

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19431

研究課題名（和文）意識を支える脳幹網様体・巨大神経細胞群の分子生物学的基盤

研究課題名（英文）Molecular Biological Basis of the Brainstem Reticularis and Giant Neurons that Underlie Consciousness

研究代表者

八木 健（Yagi, Takeshi）

大阪大学・大学院生命機能研究科・教授

研究者番号：10241241

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、脳幹網様体に存在する巨大神経網様核（NRG）細胞を解析・操作する革新的技術の開発を行い、個体レベルでの意識や随意運動を制御するメカニズムについてアプローチした。その結果、脳幹網様体に存在する両グルタミン酸・GABA作動性NRG細胞の可視化に成功し、その分布を透明化した全脳において3D解析するとともに、シングルセルレベルでの遺伝子発現プロファイルと電気生理学的特徴の解析を行った。また、脳幹網様体NRG細胞の神経投射分布解析と光遺伝学を用いた個体レベルでの機能解析を行う実験的基盤を築くことに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、これまで覚醒・意識制御における重要性が報告されていながら、その詳細な分類や解析が行われていなかった脳幹網様体に存在する巨大神経網様核（NRG）細胞を解析・操作する技術の開発を行い、意識・覚醒経路の起点となる脳部位や神経細胞を明らかにする学術的意義をもつ。意識や覚醒など個体レベルで統合的に働く脳機能制御メカニズムへのアプローチとなるものであり、覚醒・意識・随意運動形成機序の解明につながるだけでなく、ヒトの植物状態患者の蘇生法開発や精神神経疾患・運動制御疾患に対するこれまでにない新しい基盤となり、生命科学・医学の分野のみならず社会的意義の高い研究分野に発展することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed an innovative technique to analyze and manipulate the giant reticular nucleus (NRG) cells in the brainstem reticular formation, and approached the mechanisms that control consciousness and voluntary movements at the individual level. As a result, we succeeded in visualizing both glutamatergic and GABAergic NRG cells in the brainstem reticular formation, analyzed their distribution in the transparent whole brain in 3D, and analyzed gene expression profiles and electrophysiological characteristics at the single cell level. We also succeeded in laying an experimental foundation for analyzing the distribution of neural projections of brainstem reticular NRG cells and analyzing their functions at the individual level using optogenetics.

研究分野：神経科学

キーワード：脳幹網様体 巨大神経網様核細胞 意識 覚醒 光遺伝学 シングルセル解析 神経回路

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

私たちは、脳において個々の神経細胞を多様化する DNA、分子群を基盤としたメカニズムがあるのではないかと考え、脳で発現している多様化細胞接着分子群、*cPcdh* 遺伝子群の発見に成功した (Kohmura et al. *Neuron* 1998)。興味深いことに、この遺伝子群は免疫グロブリンや T 細胞受容体と類似した遺伝子クラスターを構成し、個々の神経細胞ごとに異なるランダムな組み合わせ発現をしていることが明らかになった (Esumi et al. *Nature Genet* 2005)。また、この *cPcdh* 遺伝子群が神経ネットワーク形成 (Tarusawa et al. *BMC Biol* 2016) や神経細胞活動パターン制御 (Hasegawa et al. *Front Mol Neurosci* 2017) に関与していることが明らかとなっている。この *cPcdh* 遺伝子の根本的な役割を明らかにするために、*cPcdh* 遺伝子群を全て欠損させたマウス (*cPcdh*-KO マウス) を作製したところ、興味深いことに、中脳から延髄にある脳幹網様体において大規模な機能異常と神経細胞死が認められ、*cPcdh* 遺伝子の多様性が脳幹網様体の形成に関わることが明らかとなった。脳幹網様体は身体の内部環境のホメオスタシス調節、外部環境からのマルチモーダルな感覚入力と運動制御、覚醒状態や意識を支える領域として知られ、複雑な神経ネットワークとなっている (Ruder & Arber, *Annu Res Neurosci* 2019)。特に、脳幹網様体にある巨大神経網様核 (NRG: nucleus reticular gigantocellularis) 細胞は、1 神経細胞が上行性と下行性に投射し、マルチモーダルな感覚刺激 (匂い、視覚、聴覚、触覚、前庭、運動) に反応、運動パターンや意識・覚醒を制御していること、魚類の NRG 細胞であるマウスナー細胞は、1 神経細胞の活動により逃避行動制御していることから、NRG 細胞は 1 神経細胞で個体レベルの統合的機能を制御することができる細胞であることが示唆されている。しかし、これまでに哺乳類において個々の NRG 細胞の特徴を捉え、1 神経細胞ごとの生理学的機能、個体レベルでの機能制御機構を明らかにした研究はほとんどない。よって、本研究では、個体レベルでの脳の統合的機能を制御する脳幹網様体の NRG 細胞を分子生理学的に明らかにし、神経活動を操作する方法を開発することにより、意識研究の科学的基盤を確立する本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

脳幹網様体は身体の内部環境のホメオスタシス調節、外部環境からのマルチモーダルな感覚入力と運動制御、覚醒状態や意識を支える領域として知られ、複雑な神経ネットワークとなっている (Moruzzi & Magoun, 1949; Ruder & Arber, *Annu Res Neurosci* 2019)。特に、脳幹網様体の巨大神経網様核 (NRG: nucleus reticular gigantocellularis) 細胞は、1 神経細胞が上行性と下行性に投射し、マルチモーダルな感覚刺激 (匂い、視覚、聴覚、触覚、前庭、運動) に反応、運動パターンや意識・覚醒を制御していること、グルタミン酸作動性神経細胞や GABA 作動性神経細胞だけでなく両グルタミン酸・GABA 作動性神経細胞が存在すること、脳において最も早く分化する神経細胞であることも明らかとなっている (Pfaff et al. *Trends in Neurosci* 2012)。しかし、これまでに脳の統合的機能を支える脳幹網様体の NRG 細胞に関する神経生物学的アプローチはほとんど行われていない。そこで本研究では、脳の統合的機能を制御する脳幹網様体の NRG 細胞を分子生理学的に明らかにし、神経活動を光操作する革新的方法を開発することにより、マルチモーダルな感覚入力や内的環境、運動制御、覚醒・睡眠を統合し、意識を支える NRG 細胞の分子神経生物学的基盤を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、脳幹網様体の NRG 細胞を解析・操作する革新的技術の開発を行い、個体レベルでの意識や随意運動を制御するメカニズムについてアプローチする。

(1) 脳幹網様体 Glu/GABA NRG 細胞のシングルセルレベルでの遺伝子発現プロファイルと電気生理学的特徴の解析: NRG 細胞は脳幹領域網様体に散在する巨大な神経細胞 (マウスで 40 μm 以上) である。1 神経細胞が上行性・下行性両方の両方から情報を受け取ることのできる極めて長い樹状突起を持ちほぼすべての感覚刺激に反応することが知られている。個々の NRG 細胞には個性があり脳の統合機能に関わることも示唆されているが、シングルセルレベルでの分子生理学的な機能については研究がほとんど進められていない。現在までに、放出する神経伝達物質の違いによる GABA 発現 NRG 細胞、グルタミン酸発現 NRG 細胞、それらが共発現する Glu/GABA NRG 細胞の 3 種の NRG 細胞の存在が明らかになっている。しかし、それぞれの細胞の機能的違いについては不明である。そこで本研究では NRG 細胞をアデノ随伴ウイルス (AAV) 注入により 3 種の細胞をそれぞれ区別できるように標識する。AAV はそれぞれ Cre/FLP 依存的 (Con/Fon)、Cre 依存的 (Con/Foff)、Flp 依存的 (Coff/Fon) に蛍光タンパクを発現し、P0 マウスの側頭静脈に血液脳関門を透過する PHP. eB 血清型を注入することで脳全体に感染させる。アキュートスライスを作製し、ホールセルパッチクランプ法により生理学的特徴を解析し、細胞質を吸引して RamDa-seq 法を用いて RNA シーケンスを行う。RamDa-seq 法は mRNA だけでなく non-polyA-RNA を完全

長で解析する方法であり、NRG 細胞のシングルセルレベルでの遺伝子発現プロファイルを解析する。

(2) 脳幹網様体 NRG 細胞の神経回路網と光遺伝学を用いた活動操作技術の開発：NRG 細胞の上行性投射は視床などを介して大脳皮質活性化により、覚醒や意識を制御していること、下行性投射は脊髄を介して多様な運動パターン制御に関わることが報告されてきている。興味深いことに NRG 細胞には両グルタミン酸・GABA 作動性の神経細胞が存在し、上行性と下行性の両方の投射を持つマルチ機能を持った細胞の存在が示唆されている。しかし、このような NRG 細胞の特徴や神経回路網、生理的機能についてはほとんど研究が進められていない。そこで本研究では、グルタミン酸作動性神経細胞で FLP 発現する vGluT2-Flp、GABA 作動性神経細胞で CRE 発現する GAD67-Cre と *frt/flox* 組み換え依存的に TdTomato が発現する Ai65 マウスを交配することにより両グルタミン酸・GABA 作動性神経細胞(Glu/GABA 神経細胞)でのみ tdTomato が発現するマウスを作製し、Glu/GABA 神経細胞と神経投射領域の分布を透明化した全脳において 3D により詳細に解析する。また、*frt/flox* 組み換え依存的にチャンネルロドプシン 2(ChR2) が発現するアデノ随伴ウイルスを脳幹網様体 NRG 細胞に感染させ、Glu/GABA-NRG 細胞の神経細胞と神経投射領域の分布を解析するとともに、青色光照射により神経活動誘発を行い、マウス個体における覚醒レベル、意識・運動パターン制御への Glu/GABA-NRG 細胞の関与について解析を行う。これにより、Glu/GABA-NRG 細胞の神経回路網と生理学的意義を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 脳幹網様体 Glu/GABA NRG 細胞のシングルセルレベルでの遺伝子発現プロファイルと電気生理学的特徴の解析：グルタミン酸作動性神経細胞で FLP 発現する vGluT2-Flp、GABA 作動性神経細胞で CRE 発現する GAD67-Cre と *frt/flox* 組み換え依存的に TdTomato が発現する Ai65 マウスを交配することにより両グルタミン酸・GABA 作動性神経細胞(Glu/GABA 神経細胞)でのみ tdTomato が発現するマウスの作製に成功した(図 1 A)。このマウスを解析すると、約 50 個程度のグルタミン酸・GABA 共発現 NRG 細胞(Glu/GABA NRG 細胞)が存在していることが分かった(図 1 B)。また、アキュートスライスを作製し、ホールセルパッチクランプ法により Glu/GABA NRG 細胞から細胞質を吸引して RamDa-seq 法を用いて RNA シーケンスを行った(図 2)。現在、遺伝子プロファイルについて解析を進めている。

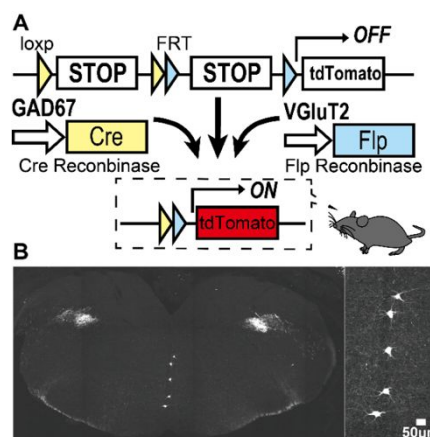


図 1. A. グルタミン酸・GABA 共発現細胞可視化マウスの概略図 B. Glu/GABA NRG 細胞

(2) 脳幹網様体 NRG 細胞の神経回路網と光遺伝学を用いた活動操作技術の開発：本研究では、グルタミン酸作動性神経細胞で FLP 発現する vGluT2-Flp、GABA 作動性神経細胞で CRE 発現する GAD67-Cre と *frt/flox* 組み換え依存的に TdTomato が発現する Ai65 マウスを交配することにより両グルタミン酸・GABA 作動性神経細胞(Glu/GABA 神経細胞)でのみ tdTomato が発現するマウスを作製し、Glu/GABA 神経細胞と神経投射領域の分布を透明化した全脳において 3D により詳細に解析した。その結果、GAD67-Cre/vGluT2-Flp マウスにおける Glu/GABA 神経細胞の分布には、マウス個体差が大きいことが明らかとなった。そこで、GAD67-Cre に代えて VGAT-Cre マウスを用いて VGAT-Cre/vGluT2-Flp マウスについても解析を行った(図 3)。また、*frt/flox* 組み換え依存的にチャンネルロドプシン 2(ChR2) が発現するアデノ随伴ウイルスを脳幹網様体 NRG 細胞に感染させ、Glu/GABA-NRG 細胞の神経投射領域分布を解析するとともに、青色光照射により神経活動誘発を行い、マウス個体における機能解析を行っている。

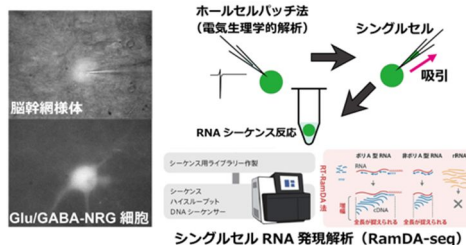


図 2 NRG 細胞のホールセルパッチクランプ法での電気生理学的解析とシングルセル RamDA-seq 解析

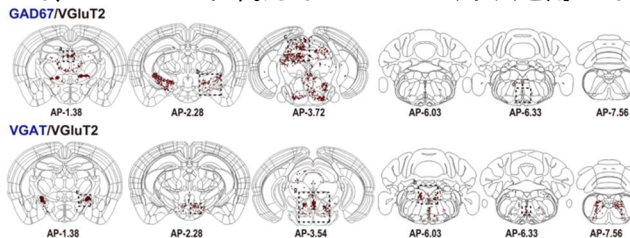


図 3 解析 GAD67-Cre/vGluT2-Flp マウス VGAT-Cre/vGluT2-Flp マウスを用いた Glu/GABA 神経細胞分布の 3D 解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Kobayashi Hiroaki, Takemoto Kenji, Sanbo Makoto, Hirabayashi Masumi, Hirabayashi Takahiro, Hirayama Teruyoshi, Kiyonari Hiroshi, Abe Takaya, Yagi Takeshi	4. 巻 26
2. 論文標題 Isoform requirement of clustered protocadherin for preventing neuronal apoptosis and neonatal lethality	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 105766 ~ 105766
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.105766	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 Kanadome T*, Hoshino N*, Nagai T, Matsuda T, Yagi T. *:Co-first authors	4. 巻 11
2. 論文標題 Development of FRET-based indicators for visualizing homophilic trans interaction of a clustered protocadherin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 22237
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-01481-2	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 Kawamura Nanami, Osuka Tomoki, Kaneko Ryosuke, Kishi Eri, Higuchi Ryuon, Yoshimura Yumiko, Hirabayashi Takahiro, Yagi Takeshi, Tarusawa Etsuko	4. 巻 10
2. 論文標題 Reciprocal Connections between Parvalbumin-Expressing Cells and Adjacent Pyramidal Cells Are Regulated by Clustered Protocadherin	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 eneuro	6. 最初と最後の頁 ENEURO.0250-23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/ENEURO.0250-23.2023	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 Hoshino Natsumi, Kanadome Takashi, Takasugi Tomomi, Itoh Mizuho, Kaneko Ryosuke, Inoue Yukiko U., Inoue Takayoshi, Hirabayashi Takahiro, Watanabe Masahiko, Matsuda Tomoki, Nagai Takeharu, Tarusawa Etsuko, Yagi Takeshi	4. 巻 120
2. 論文標題 Visualization of trans-homophilic interaction of clustered protocadherin in neurons	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2301003120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2301003120	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11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大須賀 智輝、和氣 弘明、洲崎 悦生、松本 桂彦、八木 健
2. 発表標題 脳幹網様体巨大神経細胞におけるグルタミン酸、GABA性神経伝達物質ダブルポジティブ細胞の特性解析
3. 学会等名 NEURO2022/ 第45回日本神経科学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本 裕希、大須賀智輝、八木 健
2. 発表標題 クラスター型プロトカドヘリン の発現多様性の欠如がワーキングメモリーに障害をもたらす
3. 学会等名 NEURO2022/ 第45回日本神経科学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横田哲也、八木健、金子涼輔
2. 発表標題 視覚野における特異的な神経回路形成とクラスター型プロトカドヘリンとの関係
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 島村 朋弥、八木 健、金子 涼輔
2. 発表標題 プルキンエ細胞と登上線維の結合におけるクラスター型プロトカドヘリンの役割
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 樋口 流音、星野 七海、渡辺 雅彦、三宝 誠、萩 瞭、大須賀 智輝、平林 真澄、八木 健
2. 発表標題 Pcdh C4はマウスの生存に不可欠であり、50種以上のクラスター型プロトカドヘリン (cPcdh) に多様性を与える唯一のアイソフォームである。
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 星野 七海、京 卓志、足澤 悦子、松田 知己、永井 健治、八木 健
2. 発表標題 FRETを利用したクラスター型プロトカドヘリンのホモフィリック相互作用可視化
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 千葉 清歌、増田 光起、恒松 大翔、黒沢 綾、足立 典隆、山本 亘彦、八木 健、菅生 紀之
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来大脳オルガノイドにおいてDNAポリメラーゼ 欠損は神経前駆細胞にDNA 2本鎖切断を引き起こす
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 広兼 浩二郎、中村 徹、寺下 拓真、久保田 康夫、Hu Dan、八木 健、Graybiel Ann、木津川 尚史
2. 発表標題 複雑な走行運動中のマウスにおけるリズム情報は、線条体のニューロンによってコードされている。
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金子 涼輔、阿部 学、井上 由紀子、高鶴 裕介、渡辺 雅彦、崎村 建司、柳川 右千夫、八木 健
2. 発表標題 神経細胞識別コードの可視化：クラスター型プロトカドヘリンの発現解析
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大須賀 智輝、古川 和磨、八木 健
2. 発表標題 脳幹網様体巨大神経網様核領域における GABA-glutamate 共発現細胞の特性解析
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 古川 和磨、大須賀 智輝、八木 健
2. 発表標題 SuMにおけるVGluT2・GAD67共発現細胞の 新奇環境認識への重要性
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪大学 大学院生命機能研究科 時空生物学講座 心生物学研究室
<https://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/yagi/index.htm>

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	大須賀 智輝 (Osuka Tomoki)		
研究協力者	古川 和磨 (Furukawa Kazuma)		

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