

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06531

研究課題名（和文）小脳が関与する脳高次機能のメカニズムの解明

研究課題名（英文）Analysis of the neuronal activity markers that work in the cerebellar neurons

研究代表者

幸田 和久（Kohda, Kazuhisa）

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：40334388

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）：小脳が運動のみならず認知や情動などにも関与することが明らかになってきた。より詳細な解析のため、小脳で機能する神経活動性マーカーを探索した。マウスのカイニン酸誘発痙攣モデルでは、c-fos、junB、Npas4などの発現上昇が見られたが、海馬よりもその変化率は小さかった。恐怖条件付けにおいては、小脳各領域でのそれらの発現に有意差はなかった。神経活動依存的にEGFPを発現するRAMシステムを用いると、小脳初代培養系で高濃度KCl処理によりEGFPが発現したが、個体小脳では基底状態でのEGFPの発現が無視できなかった。in vivoではTet-OFFなどの誘導系を用いる必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小脳は認知や情動などにも関与していることが分かってきたが、そのメカニズムは十分に明らかではない。その一因は、海馬や大脳皮質などで用いられている神経活動性マーカーが小脳では確立していないことにある。そこで、本研究では小脳で機能する神経活動性マーカーの探索を行った。最終的な結論には至っていないが、本研究の結果はSorensenらが報告したrobust activity marking (RAM)システムが有望であることを示している。今後より詳細な検討を経て、RAMシステムの小脳における有効性が確立すれば、小脳が関与する行動における小脳ニューロンの活動を詳細に解析することが可能となる。

研究成果の概要（英文）：The cerebellum is reported to be involved in higher brain function, such as cognition and emotion. To specify an ensemble of neurons contributing to a specific behavior, neuronal activity markers are utilized in the several brain regions. However, no activity marker has been established for the cerebellar neurons, so far. We first evaluated the promoter activity of several immediate early genes as potential activity markers in the cerebellum. Although kainate-induced seizures significantly increased the expression of c-fos, junB and Npas4 in the cerebellum, the magnitude of increase was much smaller compared to the hippocampus. We could not find significant changes in the expression of these immediate early genes in the cerebellum after fear conditioning. We next tested the RAM system in the cerebellum. While a high KCl concentration solution induced EGFP expression in the primary cultured cerebellar neurons, basal 'leak' EGFP expression was not negligible in the cerebellum in vivo.

研究分野：神経科学

キーワード：小脳 認知 情動 神経活動性マーカー

1. 研究開始当初の背景

近年のヒトやサルを用いた脳機能イメージング研究から小脳は認知や情動などにも関与していることが報告され、小脳の機能異常と精神疾患との関連も指摘されている。げっ歯類を用いた研究においても小脳が空間マップの形成、恐怖条件付け、社会性などに関与するとの報告があるものの、シナプス、神経回路レベルの研究は乏しく、特定の行動における小脳の責任領域やメカニズムについては十分に解明されていない。

2. 研究の目的

特定の行動に関与する神経細胞集団を特定するために、近年では神経活動性マーカーが海馬や大脳皮質などで用いられている。しかしながら小脳においては、確立した神経活動性マーカーが存在しない。そこで、小脳ニューロンで機能する神経活動性マーカー確立し、これを用いて小脳が関与する高次脳機能、特に恐怖条件付けのメカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

神経活動性マーカーとして利用できる遺伝子を探索するために、まず既知の最初期遺伝子 (IEG) を検討した。C57Bl6 マウスを用いてカイニン酸誘発痙攣モデルを作成し、小脳及び海馬において定量的 real time PCR、*in situ* hybridization により発現の変化を検討した。また、恐怖条件付けにおける IEG の発現変化を *in situ* hybridization により比較した。

Sorensen らが報告した robust activity marking (RAM) システムの有効性を小脳ニューロンにおいて検討した。RAM システムとは *Npas4* 結合配列に *c-fos* プロモーター配列を繋ぎ、神経活動依存的に EGFP などの蛍光タンパク質を発現させるようにしたシステムである。

4. 研究成果

カイニン酸誘発痙攣モデルマウスの海馬及び小脳において、IEG の発現の変化を検討した。定量的 real time PCR では海馬及び小脳で痙攣発作により *c-fos*、*junB*、*Npas4* などの発現が増加した。しかし、海馬や大脳皮質でマーカーとしてよく用いられる *Arc* は、小脳においては有意な変化を示さなかった。特に、*c-fos* は小脳では数十倍増えたが、海馬に比べるとオーダーが 1 桁下であった。これらの IEG の発現がどの領域のどのニューロンで変化するかを検討するために、*in situ* hybridization を行った。*c-fos* は lobule IX, X で優勢にプルキンエ細胞、顆粒細胞ともに発現が増加した。

海馬においてよりも発現増加は少ないものの、*c-fos* が小脳においても活動性マーカーとして有効である可能性を検討するため、小脳が関与することが知られている手掛かり恐怖条件付けを行い、*in situ* hybridization により *c-fos* の発現の変化を検討した。対照群には音と電気ショックを unpaired した刺激パラダイムを用いた。恐怖条件付けの獲得相と想起相の双方で検討したが、プルキンエ細胞及び顆粒細胞における *c-fos* の発現に有意な差は見られ

なかった。さらに獲得相で検討した群で、freezing 時間と *c-fos* 発現の間に相関は見られなかった。これらの結果から、カイニン酸誘発痙攣のような強い刺激に対して *c-fos* の発現が小脳においても大きく変化しうるが、生理的条件下の場合は *c-fos* プロモーター単独の作用によって活動性マーカーを構成することは困難と考えられた。

Npas4 結合配列を繋げることで *c-fos* プロモーターの作用を強めた RAM システムが小脳で機能するかを検討した。AAV-RAM-EGFP-mSyn-mCherry (mSyn: マウス synapsin プロモーター) を作成し、小脳初代培養系を用いて実験を行った。刺激前の基底状態においては EGFP の発現はほとんど見られなかったが、高濃度 KCl の刺激により、EGFP の明らかな発現がプルキンエ細胞及び顆粒細胞で観察された。そこで、このウイルスベクターを成体マウスの小脳に注入して、*in vivo* での有効性を検討したところ、*in vivo* では基底状態において無視できないレベルの EGFP の発現があり、RAM システムを活動性マーカーとして用いるには、これを抑えなければならない。このためには、Tet-OFF などにより遺伝子発現を時間的にコントロールするコンストラクトを用いる必要がある。

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
研究分担者	藤原 清悦 (Fujiwara Seietsu) (10440322)	聖マリアンナ医科大学・医学部・講師 (32713)	
研究分担者	井端 啓二 (Ibata Keiji) (30462659)	聖マリアンナ医科大学・医学部・講師 (32713)	

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