

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16250

研究課題名(和文) 発達期小脳のシナプス刈り込みにおけるPcdh10の役割の解明

研究課題名(英文) A role of Pcdh10 in synapse elimination of the developing mouse cerebellum

研究代表者

渡邊 貴樹 (Watanabe, Takaki)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・助教

研究者番号：90749798

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)：本研究は、自閉スペクトラム症(ASD)関連遺伝子Pcdh10の小脳における役割を解明した。プルキンエ細胞特異的Pcdh10ノックアウトマウスを作製して、登上線維のシナプス刈り込みについて電気生理学的・形態学的に調べた。その結果、プルキンエ細胞のPCDH10は、登上線維シナプスに局在して、シナプス刈り込みに対抗してシナプスを維持する働きを持ち、発達期に一過的に多重支配を作り出す役割があることを明らかにした。行動解析の結果、Pcdh10による登上線維のシナプス刈り込みの正常な遅れがなくなると、ASD様行動である常同性・固執性や社会性の亢進異常が顕出する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の成果は、Pcdh10発現細胞で登上線維のシナプス刈り込みが遅れて進むこと、Pcdh10がその遅れを作り出すこと、Pcdh10による小脳の発達制御が正常な脳機能に必要なことを明らかにした。また、Pcdh10のプルキンエ細胞での役割を解明しただけでなく、小脳発達が一過的に異常になったマウスが、成体になるとASD様行動異常を引き起こすという現象の発見でもあるという学術的意義がある。発達障害のひとつであるASDを発症しうる仕組みのひとつとして、小脳の発達異常を起因とする、または含んでいる可能性がある可能性を示唆しており、この理解によって治療法への開発につながるという社会的意義が考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study elucidated the role of the autism spectrum disorder (ASD)-related gene Pcdh10 in the cerebellum. I generated Purkinje cell-specific Pcdh10 knockout mice (Pcdh10-ck0) and investigated electrophysiologically and morphologically for synapse elimination of climbing fibers. I found that PCDH10 of Purkinje cells, which is localized in climbing fiber synapses, has a function of maintaining the synapses against synapse elimination during development, resulting in a delay of climbing fiber elimination in Pcdh10-positive Purkinje cells. Behavioral analysis of Pcdh10-ck0 mice in adults suggested that if the normal delay in synapse elimination of climbing fibers by Pcdh10 disappears, repetitive / inflexible behaviors and sociability, which are related to ASD-like behaviors, were enhanced in Pcdh10-ck0 mice.

研究分野：神経科学

キーワード：小脳 プルキンエ細胞 シナプス刈り込み プロトカドヘリン 自閉スペクトラム症

## 1. 研究開始当初の背景

脳の神経回路は、生後発達期に外界からの刺激による神経活動に依存した過程を経て、環境に適応するように成熟する。神経細胞レベルでは、出生後に一旦過剰なシナプスが形成された後、神経活動に依存して必要なシナプス結合の強化と不要な結合の除去(シナプス刈り込み)がおこる。このシナプス刈り込みの異常は、自閉スペクトラム症(ASD)や統合失調症といった精神疾患に関与することが示唆されている<sup>1</sup>。一方、ヒトの臨床研究によると、生後に小脳傷害が起きると ASD 発症のリスクが高まることが示されている<sup>2</sup>。そこで申請者は、ASD 関連遺伝子の変異によって、発達期小脳でおこるシナプス刈り込みに異常が起きると ASD 発症のリスクが高まるのではないかと仮説を立てた。

近年、ASD 関連遺伝子 **Tsc1** のプルキンエ細胞特異的欠損マウスが ASD 様行動を起こすと示され<sup>3</sup>、このマウス小脳の右半球部の第 I 脚 (**CrusI**) の活動異常と ASD 様行動の関連が報告された<sup>4</sup>。発達期小脳において、登上線維 - プルキンエ細胞シナプスの刈り込みが起こるが<sup>5</sup>、ASD と関連する小脳半球部位での刈り込みの動態は不明である。小脳の構造は、アルドラーゼ **C/zebrinII (Aldoc)** などの遺伝子発現の有無と対応したコンパートメント構造があることが知られているが<sup>6</sup>、この構造とシナプス刈り込みの関係やその分子基盤には未だ謎が多い。本研究では、そもそも発達期に小脳半球部やコンパートメント構造においてシナプス刈り込みが均一に進むかを調べ、ASD 関連遺伝子の欠損によって小脳のどの部位でのシナプス刈り込みの障害が ASD 様行動を引き起こしうるのか検証した。

## 2. 研究の目的

上述の仮説に答えるために、本研究の目的は、発達期小脳における ASD 関連遺伝子プロトカドヘリン **10(Protocadherin 10, Pcdh10)** の役割の解明とした。これまでに、**Pcdh10** ノックアウトマウス (**LacZ** ノックイン) は大脳-視床間の投射などに異常があり、生後数週間で致死になることが分かっている<sup>7</sup>。このヘテロマウスの **LacZ** 発現を利用して、**Pcdh10** は小脳においては **Aldoc** 陽性(+)細胞の一部 (**CrusI, CrusII**, 第 VI, VII 小葉など) のプルキンエ細胞集団にだけ発現することが明らかにされた<sup>8</sup>。しかし、**Pcdh10** の小脳での役割は依然不明であった。そこで申請者は、**Cre** 依存的にノックアウトし代わりに赤色蛍光タンパク質を発現する **Pcdh10-DIO-tdTomato** マウスを新規に作製して、これまで不可能だったこのプルキンエ細胞特異的ノックアウトマウスにおいて電気生理学的解析を実現した。標準コントロールとして、**Aldoc** 細胞で赤色蛍光タンパク質が発現する **Aldoc-tdTomato** マウス<sup>9</sup> を用いることで、小脳虫部と右半球部、**Aldoc** または **Pcdh10** 陽性・陰性のそれぞれのコンパートメントにおける登上線維のシナプス刈り込みの違いを初めて明確にした。

## 3. 研究の方法

小脳の登上線維 - プルキンエ細胞シナプスの形成・除去の発達過程における **Pcdh10** の役割を明らかにするため、**Pcdh10-DIO-tdTomato** マウスを利用したプルキンエ細胞特異的ノックアウトマウス (**Pcdh10-cKO**)、コントロールとして **Aldoc-tdTomato** ヘテロマウス、**Cre** なしの **Pcdh10-DIO-tdTomato** マウスを用いて電気生理学的解析を行った。プルキンエ細胞選択的に **Cre** を発現する **GluD2-Cre<sup>10</sup>** と交配して **Pcdh10-cKO** を得た。**Pcdh10-cKO**、**Cre** なしのコントロール、**Aldoc-tdTomato** マウスの発達段階を追って、小脳虫部・右半球部のスライス標本作製し、プルキンエ細胞からホールセル記録して登上線維の興奮性シナプス後電流を測定し、投射の本数や入力の大さを調べた。平行線維・抑制性シナプスについても電気生理学的・形態学的にも解析した。抗 **Pcdh10** 抗体および登上線維マーカー抗 **VGluT2** 抗体を用いた免疫染色法によって、プルキンエ細胞における **PCDH10** と **VGluT2** の局在を調べた。

子宮内エレクトロポレーション法により **Pcdh10** をプルキンエ細胞内で過剰発現させて、その効果を電気生理学的に検証した。また、登上線維の起始核である延髄の下オリブ核でも **Pcdh10** の発現を発達期において免疫染色法で調べ、生後 0 - 2 日の **Pcdh10-DIO-tdTomato** マウスの下オリブ核に **AAV** を介して **Cre** を導入して登上線維において **Pcdh10** をノックアウトして、電気生理学的に解析した。さらに、プルキンエ細胞と登上線維の両方でダブルノックアウトした場合も解析した。

**Pcdh10-cKO** マウスにおいて行動異常が現れるかを検証するため、**L7-Cre<sup>11</sup>** と交配させた、プルキンエ細胞特異的 **Pcdh10-cKO** を用いて行動解析を行った。**GluD2** は大脳などにおいても発現が見られることが最近分かり、**L7-Cre** による **cKO** を作製して電気生理学的解析・行動解析を追加した。これらの **Pcdh10-cKO** と **Cre** なしのコントロールマウスを用いて、運動機能・ASD 様行動解析を行った。

## 4. 研究成果

発達期小脳で起こる登上線維-プルキンエ細胞のシナプス刈り込みがそもそも小脳全体で均一に進むかを、**Pcdh10+/Aldoc+** 領域に注目して、小脳スライス標本で電気生理学的に調べた。

小脳虫部で調べた結果、**Aldoc+**細胞の一部の集団である**Pcdh10+**細胞(特に第**VI, VII**小葉)において、コントロールマウスでは登上線維のシナプス刈り込みが他の領域と比べて遅れて進む、すなわち登上線維による多重支配が一過的に多いことが分かった。**ASD**に関連すると考えられている小脳の右半球(**CrusI, CrusII, SIM**)でも調べた結果、小脳右半球の**Aldoc+**細胞は、**Aldoc-**細胞に比べて登上線維のシナプス刈り込みが遅れて進むことが分かった。一方、**Pcdh10-cKO**では、このシナプス刈り込みの遅れが、小脳虫部および右半球において消失していた。**Pcdh10-cKO**の成体マウスにおいては登上線維に異常はみられなかった。**L7-Cre**と交配した**Pcdh10-cKO**マウスでも同様の結果が得られた。これらのことから、登上線維のシナプス刈り込みは小脳全体で均一に進んでおらず、**Pcdh10+**細胞において遅れて進んで、多重支配が多い状態が一過的に起こり、その遅れは**Pcdh10**の発現に起因することが示唆された。

平行線維と抑制性シナプスの電気生理学的および形態学的解析を行った結果、平行線維および抑制性シナプスのシナプス応答および興奮性・抑制性シナプス分子(**VGluT1, VGAT**)の局在には、**Pcdh10-cKO**マウスで有意な差はみられなかった。

次に、プルキンエ細胞において**Pcdh10**を過剰発現することによる影響を調べた。子宮内エレクトロポレーション法によって発達期のプルキンエ細胞特異的に**Pcdh10**を**GFP**と共に過剰発現させた結果、離乳期ごろにおいて登上線維による多重支配の割合が有意に増加することが判明した。したがって、**Pcdh10**の過剰発現によって登上線維の刈り込みが阻害されている可能性、または刈り込まれるべき登上線維シナプスを維持する可能性が考えられた。

抗**PCDH10**抗体を用いた免疫染色によって、発達を追ってプルキンエ細胞における**PCDH10**の局在を調べた。野生型マウスにおける**PCDH10**は、発達初期から登上線維マーカーである**VGluT2**と共局在することから、登上線維シナプス上にあることが示唆された。プルキンエ細胞特異的ノックアウトマウスにおいては、プルキンエ細胞上での**PCDH10**のシグナルが欠失する一方、登上線維側のシグナルは残ったままであった。これらのことから、野生型マウスにおいてプルキンエ細胞上(ポストシナプス)と登上線維上(プレシナプス)の両側のシナプスに**PCDH10**は局在しており、同族親和的に結合している可能性が考えられた。

生後発達期における下オリブ核での**PCDH10**の発現を調べた結果、特に**MAO**領域に発現が高いことが分かった。登上線維での**Pcdh10**の役割も明らかにするために、生後**0-2**日の**Pcdh10-DIO-tdTomato**マウスの延髄の下オリブ核に**AAV**を介して**Cre**を導入して登上線維において**Pcdh10**をノックアウトして、電気生理学的に解析した。その結果、プルキンエ細胞特異的ノックアウトと同様に、登上線維のシナプス刈り込みの遅れが消失した。加えて、プルキンエ細胞と登上線維の両方でダブルノックアウトした場合でも、同様の結果であり、刈り込みが促進する異常が加算することはなかった。

以上の結果から、プルキンエ細胞の**PCDH10**は登上線維シナプスに局在して、シナプス刈り込みに対抗してシナプスを維持する働きを持ち、一過的に多重支配を作り出していることが示唆された。

**L7-Cre**と交配した**Pcdh10-cKO**マウスの成体において**ASD**様行動異常がみられるか検証した。**Pcdh10-cKO(L7-Cre)**マウスは、グルーミングとビー玉埋めの頻度が有意に上昇する異常がみられ、繰り返し運動・常同性の亢進が示唆された。水**Y**迷路を用いた逆転学習における成績が一過的に有意に下がったため、一度覚えた条件から異なる条件に学習しづらいという固執性の亢進が示唆された。社会的相互作用および社会性新規テストの結果、見知らぬマウスに対してよく接触したり近づいたりすることから社会性の亢進異常が示唆された。一方で、ロタロッドテストは正常に行えることから運動協調学習に異常はないことが示された。これらの結果から、**Pcdh10**による登上線維のシナプス刈り込みの正常な遅れがなくなると、**ASD**様行動である常同性・固執性や社会性の亢進異常が顕出する可能性が考えられた。

以上の研究により、離乳前の発達期小脳で起こるシナプス刈り込みの異常が、成体になると**ASD**様行動異常を引き起こし得ることを明らかにした。**Pcdh10-cKO**の成体では小脳の機能異常が認められないことから、他の脳部位(**ASD**で異常が認められる大脳など)での異常が残ったと考えられる。これまでに小脳異常が**ASD**様行動をもたらすモデルとして知られているプルキンエ細胞特異的**Tsc1**ノックアウトマウスは、**Tsc1-cKO**は成体でのプルキンエ細胞の活動減少と脱落が主な異常であり、発達期の異常は認められていない<sup>3</sup>。今回の成果は、小脳発達が一過的に異常になったマウスが、成体になると**ASD**様行動異常を引き起こすという現象の発見であり、世界初のマウスモデルを作ったとして学術的にインパクトがある。今後は、**Pcdh10-cKO**でみられた小脳の発達異常が、どこの脳部位に異常を残しているのか特定して、その神経基盤と分子基盤を明らかにしていく予定である。

#### 引用文献

1. **Penzes, P., Cahill, M. E., Jones, K. A., Vanleeuwen, J. E. & Woolfrey, K. M. Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nat. Neurosci.* 14, 285–293 (2011).**

2. Wang, S. S. H., Kloth, A. D. & Badura, A. The Cerebellum, Sensitive Periods, and Autism. *Neuron* **83**, 518–532 (2014).
3. Tsai, P. T. *et al.* Autistic-like behaviour and cerebellar dysfunction in Purkinje cell *Tsc1* mutant mice. *Nature* **488**, 647–651 (2012).
4. Stoodley, C. J. *et al.* Altered cerebellar connectivity in autism and cerebellar-mediated rescue of autism-related behaviors in mice. *Nat. Neurosci.* **20**, 1744–1751 (2017).
5. Hashimoto, K. & Kano, M. Synapse elimination in the developing cerebellum. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 4667–4680 (2013).
6. Fujita, H., Morita, N., Furuichi, T. & Sugihara, I. Clustered fine compartmentalization of the mouse embryonic cerebellar cortex and its rearrangement into the postnatal striped configuration. *J. Neurosci.* **32**, 15688–15703 (2012).
7. Uemura, M., Nakao, S., Suzuki, S. T., Takeichi, M. & Hirano, S. OL-protocadherin is essential for growth of striatal axons and thalamocortical projections. *Nat. Neurosci.* **10**, 1151–1159 (2007).
8. Vibulyaseck, S. *et al.* Spatial rearrangement of Purkinje cell subsets forms the transverse and longitudinal compartmentalization in the mouse embryonic cerebellum. *J. Comp. Neurol.* **525**, 2971–2990 (2017).
9. Tsutsumi, S. *et al.* Structure–function relationships between aldolase C/Zebirin II expression and complex spike synchrony in the cerebellum. *J. Neurosci.* **35**, 843–852 (2015).
10. Hashimoto, K. *et al.* Postsynaptic P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channel in Purkinje cell mediates synaptic competition and elimination in developing cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 9987–9992 (2011).
11. Gong, S. *et al.* Targeting Cre recombinase to specific neuron populations with bacterial artificial chromosome constructs. *J. Neurosci.* **27**, 9817–9823 (2007).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Rai Y, Watanabe T*, Matsuyama K, Sakimura K, Uesaka N, Kano M	4. 巻 20
2. 論文標題 Phospholipase C 3 is Required for Climbing Fiber Synapse Elimination in Aldolase C-positive Compartments of the Developing Mouse Cerebellum.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience.	6. 最初と最後の頁 30268-2
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuroscience.2020.04.035.	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 Watanabe T, Suzuki H, Kano M	4. 巻 71(12)
2. 論文標題 Postnatal Development of Cerebellar Neural Circuits	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BRAIN and NERVE	6. 最初と最後の頁 1373-1383
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11477/mf.1416201457.	査読の有無 無
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 Kano M, Watanabe T.	4. 巻 8
2. 論文標題 Developmental synapse remodeling in the cerebellum and visual thalamus.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 F1000Research	6. 最初と最後の頁 1191
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.12688/f1000research.18903.1.	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6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takaki Watanabe, Kazuto Sakoori, Honoka Suzuki, Tsubasa Akamatsu, Kyoko Matsuyama, Shutaro Inoue, Manabu Abe, Kenji Sakimura, Naofumi Uesaka, Masanobu Kano
2. 発表標題 Protocadherin 10 delays developmental climbing fiber synapse elimination in a subset of aldolase C-positive Purkinje cells in the cerebellum
3. 学会等名 Neuro2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡邊貴樹、佐郡和人、鈴木穂香、赤松翼、松山恭子、井上秀太郎、阿部学、崎村建司、上阪直史、狩野方伸
2. 発表標題 Protocadherin 10 delays developmental climbing fiber synapse elimination in a subset of aldolase C-positive Purkinje cells in the cerebellum
3. 学会等名 第3回領域会議_新学術マルチスケール脳
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takaki Watanabe, Yurie Rai, Honoka Suzuki, Tsubasa Akamatsu, Naofumi Uesaka, Masanobu Kano
2. 発表標題 Climbing fiber synapse elimination in aldolase C-positive Purkinje cells is delayed compared to aldolase C-positive Purkinje cells and requires phospholipase C beta 3 in the developmental cerebellum
3. 学会等名 Neuro2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊貴樹
2. 発表標題 発達期小脳のプルキンエ細胞における登上線維シナプス刈り込みのPcdh10依存的特異性
3. 学会等名 2019年度若手技術支援講習会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊貴樹
2. 発表標題 Protocadherin 10 delays developmental climbing fiber synapse elimination in a subset of aldolase C-positive Purkinje cells in the cerebellum
3. 学会等名 次世代脳プロジェクト冬のシンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takaki Watanabe, Honoka Suzuki, Tsubasa Akamatsu, Kazuto Sakoori, Shutaro Inoue, Manabu Abe, Kenji Sakimura, Naofumi Uesaka, Masanobu Kano
2. 発表標題 Protocadherin 10は一部のアルドラーゼC陽性の小脳プルキンエ細胞において発達期の登上線維シナプスの刈り込みを遅延させる
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<a href="http://plaza.umin.ac.jp/~neurophy/Kano_Lab_j/Top_j.html">http://plaza.umin.ac.jp/~neurophy/Kano_Lab_j/Top_j.html</a>
---

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
研究協力者	狩野 方伸  (Kano Masanobu)  (40185963)		
研究協力者	佐郡 和人  (Sakoori Kazuto)  (00415168)		

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