

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 24 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K18394

研究課題名(和文) 下オリーブ核における小脳学習信号の生成メカニズムの研究

研究課題名(英文) Neural mechanisms generating cerebellar learning signal in the inferior olivary nucleus

研究代表者

石川 享宏 (ISHIKAWA, Takahiro)

公益財団法人東京都医学総合研究所・運動・感覚システム研究分野・主席研究員

研究者番号：90595589

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：小脳の学習信号の生成メカニズムを明らかにするため、プルキンエ細胞の複雑スパイクを電気生理実験およびカルシウムイメージングによって観察するとともに、下オリーブ核の入出力回路を神経トレーサー注入実験によって調べた。小脳皮質のCrus IおよびVermis VIにおいて、体性感覚刺激と大脳皮質運動野の電気刺激の両方に対して複雑スパイクが生じるプルキンエ細胞が多数確認された。一方、脊髄や小細胞赤核から下オリーブ核への神経投射に空間的な重複はほとんど見られなかった。下オリーブ核内部の細胞間のネットワークを介して情報が広域に伝播し、小脳皮質上の領域を問わず様々な刺激により学習信号が生成されると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

登上線維を介した下オリーブ核から小脳への出力は学習信号として働き、小脳の出力を柔軟に変化させることができる。したがって、下オリーブ核における学習信号生成メカニズムを明らかにできれば、その神経情報処理のルールを利用し、外部から人為的に刺激を与えたり、一定の手順を踏むことによって、適切な学習信号の生成を促すことも可能であると考えられる。小脳における学習の効率化や合理化によって、効果的なりハビリ法やトレーニング法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：To investigate how climbing fiber inputs to Purkinje cells (PCs), that is instructive signal in the cerebellum, is generated in the inferior olive, two experiments were performed. First, complex spikes in PCs evoked by sensory stimuli and electrical stimuli to the cerebral motor cortex were recorded in Crus I and Vermis VI. Recordings were performed by electrophysiological technique and calcium imaging. We found that many PCs generate complex spike in response to both stimuli. Second, we performed neuroanatomical experiments to understand why PCs receive climbing fiber input in response to multiple stimuli. As a result, it is confirmed that only a part of the principal olive sends climbing fiber input to PCs in Crus I, and that part of the principal olive receives input from only the parvocellular red nucleus. Therefore, it is assumed that there is a large network in the inferior olive and multiple sensory and motor information is communicated from one neuron to another.

研究分野：神経生理学

キーワード：小脳 プルキンエ細胞 下オリーブ核 登上線維

## 1. 研究開始当初の背景

小脳は眼球運動、姿勢制御、歩行から手指の精緻な動きまでさまざまな運動制御に関与しており、新しい運動を適応的に獲得(学習)するという機能を持つ。小脳における運動学習の基本的な神経基盤は、ヒトを含む脊椎動物全般に共通である。延髄の下オリーブ核から小脳に投射する登上線維入力、プルキンエ細胞など小脳皮質の神経細胞間のシナプスにおいて長期増強や長期抑圧などの可塑性を引き起こし、結果として小脳の入出力関係を変化させると考えられている。すなわち、登上線維入力は「いつ、どの出力を変えるか」を小脳に伝達する学習信号の役割を果たしている。登上線維入力が投射先の小脳神経細胞に及ぼす分子レベルの作用や、運動学習における機能的役割は多くの先行研究によって明らかにされつつある一方、登上線維入力が作り出される生理学的メカニズムの研究はほとんど行われていない。我々ヒトの神経系がどのような状況や情報に対して行動を修正する性質を持っているのかを理解するために、小脳を介した学習を制御する登上線維入力が下オリーブ核においてどのように生成されるのかを解明する必要がある。

## 2. 研究の目的

小脳の出力は下オリーブ核からプルキンエ細胞に投射する登上線維入力によって調節されるが、この登上線維入力が下オリーブ核内でどのように生成されるのかを解明することが本研究の最終目標である。そこで、大脳皮質や末梢神経からどのような刺激(情報)が下オリーブ核に入力しているのかを調べた。また、異なる情報を持つ複数の入力が単一の登上線維を介した信号生成に関わるのか、その場合の入力の組み合わせはどのようなものか、小脳皮質の部位ごとに異なるのかどうかを調べた。

## 3. 研究の方法

(1) 下オリーブ核には中枢神経・末梢神経、運動性・感覚性を問わず由来や属性が異なる多様な入力があり、それらの入力に応じて小脳の学習信号が生成されると考えられる。そこで、具体的にどこから来るどのような入力が学習信号の生成に有効であるかを明らかにするため、マウスを用いて大脳皮質や末梢神経の電気刺激、光刺激、音刺激に伴う反応を電気生理学的計測法によりプルキンエ細胞単位で計測した。また、マイクロゾーン(機能単位としてのプルキンエ細胞群)単位で同様の刺激に対する反応を調べるため、アデノ随伴ウイルスベクターを利用してプルキンエ細胞特異的に蛍光カルシウムプローブ(GCaMP6f)を発現させたマウスを用い、カルシウムイメージングによって登上線維入力に伴うカルシウムスパイクを計測し、その空間パターンを分析した。

(2) 下オリーブ核の各部位がどこから入力を受けるのか、また小脳皮質のどの部位へ出力するのかを調べるため、神経回路トレーサーの微量注入実験を行った。更に、下オリーブ核内部でギャップ結合を介して電氣的に結合した細胞群がどの程度の広がりを持つのかを調べるためのトレーサー注入実験を行った。

## 4. 研究成果

(1) 小脳の中でも特に大脳皮質との間にループ状の神経回路を形成する大脳小脳に注目し、大脳運動野と末梢神経の電気刺激に対する応答を調べた。大脳小脳の一部である Crus I のプルキンエ細胞において、大脳および末梢の両方の刺激に対して登上線維入力に伴う複雑スパイクが計測された(図1)。どちらの刺激に対しても応答までの潜時がほぼ同じ(約12ミリ秒)であったことから、Crus I に登上線維を送る下オリーブ核の一部(主オリーブ核)において中枢および末梢からの入力が同一の細胞に収束していると考えられる。

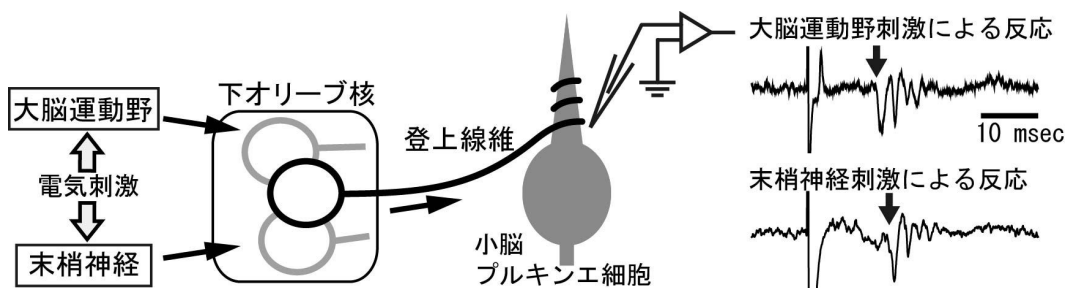


図1 中枢および末梢刺激に対するプルキンエ細胞の応答

(2) 上記(1)の結果に加え、単一のプルキンエ細胞が光刺激や音刺激に対しても複雑スパイクを生じることから、多様な入力(情報)が個々の細胞に伝播するような仕組みが下オリーブ核内にあると推測された。そこで、下オリーブ核の各部位において多様な入力混在しているのか、従来考えられているように部位によって異なる入力を受けているのかを確認するため、神経トレーサー(デキストラン, 10000MW)を用いて下オリーブ核に注射する神経回路を調べた。その結果、例えばCrus Iに登上線維を送る領域は対側の主オリーブ核の一部のみであり、この部位に直接投射していることが確認できたのは小細胞赤核のみであった。したがって従来の理解の通り、下オリーブ核は部位ごとに異なる入力を受けているが、内部のネットワークを介して多様な入力が広範囲に伝播する仕組みがあると推測される。

(3) カルシウムイメージングによって登上線維入力に伴うプルキンエ細胞のカルシウムスパイクをセグメント単位で観察したところ、電気生理実験において確認されたように、個々のセグメントが複数の感覚刺激や大脳運動野刺激に反応する様子が確認された。また、隣接するセグメントへカルシウムスパイクが次々に伝播していくようなパターンが観察された。麻酔下において小脳皮質のVermis VIを中心にイメージングした時の取得画像を図2 A、各セグメントから計測された蛍光強度変化、および検出されたスパイクのタイミングを図2 Bに示す。イメージングのフレームレートは20Hzとした。図2 CはROIを基準としてROIおよびで検出されたスパイクの相対的タイミングを示す。隣接するセグメントでは前後2フレーム(100ミリ秒)以内に高確率で連続してスパイクが生じるが、距離が離れたセグメントではスパイクタイミングに有意な相関が認められなかった。したがって、下オリーブ核の隣接する細胞は小脳皮質の隣接するセグメントに投射しており、それらの細胞はギャップ結合を介して電氣的に結合していると推測される。

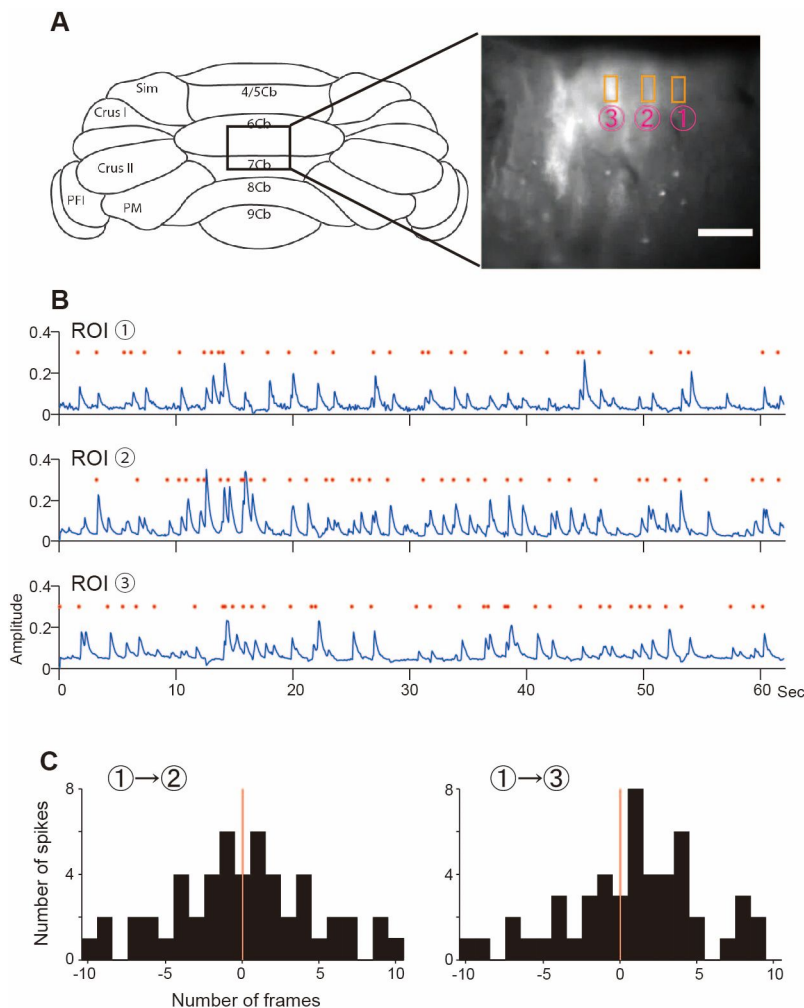


図2 カルシウムイメージングによる複雑スパイクの計測と分析

(4) 下オリーブ核の細胞はギャップ結合を介して隣接する細胞と電氣的に結合していることから、多数の細胞間でネットワークを構成し、このネットワークを介して体性感覚刺激や大脳皮質電気刺激に伴う入力が伝播している可能性が考えられる。この可能性を検証するために小脳皮質への Neurobiotin の微量注入実験をおこなった。Neurobiotin は分子量が非常に小さい

め、ギャップ結合を介して隣接する細胞に拡散することにより下オリブ核内のギャップ結合を介したネットワークの広がりを分析できると予想したが、結果として下オリブ核細胞は全くラベルされなかった。Neurobiotin は下オリブ核細胞の逆行性標識には適さない可能性が高いと考えられる。下オリブ核内のネットワークの有無やその構造の分析については、神経トレーサーの選定も含めて今後さらに検討を要する。

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