

平成 21 年 6 月 17 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006-2008
 課題番号：18500318
 研究課題名（和文） 小脳一橋一延髄標本を用いた発達小脳における機能的神経回路発現の解析
 研究課題名（英文） Analysis for functional neuronal network of developing cerebellum using cerebellum-pons-medulla preparation.
 研究代表者
 荒田 晶子 (Arata Akiko)
 兵庫医科大学・医学部・准教授
 研究者番号：00266082

研究成果の概要：

下オリーブ核から小脳への投射様式や平行線維の発達過程を蛍光トレーサーや免疫組織化学法を用いて調べた結果、P5-P7の生後1週の小脳においてLTDが発現する場所には苔状線維から入力を受けた平行線維と下オリーブ核の両方から入力を受けているプルキンエ細胞が存在し、機能的神経回路を作り始めていることが分かった。また、呼吸性活動をトリガーとして光学的測定法を行なった結果より、同じ呼吸相の活動が登上線維からと平行線維から小脳へ向かっていることが示唆された。これは、呼吸性活動が小脳神経回路の発達・形成に関与する可能性を示唆する。呼吸性活動は、発達初期に、小脳神経回路の活動依存的シナプス形成に深く関わっていると考えられた。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2006年度 | 2,200,000 | 0 | 2,200,000 |
| 2007年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 2008年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,600,000 | 420,000 | 4,020,000 |

研究分野：神経生理学

科研費の分科・細目：神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：摘出脳ブロック標本、光学的測定法、蛍光トレーサー、小脳神経回路形成

1. 研究開始当初の背景

小脳の運動制御に関する研究は、in vivo 実験によりネットワークレベルでの解析が行われている。また、シナプスの可塑性 (Long-term depression: LTD) については、スライス標本、培養細胞の研究により大きく進んでいる。しかし、発達期の小脳において、どのように機能が発現してくるのか、それを評価するような実験系はまだない。申請者は、発達期において小脳機能をつかさど

るネットワークが、どのように構築され、機能発現するのかという問題は、摘出小脳一橋一延髄標本を用いることによって解明できると考えている。成熟した小脳はどこも同じ構造をしているが、発達期においては、すべての部分において一様な構造をしているかどうかは疑問である。比較的早い時期に機能を獲得しなくてはならない部分が早く発達すると考えられる。この摘出小脳一橋一延髄標本は、解析方法も電気生理学的手法と光

学的測定法の両方からのアプローチが可能であるため、機能的神経回路がいかに構築されるかを細胞レベルから時間的・空間的なネットワークレベルへとつなぐことができる。本研究は、小脳の機能分化、発達という分野に大きく貢献できると考えられる。

2. 研究の目的

小脳のネットワークの発達において、脳全体を捉えながら、なおかつ下オリーブ核からの投射が発達過程において、どのように小脳の各部分に入力しているのかを観察した研究はない。一方、自律機能の1つである呼吸のネットワークは生前から準備され、生後は外環境に慣れすぐに安定した呼吸リズムを作り出している。呼吸の onset にトリガーをかけて光学的測定法を用いて 30-50 回平均加算することにより、脳全体の呼吸性ニューロンの分布を特定することができる (Fujii, Umezawa, Arata, Eur. J. Neurosci., 2006)。この方法を用いて下オリーブ核のニューロンが発達初期において、小脳にどのように分布しているのかどうか明らかにし、小脳神経回路形成にどのような関与があるのか探る。

3. 研究の方法

発達初期の小脳神経回路の成り立ちを解析するために、小脳だけでなく橋や延髄も含んだ摘出小脳-橋-延髄標本を開発した。この標本を作製し電位感受性色素に浸潤させ、その後取り出して記録用チェンバーに移し、呼吸の onset にトリガーをかけて光学的測定法を用いて 30-50 回平均加算することにより、脳全体の呼吸性ニューロンの分布が時間・空間的に見ることが出来る。この方法を用いて小脳における呼吸性活動を観察する。

また、蛍光色素トレーサーを登上線維の起始核である下オリーブ核や迷走神経根に注入し、小脳に見える呼吸性活動が下オリーブ核を経由した登上線維から来ているものか、苔状線維-平行線維から来ているものか、それら両方から受けているものなのかを区別し、発達の変化と呼吸性活動の出現部位の変化の相関関係を調べる。

4. 研究成果

小脳-橋-延髄標本(小脳ブロック標本: 図1)に電位感受性色素を浸潤させて光学的測定法を行った。

比較的発達が早いとされる片葉・傍片葉について検討した。片葉・傍片葉へ投射する下オリーブと、それに交わる平行線維の組み合わせ刺激では、両方の刺激が重なり合っているところの小脳の側端部では、光学反応が長時間抑圧(LTD)され、両方の刺激が重なり合っていないところでは、反応は抑制されない

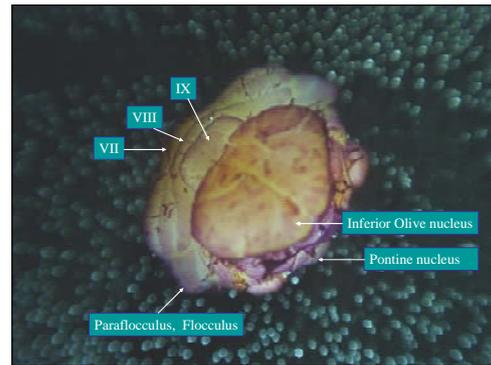


図1 摘出脳ブロック標本

ことも確認できた。さらに下オリーブ核から小脳へ投射様式や平行線維の発達過程を蛍光トレーサーや免疫組織化学法を用いて調べた。その結果、片葉・傍片葉部では、下オリーブ核から小脳への投射はP5-P7において多重支配から単一支配へ移行している状態であった。平行線維に関しては、P5でプルキンエ細胞とシナプスを作り始め、顆粒細胞は内顆粒層へ移動し始めていた。P7-P8では、プルキンエ細胞の樹状突起が伸びて平行線維と多くのシナプスを作っており、顆粒細胞は苔状線維とシナプスを形成し始めていることが分かった。P5-P7の生後1週の小脳においてLTDが発現する場所には苔状線維から入力を受けた平行線維と下オリーブ核の両方から入力を受けているプルキンエ細胞が存在し、機能的神経回路の存在を示唆する。

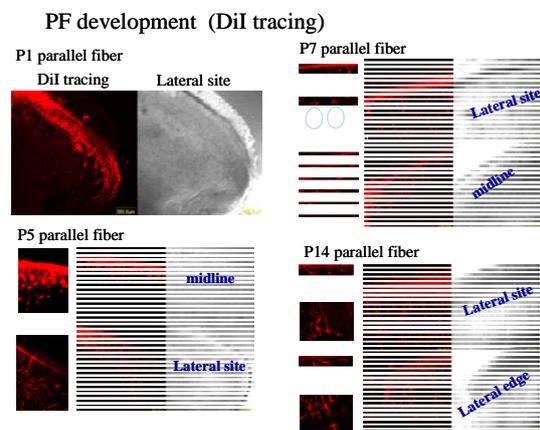


図2 片葉・傍片葉における平行線維の発達

一方、小脳の機能発達において、自律神経系の1つである呼吸に注目した。発達初期からリズムを作り、規則的に発火相を作る呼吸性活動は、発達過程において、小脳神経回路形成に関わるのではないかと考えたからである。小脳ブロック標本で呼吸性活動をモニターしながら光学的サイクルトリガーヒストグラム法により30-50回加算平均すると、呼吸性ニューロンの光学シグナルによるニューロンマッピングが出来る。すなわち、呼

吸性活動が時間的・空間的に見えてくるのである。そうすると、延髄の呼吸関連の場所だけでなく、小脳の外側部や虫部にシグナルが捕らえられた。それも、発達初期においては、登上線維の走行の仕方に良く似たコンパートメント状に呼吸性ニューロン活動が観察された。

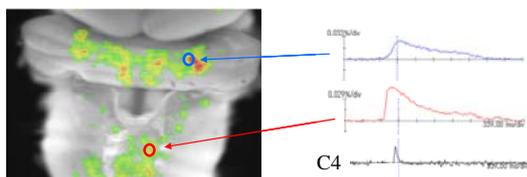


図3 光学的測定法による呼吸性活動の分布

また、その呼吸性活動は下オリーブ核、傍結合腕核 (Nucleus Parabrachialis) に存在し、パッチクランプ法を用いた結果より、Post-Inspiratory neuron が記録された。それと同様の Post-Inspiratory 活動が小脳にも観察された。これらの結果より、同相の活動が登上線維からと平行線維から小脳へ向かっていることになる。これは、呼吸性活動が小脳神経回路の発達・形成に関与する可能性を示唆する。呼吸性活動は、発達初期に、小脳神経回路の活動依存的シナプス形成に深く関わっていると考えられた。

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 5 件)

1. Amano K, Fujii M, Arata S, Tojima T, Ogawa M, Morita N, Shimohata A, Furuichi T, Itoharu S, Kamiguchi H, Korenberg JR, Arata A, Yamakawa K.
DSCAM deficiency causes loss of pre-inspiratory neuron synchronicity and perinatal death. *J. Neurosci.* 29: 2984-2996, 2009. (査読有)

2. Arata A, Fujii M.
Catecholaminergic modulation of the respiratory rhythm generator in the isolated brainstem-spinal cord preparation from neonatal rat. *Adv Exp Med Biol.*, 605: 83-87, 2008. (査読有)

3. Fujii M, Arata A, Kanbara-Kume N, Saito K, Yanagawa Y, Obata K.
Respiratory activity in brainstem of fetal mice lacking glutamate decarboxylase 65/67 and vesicular GABA transporter. *Neuroscience.* 146: 1044-1052, 2007. (査読有)

4. Fujii M, Umezawa K, Arata A.

Adrenaline contributes to prenatal respiratory maturation in rat medulla-spinal cord preparation. *Brain Res.*, 1090: 45-50, 2006. (査読有)

5. Fujii M, Umezawa K, Arata A.
Dopamine desynchronizes the pace-making neuronal activity of rat respiratory rhythm generation. *Eur J Neurosci.*, 23: 1015-1027, 2006. (査読有)

[学会発表] (計 14 件)

1. Arata, A., Fujii, M., Matsunaga, W., Obata, K.
Adrenaline contributes to respiratory neural network maturation in developing rat medulla-spinal cord preparation. 6th Forum of European Neuroscience (Geneva, Switzerland, July 12-16, 2008)

2. Arata, A., Fujii, M., Ito, M.
Respiratory activities presumably play roles in the activity-dependent formation of neuronal networks in the developing cerebellum. (The 31st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Tokyo, July 9-11, 2008)

3. Amano, K., Fujii, M., Arata, S., Ogawa, M., Itoharu S., Arata, A., Yamakawa, K.
Abnormal facial nucleus activity in Dscam1-deficient mouse: A model for sudden infant death syndrome. *Neurosci. Res.* 61, S164. (The 31st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Tokyo, July 9-11, 2008)

4. Aoki, T., Agetsuma, M., Aizawa, H., Arata, A., Higashijima, S., Okamoto, H.
Optical imaging analysis on the memory trace in zebrafish. *Neurosci. Res.* 61, S256. (The 31st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Tokyo, July 9-11, 2008)

5. Arata, A., Fujii, M., Amano, K., Arata, S., Yamakawa, K.
Central hypoventilation caused by abnormalities of respiratory network in Dscam1 deficient mouse. (The 85th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, Tokyo, March 25-27, 2008)

6. Arata, A., Fujii, M., Ito, M.
Neonatal cerebellum broadly displays respiratory activities
The 30th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Neuro2007), Yokohama, September, 10-12, 2007)

7. Arata, A., Fujii, M., Ito, M.
Respiratory activities optically recorded from the newborn rat cerebellum and related medullary structures
(The 84th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, Osaka, March 20-22, 2007)

8. Arata, A., Fujii, M., Matsunaga, W., Ito, M.
The prolonged responses of Purkinje cells in the flocculus/paraflocculus regions of the developing cerebellum.
(36th Annual Meeting Soc. Neurosci., Atlanta, October 14-18, 2006)

9. Nisimaru, N., Mittal, C., Shirai, Y., Sooksawate, T. Gupta, M., Arata, A., Sakurai, T., Yamamoto, M., Ito, M.
Orexin-containing beaded cerebellar afferents mediate effects of stimulation of hypothalamic defense area on flocculus Purkinje cells in rabbits.
(36th Annual Meeting Soc. Neurosci., Atlanta, October 14-18, 2006)

10. Arata, A., Fujii, M.
Modulation of catecholamine on respiratory rhythm generator in isolated brainstem-spinal cord preparation from neonatal rat.
(Oxford Conference 2006, Lake Louise, Alberta Canada, September 19-24, 2006)

11. Obata, K., Arata, A., Saito, K., Hirono, M., Yanagawa, Y.
Maintained GABA content and reduced neuronal activity in the fetal mouse brain lacking vesicular GABA transporter.
(5th Forum of European Neuroscience, Vienna, Austria, July 8-12, 2006).

12. Matsunaga, W., Arata, A., Fujii, M., Ito, M.
Parallel development of P/Q type Ca channels, primary dendrites and prolonged response of Purkinje cell in developing cerebellum.
(29th Annual Meeting Japan Neurosci. Soc. Kyoto, July 19-21, 2006)

13. Arata, A., Obata, K., Davies, J., Bellingham, M., Noakes, P.G.
Decrease in spontaneous activity and cell death of the brachial motoneurons in GAD67-deficient mouse embryo.
(29th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Kyoto, July 19-21, 2006)

14. Fujii, M., Amano, K., Arata, S., Shimohata, A., Yamakawa, K., Arata, A.
Abnormality of central respiratory network in

Dscam knock-out mouse.
(29th Annual Meeting of Japan Neurosci, Soc, Kyoto, July 19-21, 2006)

6. 研究組織
(1) 研究代表者

荒田 晶子 (Arata Akiko)
兵庫医科大学・医学部・准教授
研究者番号：00266082