

八木 健

大阪大学大学院生命機能研究科・教授

神経細胞の個性がつくる神経回路とセルアセンブリ

§1. 研究実施体制

(1) 八木グループ

- ① 研究代表者: 八木 健 (大阪大学大学院生命機能研究科、教授)
- ② 研究項目
 - ・ cPcdh 多様性減少マウスの作製
 - ・ CTCF 欠損マウスの解析
 - ・ cPcdh 遺伝子全欠損マウスの作製

(2) 澁木グループ

- ① 主たる共同研究者: 澁木 克栄 (新潟大学脳研究所、教授)
- ② 研究項目
 - ・ フラビン蛋白蛍光イメージングと 2 光子顕微鏡を用いた大脳皮質高次感覚野の解析

(3) 平林グループ (研究機関別)

- ① 主たる共同研究者: 平林 真澄 (生理学研究所、准教授)
- ② 研究項目
 - ・ cPcdh 遺伝子全欠損マウス由来 iPS 細胞とのキメラ個体作製
 - ・ キメラ個体の大脳皮質における電気生理学的解析

§ 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)

(2-1) 研究のねらい

クラスター型プロトカドヘリン(cPcdh)分子群による神経細胞の個性化メカニズムと標的認識による神経回路形成メカニズムを明らかにし、これを操作することにより、発生プログラムにおいて形成される神経回路の特性を捉え、経験依存的に形成される機能的なセルアセンブリの形成や動作原理を明らかにし、統合された脳機能をもたらす新たな仕組みを明らかにする。

(2-2) 研究実施内容

本研究における概念を Hypothesis and Theoretical Article として論文発表をおこなった。その中で、cPcdh 分子群が、個々の神経細胞で異なる発現、4量体を形成する中で、どの様な神経細胞の個性やセルアセンブリに関わる可能性があるのかを数学的な解析とともに解説した(Yagi, 2012)。また、神経細胞の個性を利用した複雑ネットワークの性質を解析し、このネットワークを利用した「特徴抽出装置、特徴抽出方法、及び、そのプログラム」の PCT 申請を行った。

cPcdh 分子群の神経回路形成メカニズムの解析については、iPS 細胞キメラマウスを用いた神経細胞の個性による神経ネットワーク形成の解析を推進している。具体的には、全ての cPcdh 遺伝子を欠損した遺伝子改変

マウスから樹立した iPS 細胞を用いキメラマウスを作製し、生理学的な解析を加えることで、その分子的多様性がシナプス形成時の細胞選択や機能的回路形成にどのように関与しているかを調べている。cPcdh ノックアウト(KO)マウスから線維芽細胞を単離培養し、レトロウイルスベクター (pMXs)を用いマウスの Oct3/4、Klf4、Sox2 および TdTomato 遺伝子

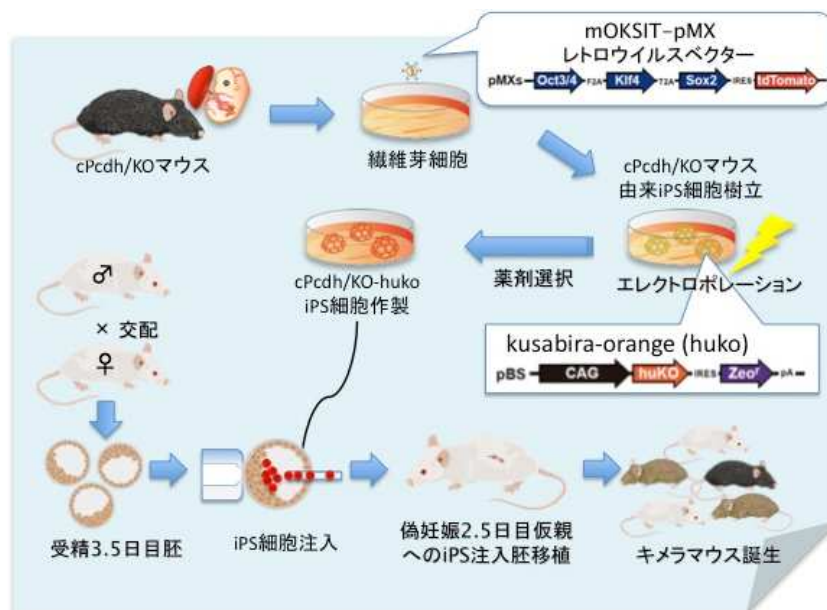
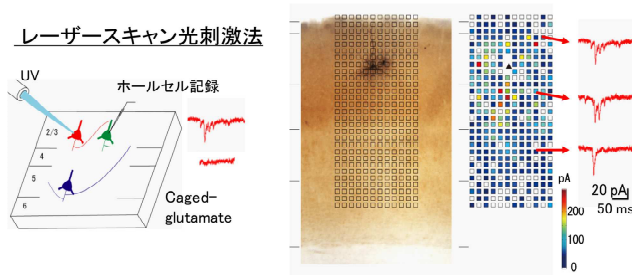


図1. cPcdh/KO マウス由来 iPS 細胞の樹立とキメラ個体の作製

(mOKSIT-pMX) を導入し、cPcdh/KO 由来 iPS 細胞を樹立した。次に、CAG プロモータ下で kusabira-orange (huko)を発現するベクターを電圧ポレーション法にて遺伝子導入し、cPcdh/KO-huko iPS 細胞を作製した。CD1 マウスの交配により 3.5 日目胚盤胞を採取し、cPcdh/KO-huko iPS 細胞を注入後、偽妊娠マウスに移植することでキメラマウスを作製した(図1)。

この生後3週齢のキメラマウス一次視覚野から急性スライス標本を作製し、2/3 層に位置する

cPcdh 全欠損錐体細胞 (kusabira-orange) からホールセル記録を行った。レーザースキャン光刺激法を用いて caged glutamate を局所的に uncaging し、記録細胞周辺の神経細胞を発火させることにより、記録細胞に対して機能的なシナプス結合を形成している神経細胞の分布を同定するとともにシナプス伝達強度を計測した(図 2)。興奮性入力および抑制性入力について正常マウスと比較した結果、入力範囲や入力強度に有意な差は見られず、cPcdh を欠損した神経細胞において機能的シナプス結合が形成されることが明らかになった(図 3)。今後は、cPcdh の単一アイソフォームを発現するような iPS 細胞からキメラマウスを作製し、同様な生理学的機能解析に加え、同じアイソフォームを発現している神経細胞同士が結合している確率をダブルホールセル記録法により明らかにする。



Yoshimura et al., Nature 2005
Yoshimura & Callaway, Nature Neurosci., 2005

図 2. 入力マップ解析方法

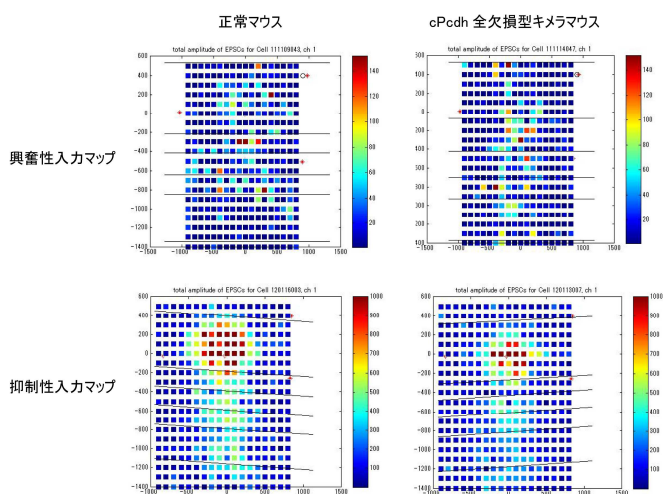


図 3. 正常マウスと cPcdh 全欠損型キメラマウスの入力マップの比較

また、終脳領域興奮性神経細胞において CTCF をコンディショナルに欠損させたマウス(CTCF cKO マウス)を作製したところ、cPcdh の個々の神経細胞での個性的な発現がなくなることが明らかとなった。この結果より、cPcdh 遺伝子クラスター領域に結合する CTCF が神経細胞の個性をもたらす遺伝子制御因子であることが明らかとなった。また、この CTCF cKO マウスでは体性感覚野におけるバレル構造が消失していることが明らかとなったことより、神経細胞の個性と大脳皮質での機能的神経回路形成との関連性が強く示唆された。

また、cPcdh α 欠損マウス(α 欠損マウス)を用いて大脳皮質体性感覚野における表現型を解析した(Yamashita et al., 2012)。腕神経叢の引き抜き損傷は、損傷神経の末梢端を対側の腕神経叢へ、末梢神経グラフトを用いて繋ぐ交差神経移植によって治療される。このメカニズムを探るため、マウスにおいて交差神経移植を行い、移植後の両側一次体性感覚野(S1)の応答を経頭蓋フラビン蛋白蛍光イメージングで解析した。その結果、移植後二か月の時点において、損傷側の上肢掌側のブラシ刺激に対し、解剖学的に推測される同側 S1 だけでなく、本来の投射先である対側 S1 も活動を示すことを見出した。この対側性 S1 応答が如何なる経路で生ずるのかを解析したところ、まず同側 S1 が活動し、この活動が対側 S1 へと脳梁線維を通して伝播することが判った。しかし、 α

欠損マウスでは交差神経移植後の対側性S1応答の出現が障害されていた。そのメカニズムを調べるため、一側のS1を電気刺激し、対側のS1に生ずる神経活動量を強化したところ、 α 欠損マウスでは両側S1を結ぶ興奮性の機能結合が減弱していることが判った。これらの結果より cPcdh 分子群が脳皮質の機能的回路形成に寄与していることが示唆された。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

- 論文詳細情報

1. 香取将太, 八木 健. CNR/プロトカドヘリン分子群変異マウス(神経軸索の投射). 疾患モデルの作製と利用ー脳・神経疾患: 277-290, 2011.
2. Yamamoto M, Matsuzaki T, Takahashi R, Adachi E, Maeda Y, Yamaguchi S, Kitayama H, Echizenya M, Morioka Y, Alexander DB, Yagi T, Itohara S, Nakamura T, Akiyama H, Noda M. The transformation suppressor gene Reck is required for postaxial patterning in mouse forelimbs. *Biology Open*. in press.
3. Yamashita H, Chen S, Komagata S, Hishida R, Iwasato T, Itohara S, Yagi T, Endo N, Shibata M Shibuki K. Restoration of contralateral representation in the mouse somatosensory cortex after crossing nerve transfer. *PLoS ONE*. in press.
4. Yagi T. Molecular codes for neuronal individuality and cell assembly in the brain. *Front Mol Neurosci*. in press

(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)