

令和元年6月23日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2015～2018

課題番号：15K06696

研究課題名（和文）精緻な神経回路を作る、個々のニューロン識別機構

研究課題名（英文）Single-neuron discrimination to construct fine neural circuit

研究代表者

金子 涼輔（Kaneko, Ryosuke）

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40390695

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではマウス小脳をモデル実験系として用いて、仮説「同じクラスター型プロトカドヘリン（Pcdh）を発現するニューロン同士で神経回路を作る」の検証を行った。その結果、小脳構築および運動学習機能の発達に関わる分子メカニズムの一端を明らかにした。特に、運動学習に必須となる小脳の構築において、ニューロンの数、密度、配置へのPcdhの重要性が判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、精神疾患などの脳機能異常状態の多くでPcdhの発現量やエピゲノム状態の異常が観察されている。しかしながら、これら異常が精神疾患などの原因なのか結果なのかは不明であった。本研究により、Pcdhは少なくとも小脳の構築異常や機能異常の原因となりうるということが判明した。これまで小脳は運動の制御に関わると言われてきたが、最近では社会性や動機付けなどの高次精神機能への関与が明らかとなってきた。したがって、Pcdhがこれら高次精神機能の制御に関わる可能性も示唆される。

研究成果の概要（英文）：This study used mouse cerebellum as a model system, and examined the hypothesis that clustered protocadherin (Pcdh) specifies fine neural circuit. This study revealed novel molecular mechanism contributing cerebellum formation and motor learning. It is discovered that Pcdh is crucial for regulation of neuron number, neuron density, and neuronal spatial distribution in cerebellum formation.

研究分野：神経生物学

キーワード：神経回路 小脳 遺伝子改変マウス

1. 研究開始当初の背景

国内・国外の研究動向及び位置づけ：個々のニューロンは識別されている

ニューロンは適切なパートナーを識別して結合する。例えば、小脳皮質にある抑制性ニューロン的一种、バスケット細胞は周囲に存在する多様な細胞群(ステレイト細胞、顆粒細胞、バークマンングリア、プルキンエ細胞)の中からプルキンエ細胞のみと結合する。さらに、1つのバスケット細胞は平均8個のプルキンエ細胞と結合する(注:ヒト小脳には、プルキンエ細胞は約1400万個存在する)。“細胞種”の識別においては、接着分子L1CAMが関わる。一方、“個々のプルキンエ細胞”を識別する機構はほとんど解明されていない。

大脳皮質や海馬においても、個々のニューロンを識別した神経回路が報告されている。したがって、個々のニューロン識別機構の解明は、神経回路の構築原理を理解する上で重要である。

これまでの成果：ニューロンごとに異なるPcdh発現パターン

個々のニューロンはどのように識別されるのだろうか?。申請者らは、この過程にも接着分子が関わると考えた。特に、個々のニューロンごとで発現が異なる接着分子の関与を想定した。そこで、クラスター型プロトカドヘリン(Pcdh)に着目した。Pcdhは脳神経系で発現する接着分子群である。哺乳類では約50種類の互いに異なったPcdh遺伝子(α 、 β 、 γ)が同一染色体上にクラスターを作っている(図1a)。

申請者らは、マウス小脳の単一プルキンエ細胞を用いたsingle-cell RT-PCR法を開発した(Esumi, Kaneko et al, Nature

Protocols, 2006)。これを用いて、Pcdh- α 、- β 、- γ の発現を調べた結果、個々の

プルキンエ細胞においてPcdh- α 、- β 、- γ それぞれが細胞ごとに異なった組み合わせでランダムに発現していた(図1b) (Esumi et al, Nat Genet, 2005; Kaneko et al, JBC, 2006; Hirano, Kaneko et al, Front Mol Neurosci, 2012、これら論文は近年のPcdh関連論文でも頻りに引用)。本Pcdh発現パターンは、理論上2500万以上の多様性をもたらす。さらに、大脳皮質や海馬の興奮性ニューロンや抑制性ニューロン、また小脳抑制性ニューロン(含、バスケット細胞)でも、個々のニューロンごとに異なるPcdhが発現していた。

以上の結果は、Pcdhが個々のニューロンを識別する分子基盤となる可能性を示唆する。

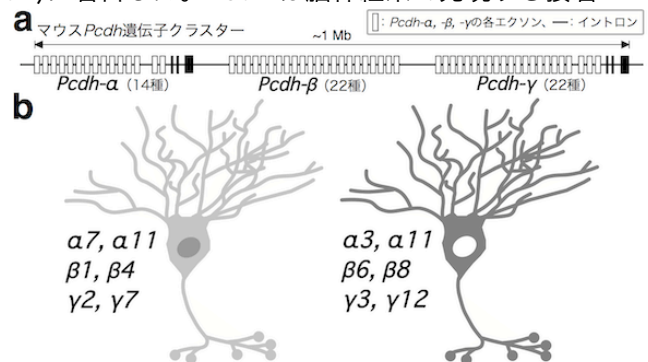


図1 プロトカドヘリン(Pcdh)は遺伝子クラスターにコードされ(a)、個々のニューロンで異なるアイソフォームを発現する(b)。

2. 研究の目的

着想に至った経緯：同じPcdhを発現するニューロン同士が結合するか?

最近、外国のグループが血球細胞の強制発現系を用いて、同一Pcdh間でのホモフィリック結合を報告した。これら結果より、「**同じPcdhを発現するニューロン同士で機能的ネットワークを作る**」との仮説を立てた。本仮説を検証するためには以下3点に答える必要がある。

- 同じPcdhを発現するニューロン同士が結合するか?
- Pcdh欠損によりネットワーク構造が乱れるか?
- Pcdh欠損により脳機能が異常になるか?

本研究ではマウス小脳のバスケット細胞—プルキンエ細胞間回路をモデル解析系とし、上記仮説の検証を目的とする。具体的には、問(a)(b)(c)に答える。

3. 研究の方法

仮説「同じ Pcdh を発現するニューロン同士で機能的ネットワークを作る」を検証する。そのためマウス小脳のバスケット細胞—プルキンエ細胞間の神経回路をモデル解析系とし、以下3課題を行なう。

- (i) Pcdh 発現を可視化する実験系の開発と解析 (蛍光タンパク質ノックインマウスの作製と解析)
- (ii) Pcdh 欠損マウスにおけるネットワーク配線の解析 (形態学的解析)
- (iii) Pcdh 欠損マウスの脳機能解析 (Pcdh 欠損マウスの小脳依存的学習課題の解析)

(i) Pcdh 発現を可視化する実験系の開発と解析 (蛍光タンパク質ノックインマウスの作製と解析)

最近、Pcdh- $\beta 3$ 遺伝子座に赤色蛍光タンパク質(tdTomato)をノックインしたマウス($\beta 3$ -tdTomato マウス)が完成した。本マウスでは赤色蛍光にて、**単一 Pcdh 分子種の発現を可視化できる**。本研究では、本マウスを用いて小脳のバスケット細胞—プルキンエ細胞における Pcdh 発現様式を解析し、問 a) 同じ Pcdh を発現するニューロン同士が結合するか?、に関する知見を得る。本課題は、オランダ・ラドバウド大学・Nael Nadif Kasri 准教授の協力も得ながら進める。

(ii) Pcdh 欠損マウスにおけるネットワーク構造の解析 (形態学的解析)

問 b) Pcdh 欠損によりネットワーク構造が乱れるか? に答えるため、Pcdh 欠損マウス(作製済。小脳特異的 Pcdh- γ 欠損マウス)における個々の神経回路の形態学的解析を行う。

(iii) Pcdh 欠損マウスの脳機能解析 (Pcdh 欠損マウスの小脳依存的学習課題の解析)

問 c) Pcdh 欠損により脳機能が異常になるか? に答えるため、オランダ・エラスムス医療センター・Chris De Zeeuw 教授との共同研究を行なう。具体的には、小脳特異的 Pcdh- γ 欠損マウスに小脳依存的学習課題(①眼球運動テスト、②瞬目反射条件付けテスト、③歩行運動テスト)を課し、脳機能を測定する。

4. 研究成果

本研究では仮説「同じ Pcdh を発現するニューロン同士で神経回路を作る」の検証を行い、本仮説を支持する結果を得た。具体的な結果を以下に記す。

課題(i): $\beta 3$ -tdTomato マウスを用いて、小脳における Pcdh 発現を解析した。その結果、バスケット細胞とプルキンエ細胞共に Pcdh を発現しており、その発現時期はこれら細胞間の神経回路が形成される時期(生後1週頃)に高いことが判明した。本結果は、Pcdh がバスケット細胞-プルキンエ細胞間の神経回路形成に関わることを示唆する。

課題(ii): 問 b) Pcdh 欠損によりネットワーク構造が乱れるか? に答えるため、小脳のほぼ全てのニューロンタイプにおいて Pcdhg を欠損させたマウス(小脳 Pcdh 欠損マウス)を作製・解析した。その結果、以下の知見を得た。本マウスでは、小脳サイズの減少、小脳バスケット細胞数の減少、プルキンエ細胞の層構造の乱れ、が観察された。これらの結果は、小脳における Pcdh 欠損は神経ネットワーク構造が乱れることを示している。さらにバスケット細胞数の減少に関わる分子メカニズムとして、アポトーシスの亢進が示唆された。また、この過程で抑制性ニューロン数を簡便に定量する方法(VGAT-tdTomato マウス)を開発し、これを論文発表した(右図)。



課題(iii): 問 c) Pcdh 欠損により脳機能が異常になるか? に答えるため、小脳 Pcdh 欠損マウスの小脳依存的学習能を調べた。その結果、本マウスは、運動機能ならびに運動学習能が低下し

ていた。すなわち、Pcdh 欠損により脳機能が異常になることが判明した。

次いで、Pcdhg 欠損によるネットワーク構造の異常化メカニズムを調べた。まず、Pcdh によるアポトーシス制御の関与を直接的に調べるため、小脳 Pcdh 欠損マウスにおいてアポトーシス制御因子 Bax を欠損させる（小脳 Pcdhg&Bax 二重欠損マウス）ことでアポトーシスを阻害した。その結果、本マウスの小脳は野生型マウスと同様のサイズであり、運動学習能も大幅に改善していた。本結果は Pcdhg はアポトーシス抑制を通じて小脳抑制性ニューロンの数を調節していることを示している。興味深いことに、小脳 Pcdhg&Bax 二重欠損マウスは、運動学習の固定化が阻害されていた。本結果は、Pcdhg が学習の固定化に関わることを示す初めての結果である。

以上のように、本研究では仮説「同じ Pcdh を発現するニューロン同士で神経回路を作る」の検証を行い、本仮説の妥当性を支持する結果を得た。さらに、Pcdhg が学習の固定化に関わることが示された。したがって、学習が固定化される際には個々のニューロンを識別した精緻な神経回路が作られることが示唆される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 14 件）

Kaneko R (corresponding author), Kakinuma T, Sato S, Jinno-Oue A.

Freezing sperm in short straws reduces storage space and allows transport in dry ice. J Reprod Dev. 2018 Dec 14;64(6):541-545. doi: 10.1262/jrd.2018-100. Epub 2018 Sep 28.

Ryosuke Kaneko (corresponding author), Yusuke Takatsuru, Ayako Morita, Izuki Amano, Asahi Hajjima, Itaru Imayoshi, Nobuaki Tamamaki, Noriyuki Koibuchi, Masahiko Watanabe, Yuchio Yanagawa

Inhibitory neuron-specific Cre-dependent red fluorescent labeling using VGAT BAC-based transgenic mouse lines with identified transgene integration site Journal of Comparative Neurology, 2018, 526(3): 373-396

Ryosuke Kaneko, Atsuko Sato, Shun Hamada, Takeshi Yagi, Ichiro Ohsawa, Mamitaro Ohtsuki, Eiji Kobayashi, Masumi Hirabayashi, and Takashi Murakami

Transgenic rat model of childhood-onset dermatitis by overexpressing telomerase reverse transcriptase (TERT) Transgenic Research, 2016, 25: 413-424

他 11 件

〔学会発表〕（計 6 件）

Ryosuke Kaneko, Manabu Abe, Yusuke Takatsuru, Yukiko U. Inoue, Masahiko Watanabe, Kenji Sakimura, Yuchio Yanagawa, Takeshi Yagi

ニューロン ID の可視化:クラスター型プロトカトヘリンの発現解析
第 41 回日本神経学会大会、2018 年、神戸、日本

Ryosuke Kaneko

How to modulate individuality: Involvement of expressional dynamism of Pcdh

「個性」創発脳 第1回国際シンポジウム(国際学会)、2018年、京都、日本

他4件

〔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:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等: <http://doujitsu.dept.med.gunma-u.ac.jp/cms/>

6. 研究組織

(1)研究分担者 該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: Chris De Zeeuw 教授 (オランダ・エラスムス医療センター)

ローマ字氏名: Professor Chris De Zeeuw (Erasmus Medical Center, Netherlands)

研究協力者氏名: Nael Nadif Kasri 准教授 (オランダ・ラドバウド大学)

ローマ字氏名: Associate Professor Nael Nadif Kasri (Radboud University, Netherlands)

※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、研究者個人に帰属されます。