

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15919

研究課題名(和文) Unipolar brush cellsが小脳機能に果たす役割の解明

研究課題名(英文) The role of Unipolar brush cells in the cerebellar functions

研究代表者

宮下 聡 (Miyashita, Satoshi)

新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号：30828900

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：小脳は、運動機能のみならず高次機能への関与及び精神疾患に関わることが報告されている脳領域である。本研究では、小脳皮質における興奮性の神経細胞であり、未だ機能がほとんど解明されていない単極性刷毛細胞(Unipolar Brush Cells; UBCs)に着目し、UBCsの生理機能の解明及び小脳皮質回路の情報処理システムの理解を深めることを目的とする。小脳の単一細胞RNAseq(scRNAseq)データから、UBCsで特異的に発現する遺伝子の同定を試みた。その結果、新規のUBCsマーカーを同定するとともに、UBCsのより詳細に分類することで、いくつかのサブタイプが存在していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

UBCsに関する研究は、小脳皮質に存在する他の神経細胞と比較して非常に限定的である。発生的な見地からは、EnglundらがTbr2の免疫染色を用いることでUBCsが菱脳唇に由来することを見出している(Englund et al. 2006)。一方、神経回路的な見地からは第X小葉におけるUBCsが前庭神経と直接シナプス結合することが示されている(Balmer 2019)。本研究によって同定されたUBCsの新規分子マーカーや詳細なサブタイプ分類は、今後、UBCsの研究をさらに発展させるとともに、小脳神経回路や小脳機能の新しい側面を解明することにつながることで期待される。

研究成果の概要(英文)：The cerebellum has been reported to be involved not only in motor functions but also in cognitive functions and sociability. In this study, we focused on unipolar brush cells (UBCs), which are excitatory neurons in the cerebellar cortex and whose functions are still largely unknown, in order to elucidate the physiological functions of UBCs. We have deciphered genes which specifically expressed in UBCs by using single-cell RNA sequencing (scRNAseq) data obtained from the cerebellum. As a result, we identified novel UBC markers and discovered that UBCs can be further classified into several subtypes. We further confirmed that these specific markers are expressed in the cerebellum in vivo. Analyzing the neural circuit of UBC subtypes will shed light on the unknown cerebellar circuits which may contribute to the cognitive and/or social function of the cerebellum.

研究分野：神経発生学

キーワード：Unipolar brush cells 小脳 神経発生 single cell RNAseq

1. 研究開始当初の背景

小脳皮質は5種類の抑制性神経細胞(プルキンエ細胞、ゴルジ細胞、等)と2種類の興奮性神経細胞(顆粒細胞、単極性刷毛細胞)という限られた種類の神経細胞から構成されるため、神経回路システムを理解する上で非常に有用なモデルである。顆粒細胞は、古くは100年以上前から多くの研究者が研究に取り組み、細胞形態や電気生理学的特性・小脳皮質回路や小脳機能における役割等の多くが明らかにされてきた。その一方で、もう一種類の興奮性神経細胞である単極性刷毛細胞(Unipolar Brush Cells; UBCs)については細胞の起源はわかっている一方で、生理機能に関してはあまり研究が為されておらず、小脳機能にどのような役割を果たしているのかほとんど不明である。しかし、UBCsの数は少なく(プルキンエ細胞とほぼ同数)、特に高次機能への関与が示唆される小脳尾側に多く分布することなどからUBCsが小脳皮質回路で重要な役割を果たしていると考えられる。しかしながら、圧倒的多数の顆粒細胞に囲まれた中からUBCsを選別する良い方法がなかったことでUBCsを対象とした研究は非常に困難であった。以上のように、UBCsは未だに不明な点が多く残る小脳機能を解明する上で、その重要性を十分に把握されていたにも関わらず、研究開始当初には、技術的な限界により研究が存在していたため解析が十分に進んでいなかった。一方、近年の生物学研究の発展により、UBCsを特異的にマークするマウスの作出や、UBCs特異的な遺伝子発現の解析が可能となっていた。

2. 研究の目的

本研究では、(1)単一細胞RNAseqデータ(single cell RNAseq; scRNAseq)の解析によるUBCsの網羅的な遺伝子発現解析と(2)UBCsにおいてCreを発現するマウスシステムを用いた神経回路網探索を行うことにより、上述の技術的な困難を解決し、小脳神経回路や小脳機能に果たすUBCsの機能を解明することを目的に、研究を行なった。

3. 研究の方法

(1)scRNAseq解析によるUBCsの網羅的な遺伝子発現解析

scRNAseqデータは、公共のscRNAseqデータ(GSE165371)をGEOからダウンロードし、Seuratパッケージを用いて解析を行なった。また、我々が作出したUBCsにおいてCreを発現するマウスシステム(UBC-Cre)とCre依存的にEGFPを発現するROSA-EGFPマウスを掛け合わせたUBC-Cre;ROSA-EGFPマウスを生後2週齢でサンプリングした。サンプリングしたマウスから小脳を抽出し、UBCsが豊富に存在する小脳後部を分散した後、Chromium controllerを用いてsingle cellライブラリーを作成した。

(2)UBC-Creマウスを用いた神経回路解析

8-10週齢のUBC-Creマウスに対して、麻酔下で頭部を固定し小脳虫部第IX葉及び第X葉にマイクロニードルを挿入し、Cre依存的にGFPを発現するアデノ随伴ウイルス(AAV)を感染させた。感染から2週間後に、マウスをサンプリングし、小脳においてウイルスが感染した細胞と、その細胞の投射経路を調べた。

4. 研究成果

(1) UBCs における網羅的な遺伝子発現解析

小脳 scRNAseq データから UBCs の遺伝子発現プロファイルを解析し、UBCs のサブタイプを調べた。まず、全小脳細胞を含むデータセットをクラスタリングし、UBCs マーカーの発現から、UBCs を含む細胞クラスターを同定した(図 1)。その後、UBCs を含むクラスターのみを抽出し、サブクラスタリングを行い、UBCs のサブタイプを探索した。興味深いことに、既知のマーカーである mGluR1, Calretinin, Plcb4 では分類できないサブタイプが存在していることを見出した。すなわち、scRNAseq によって、既存の手法では同定できなかった UBCs のサブタイプを同定できることが示された。次に、これらのサブタイプで特異的に発現しているマーカー遺伝子を探索した。その結果、同定されたサブタイプ内では、イオンチャネルや、膜分子の発現が異なることを見出した。この結果は、遺伝子発現だけではなく、細胞の機能や電気生理学的な特性もサブタイプ間で異なっていることを示唆している。今後は、これらの細胞に発現する遺伝子からサブタイプ特異的な Cre 発現マウスの作成を計画している。また、これらのサブタイプがいつから存在しているか、そして、真に生体内に存在する UBCs のサブタイプであるかを調べるために、生後 2 週齢の UBC-Cre;ROSA-EGFP マウスの小脳から細胞を抽出し、GFP 陽性細胞のみを FACS によってソーティングすることで、UBCs のみを単離し、それらを chromium controller によって、single cell ライブラリー化したサンプルを取得した。生後 2 週齢においては、UBCs のみに GFP の発現がみられるため、これによって、よりピュアな UBCs 細胞群における遺伝子発現とサブクラス分類の検証を行なっていく予定である。

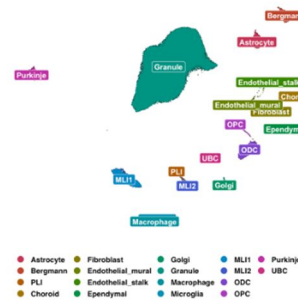


図1. 全小脳細胞のクラスタリング

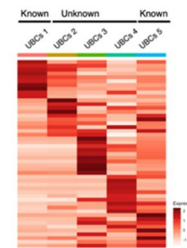


図2. 新規UBCsのサブタイプとマーカーの発現

(2) UBC-Cre マウスを用いた神経回路解析

8-10 週齢の UBC-Cre マウスに対して、Cre 依存的に GFP を発現する AAV-Flex-EGFP をインジェクションし、UBCs の投射経路を調べた。残念ながら、本研究で用いた UBC-Cre マウスは、UBCs 以外の細胞でも微量の CRE を発現していることが解析を進めていく中で明らかとなったため、8-10 週齢の成体マウスを用いた解析は困難であることがわかった。その後、UBCs でのみ Cre を発現する時期を詳細に調べると、生後から 4 週齢までは、UBCs に特異的であり、その後から徐々にプルキンエ細胞などで発現がみられることがわかってきた。そのため、現在は、生後初期にインジェクションをし、4 週目までに、UBCs を除去する系の立ち上げを行なっている。また、新たな UBCs 特異的な Cre 発現マウスを導出するために、上記の scRNAseq のデータを用いて、UBCs に特異的に発現する遺伝子を探索した(図 3)。その結果、イオンチャネルの機能を持つ膜分子が、UBCs 特異的に発現していることを見出した。今後、この遺伝子をターゲットにした新たな UBCs 特異的な Cre マウスの系統を作出することを検討している。

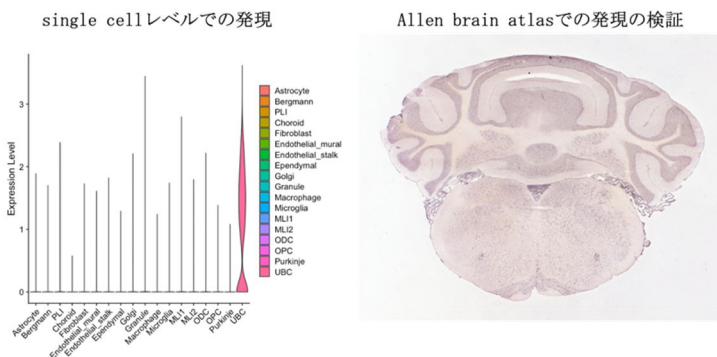


図3. 新規UBCsマーカー候補の検討

参考文献

Kozareva V, Martin C, Osorno T, Rudolph S et al. Author Correction: A transcriptomic atlas of mouse cerebellar cortex comprehensively defines cell types. Nature 2022 Feb;602(7896):E21. PMID: 35022615

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nakamura Yuka, Kurabe Miyuki, Matsumoto Mami, Sato Tokiharu, Miyashita Satoshi, Hoshina Kana, Kamiya Yoshinori, Tainaka Kazuki, Matsuzawa Hitoshi, Ohno Nobuhiko, Ueno Masaki	4. 巻 12
2. 論文標題 Cerebrospinal fluid-contacting neuron tracing reveals structural and functional connectivity for locomotion in the mouse spinal cord	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.83108	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 Nakata Satoshi, Miyashita Satoshi, Natsumeda Manabu, et al.	4. 巻 25
2. 論文標題 Epigenetic upregulation of Schlafen11 renders  WNT- and SHH-activated medulloblastomas sensitive to?cisplatin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuro-Oncology	6. 最初と最後の頁 899 ~ 912
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/neuonc/noac243	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 Nakamura Yuka, Kurabe Miyuki, Matsumoto Mami, Sato Tokiharu, Miyashita Satoshi, Hoshina Kana, Kamiya Yoshinori, Tainaka Kazuki, Matsuzawa Hitoshi, Ohno Nobuhiko, Ueno Masaki	4. 巻 12
2. 論文標題 Cerebrospinal fluid-contacting neuron tracing reveals structural and functional connectivity for locomotion in the mouse spinal cord	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 0-0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.83108	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 Nakata Satoshi, Miyashita Satoshi, Natsumeda Manabu et al.,	4. 巻 25
2. 論文標題 Epigenetic upregulation of Schlafen11 renders  WNT- and SHH-activated medulloblastomas sensitive to?cisplatin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuro-Oncology	6. 最初と最後の頁 899 ~ 912
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/neuonc/noac243	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 Miyashita Satoshi, Hoshino Mikio	4. 巻 11
2. 論文標題 Transit Amplifying Progenitors in the Cerebellum: Similarities to and Differences from Transit Amplifying Cells in Other Brain Regions and between Species	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 726 ~ 726
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells11040726	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 Miyashita Satoshi, Owa Tomoo, Seto Yusuke, Yamashita Mariko, Aida Shogo, Sone Masaki, Ichijo Kentaro, Nishioka Tomoki, Kaibuchi Kozo, Kawaguchi Yoshiya, Taya Shinichiro, Hoshino Mikio	4. 巻 40
2. 論文標題 Cyclin D1 controls development of cerebellar granule cell progenitors through phosphorylation and stabilization of ATOH1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e105712
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2020105712	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 Adachi Toma, Miyashita Satoshi, Yamashita Mariko, Shimoda Mana, Okonechnikov Konstantin, Chavez Lukas, Kool Marcel, Pfister Stefan M., Inoue Takafumi, Kawauchi Daisuke, Hoshino Mikio	4. 巻 8
2. 論文標題 Notch Signaling between Cerebellar Granule Cell Progenitors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eneuro	6. 最初と最後の頁 0468-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/ENEURO.0468-20.2021	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 Nogami Ken'ichiro, Maruyama Yusuke, Sakai-Takemura Fusako, Motohashi Norio, Elhussieny Ahmed, Imamura Michihiro, Miyashita Satoshi, Ogawa Megumu, Noguchi Satoru, Tamura Yuki, Kira Jun-ichi, Aoki Yoshitsugu, Takeda Shin'ichi, Miyagoe-Suzuki Yuko	4. 巻 30
2. 論文標題 Pharmacological activation of SERCA ameliorates dystrophic phenotypes in dystrophin-deficient mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 1006 ~ 1019
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddab100	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 Adachi Toma, Miyashita Satoshi, Yamashita Mariko, Shimoda Mana, Okonechnikov Konstantin, Chavez Lukas, Kool Marcel, Pfister Stefan M., Inoue Takafumi, Kawauchi Daisuke, Hoshino Mikio	4. 巻 -
2. 論文標題 Notch Signaling between Cerebellar Granule Cell Progenitors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eneuro	6. 最初と最後の頁 0468 ~ 20.2021
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/ENEURO.0468-20.2021	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 Yamashita Mariko, Owa Tomoo, Shiraishi Ryo, Adachi Toma, Ichijo Kentaro, Taya Shinichiro, Miyashita Satoshi, Hoshino Mikio	4. 巻 25
2. 論文標題 The role of SCF Skp2 and SCF TrCP1/2 in the cerebellar granule cell precursors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 796 ~ 810
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12813	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 Arimura Nariko, Okada Mako, Taya Shinichiro, Dewa Ken-ichi, Tsuzuki Akiko, Uetake Hiroto, Miyashita Satoshi, Hashizume Koichi, Shimaoka Kazumi, Egusa Saki, Nishioka Tomoki, Yanagawa Yuchio, Yamakawa Kazuhiro, Inoue Yukiko U., Inoue Takayoshi, Kaibuchi Kozo, Hoshino Mikio	4. 巻 6
2. 論文標題 DSCAM regulates delamination of neurons in the developing midbrain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 1693 ~ 1693
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.aba1693	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 Hori K, Yamashiro K, Nagai T, Shan W, Egusa SF., Shimaoka K, Kuniishi H, Sekiguchi M, Go Y, Tatsumoto S, Yamada M, Shiraishi R, Kanno K, Miyashita S, Sakamoto A, Abe M, Sakimura K, Sone M, Sohya K, Kunugi H, Wada K, Yamada M, Yamada K, Hoshino M	4. 巻 23
2. 論文標題 AUTS2 Regulation of Synapses for Proper Synaptic Inputs and Social Communication	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101183 ~ 101183
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101183	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4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 宮下 聡
2. 発表標題 発生期小脳顆粒細胞における一過的な神経前駆細胞の増殖メカニズム
3. 学会等名 Neuro2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮下 聡
2. 発表標題 Transit amplification of cerebellar granule cell in human and mouse cerebellum.
3. 学会等名 Neuro2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Satoshi Miyashita
2. 発表標題 A novel developmental pattern of cerebellar granule cells revealed by big data-driven approach
3. 学会等名 Korea-Japan Joynt Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮下 聡
2. 発表標題 ビッグデータが切り開く小脳顆粒細胞の新しい発生様式とその分子基盤
3. 学会等名 CBIR若手インスパイアシンポジウム
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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