのように配置され、どのようにして配線（それぞれの投射先へ正しく軸索を伸ばして回路を形成）するのであろうか？本研究では、大脳の代表的な長距離神経回路である脳梁投射をモデルとして用いて、その形成機構を明らかにする研究を行った。

脳梁軸索は左右の脳半球をつなぎ、それぞれの半球で処理された情報の統合を行う大脳の重要な長距離軸索である（図 1）。多くの精神疾患や発達障害において、その形成不全や異常が報告されている。脳梁神経回路の形成は、マウスにおいて、胎生後期（E15 以降）から生後初期（P15 まで）に起こり、その過程には軸索ガンダンス分子と共に、神経活動が深く関わる。生後初期の神経活動を抑制する実験を行うと、脳梁軸索投射が途中で障害される［1］。生後初期のマウス大脳の自発神経活動を記録すると、いくつかの特徴的なパターンが混在し、それが発達に伴って変化することが報告されている［2，3］。どの時期のどのパターンの自発神経活動が活動依存的な脳梁軸索投射の形成に重要かは明らかになっていない。また、形成過程の脳梁軸索は、局所では成長と縮退を繰り返しながら最終的な軸索分枝形態を完成させると考えられるが［4］、それがどのような過程を経て、どのように制御されるのかは不明である。本研究では、時期特異的な神経活動操作実験により前者を、脳梁軸索の *in vivo* タイムラプスイメージング実験により後者を明らかにすることをめざした。

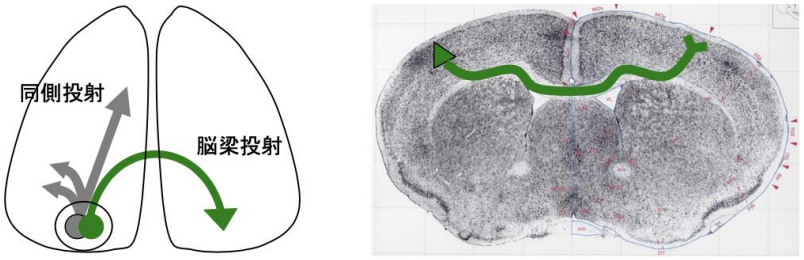


図1. 脳梁軸索投射の模式図

脳梁軸索投射は左右脳半球間をつなぐ、大脳の代表的な長距離軸索投射である。

方　法

1. 脳梁投射細胞の時期特異的な神経活動操作実験

脳梁投射細胞を含む大脳 2/3 層神経細胞に神経活動を抑制する分子ツール Kir2.1 イオンチャネルを遺伝子導入することで、神経活動抑制実験を行った。遺伝子導入の方法には子宮内電気穿孔法を用いた［1］。神経活動を時期特異的に制御するため、Kir2.1 を Tet-off 遺伝子発現システムを用いて発現させた。具体的には、pCAG-tTA2^{s} と pTRETight2-

Kir2.1 プラスミドを遺伝子導入し、目的の時期から DOX を投与することで、Kir2.1 の発現をオフにする（神経活動を回復させる）実験を行った［5］。脳梁軸索は、同時に遺伝子導入する pCAG-EGFP/TurboRFP によって可視化した。新生仔マウスへの DOX 投与は母乳を介して行った。DOX の新生仔への移行が早くなるよう、あらかじめ 1 週間 DOX を投与した仮親を用いた。この方法で、DOX 投与後 4 日で遺伝子発現がオフになることを予備実験で確認した。

2. 脳梁軸索の *in vivo* タイムラプスイメージング実験

脳梁軸索の蛍光標識には Supernova 法を用いた［6］。新生仔マウスの頭蓋骨（遺伝子導入と反対側の大脳皮質）に観察用の窓を作製し、蛍光標識された脳梁軸索の形態変化を、2 光子顕微鏡を用いて P9～P13 に経時的に観察した。2 光子顕微鏡による観察は麻酔下で行い、観察時以外は母親の元に戻して生育させた。

結果と考察

1. 脳梁投射に重要な自発神経活動パターン

活動依存的な脳梁軸索投射にどの時期の、どのような活動パターンが重要なのかを明らかにする目的で、時期特異的な神経活動操作の実験を行った。神経活動を抑制する分子ツール Kir2.1 イオンチャネルを脳梁投射細胞に E15 から P15 まで発現させると、P15 において脳梁軸索投射が阻害される。Tet-off 遺伝子発現システムを組み合わせた実験系［5］を用いて、P6 から Dox を投与することで Kir2.1 発現を P10 からオフにすると、P15 において脳梁投射の回復が見られた（図 2）。2 光子顕微鏡を用いた *in vivo* Ca^{2+}イメージングの手法で P13 大脳の神経活動記録実験を行ったところ、(1) Kir2.1 の発現を P10 からオフにすると P13 において自発神経活動が回復していること、(2) その活動パターンは、活動記録した領域の大多数（>60%）の細胞が参加する同期活動（H event とよばれる）ではなく、参加細胞の割合がより少ない同期活動（L event：参加細胞の割合は 20～60%）であることを見出した。この結果は、脳梁軸索投射の形成・回復には、L event とよばれる同期自発活動があれば十分であることを示唆する。また、Dox を投与する時期を変える実験を行い、神経活動の回復が P10 からであれば脳梁投射は回復するが、神経活動の回復が P13、P16 からでは投射は回復しないことを見出した。つまり、脳梁投射の形成・回復には「臨界期」があることになる。この臨界期は、DREADD 法を用いた別の神経活動操作実験でも確かめることができた。以上の結果をまとめた論文を投稿準備中である（Tezuka, Hagihara et al., in preparation）。

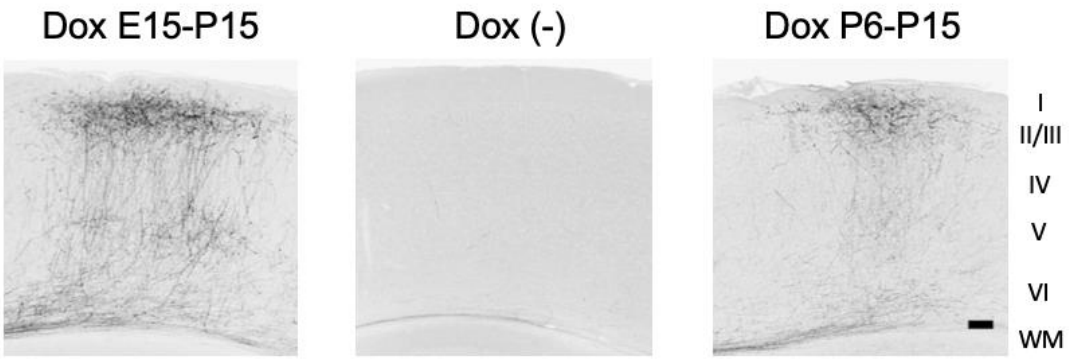


図2. 神経活動の回復による脳梁投射の回復

Tet-offシステムにより、神経活動を抑制する分子ツールKir2.1を時期特異的に発現させた。Doxを継続的に投与してKir2.1を発現させない条件では、脳梁投射は正常に起こる（左）。Dox投与をせずにKir2.1が継続的に発現する条件では、脳梁投射が障害される（中）。Dox投与をP6から行い、P10からKir2.1の発現がオフになる条件では、脳梁投射の回復がみられた。スケールバー：100 μ m。

脳梁軸索投射の形成・回復に関与する L event とよばれる同期活動は、どのような神経活動なのであろうか？大脳 2/3 層において、脳梁投射細胞は、他の部位へ軸索投射を行う細胞と混在している。発達期の大脳 2/3 層において、脳梁投射細胞同士が機能的なサブネットワークをつくり、その同期活動が脳梁投射に寄与するのではないかという仮説を立てた。それを検証する第一歩として、大脳皮質スライス標本で脳梁投射細胞同士、または脳梁投射細胞とそれ以外の投射細胞の間でのシナプス形成の確率を比較する実験を行ったところ、脳梁投射細胞同士の方がより高い確率でシナプス形成しているという結果が得られた［7］。この結果を合わせて考えると、L event の一部は脳梁投射細胞群の同期活動であり、それが脳梁投射に重要な役割を担う可能性が示唆された（図 3）。

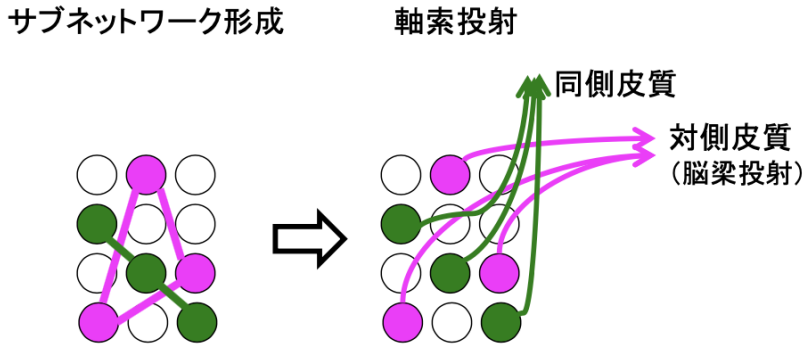


図3. 活動依存的な脳梁投射のメカニズム（仮説）
大脳 2/3 層において、脳梁投射細胞（赤）は、他へ軸索投射する細胞（緑）と混在する。発達期に脳梁投射細胞同士で機能的なサブネットワークをつくり、その同期活動が投射先特異的な軸索投射パターンの形成に寄与するのではないかと考えている。

2. 脳梁軸索発達の動的過程の可視化

脳梁軸索は、片側大脳にある細胞体から出発し、脳の正中部を通過して、反対側大脳に領域・層特異的に投射する。特に反対側大脳の目的とする領域へ進入した後、特定の層（1～3 層と 5 層）において多くの分枝を発達させ［4］、そこでシナプス後細胞とシナプス形成する。このダイナミックな形成過程とその制御機構を明らかにする目的で、*in vivo* 脳における脳梁軸索のタイムラプスイメージング実験を行った。蛍光標識された同一の脳梁軸索を P9 から P13 に経時的に 3 次元イメージングを行うと、軸索の伸長と縮退、分枝の形成と消失というダイナミックな形態変化を観察することができた（図 4）。どの軸索分枝が伸長して定着しやすく、どの枝が縮退・消失しやすいのか、軸索発達ダイナミクスを制御するルールを明らかにする目的で、大脳体性感覚野のバレル構造を重ねて解析する実験系を組み合わせた。

1. バレルの中を通過する軸索は縮退しやすく、バレルとバレルの間を通過する軸索は残りやすいのではないか、2. あるバレルに枝が多く出る軸索は、他のバレルへの枝を縮退させるのではないか、などの仮説のもと、結果を現在解析中である。

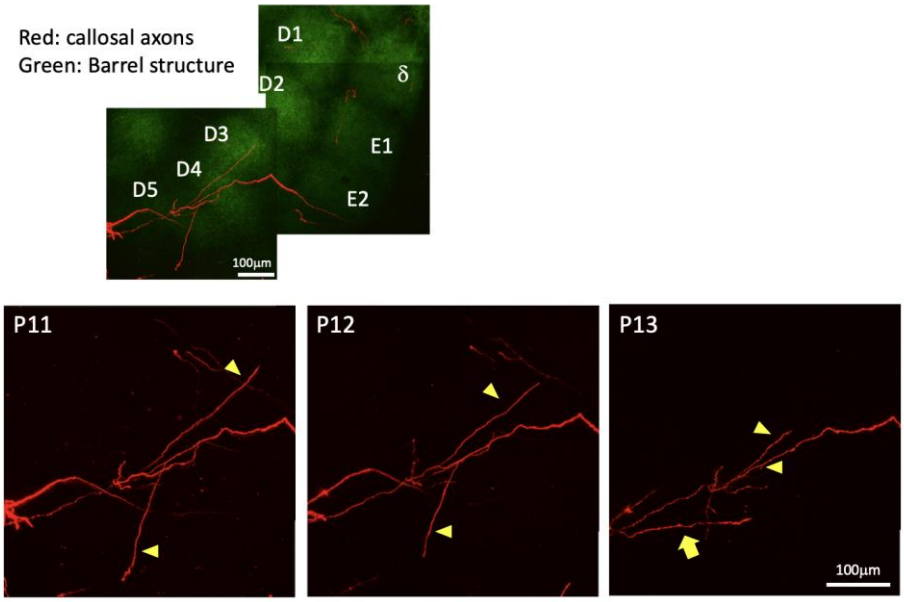


図4. *in vivo* 脳における脳梁軸索のタイムラプスイメージング
蛍光標識された1本の脳梁軸索のダイナミックな形態変化：矢頭は軸索分枝の縮退、矢印は伸長を示す。いずれも1日で100μm以上変化している。どの軸索分枝が伸長して維持され、どの枝は縮退・消失するか、そのルールを明らかにする一助として、大脳体性感覚野のバレル構造（緑：D1～5、E1～2等はヒゲに対応したバレルの名称）を参照する解析を進めている。スケールバー：100μm。

共同研究者・謝辞

本研究の遂行にあたり、上原記念生命科学財団からのご支援に深く感謝致します。また、本研究の遂行にあたり、京都大学大学院理学研究科生物物理学教室の平野丈夫先生、手束勇太君、東京大学大学院医学系研究科統合生理学教室の大木研一先生、萩原賢太先生、生理学研究所視覚情報処理研究部門の吉村由美子先生、石川理子先生、鹿児島大学大学院医歯学総合研究科神経筋生理学分野の中川直先生、熊本大学国際先端医学研究機構の水野秀信先生、国立遺伝学研究所形質遺伝研究部門の岩里琢治先生のご協力に感謝致します。

文　献

1) Mizuno H, Hirano T, Tagawa Y. Evidence for activity-dependent cortical wiring: formation of interhemispheric connections in neonatal mouse visual cortex requires projection neuron activity. J Neurosci. 2007 Jun 20;27(25):6760-70. PMID: 17581963 doi: 10.1523/JNEUROSCI.1215-07.2007
2) Siegel F, Heimel JA, Peters J, Lohmann C. Peripheral and central inputs shape network dynamics in the developing visual cortex in vivo. Curr Biol. 2012 Feb 7;22(3):253-8. PMID: 22264606 doi: 10.1016/j.cub.2011.12.026.
3) Tagawa Y, Hirano T. Activity-dependent callosal axon projections in neonatal mouse cerebral cortex. Neural Plast. 2012 2012:797295. PMID: 23213574 doi: 10.1155/2012/797295.
4) 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. Eur J Neurosci. 2010 Feb;31(3):410-24. PMID: 20105242 doi: 10.1111/j.1460-9568.2009.07070.x.

5) Hagihara KM, Murakami T, Yoshida T, Tagawa Y, Ohki K. Neuronal activity is not required for the initial formation and maturation of visual selectivity. Nat Neurosci. 2015 Dec;18(12):1780-8. PMID: 26523644 doi: 10.1038/nn.4155.
6) Mizuno H, Luo W, Tarusawa E, Saito YM, Sato T, Yoshimura Y, Itohara S, Iwasato T. NMDAR-regulated dynamics of layer 4 neuronal dendrites during thalamocortical reorganization in neonates. Neuron. 2014 Apr 16;82(2):365-79. PMID: 24685175 doi: 10.1016/j.neuron.2014.02.026.
7) Hagihara KM, Ishikawa AW, Yoshimura Y, Tagawa Y, Ohki K. Long-Range Interhemispheric Projection Neurons Show Biased Response Properties and Fine-Scale Local Subnetworks in Mouse Visual Cortex. Cereb Cortex. 2021 Jan 5;31(2):1307-1315. PMID: 33063102 doi: 10.1093/cercor/bhaa297.