

「脳神経回路の形成・動作原理の解明と制御技術の創出」
平成22年度採択研究代表者

H23 年度 実績報告

大木 研一

九州大学大学院医学研究院・教授

大脳皮質の機能的神経回路の構築原理の解明

§ 1. 研究実施体制

(1) 大木グループ

① 研究代表者: 大木 研一(九州大学大学院医学研究院、教授)

② 研究項目

二光子イメージングによる大脳皮質の機能的神経回路の解析

(2) 田川グループ

① 主たる共同研究者: 田川 義晃(京都大学大学院理学研究科、助教)

② 研究項目

光遺伝学による神経活動操作技術の確立

§ 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

大脳皮質には数百億の神経細胞が存在するが、その機能によって何十もの領野に分かれ、各領野も神経細胞の機能によって、さらに細かいモジュールに分割されている。それでは、何が機能的な神経回路の最小単位なのだろうか？そのような最小単位を解明できれば、大脳皮質は単位回路が並列に組み合わさったものとして理解されるであろう。

本研究では、単一細胞レベルの解像度をもつ独自の in vivo 二光子イメージング技術を用いて、機能的な大脳局所回路の解明を目指す。単位回路の動作・形成原理の解明を通して、視覚野の神経回路が情報処理を行う上での基本構造・原理とその発生のメカニズムを解明することを目的とする。

テーマ①: ミニコラムに対応する機能的構造の解明 (大木グループ)

大脳皮質内の局所神経回路の**解剖学的**な基本単位として、ミニコラムという構造が存在する。大脳皮質の切片を見ると、縦方向(皮質表面と垂直)に数珠状に細胞体が並んでおり、それぞれの列をミニコラムと呼ぶ。神経細胞間の結合様式を調べると、縦方向の結合が強く、同一のミニコラムに属する細胞間の結合が強い。このことから、ミニコラムは大脳皮質の局所回路の基本単位として働いているのではないかと示唆されてきた。

しかしながら、ミニコラムに対応する**機能的**な構造は見つかっていない。最近、我々は、げっ歯類の視覚野では、横方向(皮質表面と平行方向)にはこのようなマクロな機能コラムが存在せず、隣接する神経細胞も異なる選択性を持つことを見出した(Ohki et al., 2005)。しかしながら、二光子イメージングが横方向のイメージを取得するために、縦方向にどのような構造になっているかについては、十分な解析をすることができなかった。解剖学的には、上記のように縦方向に非常に強い結合が見られることから、ミニコラムに対応して、同じ反応選択性を持つ細胞が縦方向に並んでいるのではないかと予想し、ミニコラムに対応する機能的構造を解明する。

上記の目的のため、3次元の機能イメージングの系を開発した。高速のレゾナントスキャナーを X 軸のスキャンに用い、ピエゾで対物レンズを高速に Z 方向に駆動するシステムを構築し、XYZ 方向に 340 x 170 x 200 ミクロンの範囲を、1 volume あたり 0.6 秒の速さで機能画像を取得できるようになった。この3次元機能イメージングを用いて、視覚野の 2/3 層の3次元的な機能構築を調べたところ、同一ミニコラムに属する細胞が類似した方位選択性を持つ傾向は弱く、むしろ多様な選択性を有することが示された。さらに、マイクロコラム-尖頭樹状突起が束をなす構造-に対応する機能的構造を解明するため、尖頭樹状突起のカルシウムイメージングを行ったところ、樹状突起の方位選択性を計測することに成功し、同一の束に属する樹状突起が様々な方位選択性を持つことを見出された。

テーマ②: 機能的局所回路の発生-クローン説(大木グループ)

げっ歯類と高等哺乳類の視覚野の微小機能構築は全く異なることを見出された(Ohki et al., 2005)。げっ歯類では、異なる方位選択性の細胞が混ざり合って存在していたが、高等哺乳類で

は方位選択性は単一細胞レベルまで秩序だって配列していた。なぜ、このように機能構築が異なるのであろうか？Rakic らにより、大脳皮質のミニコラムは、単一の神経幹細胞から分化した神経細胞からなるのではないかと提案されてきた。実際、サルなどの高等哺乳類では、単一神経幹細胞の子孫は、縦方向に一直列に固まって分布する傾向がある。しかしながら、げっ歯類では、単一神経幹細胞の子孫が比較的広い範囲に疎に分布する(Cepko, Walsh 1992)。この発生様式の違いは、機能構築の違いと、どう関係するだろうか。最近、非常に興味深い知見が報告された。単一の神経幹細胞の子孫は、成熟した大脳皮質で、お互いに特異的に結合していることが示された(Yu et al., 2009)。このことから、げっ歯類の大脳皮質では、単一神経幹細胞から分化した疎に分布する細胞は、(選択的な結合により)同じ方位選択性を持つかもしれないと仮説を立てた。

このことを検証するために、二光子イメージングに分子遺伝学的な手法を組み合わせる。幸運なことに、ごく少数の神経幹細胞の子孫の細胞がすべて蛍光タンパクで標識されているマウスが開発されている。TFC.09 マウス(Cre を自発的に発現するマウス; Carlos Lois (U Mass))を導入し、Jax Lab から Ai9 (Cre による組換えで tdTomato を発現するマウス)を導入した。TFC.09 x Ai9 で、組換えを少数の幹細胞にだけ起こすことに成功し、これらのマウスで、実際 tdTomato 陽性細胞のコラム状のクラスターが見られることを確認し、何匹かのマウスで tdTomato 陽性細胞の視覚反応を 2 光子カルシウムイメージングで計測することに成功した。これから、このマウスにおいて、tdTomato で標識された細胞の方位選択性が類似しているかどうかを、二光子カルシウムイメージングで検証する。

テーマ③:機能的局所回路の発生-活動依存説 (大木グループ・田川グループ)

テーマ③では、方位選択性が生後発達段階での活動に依存して決定されるかどうかを検証したい。活動依存説では、同期活動をした細胞間の結合がヘップ則に則って強化され、サブネットワークを形成し、類似した反応選択性を持つに至ると考える。このことを検証するため、発達期に活動を抑制する実験と、同期活動を誘導する実験の両者を並行させて進める。活動の抑制には内向き整流カリウムチャンネル(Kir2.1)を、同期活動の誘導にはチャンネルロドプシン(ChR2)を、子宮内電気穿孔法にて視覚野の興奮性細胞に遺伝子導入する。活動の抑制の実験では、生後発達期に一部の視覚野の細胞の活動を抑制して、それらの細胞の方位選択性の成熟に変化が見られるかどうかを調べ、神経活動が方位選択性の成熟に必須であるかを検討するとともに、どの時期の活動が重要であるかを検討する。同期活動の誘導の実験では、生後発達期の強い自発活動が見られる頃に、ChR2 がスパースに導入された細胞に光刺激で強制的に同期活動を引き起こすことによって、それらの細胞間にサブネットワークが作られ、同じ方位選択性を持つに至るかどうかを検証する。

テーマ③-1 Kir による活動抑制の実験

Kir2.1 を持続的に発現させると、反対側への軸索投射が減少することから、活動抑制が起こっていることが田川グループによって示唆されていた(Mizuno et al., 2007)。活動抑制を確認するため、2 光子カルシウムイメージングを用いて調べたところ、大人のマウスにおいても、Kir を持続発現している神経細胞の視覚応答はほぼ完全に抑制されていた。

次に、Kir を発達期のみに発現させ、大人では発現を止めるため、Tet-Off システムを導入した。まず、CAG-tTA2 の濃度がどれくらいか、Tet-Off 前には十分な発現が得られ、Tet-Off したときに発現をほぼ完全に停止できるかの条件検討を TRE-TurboRFP を用いて行った。その結果、低濃度の CAG-tTA2 (0.04 mg/ml) を用いれば、よいことがわかった。現在この条件で、誕生直前から生後 1-2 カ月目まで遺伝子導入された細胞の活動を抑制し、その後 doxycycline を 1 週間投与して Kir の発現を停止させる実験を実施中である。

テーマ③-2 ChR2 による同期活動の誘導実験

ChR2 を子宮内電気穿孔法にて遺伝子導入すると、10-30%の神経細胞に導入され、導入が疎なところを選べば、Cre-loxP を使ってさらに疎にする必要がないことを確認した。次に、ChR2 の光刺激を経頭蓋的に行えるか、どのような刺激パラメータが適切かを検討するため、頭蓋に小さな穴を開けて、斜めに電極を挿入して単一神経細胞から細胞外記録し、経頭蓋的に青色 LED による光刺激を行った。開頭部から直接光が達しないように、黒いゲルで塞いだ。5 msec のパルス状の光刺激を与えると、多くの神経細胞で、9 割以上の確率で活動電位が観察された。以上より、経頭蓋的に ChR2 を光刺激できることが確認された。現在、5 msec, 10Hz の光刺激 (1 秒) を 3-20 秒毎に 24-48 時間、開眼直前から直後の期間に与えている。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

なし

(3-2) 知財出願

- ① 平成 23 年度特許出願件数(国内 0 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 0 件)