

令和 2 年 5 月 24 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06085・19K21208

研究課題名（和文）神経細胞誕生日標識法による小脳-脳幹系の機能的神経回路構築の解析

研究課題名（英文）analysis of functional organization of neuronal circuits of cerebellum-brain stem systems by birthdate-dependent neuronal labeling

研究代表者

羅 媛君 (Luo, Yuanjun)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・特任研究員

研究者番号：00822347

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：脳が作られる際の神経細胞の誕生日の持つ意味を探るため、橋核と下オリーブ核という小脳に密接に関連した神経核に注目した。あらたに確立したNeurog2-CreERマウス（G2Aマウス）を用いる効率の高い実験手法により、小脳皮質以外に、橋核、および、下オリーブ核において、誕生日依存性の区画を見出した。下オリーブ核と小脳皮質との間の部位対応的な神経細胞間の軸索投射パターンは、誕生日の早い者同士、遅い者同士が連絡し易い訳ではないことが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳内には非常に緻密な神経核構造と神経投射パターンが形成されているが、その形成に神経細胞の誕生日の違いがどのように関与するかは明らかにされていない。マウスの脳の神経細胞は胎仔期後半の10日間のうちのどこかで生まれるが、本研究において、誕生日の違いは、橋核と下オリーブ核、それぞれにおいて、小脳皮質と同じく、神経核内での区画構造の形成に関係していることが確認された。しかし、神経核間での部位対応的な投射パターンの形成への関与は単純ではないことが判明した。脳の形成発達機構の理解において重要な成果である。

研究成果の概要（英文）：We examined significance of the birthdate of neurons in brain development in the pontine nucleus and inferior olive, which are tightly linked to the cerebellar cortex. With the efficient experimental protocol that uses the Neurog2-CreER mouse line, we found birthdate-dependent compartmentalization in the pontine nucleus and inferior olive as well as in the cerebellar cortex. The topographic axonal projection pattern between the inferior olive and the cerebellar cortex was not in accordance with the early-early/late-late relationship.

研究分野：神経科学

キーワード：神経細胞誕生日 Neurog2 マウス 小脳 下オリーブ核 橋核 区画構造 神経投射パターン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大脳、小脳、視床を含む多くの脳領域において、機能的な区画構造が観察される。小脳皮質においては 50 個以上の縦縞区画が存在し、それぞれが特異的な神経投射を受ける (Sugihara and Shinoda, 2004, *J. Neurosci.*)。小脳皮質と密接な部位対応的神経投射を持つ脳幹の関連の核 (小脳核、前庭神経核、橋核、下オリーブ核) にも、相当する区画構造が存在するはずで、小脳の区画構造との、部位対応的機能連関の関係の解明が小脳の機能の理解のための重要な課題であると考えている。

脳の区画構造は脳の発達過程において形成されるので、発達過程の研究も区画構造の理解のために重要である。小脳皮質の区画構造は胎児期の小脳において、比較的少数のプルキンエ細胞の亜集団領域が、規則的に移動・分裂して最終的に 50 余りの縦縞構造になることが大まかに示されている (Fujita et al., 2012, *J. Neurosci.*)。さらに、橋本らは (Hashimoto and Mikoshiba, 2003, *J. Neurosci.*; Namba et al., 2011, *C. Comp. Neurol.*) マウスの子宮内胎児にアデノウイルスを注射する方法で誕生日依存的に神経細胞を標識し、小脳の各区画が特定の誕生日のプルキンエ細胞から形成されることを示した。

神経細胞は誕生した後には細胞分裂しないので、明確な「誕生日」を持っている。神経細胞の誕生日はその神経細胞が最終的に何になるかの運命づけに関わっている。すなわち、特定の神経細胞群は特定の誕生日を持っている。従って、誕生日依存的に神経細胞を標識する技術があれば、脳の様々な部位で特定の神経細胞群からなる脳の機能的区画構造を示すことができると考えられる。特に、誕生日との関連が明らかにされている小脳の皮質区画構造と密接な神経結合を作る脳幹の領域 (深部小脳核、下オリーブ核、橋核) においては、神経細胞の誕生日に依存した区画構造が小脳の多彩な機能を果たすのに重要である可能性がある。誕生日依存的な区画構築が小脳関連の各神経核に存在するかどうか、そしてその区画構築に機能的な意義があるのかが本研究の問いである。

私は、これまで、学生として主として成獣マウスにおける単一軸索再構築法によって、小脳の機能構築の解明を進めてきていたが (Luo et al., 2017, *J. Comp. Neurol.*; Luo et al., 2014, *Brain Res.* 2014)、研究室での小脳の発達・形成過程に関する研究にも参加している (Vibulyaseck et al., 2017; Fujita et al., 2012, *J. Neurosci.*)。発達・形成過程をこれまで主導していた特任研究員が、母国での就職のため研究室を離れたので、現在、特任研究員に採用された私が発達・形成過程のプロジェクトを主導している。これまでの研究の過程において、小脳の入出力線維の投射パターンの解釈には、小脳の区画構築の理解が不可欠で、小脳の区画構築の理解のためには、小脳縦縞構造の形成機構の解析が不可欠であるとの考えに至った。2003 年に橋本らによって発表された、アデノウイルス子宮内注入による小脳皮質の縦縞構造の誕生日依存性の発見により、小脳関連の区画形成に神経細胞の誕生日が密接に関わっていることが明らかにされた。遺伝学研究所の平田教授によって開発された誕生日標識 CreER マウスによる誕生日依存的神経細胞標識法は、神経細胞の誕生日の解析を技術的に以前の方法より遥かに容易にするものであり、これを導入することにより、小脳関連領域の区画構築の解析が進み、小脳関連の機能構築の理解が進むと予想した。

2. 研究の目的

最近、平田らによって開発された、誕生日標識 CreER マウスのシステム (Hirata et al., *eNeuro*, 2019) は、神経細胞が最後の細胞分裂する時に短時間発現する遺伝子、例えば、*Neurogenin2* 遺伝子の発現制御領域のもとで CreER タンパク質をコードする遺伝子が導入されている (トラン

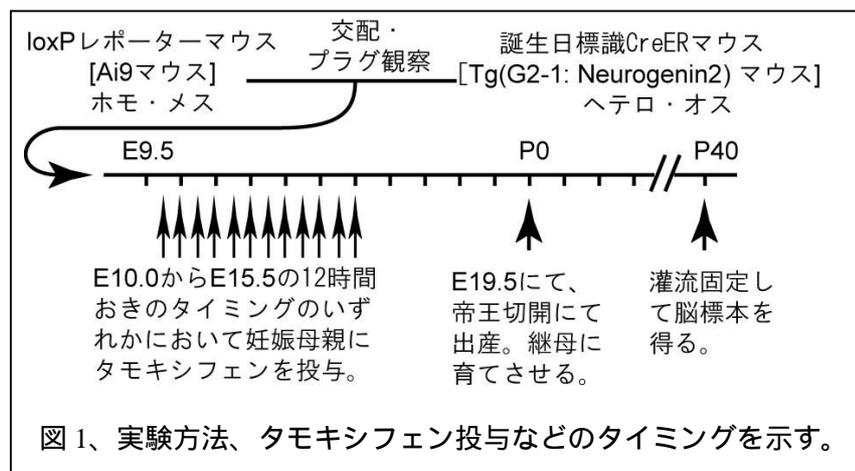
スジェニックマウス Tg(G2-1: Neurogenin2)、G2A マウス)。このマウスと Cre 依存レポーターマウスを掛け合わせ、妊娠の特定時期にタモキシフェンを注射することで誕生時期依存的に神経細胞を標識することができる。この方法は、従来の BrdU を用いる手法やアデノウイルス子宮外注入法よりも、はるかに能率的に誕生日依存性のニューロンの標識を行うことができる。

本研究は、この遺伝子改変マウスを用いて、上記の「背景」において提示した問題に取り組むことを目的としている。すなわち、小脳核と下オリブ核、橋核、前庭神経核など小脳との関連の強い脳幹の主要な神経核において、誕生日に依存した区画構築の解明を第 1 の目的としている。さらに、これらの神経核と小脳皮質との間のよく知られている部位対応性神経投射が、神経細胞の誕生日と関連したものかどうか、すなわち、誕生日の早いニューロンは早いニューロン同士で連絡し合い、誕生日の遅いニューロンは誕生日の遅いニューロン同士連絡し合う傾向があるかどうかを明らかにすることを第 2 の目的としている。これらの神経核の区画構造は、古くから知られている外形に基づいたもの以外、ほとんど明らかにされていない。しかし、神経の投射関係からは、未知の区画構造の存在が推定される。分子マーカーの標識もこれまで明らかな区画構造を示してはいない。従って、誕生日依存的な区画構造の解明が有力な手段になる可能性がある。

この研究の意義としては、小脳入出力に関する機能的な理解が格段に進むことがあげられる。小脳皮質においては、機能区分の理解がある程度進み、各種の運動に関わる部分と非運動機能、自律神経機能に関わる部位などが分けられている。しかし、同様の区分が橋核や下オリブ核にも存在するはずだが、その構造的基盤はほとんど明らかでない。これが、解明されると、小脳が関係する特別な障害、たとえば、自閉症スペクトラム、あるいは、ジストニア症における、責任区画または責任神経回路の理解が進展する可能性がある。

3. 研究の方法

初年度(2018年度)には、脳幹神経核における誕生日依存的区画の系統的な解明を進め、次年度には、誕生日依存的区画の神経投射の特異的標識による誕生日依存的神経回路の解明を進めることを計画した。



初年度は、図 1 のように、誕生日標識 CreER マウスと Ai9 マウスを交配後、妊娠メスマウスに特定の胎仔期のタイミングでタモキシフェンを腹腔注射して個体を得、生後 40 日(P40)の成獣になったところで灌流固定し、脳切片標本を得る。発現部位の同定のため、小脳の zebrin (aldolase C)の縦縞模様が蛍光タンパクで標識されている Aldoc-Venus マウスを利用した。すなわち、Ai9 マウスと Aldoc-Venus マウスのダブル homo マウスを作製して G2A マウスとの交配を行った。系統的に得られた P40 のマウスの脳切片を系統的に写真撮影することで、レポータータンパク質の発現分布を系統的に観察した。特に、小脳核、下オリブ核、橋核、および前庭神経核において、誕生日依存的な区画構築を解析した。三次元的な神経細胞の分布の解析は、既に導入済みの三次元グラフィックソフトウェア Rhinoceros を用いた。これらの手法により、小

脳核と下オリブ核、橋核、前庭神経核など小脳との関連の強い脳幹の主要な神経核において、誕生日依存性の区画を明らかにすることを計画した。

次年度（2019年度）には、初年度の実験を継続するとともに、発見された誕生日特異的な領域の興味深い箇所について、神経投射の標識を行い、神経回路の部位対応的な結合に関して、誕生日を同じくする区画同士が連絡しやすいような関係があるかどうかの解明を試みた。

4. 研究成果

初年度（2018年度）には、本研究で用いる誕生日標識 CreER マウス（G2A マウス）の繁殖を開始し、さらに、交配させるレポーターマウスとして、Ai9-AldocVenus ダブルホモマウス（dH マウス）を作製した。G2A マウス（オス）と dH マウス（メス）を掛け合わせ、妊娠 10.0 日目から 13.0 日目まで、半日おきのタイミングのいずれかでタモキシフェンを投与し、帝王切開して仔を得て、同時に用意した継母による子育ての後、生後 40 日で還流固定して脳標本を得るといふ実験系を確立した。技術的な点では、我々にとって初めての経験となるものもあったが、実験が順調に進むようになってきている。誕生日依存性の脳の区画構造の解析に利用できることを確認した。妊娠 9.5 日目から 14.5 日目まで、半日おきのタイミングのいずれかでタモキシフェンを投与して得られた個体のサンプルが系統的に得られるようになった。Zeiss 社の電動蛍光顕微鏡により、連続切片の写真を効率よく撮影することも、タイリングの機能を蛍光顕微鏡のソフトに取り入れたことで可能となり、系統的に撮影を行えるようになった。

予備的な脳の観察にて、タモキシフェン投与のタイミングに応じて、異なる神経細胞群が蛍光（tdTomato による赤蛍光）で標識されており、このシステムが、期待通り誕生日依存性の脳の区画構造の解析に利用できることを確認した。脳のほとんどの部位で良好な発現認められるが、小脳核ではおそらく Ai9 マウスの特性のためか、発現が弱いことも確認した。10.0 日目から 13.0 日目まで、系統的にサンプルが得られたので、脳全体で 50 μm の厚さの切片を切り、緑で標識されているアストロサイトと小脳の縦縞構造のマーカである Aldoc の発現とも合わせて脳切片を系統的に写真撮影することで、レポータータンパク質の発現分布を系統的に観察できるようになった。

次年度（2019年度）には、実験を系統的に行い、E9.5 から E14.5 で 12 時間ごとの各タイミングでタモキシフェンを投与したマウスの脳サンプルを得た。小脳皮質、下オリブ核、橋核において、誕生日依存的な区画構築を解析した。

まず、我々の G2A マウスでの誕生日依存性標識の特性を明らかにするため、別の方法での報告のある小脳プルキンエ細胞での標識の結果(Namba et al., 2011)と我々の G2A マウスにおける結果を詳細に比較し、一致点と不一致点をまとめた。大まかな点では、われわれの結果は、彼らのものと大きな矛盾はないが、我々の方が、より詳しく小脳全体についての解析結果を示すことができた。細かい点では、いくつかの違いがあり、主として、彼らの複製不能アデノウイルスベクターの手法と我々の Neurog2-CreER の手法の違いによるものと思われる。たとえば、彼らがプルキンエ細胞は、区画ごとに E10.5, E11.5, E12.5 のどこかで生まれると結論するのに対し、われわれの結果では、どの区画でも、プルキンエ細胞の誕生日分布には 1 日よりやや長い期間があり、また、全体として、早期と後期の大きな 2 グループの分布があるように考えられた。この部分の解析は、本研究の主要部分ではないので 1 人の大学院生に担当させて行い、彼女が論文を投稿した。

下オリブ核と橋核については、私が自ら担当した。ほぼ解析が終了し、下オリブ核の解析結果は学会発表を行った。現在、論文発表を準備している。下オリブ核、および、橋核におい

て、誕生日依存性の区画の存在を新たに見出した。下オリーブ核では、主オリーブ核（PO）と背側副核（DAO）のニューロンは早い時期（主に E10.5）に生まれ、内側副核（MAO）のニューロンは遅い時期（主に E11.5）に生まれることが判明した（図 2）。橋核では、内側部分が早い時期に生まれることが判明した。さらに、これらと小脳皮質との間の部位対応的な投射は、誕生日の早い遅いとの関係とは一致しないことが判明した（図 3）。

また、同時に、Ai9 レポーターマウスは、投射ニューロンの軸索も強く標識されて、核内の区

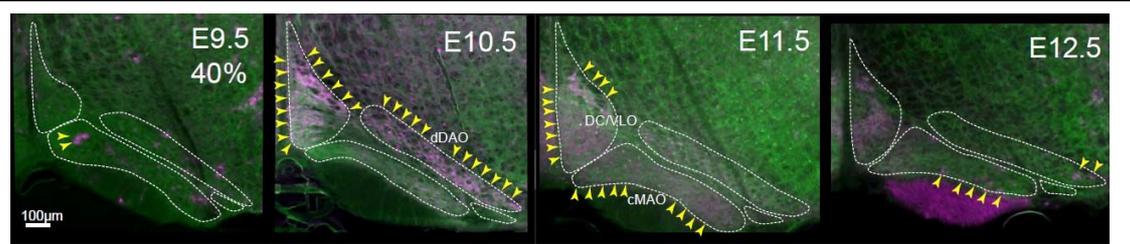


図 2、タモキシフェン投与のタイミングによるニューロン標識の違い。

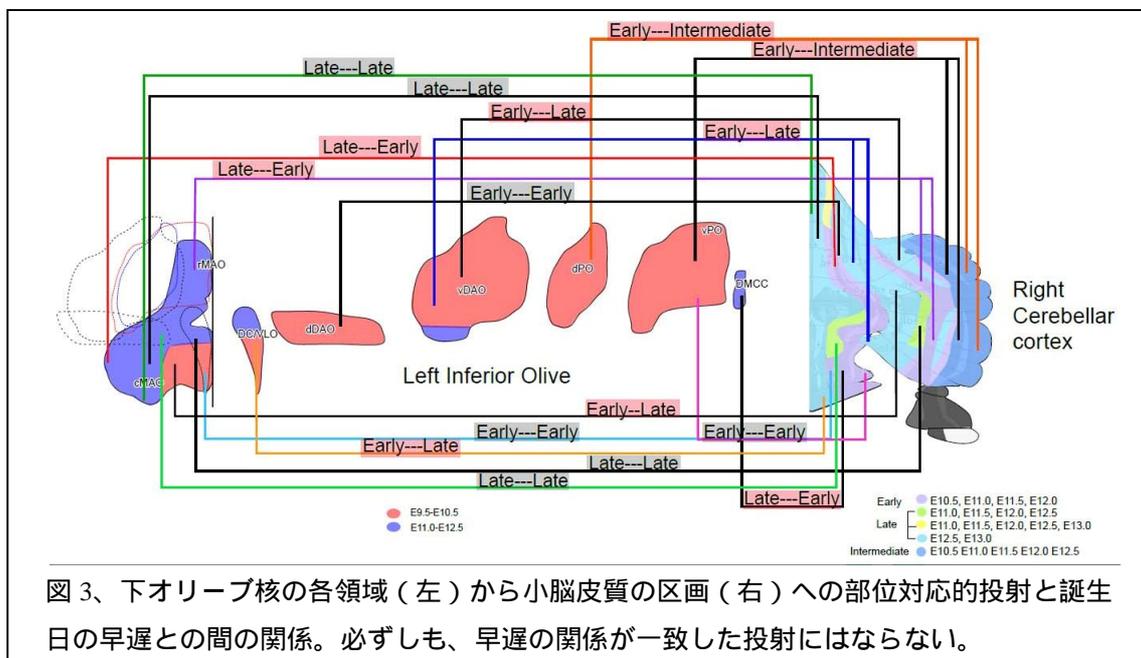


図 3、下オリーブ核の各領域（左）から小脳皮質の区画（右）への部位対応的投射と誕生日の早遅との関係。必ずしも、早遅の関係が一致した投射にはならない。

画解析が行いにくいという欠点が見いだされた。そこで、細胞の核だけが Cre 依存性に標識される R26R-H2B-mCherry マウスを入手し、Ai9 に替えて利用するべく繁殖を開始した。今後は、まだ解析が行われていない小脳核および前庭神経核において、誕生日依存的な区画構築の解析を加えること、そして、上記のように R26R-H2B-mCherry マウスでの解析も加えて、新たな研究課題の下での研究に引き継いで解析を継続する予定である。

以上より、本研究は、誕生日依存性の区画構築の存在が知られている小脳皮質の各区画が部位対応的な神経結合を作る脳幹の下オリーブ核と橋核に注目し、そこに神経細胞の誕生日に依存した機能的区画構造や部位投射パターンが存在するか否かを、Neurog2-CreER マウス（G2A マウス）による誕生日依存性の神経標識によって明らかにするという目的に対して一定の成果が得られたと考える。

また、本研究の期間以前から研究代表者が行っていた関連したプロジェクトから得られた結果も、本研究の実験結果を解釈する上で本研究に密接に関わっているため、本研究の一部として継続して論文発表に関わる作業を続けた。それらの軸索投射や分子発現の解析結果を論文として本研究中に多数発表することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sarpong Gideon A., Vibulyaseck Suteera, Luo Yuanjun, Biswas Mohammad S., Fujita Hirofumi, Hirano Shinji, Sugihara Izumi	4. 巻 526
2. 論文標題 Cerebellar modules in the olivo-cortico-nuclear loop demarcated by pcdh10 expression in the adult mouse	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Comparative Neurology	6. 最初と最後の頁 2406 ~ 2427
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cne.24499	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 該当する
1. 著者名 Nguyen-Minh Viet T., Tran-Anh Khoa, Luo Yuanjun, Sugihara Izumi	4. 巻 12
2. 論文標題 Electrophysiological Excitability and Parallel Fiber Synaptic Properties of Zebrin-Positive and -Negative Purkinje Cells in Lobule VIII of the Mouse Cerebellar Slice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 513, 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncel.2018.00513	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 Biswas Mohammad Shahangir, Luo Yuanjun, Sarpong Gideon Anokye, Sugihara Izumi	4. 巻 527
2. 論文標題 Divergent projections of single pontocerebellar axons to multiple cerebellar lobules in the mouse	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Comparative Neurology	6. 最初と最後の頁 1966 ~ 1985
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cne.24662	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 Panzai Saddam K., Luo Yuanjun, Vibulyaseck Suteera, Sarpong Gideon A., Nguyen Minh Viet T., Nedeltescu Hermina, Hirano Shinji, Sugihara Izumi	4. 巻 528
2. 論文標題 Reorganization of longitudinal compartments in the laterally protruding paraflocculus of the postnatal mouse cerebellum	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Comparative Neurology	6. 最初と最後の頁 1725 ~ 1741
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cne.24849	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 Ando Takahiro, Ueda Mitsuhiro, Luo Yuanjun, Sugihara Izumi	4. 巻 528
2. 論文標題 Heterogeneous vestibulocerebellar mossy fiber projections revealed by single axon reconstruction in the mouse	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Comparative Neurology	6. 最初と最後の頁 1775 ~ 1802
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cne.24853	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 Luo Y, Onozato T, Wu X, Sasamura K, Sakimura K, Sugihara I	4. 巻 225
2. 論文標題 Dense projection of Stilling's nucleus spinocerebellar axons that convey tail proprioception to the midline area in lobule VIII of the mouse cerebellum.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain Structure and Function	6. 最初と最後の頁 621 ~ 638
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00429-020-02025-6	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7件(うち招待講演 1件/うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Biswas MS, Luo Y, Sugihara I.
2. 発表標題 Projection of single pontocerebellar axons in relation to aldolase C stripes and lobules in the mouse cerebellum.
3. 学会等名 41th Annual Meeting of Japanese Neuroscience Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sarpong GA, Viboonayasek S, Luo Y, Biswas MS, Fujita H, Hirano S, Sugihara I.
2. 発表標題 Cerebellar modules in the olivo-cortico-nuclear loop labeled by pcdh10 expression in the adult mouse
3. 学会等名 Society for Neuroscience 48th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sugihara I, Biswas MS, Sarpong GA, Luo Y
2. 発表標題 The lobular and striped organization of the cerebellar hemisphere in relation to projection patterns of afferent and efferent axons in rodents, with a special focus on crus I.
3. 学会等名 The 75th Fujihara Seminar 'cerebellum as a CNS hub' (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Viet T Nguyen-Minh, Khoa Tran-Anh, Yuanjun Luo, Izumi Sugihara.
2. 発表標題 Comparison of electrophysiological characteristics of Zebrin-positive and -negative Purkinje cells.
3. 学会等名 The 75th Fujihara Seminar 'cerebellum as a CNS hub' (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Biswas MS, Luo Y, Sugihara I.
2. 発表標題 Morphology of single pontocerebellar axons in relation to zebrin stripes and lobules in the mouse cerebellum.
3. 学会等名 The 75th Fujihara Seminar, 'Cerebellum as a CNS hub'. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Luo Y, Sugihara I.
2. 発表標題 The midline area of vermal lobule VIII receives Stilling's nucleus spinocerebellar projection and is involved in locomotion in the mouse cerebellum.
3. 学会等名 Neuronal circuits in motor behavior, OIST workshop (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuanjun Luo, Jingyun Zhang, Khoa Tran-Anh, Tatsumi Hirata, Izumi Sugihara
2. 発表標題 The topographic neuronal connection in the cerebellum does not match with the order of neuronal birth.
3. 学会等名 The 13th Biennial Conference of Chinese Neuroscience Society (CNS 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 システム神経生理学分野 http://www.tmd.ac.jp/med/phy1/phy1.html TMDU department of systems neurophology http://www.tmd.ac.jp/med/eng/eng/phy1-E.html</p>

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