

氏 名 木村 ちえみ

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2420 号

学位授与の日付 2023 年 3 月 24 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 Study of somatosensory circuit development using brainstem
NMDAR-deficient mice

論文審査委員 主 査 木村 暁
遺伝学専攻 教授
平田 たつみ
遺伝学専攻 教授
小出 剛
遺伝学専攻 准教授
久保 郁
遺伝学専攻 准教授
丸山 千秋
東京都医学総合研究所
脳神経回路形成プロジェクト プロジェクトリーダー

(Form 3)

Summary of Doctoral Thesis

Name in full Kimura, Chiemi

Title

Study of somatosensory circuit development using brainstem NMDAR-deficient mice

Mammalian neural circuits develop in activity-dependent manners during late embryonic and early postnatal stages. The rodent whisker-barrel system is an excellent model for studies of activity-dependent neural circuit formation. In rodents, tactile information from the whiskers reaches through the brainstem ventral trigeminal principal nucleus (vPrV) and thalamic ventroposterior medial nucleus (VPM) to layer 4 of the posteromedial barrel subfield (PMBSF) region of the somatosensory cortex, where there are whisker-related patterns called barrelettes, barreloids, and barrels, respectively. These patterns are formed sequentially from the periphery to the center in activity-dependent manners during the first postnatal week. Previous studies in our lab have revealed that N-methyl-D-aspartate-type ionotropic glutamate receptors (NMDARs) in the cortex and thalamus play important roles in somatosensory circuit refinement. On the other hand, the roles of brainstem NMDARs in the development of somatosensory neural circuits, particularly cortical neural circuits, is not well known.

To address this issue, I here used mice that lack NR1, the essential NMDAR subunit, in the brainstem. I crossed NR1-flox mice with Krox20-Cre mice, in which Cre-mediated recombination was found in the brainstem vPrV but not in the thalamus or cortex, and obtained Krox20-Cre; NR1flox/flox (Bs[K]-NR1KO) mice. In Bs[K]-NR1KO mice, barrelettes were absent and barreloids and barrels were partially impaired. Functional one-to-one relationships between whiskers and barrels were also partially disturbed in these mice. I thought that these mild phenotypes in Bs[K]-NR1KO mice

may ascribe to low recombination efficiencies in the vPrV in Krox20-Cre mice. To improve the recombination efficiency in the vPrV, I crossed Hoxa2[R2]-Cre (Tg2) mice, which also show Cre-mediated recombination in the vPrV, with Bs[K]-NR1KO mice to obtain Krox20-Cre; Hoxa2[R2]-Cre (Tg2); NR1flox/flox (Bs[KH]-NR1KO) mice. I found that, in Bs[KH]-NR1KO mice, all barrelettes, barreloids and barrels were absent. The detailed analysis of the barrel structure in Bs[KH]-NR1KO mice showed that the boundaries of thalamo-cortical axon (TCA) patches were hardly distinguished and cortex layer 4 neurons, which are arranged around individual TCA patches in normal mice, were uniformly distributed in the PMBSF. In normal mice, the septa, which are the regions between barrels, can be visualized by immunostaining for an extracellular matrix marker, whereas in Bs[KH]-NR1KO mice, septa were not detected. These results demonstrate that brainstem NMDARs are important not only for barrelette and barreloid formation but also for barrel formation. Thus, brainstem NMDARs indirectly regulate neural circuit refinement in the cortex.

On the other hand, it was somewhat unexpected that barrels were present to some extent in Bs[K]-NR1KO mice, which have no barrelettes, because barrels are thought to be formed by using barrelettes as a template. My above results suggest that even though there are no barrelettes, a trace level of template could be present in Bs[K]-NR1KO mice. If so, how are barrels formed from that template in Bs[K]-NR1KO mice? I assumed that thalamic NMDARs may contribute to barrel formation in Bs[K]-NR1KO mice. To assess this possibility, I generated Krox20-Cre; Sert-Cre; NR1flox/flox (Bs/Th[KS]-NR1KO) mice, in which thalamic NMDARs of Bs[K]-NR1KO mice were ablated. I found that barrels were absent in Bs/Th[KS]-NR1KO mice. These results may suggest the possibility that thalamic NMDARs serve for cortical circuit refinement in Bs[K]-NR1KO mice by compensating a brainstem-derived incomplete template.

During the analysis of Bs[K]-NR1KO and Bs[KH]-NR1KO mice, I also found that areas of vPrV, VPM and PMBSF in both Bs[K]-NR1KO and Bs[KH]-NR1KO mice

were smaller than those in control mice. These results suggest that brainstem NMDARs affect the size of somatosensory maps not only in the brainstem but also in the thalamus and cortex.

In this study, I found followings. First, all barrelettes, barreloids and barrels were absent in Bs[KH]-NR1KO mice, demonstrating that the brainstem NMDARs are important for the somatosensory neural circuit development in the brainstem, thalamus and cortex. Second, in Bs[K]-NR1KO mice, barrelettes were absent but barrels were present to some extent, indicating that it is possible that barrels are formed even without detectable barrelettes. Third, when thalamic NMDARs were ablated in Bs[K]-NR1KO mice, barrels were absent, suggesting the possibility that thalamic NMDARs may play a role in the barrel formation when the brainstem-derived template is incomplete. Fourth, vPrV, VPM and PMBSF were shrunk in Bs[K]-NR1KO and Bs[KH]-NR1KO mice, demonstrating that brainstem NMDARs affect the size of somatosensory maps not only in the brainstem but also in the thalamus and cortex.

Taken together, the present study demonstrates important roles of brainstem NMDARs in the somatosensory neural circuit development and also highlights aspects of thalamic NMDAR function in the cortical circuit refinement.

博士論文審査結果

Name in Full
氏名 木村 ちえみ

Title
論文題目 Study of somatosensory circuit development using brainstem NMDAR-deficient mice

出願者である木村ちえみさんは、神経活動依存的な神経回路形成機構に興味を持ち研究を行った。マウスの体性感覚系においては、それぞれのヒゲに対応した神経が、脳幹においては barrelettes、視床では barreloids、皮質では barrels と呼ばれるクラスターを形成し、刺激を伝える。出願者は神経活動依存的にこれらのクラスターが形成されることから、barrelettes/barreloids/barrels の形成機構を対象に、神経活動依存的な神経回路形成機構を明らかにする研究を行った。

出願者は、「脳幹 barrelettes が視床 barreloids 形成の鋳型として、視床 barreloids が皮質 barrels の鋳型として働き、それぞれのクラスターが形成される」という仮説に基づき、研究をおこなった。NR1 遺伝子はグルタミン酸受容体 NMDA 受容体の主要サブユニットをコードし、体性感覚系におけるクラスター形成に必須な因子であることが知られている。先行研究では視床特異的に NR1 をノックアウトすると、視床 barreloids に加え皮質 barrels の構造も不明瞭になることが示されていた。一方で、脳幹特異的に NR1 をノックアウトした際に、脳幹 barrelettes、視床 barreloids、皮質 barrels の構造がどうなるかはわかっていなかった。

出願者は脳幹特異的に NR1 をなるべく完全にノックアウトするため Krox20-Cre/Hoxa2[R2]-Cre(Tg2); NR1^{flox/flox} マウス（「KH マウス」と命名）を構築した。このマウスでは、脳幹 barrelettes 構造に加えて、視床 barreloids 構造や皮質 barrels 構造が形成されていなかった。このことは脳幹における NR1 が視床 barreloids や皮質 barrels の構造形成に必要であることを初めて示したものであり、上記の鋳型仮説を支持するものである。また、脳幹特異的な NR1 ノックアウトでは、クラスター構造のみならずヒゲからの刺激の伝達を担う脳幹 vPrV 領域、視床 VPM 領域、皮質 PMBSF 領域の面積が小さくなっていることも発見した。この結果は脳幹の構造が視床や皮質の構造に影響を与えることを示す興味深い知見である。

出願者は脳幹で NR1 がノックアウトされた細胞の割合がより低い(6 割程度と推定される)Krox20-Cre; NR1^{flox/flox} マウス（「K マウス」と命名）も解析した。このマウスでも、脳幹での神経細胞のクラスター構造(barrelettes 構造)が認められなかった。一方で、視床 barreloids や皮質 barrels については不完全ながらも構造形成が認められた。このことは、脳幹における明らかなクラスター構造が解剖学的に認められなくても、ある程度は視床 barreloids や皮質 barrels が形成されることを示す意外な発見である。

出願者は以上の結果を統合して、脳幹に明らかな barrelettes 構造が形成されていなくても、脳幹にある程度の NR1 活性があれば、神経活動が視床や皮質に伝わる過程において

クラスター化が促進され、視床 barreloids や皮質 barrels の形成が可能になるとの新たなモデルを提唱している。このモデルは、脳幹における NR1 のノックアウトに加えて、視床において NR1 をノックアウトする (Krox20-Cre / Sert-Cre; NR1^{flox/flox}、「KS マウス」と命名) と、皮質 barrels 構造がほぼ完全に消失するという実験結果によって支持された。

このように出願者は神経活動依存的な神経回路形成の重要なモデル系である barrelettes/barreloids/barrels の形成機構の理解を大きく前進する成果を挙げた。出願者の研究は、脳幹部の NR1 活性が視床 barreloids や皮質 barrels の形成にとって重要であることを証明したと同時に、脳幹部の NR1 活性が低下しても、視床の NR1 活性が補填的に働くことで barrelettes/barreloids/barrels の形成を促すという新たなモデルを提案する重要な成果である。以上の理由により、審査委員会は、本論文が学位の授与に値すると判断した。