

氏 名 中沢 信吾

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2041 号

学位授与の日付 平成 30 年9月28日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻  
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Dynamic mechanism of neural circuit refinement in neonatal  
cortex

論文審査委員 主 査 教授 木村 暁  
教授 平田 たつみ  
教授 川上 浩一  
教授 澤 斉  
教授 山本 亘彦  
大阪大学 生命機能研究科

(様式3)

## Summary of Doctoral Thesis

Name in full Nakazawa, Shingo

Title Dynamic mechanism of neural circuit refinement in neonatal cortex

Proper neuronal circuit function relies on precise dendritic projection, which is established through activity-dependent refinement during early postnatal development. Mouse barrel cortex layer 4 (L4) have been used as a model of dendritic refinement. This area contains “barrels” corresponding to the arrangement of whiskers. Spiny stellate (SS) neurons located around the barrel edge extend their basal dendrites (BDs) toward the barrel center (BD orientation bias), where thalamocortical axon (TCA) termini are clustered. This feature is formed during the first postnatal week depending on TCA inputs. However, how SS neurons dynamically refine their dendritic projections and how TCA inputs regulate these dynamics are poorly understood.

To elucidate the dynamic mechanism of dendritic refinement, I conducted *in vivo* 2-photon imaging of neonates. Our laboratory previously developed the Supernova system and TCA-GFP Tg mouse to visualize L4 neurons and TCA termini, respectively. I here designed experimental apparatus/procedures for long-term imaging. Using these methods, I performed imaging repeatedly every eight hours from postnatal day 3 (P3) to P5 and at P6.

In adult L4, there are two types of excitatory neurons: SS and star pyramid neurons, which are classified by the absence/presence of an apical dendrite (AD). I observed that most L4 neurons had an AD at P3 and the majority of them retracted their AD during later development. I found that neurons which retracted ADs had BD orientation bias at P6, suggesting that these neurons were SS neurons.

Long-term imaging enabled retrospective cell type identification even before the initiation of AD retraction. By retrospective analyses, I found that prospective SS

neurons located around the barrel edge (eSS neurons) already had BD orientation bias at P3. However, BD morphology was still primitive at this stage, and I found that BD orientation bias increased from P3 to P6. I also found that BD orientation bias at P3 and that at P6 had different characteristics. At P3, the number of inner BD trees was larger than that of outer trees, while the morphologies of inner and outer BD trees were similar. Between P3 and P6, the number of inner trees and outer trees and the morphology of individual outer trees remained similar. In contrast, the length and tip numbers of individual inner trees were larger at P6 than at P3. These results suggest that BD orientation bias at P3 is accomplished by forming more BD trees inside than outside, while orientation bias enhancement between P3 and P6 primarily relies on inner BD tree-selective elaboration. In other words, eSS neurons acquire BD orientation bias through at least two phases bordered by around P3.

Next, I investigated the BD tree dynamics by analyzing eight-hourly images. I found that BD trees emerged and disappeared extensively throughout the imaging period. BD tree turnover was observed both inside and outside the barrel. Inner trees had higher survival efficiency than outer trees, and only long-survived inner trees were elaborated extensively. These results suggest that long survival is preferentially conferred to some trees extending toward TCAs and that these trees are elaborated to be winners.

In addition to eSS neurons, I also characterized SS neurons in infraorbital nerve (ION)-cut mice (iSS neurons). At P6, eSS neurons had many short trees both inside and outside the barrel, and elaborated trees were found only inside. On the other hand, most trees of iSS neurons had lengths close to the mean value, and shorter/longer trees were rare. Additionally, iSS neurons exhibited little BD tree turnover.

We recently reported unique features of spontaneous activity in neonatal barrel cortex L4, which shows spatially separated patterns corresponding to the barrel. I here

found that, when IONs were cut at P0, spatial patterns of spontaneous activity were disrupted and overlapped each other. These results suggest that iSS neurons should receive TCA inputs without bias in the directionality. In contrast, eSS neurons receive TCA inputs from one direction. I propose the bias in TCA inputs affects BD tree turnover and selective elaboration. To test this idea, I analyzed BD tree turnover of SS neurons located in the barrel center (cSS neurons), which should receive TCA inputs from all direction, similar to iSS neurons. I found that cSS neurons showed BD tree turnover rate and individual tree length distribution similar to those of iSS neurons. The result supported my idea that eSS neurons establish the characteristic BD projection pattern through BD tree turnover and selective elaboration induced by spatially biased TCA inputs.

In this study, I succeeded long-term *in vivo* imaging of neonates and revealed dynamic mechanisms of dendritic refinement of barrel cortex SS neurons. In addition, my retrospective analysis highlights the novel features of L4 neurons in early neonatal stages.

## 博士論文審査結果

Name in Full 氏名 中沢 信吾

論文題目 Dynamic mechanism of neural circuit refinement in neonatal cortex

神経回路が適切に形成されるためには、ニューロンの樹状突起が適切な方向に伸展する必要がある。中沢信吾さんは樹状突起が生後、神経活動依存的に伸長する過程に着目し、その様子を生きたマウスの脳内で直接観察することにより、ニューロンの形態が適切に形成されるメカニズムを明らかにした。具体的には、マウス大脳皮質体性感覚野のバレル神経回路を研究対象とした。バレル構造とは口髭の1本1本に対応して、皮質細胞と thalamocortical axon (視床皮質軸索、TCA)が集積している脳内の構造である。脳の第IV層の spiny stellate neuron (有棘星状神経細胞、SSニューロン)のうち、バレル構造の端(edge)付近に細胞体が存在するもの(eSSニューロン)は、その basal dendrite (基底樹状突起、BD)をバレル構造の内側に偏って伸長させる。『このような偏りのあるBDの伸長がどのように起きるのか?』を中沢さんは解析した。従来のeSSニューロンの経時観察は最も早くて生後5日齢(P5)からであり、この時点ではすでにeSSニューロンのBDはバレル構造の内側に大きく偏って伸長している。中沢さんはこの経時観察をP2から行うことに成功した。これは顕微鏡観察するためにマウスの頭に装着する器具を小さく改良したり、適切な母マウスをあらかじめ選別することにより達成した。中沢さんが自ら確立したこの独自の実験系を用いて、中沢さんはeSSニューロンの形状をP3からP6にかけて同一細胞で直接観察し、以下の成果をあげた。

1. 第IV層の興奮性ニューロンにはSSニューロンとSPニューロン (star pyramidal neuron) とがある。SPニューロンは、SSニューロンとは異なりBDの方向性に偏りがなく、またSSニューロンが持たない apical dendrite(先端樹状突起、AD)を有するという特徴がある。中沢さんの観察では、SSニューロンもP3の時点ではADを有していることが明らかとなり、それが時間経過にしたがって短縮する様子が観察された。SSニューロンにおけるADの短縮を、同一細胞において継時的に観察したのは本研究が初めてである。
2. eSSニューロンとSPニューロンは、P3の時点で共にADを有する点では区別ができないが、BDの伸長の偏り (バレル方向に伸長する樹状突起の総延長距離を細胞全体の樹状突起の距離で割った OBI という指標で定量化) はeSSニューロンのみで見られた。このことは、P3の時点でSSニューロンであるか、それともSPニューロンであるかの運命が決定していることを示す新発見である。また、eSSニューロンのBDの伸長の偏りがP3の時点ですでに存在することを明らかにしたのも初めてである。
3. 中沢さんはP3の時点でeSSニューロンのBDの総延長距離の偏りをもたらず要因をさらに定量的に解析した。あるニューロンのBDのうち、同じ根元で細胞体と連結し

ている BD のグループを 1 本の「樹(tree)」と定義した上で、「樹の本数」と「1 本の樹あたりの長さ」を定量したところ、P3 時点では「樹の本数」がバレル側で有意に多かった。

4. P6 の時点では、BD の総延長距離の偏りがさらに大きくなる (OBI が上昇)。このとき、「樹の本数」の偏りは P3 時点と同程度である一方で、P3 時点では有意差がなかった「1 本の樹あたりの長さ」の偏りが顕著に生じていることがわかった。このことから、中沢さんは eSS ニューロンで起こる樹状突起の偏りは 2 つの過程に分けられると提案した。過程 I は P3 までに起こり、「樹の本数」をバレル側とそうでない側で偏らせる。過程 II は P3 から P6 にかけて起こり、「一本の樹あたりの長さ」を偏らせる。BD の偏りを定量的に解析し、その 2 つの要因が別のタイミングで起きることを明らかにしたのは本研究が初めてであり、樹状突起が方向性をもって伸長するメカニズムの理解を大きく進展させるものである。
5. 過程 II (P3~P6) において「1 本の樹あたりの長さ」がバレル側で長くなる様子を詳細に観察した。すると、バレル側でも逆側でも BD の樹はダイナミックに消失や出現を繰り返すことがわかった。しかしバレル側では一定の頻度で消失を免れる樹が現れ、その樹が伸長や枝分かれを続けることにより、結果的にバレル側での樹状突起の発達が進められることがわかった。
6. バレルに存在する TCA からの入力が、eSS ニューロンの BD の偏りに果たす役割を理解するために、バレルの内側 (center) に細胞体が存在する cSS ニューロンの BD の定量化を行った。cSS ニューロンでは TCA からの入力の方向性に偏りが無い。cSS ニューロンの BD の消失や出現は eSS ニューロンほど頻繁ではなく、一部の BD のみが消失を免れるということではなかった。この結果は入力の偏りが、BD の消失や出現頻度の調節を介して、伸長の偏りを引き起こしている可能性を示唆した。
7. 神経活動の空間的偏りの重要性は、infraorbital nerve (ION) を切断する実験でも支持された。ION を経由する感覚刺激がなくても TCA は自発的に興奮することが中沢さんの所属研究室の先行研究でわかっている。中沢さんは、カルシウムイメージングを行い、ION を切断するとバレルの空間的配置とよく一致した TCA の発火パターンが見られなくなることを明らかにした。中沢さんは、ION 切断条件下の SS ニューロン (iSS ニューロン) における BD の消失と出現が、cSS ニューロンに近いものになることを見出した。

以上の成果は、哺乳類の神経回路が生後、神経活動に依存して構築される過程に関する新知見にあふれており、同分野の今後の研究に対して大きなインパクトを与える重要な成果である。よって、審査委員会は、本論文が学位の授与に値すると判断した。

---

(備考)

1. 用紙の大きさは、日本工業規格 (JIS) A4 縦型とする。
2. 1 行あたり 40 文字 (英文の場合は 80 文字)、1 ページあたり 40 行で作成する。
3. 上マージン、下マージン、右マージンは 2 cm、左マージンは 2.5 cm とする。