

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16295

研究課題名(和文)視線保持機構における神経積分器と前庭小脳との結合関係の解明

研究課題名(英文)Neural connections between the oculomotor neural integrators and the vestibulocerebellum

研究代表者

杉村 岳俊(Sugimura, Taketoshi)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：60812526

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：視線保持の制御に関与する脳幹の舌下神経前位核(PHN)は小脳へのコリン作動性入力的主要なソースの一つとして知られている。しかしながら、PHN-小脳投射におけるコリン作動性ニューロンの割合は定量的に調べられていない。本研究では、コリン作動性ニューロンが蛍光標識された遺伝子改変ラットを用いた逆行性トレーシングによって、4つの異なる小脳の領域に投射するPHNのニューロンを特定し、その投射におけるコリン作動性ニューロンの割合を調べた。その結果、PHN-小脳投射におけるコリン作動性ニューロンの割合は、小脳の投射エリアおよびPHNの吻側-尾側の領域に依存して異なることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

視覚を適切に働かせるには視線を保持することで視覚対象を網膜上で静止させる必要がある。視線の保持には神経積分器と呼ばれる脳幹の領域と前庭小脳との神経ネットワークが重要であることが示唆されているが、その神経回路についての実験的知見は乏しく詳細は明らかにされていない。本研究は、水平性視線保持に関与する神経積分器であるPHNと小脳との神経回路について、特にコリン作動性ニューロンに着目した新たな知見を提供した。

研究成果の概要(英文)：Cerebellar functions are modulated by cholinergic inputs, the density of which varies among cerebellar regions. Although the prepositus hypoglossi nucleus (PHN), a brainstem structure involved in controlling gaze holding, is known as one of the major sources of these cholinergic inputs, the proportions of cholinergic neurons in PHN projections to distinct cerebellar regions have not been quantitatively analyzed. In this study, we identified PHN neurons projecting to the cerebellum by applying retrograde labeling with dextran-conjugated Alexa 488 in choline acetyltransferase (ChAT)-tdTomato transgenic rats and compared the proportion of cholinergic neurons in the PHN projections to four different regions of the cerebellum. The results suggest that the proportion of cholinergic neurons among cerebellar projections from the PHN differs depending on cerebellar target areas and the rostro-caudal regions of the PHN.

研究分野：神経科学

キーワード：視線保持 舌下神経前位核 神経積分器 コリン作動性ニューロン 前庭小脳 小脳

1. 研究開始当初の背景

(1) 視覚を適切に働かせるには視線を保持することで視覚対象を網膜上で静止させる必要がある。脳幹の舌下神経前位核 (PHN) とカハール間質核 (INC) はそれぞれ水平性と垂直性の視線保持に関与する脳領域で神経積分器と呼ばれている。視線の保持には PHN や INC と前庭小脳との神経回路が重要であることが示唆されているが、その神経回路についての実験的知見は乏しく詳細は明らかにされていない。

(2) 小脳の機能は苔状線維を介したコリン作動性入力によって調節される。コリン作動性神経支配が高密度な領域は前庭小脳であり、低密度な領域は虫部第III-VII小葉や小脳半球部である。水平性視線保持の制御に関与する PHN は小脳へのコリン作動性入力の主要なソースの一つとして知られているが、PHN-小脳投射におけるコリン作動性ニューロンの割合は定量的に調べられていない。

2. 研究の目的

本研究では、PHN-小脳投射におけるコリン作動性ニューロンの割合を定量的に調べることで、視線保持に関与する神経回路の詳細を明らかにすることを目的とする。PHN から投射を受ける小脳の領域の中で、コリン作動性神経支配が高密度な前庭小脳 (flocculus (FL) または uvula and nodulus (UN)) と低密度な小脳領域 (lobules III-V in the vermis (VM) または hemispheric paramedian lobule and crus 2 (PC)) に投射する PHN のニューロンを解剖学的手法によって特定し、その投射におけるコリン作動性ニューロンの割合を定量的に解析した。

3. 研究の方法

コリン作動性ニューロンを識別するために、コリン作動性ニューロンが蛍光標識された ChAT-tdTomato ラット (生後 6-8 週齢) を用いた。Alexa488 標識デキストランを FL または UN、VM、PC に注入した。3-5 日の生存期間の後、PHN を含む脳組織標本を作製し蛍光観察して、逆行性標識された PHN のニューロンにおけるコリン作動性ニューロンの割合を調べた。本研究では、トレーサーを FL、UN、VM、PC に注入したとき、逆行性標識される PHN のニューロンをそれぞれ preposito-FL、preposito-UN、preposito-VM、preposito-PC ニューロンと表す。一部の実験において、抑制性ニューロンを識別するために VGAT-Venus ラット (生後 6-8 週齢) を用いて、Alexa594 標識デキストランを FL に注入した。

4. 研究成果

(1) ChAT-tdTomato ラットの 4 つの異なる小脳領域 (FL または UN、VM、PC) に Alexa488 標識デキストランを注入した (図 1 a-d)。PHN において逆行性標識されたニューロン (緑丸) の一部は、tdTomato と Alexa488 で二重標識されたコリン作動性ニューロン (黒丸) であった (図 1 a-d)。preposito-FL ニューロンにおけるコリン作動性ニューロンの割合 ($8.9 \pm 3.5\%$, $n = 6$) は、preposito-UN ($21.9 \pm 2.8\%$, $n = 6$, $p < .001$)、preposito-VM ($22.8 \pm 7.2\%$, $n = 6$, $p < .001$)、preposito-PC ニューロン ($19.1 \pm 4.2\%$, $n = 5$, $p < .05$) におけるそれらの割合よりも低かった (図 1 e)。解析した preposito-FL、preposito-UN、preposito-VM、preposito-PC ニューロンの数は、それぞれ 144 ± 40 個 ($n = 6$)、 186 ± 37 個 ($n = 6$)、 163 ± 32 個 ($n = 6$)、 161 ± 46 個 ($n = 5$) であった。これらの結果から、PHN-小脳投射におけるコリン作動性ニューロンの割合は、小脳の投射エリアに依存して異なることが示唆された。

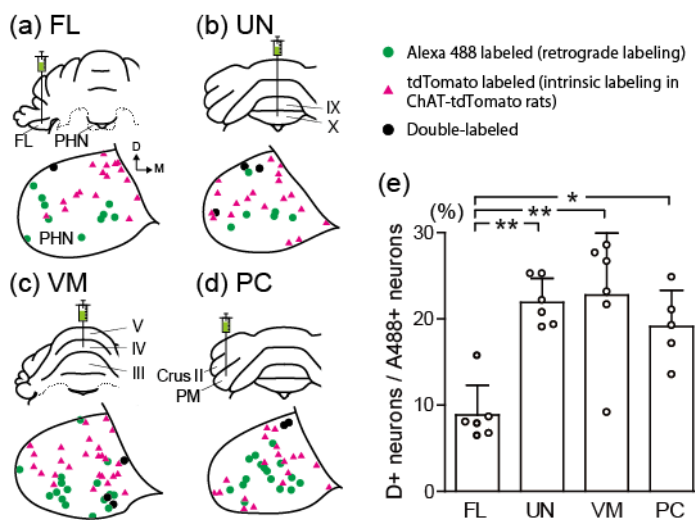


図 1. 異なる小脳領域に投射する PHN のニューロンにおけるコリン作動性ニューロンの割合

(2) VGAT-Venus ラットの FL に Alexa594 標識デキストランを注入して、逆行性標識された PHN のニューロン (73 ± 23 個, $n = 3$) を調べた。その結果、Venus と Alexa594 で二重標識された

ニューロンは PHN に存在しなかった。PHN における GABA およびグリシン作動性ニューロンが FL に直接投射しないことを確認した。

(3) PHN-小脳投射におけるコリン作動性ニューロンの割合は PHN の吻側-尾側の領域に沿って一定であるかどうかを調べるために、preposito-FL (1)、preposito-UN (2)、preposito-VM (3)、preposito-PC ニューロン (4) におけるコリン作動性ニューロンの割合を PHN の吻側 (R)、中間 (I)、尾側 (C) に分けて解析した (図 2)。その結果、preposito-FL ニューロンを除いた preposito-cerebellar ニューロンにおいて、コリン作動性ニューロンの割合は PHN の吻側-尾側の領域に依存して異なることが示唆された。

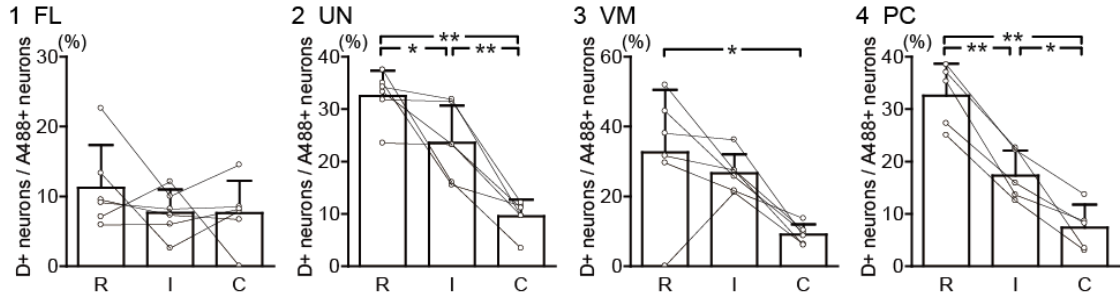


図 2. PHN-小脳投射における PHN の吻側 (R)、中間 (I)、尾側領域 (C) でのコリン作動性ニューロンの割合

(4) Preposito-FL、preposito-PC ニューロンにおけるコリン作動性ニューロンの割合に偏側性 (左右差) があるかを調べた。FL および PC へのトレーサーの注入は、右側のみに行った (図 1 a, d)。注入部位の同側と対側の PHN では、preposito-FL ($p = .89$, $n = 6$) および preposito-PC ニューロン ($p = .61$, $n = 5$) におけるコリン作動性ニューロンの割合に差はなかった (図 3)。また、両者において、逆行性標識された PHN のニューロンの数は、同側と対側の PHN で差がなかった。従って、コリン作動性 preposito-FL および preposito-PC ニューロンの分布は、PHN において偏側性がないことが示唆された。

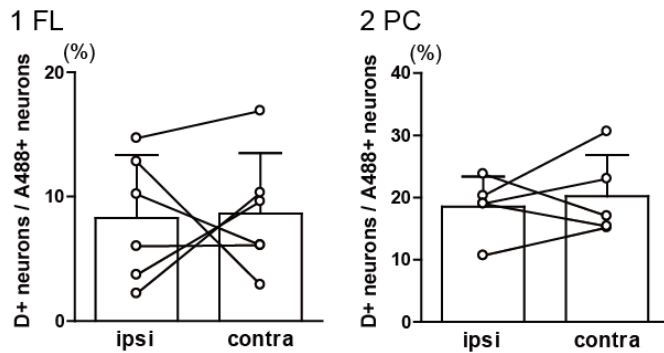


図 3. 注入部位の同側と対側の PHN で比較した PHN-FL および PHN-PC 投射におけるコリン作動性ニューロンの割合

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Saito Yasuhiko, Sugimura Taketoshi	4. 巻 7
2. 論文標題 Different Activation Mechanisms of Excitatory Networks in the Rat Oculomotor Integrators for Vertical and Horizontal Gaze Holding	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 eneuro	6. 最初と最後の頁 0364-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/ENEURO.0364-19.2019	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 Sugimura Taketoshi, Saito Yasuhiko	4. 巻 529
2. 論文標題 Distinct proportions of cholinergic neurons in the rat prepositus hypoglossi nucleus according to their cerebellar projection targets	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Comparative Neurology	6. 最初と最後の頁 1541 ~ 1552
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cne.25035	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishitani Ai, Kunisawa Naofumi, Sugimura Taketoshi, Sato Kazuaki, Yoshida Yusaku, Suzuki Toshiro, Sakuma Tetsushi, Yamamoto Takashi, Asano Masahide, Saito Yasuhiko, Ohno Yukihiro, Kuramoto Takashi	4. 巻 1706
2. 論文標題 Loss of HCN1 subunits causes absence epilepsy in rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 209 ~ 217
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainres.2018.11.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Sugimura T, Saito Y
2. 発表標題 Neural connections between oculomotor neural integrators and vestibulo-cerebellum
3. 学会等名 Society of Neuroscience 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sugimura T, Saito Y
2. 発表標題 The neural connections between the oculomotor neural integrators and the vestibulo-cerebellum
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

〔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
---------	---------