

## 大脳の長距離・局所神経回路構築ロジックの解明

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科神経筋生理学分野

田川 義晃

本研究では、哺乳類大脳の投射先特異的な神経回路構築のメカニズム解明をめざした。脳は膨大で複雑な神経ネットワークからなる。高次脳機能を生み出す大脳をマクロな視点で見ると、様々な領域・領野からなり、その間に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、同一の層であっても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（すなわち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回路である脳梁軸索投射をモデルとして用いて（図1）、その形成機構を明らかにする以下の研究を行った。

これまでの先行研究から、左右半球をつなぐ脳梁軸索投射の形成には、種々の軸索ガイダンス分子及び神経活動依存的なメカニズムが重要であることが示されてきた。特に我々の研究で、マウスにおいて、生後2週間の（自発）神経活動を抑制すると脳梁軸索投射が障害されることから、脳梁軸索投射の形成には生後2週間の自発神経活動が必要であることが示された（Tagawa and Hirano, *Neural Plasticity*, 2012）。



図1 マウス大脳の同側投射と脳梁投射の模式図（左）と蛍光蛋白質による脳梁軸索投射の可視化（右） 遺伝子導入側から対側へ伸びる脳梁軸索が蛍光蛋白質によって標識されている

マウス大脳の生後2週間の自発神経活動は、いくつかの特徴的なパターンが混在しており、さらにそれが発達時期に伴って変化する。どの時期のどんなパターンの自発神経活動が脳梁軸索投射の形成に重要かを調べる目的で、時期特異的な神経活動操作の実験を進めた。方法として、まず脳梁軸索を特異的に標識するために、子宮内電気穿孔法を用いて脳梁投射細胞に蛍光蛋白質を発現させた。さらに、Tet-off遺伝子発現システムと神経活動抑制のための分子ツールKir2.1を組み合わせた実験系（Hagihara et al, *Nature Neuroscience*, 2015）、chemogenetics、optogeneticsを用いた時期特異的な神経活動操作を組み合わせて、生後2週間の特定の時期に神経活動を回復させることで、脳梁軸索投射の回復の有無を調べる神経活動レスキュー実験を行った。Tet-off遺伝子発現システムと神経活動抑制のための分子ツールKir2.1を組み合わせた実験系から、生後6日目から遺伝子発現をオフにするための薬剤Doxを投与すると、脳梁軸索投射が回復した（図2）。この条件で、生後10日目にKir2.1の発現がオフになること（Dox投与から遺伝子発現が実際にオフになるまでに数日のタイムラグがあるため）、生後12日目の大脳で確

かに自発神経活動が回復していることを確認した。従って、この回復した自発神経活動が脳梁軸索投射の形成・回復に寄与したと考えられる。生後10日以降の神経活動が脳梁軸索投射に重要であることは、chemogeneticsの実験においても確かめた。一方、生後15日目以降に神経活動を回復させても、軸索投射の回復が見られないことも明らかにした。つまり、脳梁軸索投射の形成・回復には、臨界期のようなものがあることが示唆された。これらの結果から、脳梁軸索投射の形成には、生後10日目から15日目の自発神経活動が必要であることがわかった。

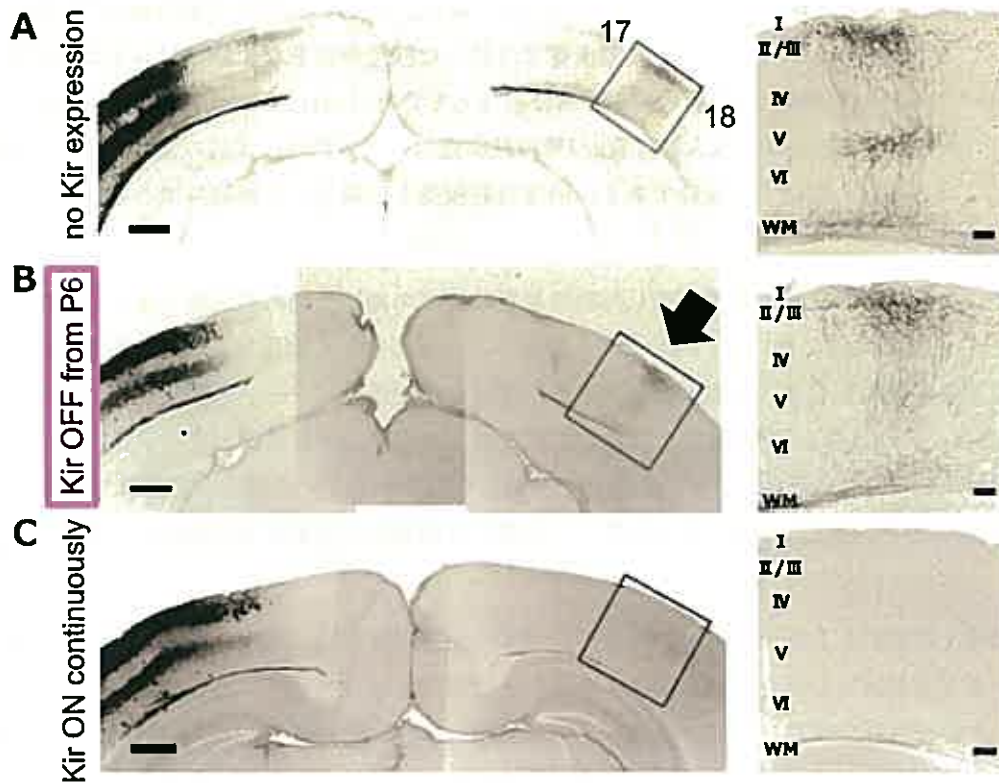


図2 時期特異的な神経活動操作と脳梁軸索投射

A: コントロールの脳梁軸索投射 (生後15日齢)

B: 生後6日目からDoxを投与してKir2.1の発現をオフにした個体の脳梁軸索投射 (生後15日齢)

C: Kir2.1を発現させ続けた個体の脳梁軸索投射 (生後15日齢)

次に、形成・回復に寄与した自発神経活動のパターンを明らかにする目的で、時期特異的な神経活動操作によって回復した神経活動パターンをより詳細に解析した。ここで解析した神経活動は、in vivo  $Ca^{2+}$  imagingの手法 (Hagihara et al, Nature Neuroscience, 2015) によって得られたものである。コントロール (神経活動操作を行っていないもの) の大脳で見られる自発神経活動は、Hイベント (60%以上の神経細胞が参加する同期活動) とLイベント (20-60%の神経細胞が参加するより少数の神経細胞群の同期活動) に分類できる。Kir2.1を発現させたものでは、両方の神経活動パターンが抑制された。軸索投射が回復した生後10日以降の神経活動を回復させたものでは、Lイベントは回復していたが、Hイベントは回復していなかった。すなわち、Lイベントがあれば、脳梁軸索投射の形成には十分であることが示唆された。我々の条件でLイベントしか回復しなかったことの原因は不明である。コントロールの脳において、生後1週まではHイベント、生後2週はLイベントが主な自発神経活動パターンであることが関係するのかもしれない (つまり、生後2週目のみに神経活動を回復させると、その活動パターンはLイベント主体になるのかもしれない)。

なぜイベントという、より参加細胞数の少ない同期活動でも、脳梁軸索投射の形成・回復に十分であるのかの1つの可能性として、このイベントが、脳梁投射細胞の同期活動であることが考えられた。この仮説に立つと、(1) 脳梁投射細胞とそれ以外の領域に投射する細胞群は異なった細胞群であり、(2) 脳梁投射細胞同士は特異的な同期活動を示す、ことが推測される。

(1) に関して、逆行性色素を用いた実験で検証を行った。マウスの大脳を用いて、右半球に赤色系の逆行性色素を注入し、左半球にある脳梁投射細胞の細胞体を蛍光標識した。さらに、左半球にある同側投射領域に緑色系の逆行性色素を注入して、同側投射細胞(一部)も標識した。赤と緑で標識される細胞(それぞれ脳梁投射細胞と同側投射細胞)の重なり具合を調べると、大脳皮質2/3層において、両者はほぼ重ならないことがわかった。ちなみに、大脳皮質では様々な機能単位をなす細胞がコラム状に分布することがあるが、脳梁投射細胞、同側投射細胞ともに混在していた(salt-and-pepper状の分布をしていた)。実験結果から、脳梁投射細胞は大脳皮質2/3層神経細胞の一部(割合は大脳の領域による: 視覚野の両眼性領域では15-20%)をなす細胞群であり、同側投射細胞とは異なった細胞群であることが示唆された。

(2) に関して、上記のようにして蛍光標識した脳梁投射細胞群の神経活動の同期性を確かめる実験を行った。大脳皮質視覚野2/3層において、赤色で蛍光標識された神経細胞を脳梁投射細胞、標識されなかった細胞を非脳梁投射細胞として、視覚刺激に対する応答時の神経活動パターンを相互比較し、signal correlation、noise correlationを調べたところ、脳梁投射細胞同士の神経活動パターンは、脳梁投射細胞と非脳梁投射細胞間の神経活動パターンに比べて有意に相関があるという結果が得られた。従って、脳梁投射細胞群はお互いに機能的なサブネットワークを作り、同期的に活動する傾向をもつことが示唆された。

これらの結果は我々の仮説を支持するものであるが、成体のマウスを用いた実験から得られたものであることに注意する必要があると考えている。成体を用いた理由は、逆行性色素の注入を領域特異的に正確に行い、さらに標識された細胞(群)の活動パターンをin vivo  $Ca^{2+}$  imagingの手法で検証するには、まず成体で技術を確立する必要があったためである。今後同様の実験(1)(2)を生後2週のマウスを用いて進める。

回路形成期の生後2週において、脳梁投射細胞群はお互いに特異的につながってサブネットワークを形成し、同期活動をする(その同期活動が特異的な脳梁軸索投射の形成に寄与する)のであろうか。それを確かめる第一歩として、生後2週において脳梁投射細胞を逆行性標識して、脳梁投射細胞同士が選択的につながっているかどうかを検証する実験を行った。具体的には、逆行性標識された脳梁投射細胞同士、又は標識された脳梁投射細胞とされていない非脳梁投射細胞を脳スライス標本上でパッチクランプ電気記録して、お互いの間にgap junctionによるつながりがあるかどうかを調べる実験を行った。その結果、脳梁投射細胞同士は有意な確率でギャップ結合によってつながっていることがわかった。回路形成初期にギャップ結合でつながっている細胞同士は、発達に伴ってより高率かつ強いシナプス結合でつながることが示唆されており(Maruoka, Nakagawa et al, Science, 2017)、生後初期の脳梁投射細胞同士のギャップ結合によるつながりが、特異的なサブネットワークの形成につながる可能性を示唆するものと考えてさらに実験を進めている。