

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：38005

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20701

研究課題名（和文）皮質脊髄路の神経回路機構解明のためのシングル核RNAシーケンシング

研究課題名（英文）snRNA sequencing to elucidate the neural circuit mechanism of corticospinal tract

研究代表者

高田 裕生（Takata, Yu）

沖縄科学技術大学院大学・神経回路ユニット・ポストドクトラルスカラー

研究者番号：90952747

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、逆行性のウイルスベクターをマウスやサル脊髄内に注入して、皮質脊髄路を形成し、指の運動を制御しているニューロンを同定して、そのニューロンで特異的に発現している遺伝子がないかをSnRNA-seqを実施して調べた。まず、前段階としてSnRNA-seqで用いることができる逆行性ウイルスベクターの調査や、サルのサンプルに適した核の分離方法を確立した。その後、実際にウイルスベクターを注入したマウスやサルを使用してSnRNA-seqを実施した。そして、マウスやサルの皮質脊髄路ニューロンの割合や発現している遺伝子、分布しているニューロンの種類などについての知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中枢神経損後の手指の運動機能障害は残存することが多く、多くの患者の自立した生活を制限する。そのような患者を減らすことができる治療法の立案のために、手指の巧緻運動に関与する神経回路機構を解明するために本研究は実施された。これまでに一次運動野に分布するニューロンの遺伝子情報は調べられていたが、手指の運動を制御するニューロンに絞った研究は行われていなかった。本研究の成果はヒトが手指の巧緻動作をどのように制御しているのかを明らかにする助けとなり、手指の機能回復の研究が大きく発展することが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, retrograde viral vectors were injected into mouse and monkey spinal cords to detect neurons that form corticospinal tracts and control finger movement. Single nucleus analysis was performed to determine whether there were specific genes expressed in those neurons. First, as a preliminary step, we investigated retrograde viral vectors that could be used for SnRNA-seq and established a nuclear isolation method suitable for monkey samples. Then, SnRNA-seq was performed using mice and monkeys injected with the viral vectors. We obtained knowledge on the proportion of corticospinal tract neurons, expressed genes, and neuron types distributed in mice and monkeys.

研究分野：神経科学

キーワード：SnRNAseq 皮質脊髄路ニューロン 手指巧緻性

### 1. 研究開始当初の背景

手指の巧緻運動は、ヒトや高次の非ヒト霊長類に特有の運動である。特にヒトにおいて手指の巧緻運動（箸を使う、ボタンをかける等）は、自立した日常生活を送る上で重要な運動である。手指の巧緻運動には、大脳皮質 5 層に分布している CST ニューロンの軸索と脊髄運動ニューロンが直接シナプスを形成する直接路が重要だと考えられている（Lemon, 2008）。CST の構造は動物種によって異なっている。手指の巧緻性が低いげっ歯類において、CST は脊髄の後索に位置しており、直接路を有していない。また、霊長類の一種で手指の巧緻性が低いマーモセットにおいて、CST は脊髄の側索に位置しているが、直接路は有していない。他方、手指の高い巧緻性を持つヒトやマカクザルなどの CST は、脊髄の側索に位置し、直接路を有している（図 1）。以上の理由から**手指の巧緻動作に与関する神経回路基盤を解明するためには、マカクザルなどの霊長類を用いた研究が必要不可欠である**。

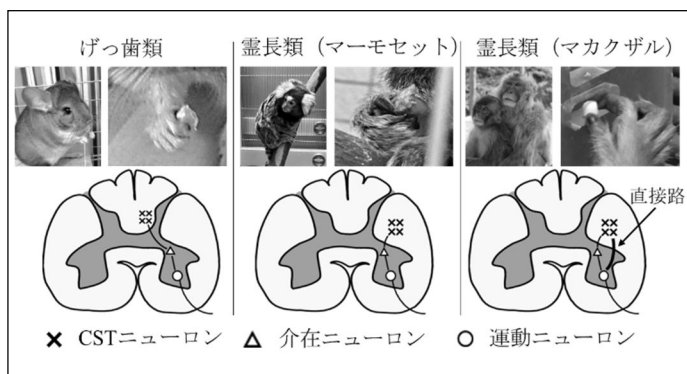


図 1

### 2. 研究の目的

先行研究によって手指の巧緻運動には、CST の直接路が重要な役割を担っていることは既に報告されている。しかし、この CST の直接路構造を霊長類が如何に獲得したかについては、未だ不明な点が多く残っている。そこで本研究は、**霊長類特異的な CST 形成に与関する機構を遺伝子レベルで明らかにすること**を目的として研究を行う。CST ニューロンが分布する一次運動野には、CST ニューロン以外のニューロンやグリア細胞も分布しているため従来の RNA 解析では、採取した組織の平均的な遺伝子発現しか知ることができない。そこで、本研究では逆行性トレーサーを用いた神経標識の技術とシングル核 RNA 解析を組み合わせることによって多彩なニューロンの中から CST ニューロンのみを選択して解析を行うことが可能となり、**CST ニューロン特異的な遺伝子発現の解明が期待できる**。

### 3. 研究の方法

本研究では、**マウス、マーモセット、マカクザルに逆行性神経トレーサーを注入し CST ニューロンの同定を行い、シングル核 RNA 解析を行う**(図 2)。



図 2

具体的には、成体のマウス、マーモセット、マカクザルの下位頸髄（C6-T1）に逆行性神経トレーサー（AAV retro-GFP）を注入し、手指の運動指令を伝達する CST ニューロンを標識する。注入の 2-3 週間後に深麻酔下にて DEPC 処理をした PBS を用いて灌流し、一次運動野を取り出し凍結させる。凍結した保存したサンプルは界面活性剤（nonidetP-40; NP-40）に入れて細胞膜を溶解し、FANS（Fluorescence Activated Nucleus Sorting）処理を行い、核を単離する。単離した核は Chromium Controller（Chromium Controller、10x Genomics）を使用して核の分画化とバーコードの付与を行う。次に PCR を行い、cDNA を増幅する。最後に次世代シーケンサーによるシングル核 RNA 解析を実施する。得られたデータから GFP の塩基配列をマーカーとして CST ニューロンを識別する。そして、CST ニューロンのクラスタリング、ヒートマップなどを作製して、種間比較を行い共通点や差異を明らかにする。

#### 4 . 研究成果

本研究では、逆行性ウイルスベクターをマウスやサルの脊髄内に注入し、皮質脊髄路を形成して指の運動を制御するニューロンを同定し、これらのニューロンで特異的に発現している遺伝子を SnRNA-seq を用いて調査した（図 3）。まず、SnRNA-seq に適用可能な逆行性ウイルスベクターの調査や、サルのサンプルに適した核の分離方法を確立した。その後、実際にウイルスベクターを注入したマウスやサルを用いて SnRNA-seq を実施した。これにより、マウスやサルの皮質脊髄路ニューロンの割合、発現している遺伝子、およびニューロンの種類などに関する知見を得た。今後、これらのデータを統合して解析することで、サルの皮質脊髄路ニューロンで特異的に発現している遺伝子を明らかにすることが期待される。

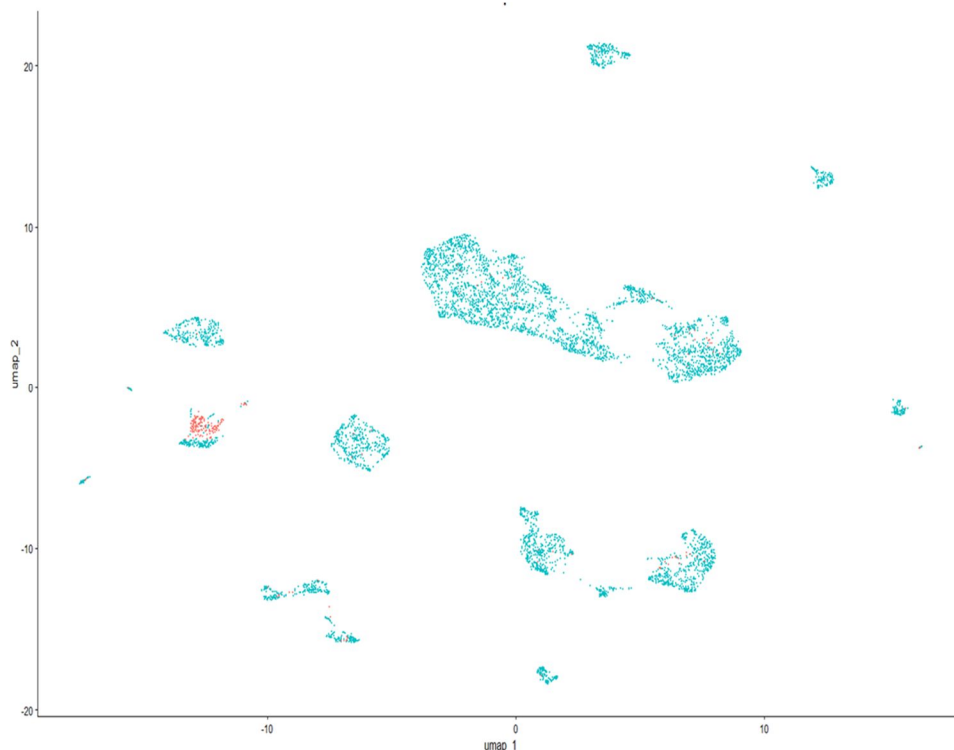


図 3

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------