

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06529

研究課題名(和文) 大脳から小脳への二重伝達経路の機能的意義

研究課題名(英文) Functional significance of the dual transmission by the cerebro-cerebellar pathway

研究代表者

石川 太郎 (Ishikawa, Taro)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50547916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：大脳皮質を光遺伝的に抑制できるマウスを用いて、顆粒細胞からのin vivo記録を行ったところ、顆粒細胞の触覚刺激応答は二峰性であり、遅い応答のみが大脳皮質依存性であった。プルキンエ細胞では、遅い単純スパイク応答と複雑スパイク応答が大脳皮質依存性であった。これらの結果は、個々の顆粒細胞が末梢と大脳皮質からの収束入力を結合してプルキンエ細胞に出力を送り、プルキンエ細胞はそれらの信号を大脳皮質からの登上線維信号と統合することを示していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は実験動物(マウス)を用いて大脳から小脳への信号の連絡様式について基本的な仕組みを示したもののだが、同様の回路はヒトでも機能しているものと考えられる。さらに、動物に比べて、ヒトはより大きな大脳を持つため、大脳と小脳の結びつき(大脳小脳連関)はより強力であると考えられている。小脳は体の運動の制御に重要であるが、そのみならず、近年では、原因が未だ明らかでない自閉症スペクトラム障害などの異常においても、大脳と小脳の連関の異常が影響していることが示唆されている。本研究で明らかになった回路原理は、様々な疾患とその治療の研究の基礎となるものである。

研究成果の概要(英文)：In vivo recordings from cerebellar granule cells in mice, in which the neocortex can be optogenetically suppressed, showed that tactile stimulus responses in granule cells were bimodal, with only slow responses being neocortex-dependent. In Purkinje cells, the slow simple spikes and complex spikes evoked by tactile stimulation were neocortex-dependent. These results indicated that individual granule cells combine convergent inputs from the periphery and neocortex and send their outputs to Purkinje cells, which then integrate those signals with climbing fiber signals from the neocortex.

研究分野：神経生理学

キーワード：大脳小脳連関 プルキンエ細胞 小脳顆粒細胞 橋核

様式 F - 19 - 2

1. 研究開始当初の背景

大脳と小脳はどのように相互連絡を行い、機能分担しているのだろうか？小脳へ到達する信号は、苔状線維と登上線維と呼ばれる二種類の線維を介して伝達され、これら二種類の線維の少なくとも一部が大脳皮質からの信号を伝えていることは以前から知られていた。しかし、苔状線維については、大脳ではなく末梢神経からの信号を伝達している線維もあることが知られており、そのような由来の異なる苔状線維がどのように混在しているか明らかではなかった。特に、大脳からの信号を伝える苔状線維と末梢神経からの信号を伝える苔状線維はそれぞれ別の顆粒細胞に信号を伝えているのか、それとも同じ顆粒細胞に信号を伝えているのか分かっておらず、顆粒細胞の機能的役割を考えるうえで重要な問題として残っていた。また、登上線維については大脳から小脳への信号伝達への関与を否定する研究報告もあり、その経路の存在自体が判然としていなかった。

2. 研究の目的

(1) 種々の感覚の中でも体性感覚(触覚)に注目し、苔状線維を介して小脳皮質顆粒細胞に到達する感覚信号が、末梢から(二次ニューロンとして)直接的に到達するのか、大脳皮質を経由して到達するのか、もしくはこれらの混合なのかを単一細胞レベルで明らかにする。これにより、小脳の入力層における情報がどのように符号化されているかを明らかにする。

(2) 小脳にはアルドラーゼCの発現により区分されるコンパートメントが存在し、各コンパートメントで異なる機能を持っている可能性がある。そのため、上記の感覚信号の符号化が各コンパートメントで異なるか否かを明らかにする。

(3) 登上線維を介してプルキンエ細胞に入力する感覚信号が、大脳皮質を経由するものか否かを明らかにする。これにより上記の苔状線維との比較において、二種類の入力系の機能の違いを理解する。

3. 研究の方法

(1) 光照射により特定領域のニューロン活動を制御するために、GABA性ニューロン選択的にチャンネルロドプシン2(ChR2)を発現しているトランスジェニックマウス(VGAT-ChR2マウス)を用いる。このマウスでは、GABA性ニューロンの活性化により周辺のニューロンが抑制されて、その領域の神経活動が抑制されるため、大脳皮質の局所(主にS1領域)に青色LED光を短時間照射し、時限的にその領域を経由する神経回路を選択的に遮断することができる。

(2) アルドラーゼCのコンパートメントを区別して行う実験では、アルドラーゼCプロモーターにより黄色蛍光タンパク質を発現するノックインマウス(Aldoc-Venusマウス)を用いる。小脳皮質を蛍光観察し蛍光強度で同定したアルドラーゼCバンドに電極を刺入する。

(3) マウスの上唇に、細いチューブからの空気噴射により触覚刺激を与える。この刺激に最もよく応答する小脳領域であるcrus II領域および大脳皮質S1上唇領域から同時に電気生理学的記録を行う。

(4) 電気生理学的記録は、大脳皮質から金属電極により電場電位記録を行い、これと同時に、小脳皮質からインピボ・全細胞パッチクランプ記録または金属電極による電場電位記録またはプルキンエ細胞の細胞外ユニット記録を行った。記録は主に麻酔下(特に断りのない限りケタミン・キシラジン混合麻酔)で行った。覚醒状態からの記録では、予め頭部固定器具を頭蓋骨に植え込む手術を行い術後回復の後に頭部固定下に記録を行う。

4. 研究成果

(1) 大脳皮質S1と小脳皮質顆粒細胞層(GCL)から電場電位記録を行った場合、GCL応答は二峰性に現れ、早い応答と遅い応答のピークまでの潜時はそれぞれ 8.3 ± 0.3 msと 28.8 ± 0.7 ms, $n = 15$)であった。これらは、S1応答のピーク(25.2 ± 1.2 ms, $n = 15$)のタイミングを挟んでいた。応答のタイミングに一致させて青色LED光をS1に短時間照射するとその応答は大幅に抑制された。このとき、GCL応答は遅い応答のみが抑制され、早い応答は抑制されなかった。この結果から、GCLの遅い応答はS1の活動依存的であることが示唆された。同様の実験を、非麻酔下の覚醒マウスで行った場合には、GCLの遅い応答が麻酔下マウスに比べて小さかったものの、同じくS1の活動依存的であることが示された。小脳応答に関与する大脳皮質の領域を同定するために、大脳皮質の様々な部位で光照射を行ったところ、応答が最も大きくなるS1の部位での光照射が最も効率よく小脳の遅い応答を抑制し、大脳運動野(M1)などのS1から離れた領域への光照射は効果がないことが判明した。この結果からS1から直接的に橋核への投射があることが示唆された(図1)。

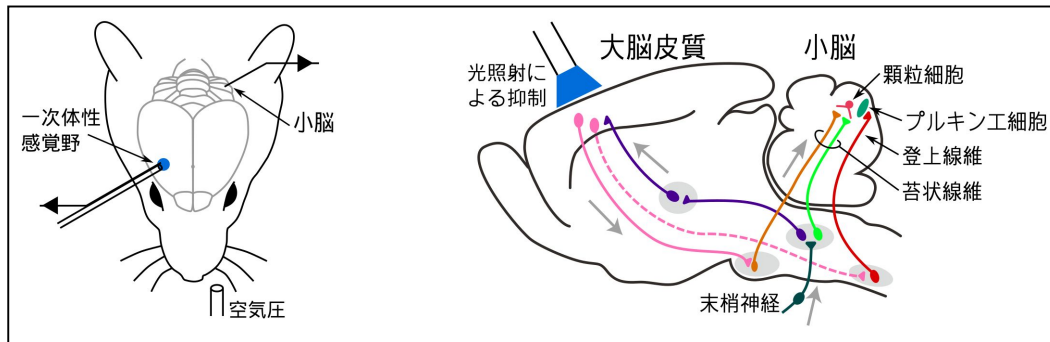


図 1

(2) 上記の結果から GCL への苔状線維投射には、早い応答を生成する三叉神経核からの直接投射と、遅い応答を生成する大脳を経由した橋核からの投射の 2 種類の投射が存在することが示唆された。これらの入力在同一の顆粒細胞に収束的に投射するのか、それとも別個の顆粒細胞に投射するのかを明らかにするために、顆粒細胞から全細胞パッチクランプ記録を行った。

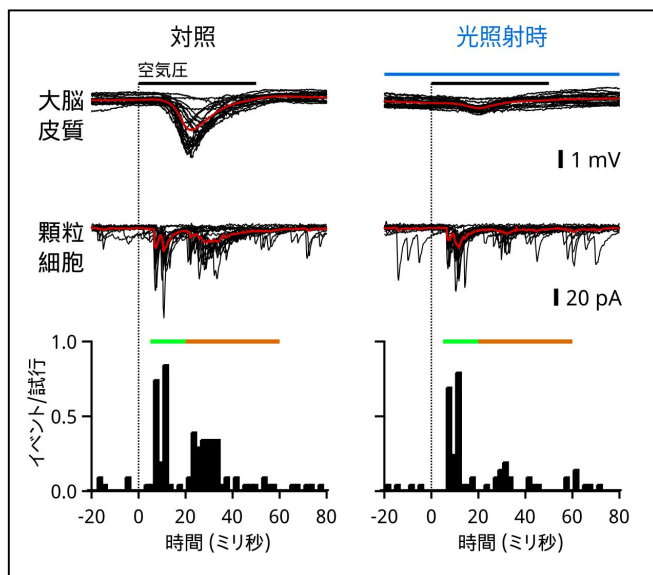


図 2

上唇の触覚刺激により、50% (12/24 個) の顆粒細胞において二峰性の応答が得られた (図 2)。この結果は、これらの細胞へ二種類の苔状線維が収束的に投射していることを意味した。しかし、その他の細胞では早い応答のみ (12.5%) や、遅い応答のみ (25.0%) であった。予想した通り、大脳皮質の光抑制により遅い応答は抑制され、遅い応答が S1 の活動依存的事であることが確認された。

(3) 小脳皮質にはアルドラーゼ C の発現によって識別される矢状断方向のバンド (縦縞) が存在する。各バンドを視覚化できる Aldoc-Venus マウスを使用して、早い応答と遅い応答の分布を明らかにすることを試みた。調べたバンド全てにおいて、早い応答と遅い応答の両方が観察された。しかし、遅い応答は 5-バンドに比べて 7+バンドで有意に大きかった。この結果から、2 種類の苔状線維の神経投射の分布はバンドごとに差異が有るものの、特定のバンドに特異的とは言えないことが示された。

(4) プルキンエ細胞における触覚刺激応答は、単純スパイク (SS) と複雑スパイク (CS) として観察された。SS 応答には、早い興奮 (刺激後 10 ms 以内)、早い抑制 (10-20 ms)、遅い興奮 (20-30 ms)、遅い抑制 (30-60 ms) の 4 つの相があった。CS 応答は SS の遅い抑制応答と同じタイミングで生じた。大脳皮質を光抑制すると、SS の早い興奮と早い抑制応答には変化がなかったが、遅い興奮と遅い抑制応答は抑制された。このことは、早い興奮が三叉神経からの直接投射によるもので、早い抑制は三叉神経からの直接投射が小脳分子層の抑制性細胞を介してプルキンエ細胞を抑制する応答であることを示唆し、さらに遅い興奮と抑制は大脳 S1 を経由する応答であることを示唆した。さらに、大脳皮質光抑制により、CS 応答も抑制されたことから、下オリブ核からの登上線維の入力を反映する CS 応答も大脳皮質依存的事であることが示された。これらの結果は、個々の顆粒細胞が末梢と大脳皮質からの収束入力を組み合わせ、それらの出力をプルキンエ細胞に送り、プルキンエ細胞がそれらの信号を大脳皮質からの登上線維信号と統合することを示していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Misa Shimuta, Izumi Sugihara, Taro Ishikawa	4. 巻 3(1)
2. 論文標題 Multiple signals evoked by unisensory stimulation converge onto cerebellar granule and Purkinje cells in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications biology	6. 最初と最後の頁 381
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-020-1110-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Misako Kunii, Hiroshi Doi, Shunta Hashiguchi, Toyojiro Matsuishi, Yasunari Sakai, Mizue Iai, Masaki Okubo, Haruko Nakamura, Keita Takahashi, Atsuko Katsumoto, Mikiko Tada, Hideyuki Takeuchi, Taro Ishikawa, Noriko Miyake, Hiroto Saito, Naomichi Matsumoto, Fumiaki Tanaka	4. 巻 416
2. 論文標題 De novo CACNA1G variants in developmental delay and early-onset epileptic encephalopathies	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the Neurological Sciences	6. 最初と最後の頁 117047
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jns.2020.117047	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hashiguchi S, Doi H, Kunii M, Nakamura Y, Shimuta M, (32名略) Ishikawa T, Tanaka F	4. 巻 130
2. 論文標題 Ataxic phenotype with altered CaV3.1 channel property in a mouse model for spinocerebellar ataxia 42	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurobiology of Disease	6. 最初と最後の頁 104516
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.nbd.2019.104516	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 3件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Taro Ishikawa
2. 発表標題 Multiple cortico-cerebellar pathways in sensory signaling
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Taro Ishikawa, Izumi Sugihara, Misa Shimuta
2. 発表標題 Convergence of sensory-evoked signals via multiple pathways in the cerebellum
3. 学会等名 Society for Neuroscience Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川太郎
2. 発表標題 プルキンエ細胞と顆粒細胞における大脳小脳関連信号の統合
3. 学会等名 第13回Motor control研究会, シンポジウム「小脳が関与する制御機能の最前線 -基礎と臨床の融合を目指して」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 志牟田美佐, 杉原泉, 石川太郎
2. 発表標題 Convergence of sensory-evoked multi-pathway signals in the cerebellum
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Misa Shimuta, Izumi Sugihara, Taro Ishikawa
2. 発表標題 Cerebellar integration of multiple input signals
3. 学会等名 The 75th Fujihara seminar (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Taro Ishikawa
2. 発表標題 Processing of sensory-evoked signals in the cerebro-cerebellar communication
3. 学会等名 河北医科大学病理生理学高端學術論壇（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Misa Shimuta, Izumi Sugihara, Taro Ishikawa
2. 発表標題 Cerebellar integration of neocortical somatosensory signals
3. 学会等名 FAOPS2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>プレスリリース: 大脳からの信号と末梢神経からの信号が小脳の神経回路において統合される http://www.jikei.ac.jp/news/press_release_20200716.html 研究室webページ http://www.jikei-pharm.com/member/ishikawa</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	志牟田 美佐 (Shimuta Misa) (70609172)	東京慈恵会医科大学・医学部・講師 (32651)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------