

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06926

研究課題名(和文)小脳における新規神経回路の同定とその生理機能の解析

研究課題名(英文) Identification of new neural circuits in the cerebellum and analysis of their physiological functions

研究代表者

橋本 光広 (Mitsuhiro, Hashimoto)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：90311357

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：小脳虫部の損傷や小脳虫部の変性を伴う多くの疾患(脊髄小脳変性症など)では、睡眠-覚醒サイクルの異常が起こり、重度の睡眠障害が生じることが知られており、小脳が、睡眠-覚醒サイクルの調節に関与していることが示唆されている。しかし、「どのような神経基盤(神経回路・神経システム)によって、小脳が睡眠-覚醒サイクルの調節に関与するのか」は、明らかになっていなかった。本研究は、小脳が睡眠-覚醒サイクルの調節への関与を示唆する新規神経回路を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小脳虫部の損傷や小脳虫部の変性を伴う多くの疾患(脊髄小脳変性症など)では、睡眠-覚醒サイクルの異常が起こり、重度の睡眠障害(不眠症、日中における抵抗しがたい過度の眠気、レム睡眠行動障害、睡眠時無呼吸症)が生じることが知られている。本研究は、小脳が睡眠-覚醒サイクルの調節への関与を示唆する新規神経回路を同定した。小脳虫部の損傷と重度の睡眠障害の神経基盤が明らかとなり、重度の睡眠障害に対する新たな治療対象を示唆している。

研究成果の概要(英文)：It is known that many diseases (e.g., spinocerebellar degeneration) that involve damage of the cerebellar vermis or degeneration of the cerebellar vermis cause abnormalities in the sleep-wake cycle resulting in severe sleep disturbances. The observations suggest that the cerebellum is involved in regulating the sleep-wake cycle. However, it has not been clarified what kind of neural basis (neural circuits and systems) the cerebellum uses to regulate the sleep-wake cycle. In this study, we identified a novel neural circuit that suggests the cerebellum is involved in regulating the sleep-wake cycle.

研究分野：神経科学

キーワード：小脳 内側傍小脳脚核 視床下部外側野 アデノ随伴ウイルスベクター 神経回路

1. 研究開始当初の背景

小脳は、知覚と運動機能を統合することによって平衡・筋緊張・随意筋運動の調節を行う機能を担っている。「小脳の機能は、運動機能調節」と短絡的に関連付けてしまいがちであるが、近年の小脳疾患の症例研究や小脳の基礎研究によって、小脳が知覚と運動を統合する機能以外に、多くの生理機能・認知機能を担っていることが明らかとなってきた。人が小脳を損傷すると、運動失調・眩暈・嘔吐などとともに、遂行機能障害・空間認知障害・言語障害・人格障害が出現し、それらは、小脳性認知情動症候群 (Cerebellar Cognitive Affective Syndrome: CCAS) として臨床報告されて小脳後方領域または小脳虫部の損傷と、CCAS 発症の関連性が高いことが示唆されている。また、小脳虫部の損傷や小脳虫部の変性を伴う多くの疾患 (脊髄小脳変性症など) では、睡眠-覚醒サイクルの異常が起こり、重度の睡眠障害 (不眠症、日中における抵抗しがたい過度の眠気、レム睡眠行動障害、睡眠時無呼吸症) が生じることが知られており、小脳が、睡眠-覚醒サイクルの調節に関与していることが示唆されている。また、ウサギの小脳虫部の損傷または電気刺激が、血圧や動脈血の流入量の変化を引き起こすことから、小脳虫部は、心臓血管系反応にも関与していることが、示唆されている。しかし、睡眠-覚醒サイクルの調節は、小脳以外の神経核視床下部外側野・青斑核・内側傍小脳脚核などが担っており、小脳は、睡眠-覚醒サイクルの調節に直接関与しないとされている。そのことから、小脳と睡眠-覚醒サイクルを調節する神経核との間には神経連絡が存在し、小脳は、それら神経核の神経活動を制御することによって、睡眠-覚醒サイクルの調節に関与していると考えられたが、小脳と睡眠-覚醒サイクルの調節を担う神経核との神経連絡は、不明であった。このように、「どのような神経基盤 (神経回路・神経システム) によって、小脳が前出の生理機能の出現に関与するのか」は、明らかになっていなかった。

蛍光タンパク質を発現する AAV ベクターを用いることにより、小脳虫部のプルキンエ細胞から内側傍小脳脚核 (内側結合腕傍核) に直接投射する新規の神経経路が見いだされた。内側傍小脳脚核は、レム睡眠とノンレム睡眠の切り換え制御・心血管系反応の制御・呼吸反応の制御 (を行っている重要な神経核であることが知られている)。したがって、小脳虫部のプルキンエ細胞から内側傍小脳脚核への神経経路は、小脳が、睡眠-覚醒サイクルの調節並びに心血管系反応の制御にも関与するための神経基盤を示唆するものであった。

2. 研究の目的

本研究は、小脳虫部のプルキンエ細胞が内側傍小脳脚核へ直接入力する神経回路を基盤とした神経回路網を明らかにし、小脳虫部のプルキンエ細胞が内側傍小脳脚核へ直接入力する神経回路を基盤とした生理的機能を明らかにすること研究目的としている。

3. 研究の方法

(1) AAV ベクターは多くのセロタイプが存在し、各セロタイプによって、神経組織における遺伝子導入効率ならびに感染機序が異なる。そこで、AAV ベクターの各セロタイプを小脳へ注入し、その遺伝子導入効率ならびに感染機序を解析したところ、蛍光タンパク質を発現する AAV ベクター (セロタイプ rh10) が、順行性にのみ神経細胞をラベルし (逆行性ラベルを全く示さない)、ラベルされた神経細胞の軸索を強い蛍光シグナルで可視化することを見いだした。さらに、蛍光タンパク質を発現する AAV ベクター (セロタイプ rAAV2-retro) が、非常に効率よく逆行性に神経細胞をラベルし、逆行性にラベルされた神経細胞の軸索を強い蛍光シグナルで可視化することを見いだした。そこで、蛍光タンパク質を発現する AAV ベクター (セロタイプ rh10) を順行性ラベルに用

い，蛍光タンパク質を発現する AAV ベクター（セロタイプ rAAV2-retro）を逆行性ラベルに用い，小脳虫部第 9 葉における，入力・出力神経回路を詳細に解析する．

（2）ガラス電極（インピーダンス 4M Ω ）と，電極内液に，人工脳脊髄液とビオチン化デキストランアミン（BDA）（分子量 10,000）の混合液を用い，マイクロマニピレーターでガラス電極を，麻酔下マウス小脳虫部第 9 葉に刺入する．電気生理学的手法（シングルユニットレコーディング）を用い，小脳神経細胞の神経活動を記録する．小脳プルキンエ細胞によるシンプルスパイクとコンプレックススパイクの存在を確認することによって，小脳虫部第 9 葉のプルキンエ細胞を同定する．その後，電極内液の BDA を電氣的に小脳虫部第 9 葉のプルキンエ細胞へ導入し，小脳虫部第 9 葉のプルキンエ細胞を局所的に BDA でラベルする．

4．研究成果

蛍光タンパク質（EGFP）を発現する AAV ベクター（セロタイプ rAAV2-retro）（AAV2retro-CAG-EGFP）をマウス小脳虫部第 9 葉に注入することにより，小脳虫部第 9 葉に入力する神経細胞を逆行性に EGFP でラベルしたところ，内側傍小脳脚核の神経細胞に加え，視床下部外側野に EGFP でラベルされた神経細胞群が観察された．視床下部外側野において，逆行性に EGFP でラベルされた神経細胞の多くは，オレキシン A 陽性であり，また，それら EGFP 陽性神経細胞は，メラトニン凝集ホルモン陰性であった．この結果は，小脳虫部第 9 葉は，視床下部外側野のオレキシン A 陽性神経細胞から軸索入力を受けていることを示唆している．そこで，蛍光タンパク質（hrGFP）を発現する AAV ベクター（セロタイプ rh10）（AAV10-CMV-hrGFP）をマウス視床下部外側野に局所的に注入し，視床下部外側野の神経細胞を順行性に hrGFP でラベルしたところ，小脳虫部第 9 葉に hrGFP 陽性の軸索が観察され，その hrGFP 陽性軸索は，オレキシン A 陽性であった（図 1）．このことから，小脳虫部第 9 葉は，視床下部外側野から，オレキシン A 陽性入力を受けていることが判明した．小脳プルキンエ細胞は，オレキシン A の受容体であるオレキシン 2 受容体を，細胞体と一次樹状突起に発現しており（オレキシン 1 受容体は，発現していない），視床下部外側野からのオレキシン A 入力を，プルキンエ細胞が受容していることが示唆された．視床下部外側野に存在するオレキシン A 陽性神経は，摂食行動の制御ならびに，睡眠-覚醒の制御に関わる重要な神経細胞である．視床下部外側野のオレキシン A 陽性細胞から，小脳虫部への軸索入力の存在は，小脳プルキンエ細胞が，オレキシン A によって制御されていることを示唆している．

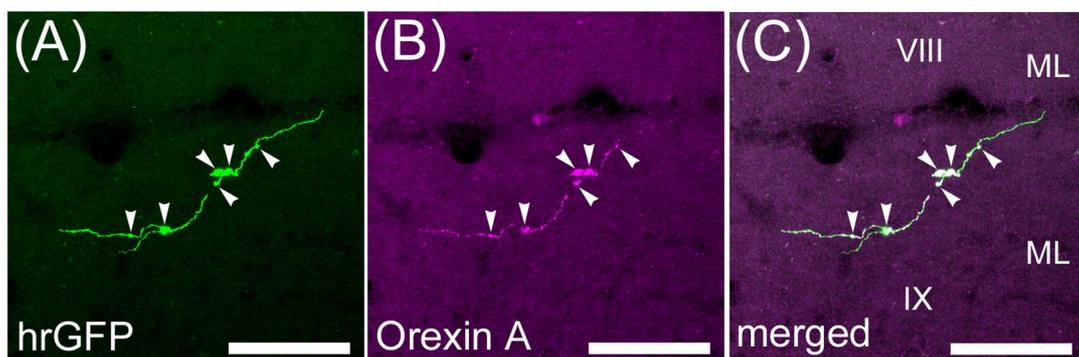


図 1 視床下部外側野から小脳虫部第 9 葉へのオレキシン A 陽性軸索入力
(A) 視床下部外側野から順行性に hrGFP でラベルされた軸索. (B) 抗オレキシン A 抗体による蛍光免疫染色. (C) A と B の合成像. 矢頭は、オレキシン A 陽性軸索に観察されたブー
トン構造を示す. VIII, 小脳虫部第 8 葉; IX, 小脳虫部第 9 葉; ML, 小脳分子層. スケールバー,
50 μ m

オレキシン A 陽性軸索の小脳内分布を詳細に調べるために，全小脳の連続冠状断切片を

作製し、全ての切片を抗オレキシン A 抗体で免疫染色した。その結果、小脳でのオレキシン A 陽性軸索は、均一に分布しているのではなく、小脳虫部第 9 葉・第 10 葉・片葉・傍片葉に集中して存在していることが判明した (図 . 2)。特に、小脳虫部 9 葉・10 葉は、この領域のプルキンエ細胞が、内側傍小脳脚核へ多くの軸索を送る領域である。

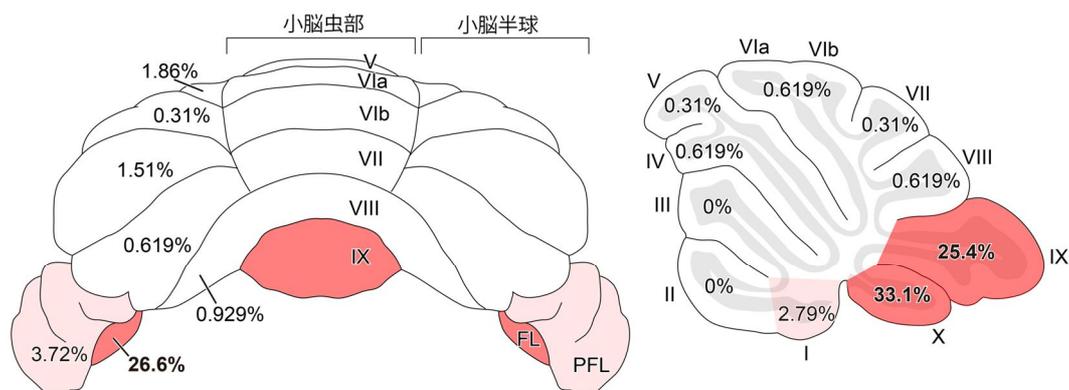


図. 2 小脳内におけるオレキシンA陽性軸索の分布
小脳連続切片上に存在するオレキシンA陽性軸索断片を計測し、小脳全体のオレキシンA陽性軸索断片の数に対する、小脳核領域内におけるオレキシンA陽性軸索断片の数の割合を示している。
IX, 小脳虫部第9葉; X, 小脳虫部第10葉; FL, 片葉; PFL, 傍片葉

小脳虫部第 9 葉のプルキンエ細胞から内側傍小脳脚核への軸索投射を、より詳しく調べるため、電気生理学的手法を用いて、小脳虫部第 9 葉のプルキンエ細胞を BDA で局所的にラベルした。その結果、小脳虫部第 9 葉のプルキンエ細胞の軸索は、下小脳脚を経由し、内側傍小脳核へ投射していることが判明した (図 . 3)。

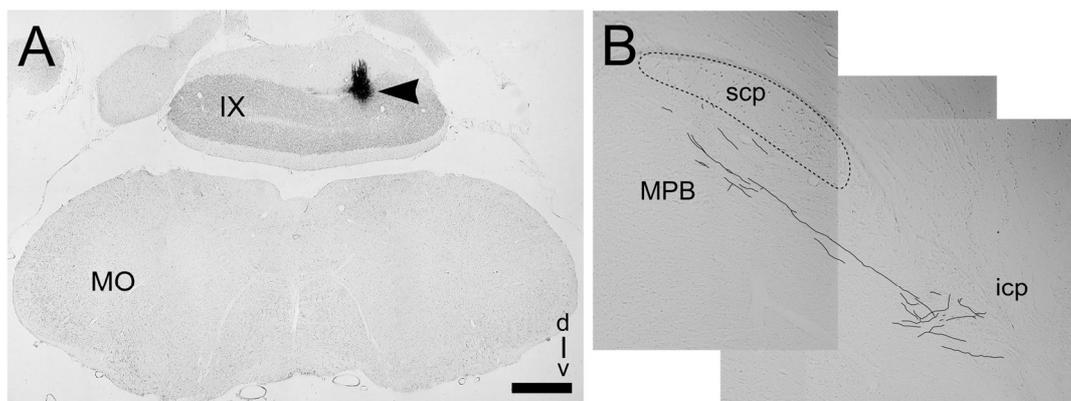


図. 3 小脳虫部第9葉のプルキンエ細胞の局所的ラベル
(A) 電気生理学的手法を用い、小脳虫部第9葉のプルキンエ細胞をBDAで局所的に順行性ラベル。矢頭、BDAでラベルされたプルキンエ細胞。(B) BDAラベルされたプルキンエ細胞の軸索トレース。
IX, 小脳虫部第9葉; d, 背側; icp, 下小脳脚; MO, 延髄; MPB, 内側傍小脳脚核; scp, 上小脳脚; v, 腹側, スケールバー, 1 mm

本研究成果により、小脳における新規神経回路が同定した (図 . 4)。この神経回路は、今まで解明されていなかった、小脳の睡眠-覚醒サイクルの調節への関与・心血管系反応の制御を担う神経基盤であると思われる。

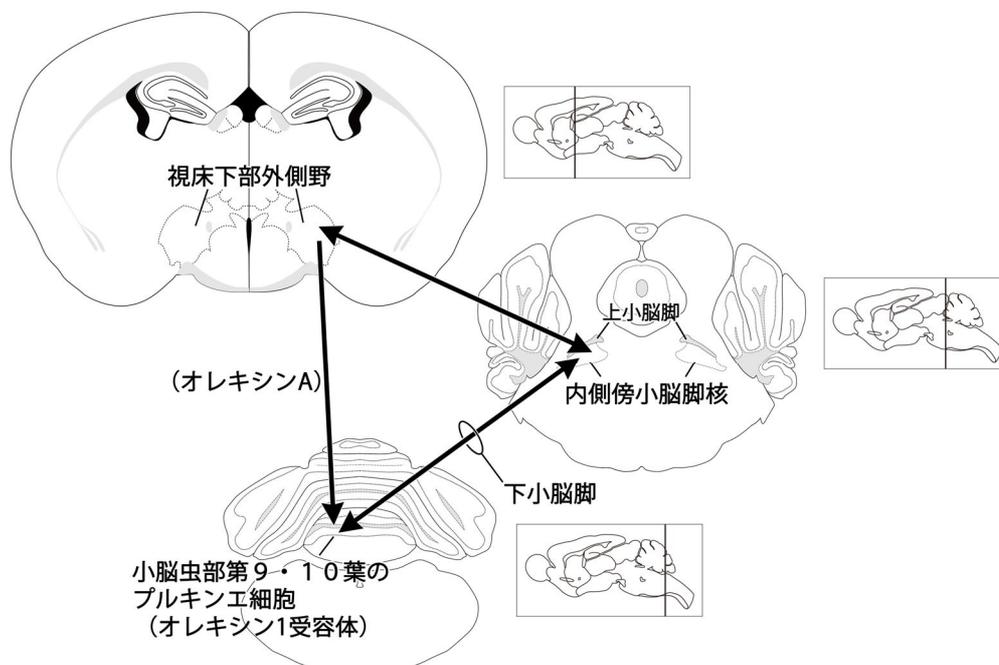


図. 4 小脳における新規神経回路

<引用文献>

- DeRosso, L. M., Hoque, R., *Neurol Clin*, **32**:893-900, 2014
 Canto, C. B. *et al.*, *Trends Neurosci*, **40**:309-323, 2017
 Nisimaru, N., *Jpn J Physiol*, **54**:431-448, 2004
 Hashimoto, M., *et al.*, *FrontNeural Circuit*, **12**, Article 6, 2018
 Hayashi, Y. *et al.*, *Science*, **350**:957-961, 2015
 Song, G. *et al.*, *J Neurosci*, **26**:300-310, 2006
 Tervo, D. G. *et al.*, *Neuron*, **92**:372-382, 2016
 Sakurai, T., *Nat Rev Neurosci*, **8**:171-181, 2007

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 橋本光広	4. 巻 52
2. 論文標題 小脳における、睡眠-覚醒サイクルの調節に関わる新規神経回路の同定	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 月刊「細胞」	6. 最初と最後の頁 566-567
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Nakamichi Yu, Okubo Kai, Sato Takayuki, Hashimoto Mitsuhiro, Tanifuji Manabu	4. 巻 9
2. 論文標題 Optical intrinsic signal imaging with optogenetics reveals functional cortico-cortical connectivity at the columnar level in living macaques	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1 - 12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-42923-2	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 橋本光広
2. 発表標題 Wnt7bは、Phelan-McDermid症候群の責任遺伝子のひとつである
3. 学会等名 東京理科大学 脳学際研究部門 第4回公開シンポジウム 「脳の理科から脳の謎に挑む」（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 橋本光広、加藤成樹、小林和人、八木沼洋行
2. 発表標題 ウイルスベクターを用いた、新たな小脳の神経回路の解明
3. 学会等名 第476回福島医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋本光広
2. 発表標題 視床下部外側野から小脳虫部へのオレキシン入力
3. 学会等名 第42回日本神経科学学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋本光広
2. 発表標題 小脳の機能基盤である小脳内領域化 - 発生から生理機能まで -
3. 学会等名 第252回つくばブレインサイエンスセミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋本光広、八木沼洋行
2. 発表標題 視床下部外側野から小脳へのオレキシン入力
3. 学会等名 第125回日本解剖学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 平井 宏和、日置 寛之、小林 和人	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 285
3. 書名 決定版 ウイルスペクターによる遺伝子導入実験ガイド	

〔産業財産権〕

〔その他〕

Mitsuhiro Hashimoto Home page
<https://mhashimoto.main.jp/>
 福島県立医科大学研究者データベース
https://www.fmu.ac.jp/kenkyu/html/1585_ja.html
 ORCID
<https://orcid.org/0000-0002-8751-4068>
 Google scholar
https://www.fmu.ac.jp/kenkyu/html/1585_ja.html
 Publons
https://www.fmu.ac.jp/kenkyu/html/1585_ja.html
 Mitsuhiro Hashimoto Home page
<http://www004.upp.so-net.ne.jp/MAK-hashimoto/>
 福島県立医科大学研究者データベース
https://www.fmu.ac.jp/kenkyu/html/1585_ja.html
 ORCID
<https://orcid.org/0000-0002-8751-4068>
 Google scholar
<https://scholar.google.com/citations?user=YBiGK00AAAAJ&hl=en>
 Publons
<https://publons.com/researcher/2823717/mitsuhiro-hashimoto/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------