

感覚神経系を用いた選択的神経回路の形成メカニズム解析

東京大学大学院医学系研究科・神経機能解明ユニット
河崎 洋志

1. はじめに

高次脳機能の中枢である哺乳類の脳神経系、その中でも特に大脳皮質での局所神経回路ネットワークの形成メカニズムおよび機能的理解は、基礎神経科学および臨床医学的にも主要な研究課題である。これまでに我々は視覚神経系や体性感覚系神経回路（バレル神経系）を用いて研究を推し進めてきた。

マウス大脳皮質の一次体性感覚野は、神経回路形成、可塑性および臨界期研究の代表的なモデル系である。従来、末梢から大脳皮質に至る入力に関する神経回路は詳細に記載されてきたが、実際の情報処理を担う大脳皮質内の神経回路は未だに不明な点が多い。そこで我々は子宮内電気穿孔法を用いて大脳皮質2/3層の興奮性神経細胞に選択的にGFPを発現させ、2/3層興奮性神経細胞の軸索投射パターンの解析を行った。その結果、2/3層の神経細胞の軸索が4層のセプタと呼ばれる特別な部位に優先的に投射していることを見出し、この新規の大脳皮質内の局所神経回路をバレルネットと命名し報告した(*Journal of Neuroscience* 2010) (図1)。そこで本研究課題では、我々の見出した新規局所回路バレルネットに焦点を絞り、1) 形成を制御するメカニズムの解析、2) バレルネットの一般性の解析を行った。

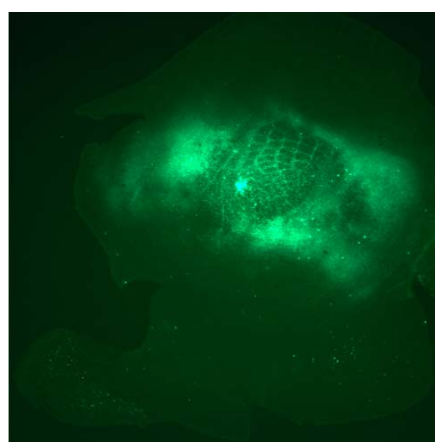


図1. マウス大脳皮質一次体性感覚野に見出したバレルネット

2. 方法

大脳皮質2/3層神経細胞の軸索投射パターンを可視化するために、マウスでは胎生15.5日齢で、ラットでは胎生18日齢で子宮内電気穿孔法を行い、プラスミドを大脳皮質2/3層興奮性神経細胞へと選択的に導入した。出生後に還流固定を行い30%スクロース処理後に、冠状断切片もしくは接線方向断切片を作成した。必要に応じて免疫組織染色を行い、蛍光顕微鏡もしくは共焦点顕微鏡を用いた撮像を行った。

軸索投射パターンの可視化にはGFPもしくはmCherryを、シナプス前部の可視化にはsynaptophysin-GFPもしくはsynaptophysin-mCherryをCAGプロモータ制御下に発現させた。

3. 研究成果

我々は以前にマウスの一次体性感覚野でバレルネットを見出したが（図1）、バレルネットが動物種を越えて存在する普遍的な皮質内神経回路であるかを検討するためにラットを用いた検討を行った。ラットの胎生18日齢で子宮内電気穿孔法を行い、2/3層興奮性神経細胞の軸索をGFPで可視化したところ、ラットでもバレルネットが存在することを見出した（図2）。共焦点顕微鏡を用いた詳細な解析の結果、セプタと呼ばれる特殊な部位においてGFP陽性軸索が密集していることが分かった。

2/3層興奮性神経細胞の多くは、対側の大脳皮質へと交連性線維を延ばしていることが知られている。そこで子宮内電気穿孔法を行った大脳皮質とは対側の大脳皮質における軸索分布を検討したところ、対側においてもバレルネット様の軸索分布が存在することを新たに見出した（図3）。そこでこの対側に存在

する構造を対側バレルネット（contralateral barrel nets）と名付け、以前に我々が見出したバレルネットは同側バレルネット（ipsilateral barrel nets）と再命名した。synaptophysin-GFPを発現させたところ、同側・対側バレルネットのいずれにおいてもシナプスを形成していることが示唆され、バレルネットは情報処理に関与している可能性が示唆された。対側バレルネットをマウスとラットで比較したところ、ラットと異なりマウスではこの回路の発達が悪いことが分かり、回路レベルでの情報処理の種差を反映している可能性がある。また同側バレルネットと対側バレルネットの相違点も明らかとなった。同側バレルネットは一次体性感覚野内の全範囲に存在していたのに対して、対側バレルネットは不均一であり一次体性感覚野の中で、より外側部分に集中的に投射していることが分かった（図3）。

続いてバレルネットの形成過程の解析を行ったところ、その形成過程には2段階あることが分かった。形成過程初期の第一段階（生後第1週）では、2/3層興奮性神経細胞の軸索はセプタ部分に濃縮せずに大脳皮質内に均等に分布しバレルネット構造は見られなかった。続く生後2週目になって初めて軸索はセプタ部分に濃縮し、バレルネット構造が顕在化する。おもしろいことに、抗nestin抗体を用いて放射状グリアを可視化したところ、第一段階の2/3層神経細胞の軸索は放射状グリアの突起と隣接していた一方で、第2段階に入ると軸索は放射状グリアから離れることを見出した。放射状グリアは大脳皮質内で等間隔に存在していることから、第一段階では放射状グリアによってその空間分布が規定されているためにバレルネットという特徴的な軸索空間分布が見られず、第二段階になると放射状グリアから解放されるためにバレルネットという特徴的な軸索空間分布が見られるようになると考えれば、この形成過程の説明が可能である。ただし、

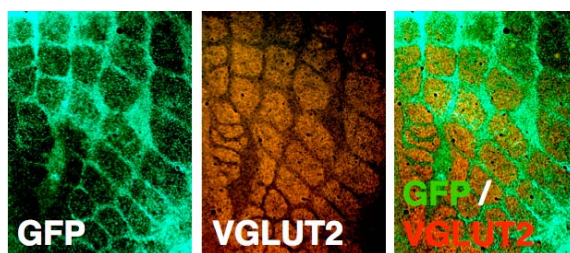


図2. ラット大脳皮質一次体性感覚野のバレルネット（左）。VGLUT2 陽性の視床皮質軸索とは相補的な空間分布を示している。

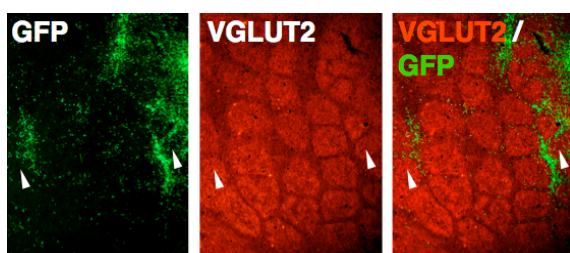


図3. ラットの対側バレルネット（左）。一次体性感覚野の外側において VGLUT2 陽性の視床皮質軸索とは相補的な空間分布を示している（矢頭）。

この仮説が実際に正しいかは今後の検証が必要である。また対側バレルネットの形成過程を解析したところ、第一段階が存在せず、第二段階のみが存在することが分かり、同側バレルネットと対側バレルネットとはその形成過程に違いがあることが分かった。

4. まとめ

感覚情報は末梢で異なる情報特性に分離分割され、異なる情報特性ごとに大脳皮質に伝達された後に情報処理される。この末梢からの大脳皮質に至るまでの入力神経回路は詳しく解析されているのに対して、大脳皮質における感覚情報処理の回路レベルでの基盤は完全には分かっていない。我々が見出したバレルネットが情報処理においてどのような機能的意義があるのか興味深い。バレルネットの機能的意義を解析するためには、その形成メカニズムを理解し、バレルネットを選択的に破壊することが必要となる。バレルネットの選択的神経回路形成を制御する分子メカニズムの解明は今後の重要な課題である。また我々は、バレルネットの形成過程の解析を通じて、2/3層神経細胞の軸索投射パターン形成には2段階のステップがあることを見出した。バレルネットの回路構築および形成メカニズムが、体性感覚系以外の神経回路にも存在するか今後の解析が必要である。

5. 発表論文、参考文献

1. Yamasaki T., Kawasaki H. and Nishina H., Diverse roles of JNK and MKK pathways in the brain, **Journal of Signal Transduction**, in press
2. Yamasaki T., Kawasaki H. (Co-corresponding author), Arakawa S., Shimizu K., Shimizu S., Reiner O., Okano H., Nishina S., Azuma N., Penninger J. M., Katada T. and Nishina H., Stress-activated protein kinase MKK7 regulates axon elongation in the developing cerebral cortex, **Journal of Neuroscience**, 31, 16872-16883, 2011.
3. Ako R., Wakimoto M., Ebisu H., Tanno K., Hira R., Kasai H., Matsuzaki M. and Kawasaki H., Simultaneous visualization of multiple neuronal properties with single-cell resolution in the living rodent brain, **Molecular and Cellular Neuroscience**, 48, 246-257, 2011.
4. Kawasaki H., Molecular signatures of parallel pathways in the visual thalamus, **Visual Cortex**, Nova Science, New York, 2011, in press
5. Sehara K. and Kawasaki H., Neuronal circuits with whisker-related patterns, **Molecular Neurobiology**, 43, 155-162, 2011.