

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430035

研究課題名(和文)分子発現パターンに注目した自閉症関連小脳神経回路の解析

研究課題名(英文) Analysis on the cerebellar neuronal circuitry that is related to autism spectrum disorders based on molecular expression patterns

研究代表者

藤田 啓史 (Fujita, Hirofumi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：60725901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：自閉症スペクトラム障害(ASD)と関連の強い小脳の第VI-VII小葉に関して、その構築と発生過程、入出力軸索投射を解析した。その小葉の半球部である第I脚・第II脚は霊長類でよく発達している。まず、霊長類の小脳で両者を合わせた部分がげっ歯類小脳で第I脚と命名されている小葉と相同であることを示した。げっ歯類の第I脚は、Pcdh10陽性領域が大きく、特異的な神経投射パターンを持っていた。さらに、マウス胎生期の小脳において、Pcdh10陽性領域の横方向への成長が形成途上の第VI-VII小葉・第I脚において特異的に見られた。以上の結果は哺乳類小脳のこれらの小葉の構築および入出力回路の特異性を支持する。

研究成果の概要(英文)：Cerebellar lobules VI-VII are closely related to autism spectrum disorder syndrome (ASD). We analyzed structure, development and axonal projection patterns of these lobules in primates and rodents. Crus I and crus II lobules, which are the hemispheric part of lobules VI-VII, are well-developed in the primate cerebellum. We demonstrated that a combination of both of crus I and crus II in the primate is homologous only to the lobule that is defined as crus I in the rodent. Crus I of the rodent cerebellum contained large Pcdh10-positive compartments and had specific axonal projection patterns. Furthermore, transverse growth of Pcdh10-positive compartments occurred specifically in the developing lobules VI-VII and crus I. These results support the uniqueness of structure and input-output axonal projections of lobules VI-VII and crus I of the mammalian cerebellum.

研究分野：神経解剖

キーワード：小脳 自閉症スペクトラム障害 マウス マーモセット Pcdh10 比較解剖 神経発生 神経回路

1. 研究開始当初の背景

(1) 対人コミュニケーションなどが障害される自閉症スペクトラム障害 (ASD) は、我が国では約 100 人に 1 人が発症しているとされており、これに関連して現在までに様々な遺伝子発現や脳構造の異常が精力的に調べられている。そのため、その発現部位と脳部位とを組み合わせることで、その症状を説明するような神経回路およびその本質的機能障害についての検討を行えるだけの基盤が整いつつある。ASD において異常が観察される脳部位、あるいは ASD 関連遺伝子の発現する部位として下前脳回、大脳前頭前野、帯状回、大脳白質、扁桃核、海馬、大脳基底核、小脳などが報告されている。我々は、その中でも特に、ASD との関連が深いとされる小脳に着目した。

(2) 小脳は、運動機能のみならず、非運動機能にも関係が強いことが近年明らかにされつつある。ASD においては、構造や活動の異常が特に頻りに検出される部位でもあるため、その病態と強く関連すると考えられている。これを実験的に裏付けるデータのひとつに、脳の様々な種類の神経細胞のなかで小脳プルキンエ細胞のみに特定のシナプス異常を引き起こすような掛け合わせをした遺伝子改変マウスにおける研究が挙げられる。このマウスを用いた解析において、社会性行動スコアの低下などの様々な ASD 様の行動異常が出現したことから、ASD における小脳異常は、他の脳部位の異常の結果として引き起こされるというよりも、他の脳部位の異常を引き起こす原因のひとつとなりうることを示唆された。実際に、小脳を刺激すると内側前頭前野 (他者の表情を判断する際に活動する部位で、ASD ではその活動が弱いと報告されている) にて応答が得られることがげっ歯類において知られており、この回路と ASD 症状との関連が示唆されている。従って、げっ歯類モデルを用いて、小脳の神経機能の

異常と ASD 発症との関連の神経メカニズムを詳しく解析することが可能となる可能性が高い。しかし、げっ歯類モデルにおいて小脳と ASD とを結びつけるためには、マウス-ヒト間における小脳構築の相同性の問題が未解決である。さらに、今後の研究を行ううえで、小脳の入出力回路の解剖学的な同定が不可欠である。

2. 研究の目的

(1) 小脳は横方向に伸びる多数の葉構造を持っており、それらは深い溝によって第 I-X 小葉に区分されている。このなかでも ASD においては (虫部) 第 VI-VII 小葉と、それら小葉の領域から半球部へと伸びる半球部第 I 脚・第 II 脚において構造や機能の異常が頻りに検出されている。これらの部位は、ヒト小脳において情動機能や認知機能との関連が示唆されている部位と一致するため、我々は、これら小脳部位に特徴的な神経回路の異常が ASD と関連するのではないかという仮説を立てている。しかし、異なる動物種間でのこれら小脳機能区分の比較のためには、小脳の相同な小葉が動物種間で正しく同定されていることが必要である。われわれは、予備的な研究の段階で現在標準的に用いられている小脳小葉の同定が相同性を正しく反映していない可能性に気づき、この点の再検討をおこなった。その過程で、各小葉の神経投射も検討した。それにより、小脳の外観からだけでなく、神経細胞の種類や入出力回路を反映させて小脳の構築を理解する手法を確立した。また、ASD は発達過程で明らかとなってくるため、これら小脳区分における神経回路の発達期の形成過程を調べることも重要であると考えられた。そこで、特に小葉構造が形成される発達上の時期において、ASD において注目される (虫部) 第 VI-VII 小葉と (半球部) 第 I 脚の形成過程を把握することが必要と考えられた。以上から、本研究では、ASD に関する仮説を検討する基盤を整

えるために、A) 小脳半球部第 I 脚・第 II 脚のマウス-ヒト間の相同性、また、B) 小脳虫部第 VI-VII 小葉および半球部第 I 脚の発達期神経回路の同定、を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) A) 異なる動物種間で相同な脳部位を同定する比較解剖学的手法として、古くには外観の比較解析、近年では入出力神経回路の比較解析、また、分子発現で区別される異なる神経細胞種の空間的配置の比較解析等がよく用いられる。小脳においては、マウス・マーモセット共に Aldolase C という分子が特異な縦縞模様状に発現することがよく知られており、この縦縞は入出力神経回路と密な関係があることが我々を含めた複数の研究グループのこれまでの解析で判明している。そこで、小脳分子発現・入出力回路を Aldolase C の発現パターンを介して調べた。それによりマウス・マーモセット間の小脳区分の相同性を確認し、その後に主に入出力回路の検討によりマーモセット・マカクザル・ヒト間での小脳区分の相同性を調べた。

(2) B) 本研究では、特定の神経細胞群を、特定の分子発現により標識することで、小脳区分特異的な神経回路の同定を試みた。小脳虫部第 VI-VII 小葉および半球部第 I 脚にはプロトカドヘリン 10 (Pcdh10) という ASD 関連遺伝子の分子発現が特徴的な縞状・パッチ状に強く見られることがこれまでの我々の研究で明らかになっている。この発現パターンは Aldolase C の発現パターンと密接に関係しているため、入出力投射とも対応付けて考えることができる。我々は、Pcdh10 の発現が可視化された遺伝子改変マウス (OL-KO) の小脳連続切片を詳細に解析することで、大まかな小脳入出力回路が形成される胎生期小脳の Pcdh10 発現区画の成長過程を三次元的に追跡した。その発達期小脳の再編成や分子発現の変化の過程を解析するなかで、小脳の非

運動機能に関連する部位、特に ASD 関連領域が何らかの特徴のある部位なのか検討した。

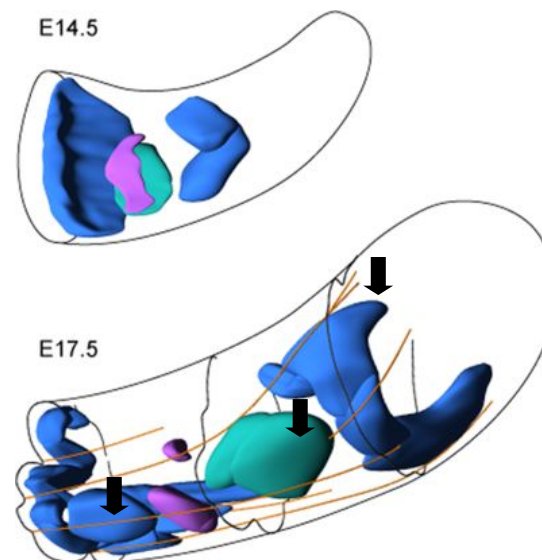


図 1. 胎生期小脳における Pcdh10 発現部位の三次元再構築

4. 研究成果

(1) A) ヒト、マカク、マーモセット、ラット、マウスの小脳について MRI 画像あるいは連続切片から三次元形態解析を行うとともに、軸索投射パターンや分子発現パターンについてマーモセット、ラット、マウスについて解析した。マウス・マーモセット間での Aldolase C 発現および入出力神経回路の比較を通して考えると、霊長類小脳において非運動機能との関連が強く示唆されるとともに ASD 関連部位でもある第 I 脚・第 II 脚と呼ばれる部位が両者を合わせてげっ歯類の第 I 脚と相同であると考えられた (発表論文 8)。この結果から、げっ歯類を用いた ASD 関連小脳部位の解析が可能となった。

(2) B) Pcdh10 発現がレポーター発現で標識された OL-KO マウスを用い、Pcdh10 発現区画の構築とその発生過程、入出力軸索投射を解明することを本研究の中心とした。マウス成獣小脳皮質における Pcdh10 発現区画を、標準的マーカー分子 Aldolase C の発現パターンと比較して同定し、さらに、小脳核と下オ

リーブ核においても、小脳皮質と部位対応の関係にあると思われる区画に特異的な Pcdh10 発現が存在することを発見した(発表準備中)。さらに、大まかな小脳入出力回路が形成される胎生 14.5 日から 17.5 日の小脳 Pcdh10 発現区画の成長過程を OL-K0 マウスにおいて三次元的に追跡した。その区画の中に、通常の縦方向への成長でなく、横方向への成長をする部分があり(図 1、矢印の部分)、それが第 VI-VII 小葉・第 I 脚へと成長することを見出した。この結果は、第 VI-VII 小葉・第 I 脚の入出力回路また機能の特異性を支持した(発表論文 1)。

(3) 本研究の成果のまとめとしては、まず、自閉症スペクトラム障害に関する小脳の関与をマウスモデルで研究する場合、ヒトの第 I 脚・第 II 脚に相当する標的領域としてマウスの第 I 脚に焦点を当てればよいということを明らかにしたこと、次に、この領域の神経回路結合と形成過程が他の小脳領域とどのように異なるかを示したことである。これらの成果は、ほぼ現在までに国際学術誌に論文として発表済みである。今後、小脳の自閉症スペクトラム障害発症に関与する神経メカニズムをさらに理解していく上で、重大な知見と考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 9 件)

[原著論文]

1. Vibulyaseck S*, Fujita H*, Luo Y, Tran AK, Oh-Nishi A, Ono Y, Hirano S, Sugihara I. Spatial rearrangement of Purkinje cell subsets forms the transverse and longitudinal compartmentalization in the mouse embryonic cerebellum. *J Comp Neurol*. 2017 May 24. doi: 10.1002/cne.24250. [Epub ahead of print] PubMed PMID:28542916. (*equal contribution) 査読有
2. Lang EJ, Apps R, Bengtsson F, Cerminara NL, De Zeeuw CI, Ebner TJ, Heck DH, Jaeger D, Jörntell H, Kawato M, Otis TS, Ozyildirim O, Popa LS, Reeves AM, Schweighofer N,

Sugihara I, Xiao J. (2017) The roles of the olivocerebellar pathway in motor learning and motor control. A consensus paper. *Cerebellum*. 2017 Feb;16(1):230-252. doi: 10.1007/s12311-016-0787-8. PMID: 27193702 査読有

3. Tang T, Xiao J, Suh CY, Burroughs A, Cerminara NL, Jia L, Marshall SP, Wise AK, Apps R, Sugihara I, Lang EJ. (2017) Heterogeneity of Purkinje cell simple spike - complex spike interactions: zebrin- and non-zebrin-related variations. *J Physiol*. 2017 May 18. doi: 10.1113/JP274252. [Epub ahead of print] PMID: 28516455 査読有
4. Vibulyaseck S, Luo Y, Fujita H, Oh-Nishi A, Ohki-Hamazaki H, Sugihara I. Compartmentalization of the chick cerebellar cortex based on the link between the striped expression pattern of aldolase C and the topographic olivocerebellar projection. *J Comp Neurol*. 2015 Mar 2. doi: 10.1002/cne.23769. PubMed PMID: 25732420. 査読有
5. Lang EJ, Tang T, Suh CY, Xiao J, Kotsurovskyy Y, Blenkinsop TA, Marshall SP, Sugihara I. (2014) Modulation of Purkinje cell complex spike waveform by synchrony levels in the olivocerebellar system. *Front Syst Neurosci*. 2014 Oct 30;8:210. doi: 10.3389/fnsys.2014.00210. PMID: 25400556 査読有
6. Xiao J, Cerminara NL, Kotsurovskyy Y, Aoki H, Burroughs A, Wise AK, Luo Y, Marshall SP, Sugihara I, Apps R, Lang EJ (2014) Systematic regional variations in Purkinje cell spiking patterns. *PLoS ONE*. 2014 Aug 21;9(8):e105633. doi: 10.1371/journal.pone.0105633. 査読有
7. Luo Y, Sugihara I. Cerebellar afferents originating from the medullary reticular formation that are different from mossy, climbing or monoaminergic fibers in the rat. *Brain Res*. 2014 May 30;1566:31-46. doi: 10.1016/j.brainres.2014.04.020. Epub 2014 Apr 18. PubMed PMID: 24751573. 査読有

[総説]

8. Luo Y*, Fujita H*, Nedelescu H, Biswas MS, Sato C, Ying S, Takahashi M, Akita K, Higashi T, Aoki I, Sugihara I. Lobular homology in cerebellum hemispheres of humans, non-human primates and rodents: a structural, axonal tracing and molecular expression analysis. *Brain Struct Funct*. 2017 May 15. doi: 10.1007/s00429-017-1436-9. [Epub ahead of print] Review. PubMed PMID: 28508291. (*equal contribution) 査読有
9. 杉原泉(2015) 小脳の解剖(小葉構造)と基本的な機能局在. *医学のあゆみ*, 255(10):927-933. 査読なし

〔学会発表〕(計 21 件)

1. Sarpong GA, **Fujita H**, Vibulyaseck S, Furuichi T, Hirano S, **Sugihara I**. Comparison of expression patterns of different marker molecules of the cerebellar longitudinal striped compartments in the mouse. The 39th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. Yokohama, Japan. July 20-22, 2016.
2. Vibulyaseck S, Sarpong GA, **Fujita H**, Hirano S, **Sugihara I**. Early development of the longitudinal striped compartments in the prenatal mouse cerebellum studied with three-dimensional mapping of protocadherin 10 expression. The 39th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. Yokohama, Japan. July 20-22, 2016.
3. Luo Y, **Fujita H**, Nedelescu H, Sato C, Ying S, Takashi M, Biswas MS, Akita K, Aoki I, **Sugihara I**. Identification of the cerebellar lobules that are homologous to human crus I/II in macaque, marmoset, rat and mouse. The 39th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. Yokohama, Japan. July 20-22, 2016.
4. Luo Y, **Fujita H**, Nedelescu H, Takashi M, Biswas MS, **Sugihara I**. Identification of homologous cerebellar lobules in human, non-human primates and rodents. 8th CBIR symposium for young investigator, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan. February 20, 2016.
5. Vibulyaseck S, Sarpong GA, **Fujita H**, Ohki-Hamazaki H, **Sugihara I**. Developmental change of Protocadherin 10 expression pattern in the individual clusters of the mouse embryonic cerebellar cortex. 8th CBIR symposium for young investigator, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan. February 20, 2016.
6. Nedelescu H, Luo Y, **Sugihara I**. Deriving the interplay between the cerebellum and basal ganglia from structural analysis. 8th CBIR symposium for young investigator, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan. February 20, 2016.
7. Luo Y, Vibulyaseck S, **Fujita H**, Hirano S, **Sugihara I**. Compartmentalization of the chick cerebellar cortex based on the link between the striped expression pattern of aldolase C and the topographic olivocerebellar projection. 8th CBIR symposium for young investigator, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan. February 20, 2016.
8. 杉原 泉. 小葉の立体構造、軸索投射、分子発現パターンの解析に基づくヒト、ニホンザル、マーモセット、ラット、マウスの小脳半球部小葉構造の相同性。2016年3月28日シンポジウム講演、第121回日本解剖学会、福島
9. **Fujita H**, Kodama T, du Lac S. Morphologically, molecularly, and functionally distinct classes of neurons in the medial cerebellar output nucleus. 2016年3月28日シンポジウム講演、第121回日本解剖学会、福島
10. **Sugihara I**, Ueda M, Ando T, Luo Y. Single axon morphology of vestibulocerebellar mossy fibers indicates the phylogenetically old nature of the vestibulocerebellum, The 38th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. Kobe, Japan. July 28, 2015. (Talk in the Symposium)
11. Luo Y, **Sugihara I**. Reconstruction of spinocerebellar single axons in the mouse. The 38th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. Kobe, Japan. July 30, 2015.
12. **Sugihara I**. Precise relationship among input-output connections, somatotopic representation and zebrin stripes in the cerebellum. The 92th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. Kobe, Japan. March 23. (Talk in the Symposium).
13. Shimuta M, **Sugihara I**, Ishikawa T. Convergence of multi-pathway signals in single cerebellar granules cells in vivo. The 92th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. Kobe, Japan. March 23.
14. Onozato T, Luo Y, **Sugihara I**. Tail proprioceptive representation area in the cerebellum identified by using Aldoc-venus knock-in mice. The 92th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. Kobe, Japan. March 23.
15. Onozato T, Sakimura K, **Sugihara I**. 小脳における縦縞区画可視化 Aldoc-Venus マウスを用いた in vivo 実験について, 7th CBIR symposium for young investigator, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan. February 21, 2015.
16. Luo Y, **Sugihara I**. Reconstruction of BDA-labeled long projecting axons in the central nervous system in bright-field serial section specimen. 7th CBIR symposium for young investigator, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan. February 21, 2015.
17. Vibulyaseck S, Hirano S, **Sugihara I**. Protocadherin 10 expression pattern in the developing mouse cerebellar cortex. Poster presentation in the Annual Meeting of the SfN, Neuroscience 2014, Washington DC, USA. Noember 17, 2014.
18. 杉原 泉. 「感覚運動適応能力の基盤としての小脳と前庭系の神経回路」, 第42回秋田めまい懇話会. 秋田メトロポリタンホテル、秋田県秋田市 2014年9月26日. (招待講演)
19. Vibulyaseck S, Hirano S, **Sugihara I**. Striped Protocadherin 10 expression pattern in the adult

and developing mouse cerebellar cortex. Poster presentation in The 37th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Pacifico Yokohama, Kanagawa, Yokohama. September 11, 2014.

20. Luo Y, Sasamura K, Patel RP, Sugihara I. Projection patterns of individual spinocerebellar axons in the mouse. Poster presentation in the 37th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Pacifico Yokohama, Kanagawa, Yokohama. September 11, 2014.

21. Luo Y, Vibulyaseck S, Fujita H, Ohki-Hamazaki H, Sugihara I. Compartmentalization of the chick cerebellar cortex based on the link between the striped expression pattern of aldolase C and the topographic olivocerebellar projection. Winter workshop of Comprehensive Brain Science Network. Tokyo, Japan. December 11, 2014.

〔図書〕(計 1 件)

1. Luo Y, Sugihara I. (2016) The Olivocerebellar Tract. in: Gruol DL. Et al. Ed Essentials of Cerebellum and Cerebellar Disorders. A Primer For Graduate Students. Springer, 2016, p 55-61.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/med/phy1/phy1.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

藤田 啓史 (FUJITA, Hirofumi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：60725901

(2)研究分担者

杉原 泉 (SUGIHARA, Izumi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：60187656

(4)研究協力者

()