

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430008

研究課題名(和文)小脳内領域化を決定する分子メカニズムとその生理的意義の解明

研究課題名(英文)Molecular and physiological mechanisms of the cerebellar compartmentalization

研究代表者

橋本 光広 (Hashimoto, Mitsuhiro)

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) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：1. Wnt7bの発現を抑制することができるアデノウイルスベクターを新規に開発し、マウス胎生11.5日生まれの神経細胞において、Wnt7bの発現を選択的に抑制した。その結果、Wnt7bの発現を抑制されたマウスは、低発育・大脳皮質の低形成・小脳虫部の欠損を示し、自閉症様の行動異常・覚醒時脳波の異常を示した。  
2. 自由行動下において、チャンネルロドプシン2を発現した神経細胞の活性を光刺激によって制御できる新規無線小型装置を2種類開発した。無線には赤外線またはBluetooth 4.0を使用している。Bluetooth無線の光刺激装置は、iPadまたはiPhoneアプリで無線制御できる。

研究成果の概要(英文)：1. We newly generated an adenoviral vector expressing antisense RNA of Wnt7b. The adenoviral vector suppressed successfully Wnt7b-expression in vitro and in vivo. Using the adenoviral vector, we suppressed Wnt7b-expression in neurons born on embryonic day (E)11.5, selectively. Wnt7b-suppression caused underdevelopment, neocortex hypoplasia, cerebellar vermis hypoplasia, autism-like abnormal behavior, and abnormal EEG.  
2. We newly made two kinds of optical-stimulators that were small enough to mount the device on a mouse head. One was controlled by infrared wireless communication and another one was controlled by wireless communication of Bluetooth 4.0 (Bluetooth Low Energy). The Bluetooth-device could be modulated by an iPad or iPhone application.

研究分野：神経科学

キーワード：小脳 アデノウイルスベクター 神経細胞の誕生日 22q13欠失症候群 Wnt7b

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、アデノウイルスベクターを用いることによって、同じ誕生日を有した神経細胞群特異的に遺伝子を導入できることを、初めて明らかにした (Hashimoto, 2004)。この技術は、同じ誕生日を有した神経細胞群へ遺伝子を導入する唯一の方法であり、神経細胞の発生・分化ならびに、同じ誕生日を有した神経細胞群の機能を研究する上で大変有用である。研究代表者は、この技術を用いることによって、小脳内に形成される縦縞状の領域が、小脳プルキンエ細胞の誕生日によって規定されていることを、初めて明らかにした (Hashimoto, 2003)。さらに、研究を進展させ、小脳プルキンエ細胞の誕生日が規定する縦縞状領域は、小脳内の神経回路網と高い相関関係を有することを明らかにした (Namba, 2011)。いままで、小脳内に形成さえる縦縞状の領域がどのようなしくみで形成されるのかは、不明であったが、研究代表者は、プルキンエ細胞の誕生日という新しい概念を導入することにより、小脳の縦縞状領域化・小脳内神経回路網形成のしくみが説明できることを明らかにした。研究代表者の研究成果は、多くの総説・書籍に引用されている。

研究代表者は、光遺伝学(オプトジェネティクス)を用いた覚醒マウス用無線小型光刺激装置の開発を行ってきた (Iwai, 2011)。開発した装置を用いることによって、覚醒・自由行動下マウスの行動を無線通信で制御することを可能とした。本装置を用いれば、覚醒・自由行動下マウスの特定神経細胞群を選択的に光刺激することができ、脳内の各領域における神経細胞群の生理機能を詳細に解析することができる。今まで開発してきた装置は、赤外線を無線通信に使用している。赤外線無線通信は、遮蔽物に弱く、実験動物が遮蔽物の裏に隠れてしまうと通信が途絶えてしまう欠点があった。

## 2. 研究の目的

異なる誕生日を有したプルキンエ細胞群の遺伝子発現パターンを比較し、プルキンエ細胞の誕生日特異的に発現している分子を同定する。同定された分子が、プルキンエ細胞の分化・領域形成にどのように関わっているかを明らかにする。これによって、プルキンエ細胞の誕生日と分化(分子生物学的に異なる性質の獲得)の間に密接な相関関係があることを証明し、プルキンエ細胞の誕生日によって規定される小脳内領域化を制御する分子メカニズムを解明する。一般的に、小脳プルキンエ細胞は均一であると考えられているので、本研究によって、「小脳プルキンエ細胞は分子生物学的に不均一な細胞集団であり、その不

均一性はプルキンエ細胞の誕生日が規定している」という、小脳研究における新しい概念の確立を目指す。また、小脳変性疾患や自閉症症候群の中には、小脳が小さくプルキンエ細胞が縦縞状に変性脱落する症状を呈するものがある。異なる誕生日を有する小脳プルキンエ細胞の分子プロファイルを明らかにすることによって、多くの小脳変性を伴う疾患と小脳プルキンエ細胞の誕生日との因果関係を解明する。麻酔下の神経活動は、無麻酔下の神経活動と異なることが報告されており、無麻酔下で神経細胞の機能を解析することの重要性が示唆されている。小脳プルキンエ細胞の活性も麻酔下と無麻酔下で異なることが報告されている。そこで、本研究では、同じ誕生日を有するプルキンエ細胞群の活性を、自由行動下において選択的に制御する技術の開発を行う。この研究を遂行するために、チャンネルロドプシン2またはハロロドプシンを発現するアデノウイルスベクターを作製し、チャンネルロドプシン2またはハロロドプシンを発現している神経細胞を、自由行動下で光刺激するための新規無線光刺激装置を開発する。アデノウイルスベクターと無線小型光刺激装置を用いることによって、同じ誕生日を有したプルキンエ細胞の機能を無麻酔下で制御し、プルキンエ細胞の誕生日と小脳生理機能との相関関係を明らかにする。

## 3. 研究の方法

Venus(高輝度蛍光蛋白質)を発現するアデノウイルスベクターを用い、同じ誕生日を有するプルキンエ細胞を蛍光ラベルする。その後、FACSを用いて、同じ誕生日を有するプルキンエ細胞を、胎生18.5日の小脳から選択的に回収する方法を確立した。この方法を用い、マウス胎生10.5日、胎生11.5日、胎生12.5日生まれのプルキンエ細胞を、胎生18.5日の小脳から選択的に、分離・回収した。回収したサンプルからRNAを抽出し、2回増幅後(頻回増幅による擬陽性の増幅を避けるため2回増幅にとどめる)、各誕生日ごとのプルキンエ細胞に発現している遺伝子を、DNAマイクロアレイを用いて網羅的に解析する。DNAマイクロアレイの解析結果を用いて、異なる誕生日を有するプルキンエ細胞群間で遺伝子の発現パターンを比較し、ある誕生日を有するプルキンエ細胞において発現が上昇している、または、発現が減少している遺伝子群を選定する。選定した遺伝子群に対して *in situ hybridization* および免疫染色を行い、それらの発現パターンを時空間的に解析する。解析結果をもとに、ある誕生日を有するプルキンエ細胞に特異的に発現している機能分子を同定する。プルキンエ細胞の誕生日特異的な機能分

子を発現する、ならびに、その機能分子を抑制する分子(アンチセンス遺伝子、または、siRNA)を発現するアデノウイルスベクターを作製する。アデノウイルスベクターを用いて、機能分子を異所的に発現させる、または、抑制することによって、同定した機能分子とプルキンエ細胞の分化・小脳内領域形成・神経回路網形成に、どのように関与・制御しているかを解析する。チャンネルロドプシン2を発現するアデノウイルスベクターを用いて、胎生12.5日生まれのプルキンエ細胞へ選択的にチャンネルロドプシン2を発現させ、麻酔下4週齢のマウスにおいて、プルキンエ細胞の活性を光刺激によって制御できることを確認した。自由行動下において、チャンネルロドプシン2を発現したプルキンエ細胞の活性を光刺激によって制御するためには、動物の行動を抑制しない小型無線光刺激装置が必要となる。赤外線通信を用いた無線光刺激装置を開発したが、赤外線通信には、遮蔽物によって通信が遮断されてしまうという欠点があった。自由行動下のマウスを迷路などの装置内で光刺激する際、赤外線通信が支障を来すことがある。そこで、小型無線光刺激装置のさらなる開発を行い、新規無線光刺激装置の開発を行う。アデノウイルスベクターを用いて、同じ誕生日を有するプルキンエ細胞に、チャンネルロドプシン2またはハロロドプシンを選択的に発現させ、自由行動下において、小脳を光刺激するための技術・方法の確立を行う。

#### (参考文献)

- Hashimoto M. and Mikoshiba K. (2003) "Mediolateral compartmentalization of the cerebellum is determined on the Birth date of Purkinje cells.", *J. Neuroscience*, **23**, 11342-11351.
- Hashimoto, M., and Mikoshiba, K. (2004) "Neuronal birthdate-specific gene transfer with adenoviral vectors.", *J. Neuroscience*, **24**, 286-296.
- Namba, K., Sugihara, I., and Hashimoto, M. (2011) "Close correlation between the birthdate of Purkinje cells and the longitudinal compartmentalization of the mouse adult cerebellum.", *Journal of Comparative Neurology*, **519**, 2594-2614.
- Iwai, Y., Honda, S., Ozeki, H., Hashimoto, M., Hirase, H. (2011) "A simple head-mountable LED device for chronic stimulation of optogenetic molecules in freely moving mice.", *Neuroscience Research*, **70**, 124-127.

#### 4. 研究成果

マウス胎生10.5日、胎生11.5日、胎生12.5日生まれのプルキンエ細胞群それぞれに発現している遺伝子を、DNAマイクロアレ

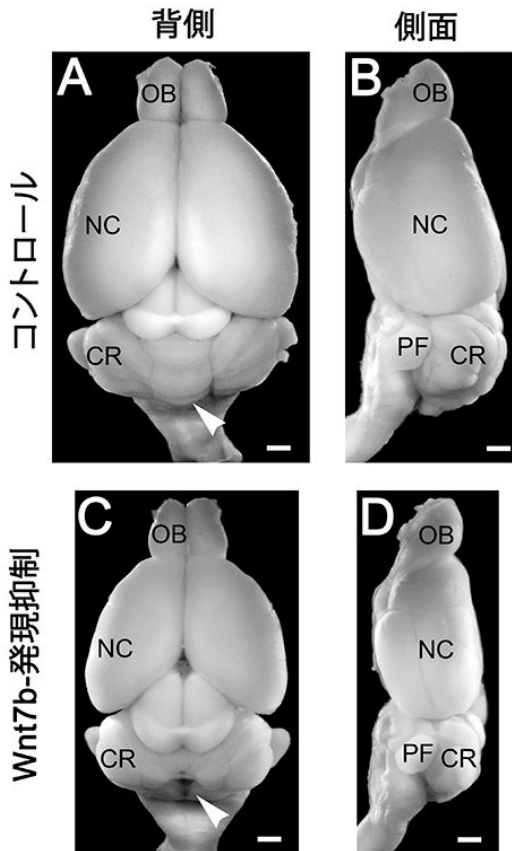
イで解析したところ、約1000種類の遺伝子が、各誕生日で異なって発現していることが判明した。同定された遺伝子群の中には、転写因子・細胞間情報伝達因子・グルタミン酸受容体などが含まれていた。同定したそれぞれの分子に対する特異抗体を用いて、小脳切片を免疫染色したところ、マウス胎生10.5日生まれのプルキンエ細胞に発現が多い遺伝子は、マウス胎生10.5日生まれのプルキンエ細胞を選択的に免疫染色した。この傾向は、胎生11.5日生まれのプルキンエ細胞、胎生12.5日生まれのプルキンエ細胞においても同様であった。この結果から、マウス胎生10.5日生まれのプルキンエ細胞とマウス胎生11.5日生まれのプルキンエ細胞を、特異抗体を用いて選択的に染め分けることが可能となった。この結果は、「小脳プルキンエ細胞は分子生物学的に不均一な細胞集団であり、その不均一性はプルキンエ細胞の誕生日が規定している」ことを示唆しており、「小脳プルキンエ細胞は均一である」という今までの概念を覆すものであった。遺伝子発現パターンを解析している過程で、胎生11.5日生まれの小脳プルキンエ細胞ならびに、胎生11.5日生まれの大脳皮質の神経細胞において、Wnt7bが特異的に発現していることが判明した。この結果は、Wnt7bが、胎生11.5日生まれの神経細胞における重要遺伝子であることを示唆している。そこで、Wnt7bの発現を抑制するアデノウイルスベクターを新規に作成し、胎生11.5日生まれの神経細胞に発現しているWnt7bの発現を抑制することによって、Wnt7bの機能を解析した。アデノウイルスベクターによって、胎生11.5日生まれの神経細胞におけるWnt7bの発現を抑制したところ、Wnt7bの発現を抑制されたマウスは、低発育・大脳皮質の低形成・小脳虫部の欠損(図. 1)を示し、自閉症様の行動異常・覚醒時脳波の異常を示した。人においてWnt7bは、クロモゾーム22q13.3にコードされており、22q13.3欠失症候群が報告されている。多くの22q13.3欠失症候群では、Wnt7bが欠損しており、その症状は、Wnt7bの発現を抑制したマウスの症状と同様であることが判明した。この結果は、胎生11.5日生まれの神経細胞に発現しているWnt7bが、脳の形態形成において重要な分子であること、ならびに、Wnt7bが22q13.3欠失症候群の責任分子の一つであることを示唆している。赤外線通信を用いた初期型の無線光刺激装置(Iwai, 2011)では、赤外線のパルスパターンを光刺激のパルスパターンに変換しているため、遮蔽物によって赤外線通信が遮断されてしまうと、光刺激が途絶えてしまうという欠点があった。これは、自由行動下のマウスを長期間光刺激し、マウスの行動を解析する上で大きな支障となる。そこで、マウスの頭部に留置する小型光刺

激装置に、光刺激のパルスパターンをプログラムし、光刺激開始の合図信号のみを12ミリ秒の赤外線パルス送信で行うようにした、新規小型光刺激装置を開発した(図. 2 ; Hashimoto, 2014)。マウス頭部に留置した光刺激装置が、12ミリ秒の赤外線パルスによる合図信号さえ受信できれば、その後赤外線通信を行わなくとも、光刺激装置が自立的に光刺激を行う。よって、光刺激中の赤外線通信が必要なくなり、遮蔽物への耐性が格段に向上した。Bluetooth通信は、遮蔽物の裏側にも電波が回り込むため、赤外線通信よりも遮蔽物に対する耐性が高い。例えば、マウスの迷路学習など、遮蔽物が多い行動解析においては、赤外線よりもBluetooth通信の方が、適していると考えられる。そこで、Bluetooth通信を用いた新規無線小型光刺激装置も開発した。光刺激装置の発光パターンは、iPhoneやiPadのアプリで自由に変更できる(図. 3)。

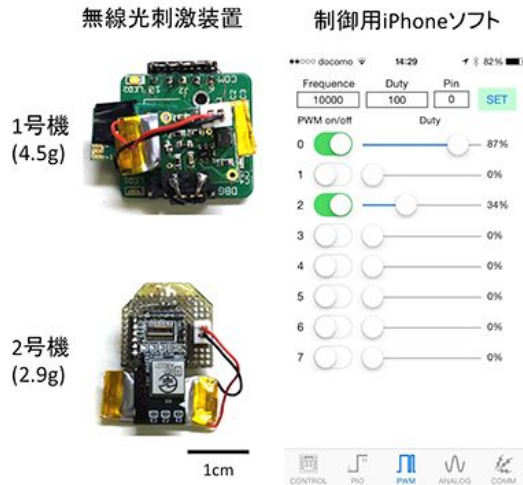


(図. 2) 新規無線光刺激装置(赤外線通信を使用)

チャンネルロドプシン2を脳内に発現しているトランスジェニックマウスの頭部に光刺激装置を留置してある。覚醒下マウスの行動を光刺激装置で制御できる。



(図. 1) 胎生11.5日生まれの神経細胞に発現しているWnt7bを抑制することによっておこる脳の形態形成異常 (A,B) コントロールマウス(出産後38日目)の背側と側面を示す。(C,D) アデノウイルスベクターを用い、胎生11.5日生まれの神経細胞においてWnt7bの発現を抑制した脳(出産後38日目)の背側と側面を示す。大脳皮質の低形成ならびに小脳虫部の欠損(Cの矢頭)が観察される。OB, 嗅球; NC, 大脳皮質; CR, 小脳; スケールバー, 1 mm



(図. 3) 新規無線光刺激装置 (Bluetooth通信を使用)

Bluetooth を用いた無線光刺激装置 (1号機、2号機) とそれを制御する iPhone ソフトを示す。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

Hashimoto, M., Hata, A., Miyata, T., Hirase, H. (2014) "Programmable wireless light-emitting diode stimulator for chronic stimulation of optogenetic molecules in freely moving mice." *Neurophotonics*, 1, 011002.

橋本光広 (2016) オプトジェネティクスを用いた覚醒マウス用無線小型光刺激装置の開発, *レーザー研究*, (査読有り) *in press* 査読あり

[http://www.lsj.or.jp/laser/l1\\_2.html](http://www.lsj.or.jp/laser/l1_2.html)

Mayumi Okamoto, M., Takaki Miyata, T., Daijiro Konno, D., Ueda, R. H., Kasukawa, T., Hashimoto, M., Matsuzaki, F., Kawaguchi, A. (2016)

"Cell-cycle-independent transitions in temporal identity of mammalian neural

progenitor cells.”, *Nature Communications*, 査読あり  
doi:10.1038/ncomms11349

〔学会発表〕(計 10 件)

橋本光広, 宮田卓樹・Formation process of individual compartments in the cerebellum of mouse embryo・第46回発  
生生物学会・松江・2013年6月 口頭発表  
橋本光広, 宮田卓樹・異なる誕生日を有する  
プルキンエ細胞群は、相互作用し、小脳  
内に個別の領域を形成する・第36回日本  
神経科学大会・京都・2013年6月 口頭  
発表

Hashimoto, M.・Cohorts of Purkinje cells  
that share the same birthdate  
communicate each other and form  
individual compartments in the  
cerebellum.・Gordon Research Conference  
cerebellum 2013・New Hampshire・2013  
年8月 口頭発表・ポスター発表

Hashimoto, M., Yamada, K., Miyata, T.・  
Formation process of the cerebellar  
compartments that are determined by  
birthdate of Purkinje cells・43<sup>rd</sup> Annual  
Meeting of the Society for  
Neuroscience・San Diego・2013年11月  
ポスター発表

橋本光広, 宮田卓樹, 平瀬肇・Programmable  
wireless LED stimulator for chronic  
stimulation of optogenetic molecules in  
freely moving mice・第37回日本神経科  
学大会・横浜・2014年9月 口頭発表

Hashimoto, M., Miyata, T., Hirase, H.・  
Programmable wireless LED stimulator  
for chronic stimulation of optogenetic  
molecules in freely moving mice・44<sup>th</sup>  
Annual Meeting of the Society for  
Neuroscience・Washington, D. C.・2014  
年11月 ポスター発表

橋本光広・Wnt7b expressed by neurons  
born on embryonic day 11.5 of mouse  
brain is necessary for the normal brain  
morphogenesis・第48回日本発生生物  
学会・つくば・2015年6月 口頭発表

橋本光広・Wnt7b expressed by neurons  
born on embryonic day 11.5 of mouse  
brain is necessary for the normal brain  
morphogenesis・第38回日本神経科学  
大会・神戸・2015年7月 口頭発表

橋本光広・マウス胎生11.5日生まれの神  
経細胞に発現しているWnt7bは、脳の形態  
形成に必須である・第61回解剖学会・東  
北・北海道連合支部学術集会・盛岡・2015  
年8月 口頭発表

橋本光広・小脳プルキンエ細胞の発生時期  
(誕生日)を指標とすることで明らかとな  
った、マウス小脳内領域の形成過程・第1  
21回日本解剖学会・郡山・2016年3月  
シンポジスト・座長・口頭発表

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

Researchmap

(<http://researchmap.jp/mhashimoto/>)

個人ホームページ

(<http://www004.upp.so-net.ne.jp/MAK-hashimoto/>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 光広 (HASHIMOTO, Mitsuhiro)

福島県立医科大学神経解剖・発生学講座

助教(学内講師)

研究者番号: 90311357