

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20300137

研究課題名（和文） 小脳モジュールの構築と基本動作機構

研究課題名（英文） Organization and basic functional mechanism of cerebellar modules

研究代表者

杉原 泉（SUGIHARA IZUMI）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：60187656

研究成果の概要（和文）：

小脳モジュールを構成する要素は、分子発現パターンとプルキンエ細胞軸索、登上線維、苔状線維の入出力軸索投射パターンである。このうち、プルキンエ細胞軸索と、後索核に由来する苔状線維軸索の単一軸索投射パターンとアルドラーゼCの発現パターンを関連づけた。これまでの登上線維の知見と合わせ、小脳モジュールの構築が解明され、入出力の動作の部位的対応関係が示された。さらにラットでの解析にマーモセットでの解析を加え、齧歯類と霊長類の類似性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

The cerebellar module is organized by the molecular expression pattern and input-output axonal connections of Purkinje cells, climbing fibers and mossy fibers. We related axonal connections of Purkinje cells and mossy fiber axons that originate from the dorsal column nuclei to the aldolase C expression pattern. Combining the results with our previous findings on the climbing fiber projection pattern, we clarified the organization of cerebellar modules, and show how cerebellar input and output functions are correlated topographically. Furthermore, we have shown similarity of the cerebellar modular organization between rodents and primates by analyzing the marmoset cerebellum in addition to the rat cerebellum.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2009年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：神経科学・神経解剖学・神経生理学

科研費の分科・細目：分科：神経科学、細目：神経・筋肉生理学

キーワード：小脳、後索核、プルキンエ細胞、アルドラーゼC、マーモセット、苔状線維、ラット、神経解剖学

1. 研究開始当初の背景

小脳の基本構造として、小脳皮質・小脳核が多数の対応する機能区分に分かれ、それが小脳モジュール（小脳皮質-核モジュール）を形成しているという考えは、古くからの解剖学的・生理学的研究から唱えられていた。しかし、それは、小脳の片葉等ごく一部の結果から全体を想像していたのに過ぎなかった。小脳全体において、モジュール構造の実体が形態学的な実体を明らかにすることは、小脳の基本構築の本質的な理解に極めて重要である。モジュール構造を正確に同定したうえで正確な生理学的な実験を行うことができるようになる。

われわれは、10年余り前から小脳の入出力線維の投射パターンを単一軸索レベルで解明するというプロジェクトを始めて、下オリーブ核由来の登上線維、また、一部の苔状線維の形態を明らかにした。登上線維の皮質投射には、非常に細かいトポグラフィックな投射が見られ、下オリーブ核内で近傍にあるニューロン群に由来するすべての登上線維は、小脳皮質では、機能構築上の一つの小単位と考えられる微細な縦の帯状の範囲に局限して投射することを見いだした。また、3年余り前から、アルドラーゼCというプルキンエ細胞のマーカ分子に着目して、アルドラーゼCに対する抗体を作成した。この分子の発現の見られるプルキンエ細胞と見られないプルキンエ細胞の存在領域が小脳全体でどのような縦縞模様状配列になっているかを示し、線維投射との対応からこの縞のパターンが、基本的な小脳皮質のモジュールに対応することを示した。次いで、小脳核においても、アルドラーゼC陽性のプルキンエ細胞の軸索終末がアルドラーゼCを発現していることから、アルドラーゼC発現パターンの存在を初めて突き止め、これと登上線維の小脳核側枝の狭い範囲に局限した投射パターンから、小脳核の最も基本的なモジュール構造を明らかにした。

小脳の神経科学的研究は、細胞レベル、ユニット記録のレベル、発生等、多種類の側面からなされている。しかし、われわれが行ってきたような基礎的かつ系統的な神経回路の解析の研究は他には余りないユニークなものである。今後の発展としては、モジュール構造に関してまだ曖昧なまま残っている多くの点に関して一層精密にこの構造を追求することが一つには必要である。小脳モジュール構造が正確に把握された上で小脳の神経回路の精密な機能解析が可能になると考えられる。

2. 研究の目的

小脳皮質と小脳核は、対応する多数の機能区分（小脳モジュール）から構成されると考えられる。この構成の原則を理解することが、小脳の機能の理解と、ヒトの小脳疾患の病態生理の理解に必要である。これまで、われわれ、ラットを用いて小脳モジュールの解析を行い、それが小脳の片葉構造とアルドラーゼCなどの分子の縦縞状発現パターンに密接に関係していることを示した。しかし、いまだ系統的に解析され尽くしてはならず、特に、これまでわれわれが用いてきたラットにおいても、プルキンエ細胞の投射パターン、苔状線維の投射パターンが十分解析されていない。これらの投射を単一軸索再構築という正確な手法で解析することをまずめざした。

また、齧歯類以外の動物での小脳モジュールはほとんど解析されていない。そこで、ヒトに近縁の霊長類（マーモセット）での、モジュール構造の解析を行う。さらに、小脳の縦縞構造を可視化した遺伝子改変マウスを用いて、発生学的な観点を含めて、投射パターンを小脳の分子発現パターンと関連させてより系統的に解析し、小脳全体におけるモジュール構成の詳細を解明する。そのような解析で小脳モジュールの全体的な構築と入出力結合に基づく基本動作機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

初年度は、ラットにおいて、順行性神経標識法とaldolase C免疫染色により、小脳モジュールの最も重要な構成要素となるプルキンエ細胞投射軸索の形態を単一軸索レベルにおいて明らかにし、さらにその投射のトポグラフィックをする。次年度は、霊長類小脳における小脳モジュールの構築を解析した。霊長類としては、小型で形態学的解析のしやすいマーモセットを用い、aldolase C免疫染色により小脳の縦縞構造を染め出し、さらに、神経標識法により縦縞に固有のプルキンエ細胞と下オリーブニューロンの投射を標識した。最終年度は、小脳投射ニューロン（苔状線維）と小脳モジュールの構築との関係に関して調べるため、上肢・体感・下肢等の異なる体部位からの触覚と深部感覚の中継核である後索核から小脳への投射軸索の形態を再構築によって明らかにした。さらに、縦縞模様状にマーカが発現している2種類の遺伝子改変マウス（1NM13, Aldc-Vns）を用いて、小脳モジュールの構築に関する解析を行った。

4. 研究成果

初年度は、小脳モジュールの構築を小脳の

小葉構造と分子コンパートメントに関連づけて解明する目的で、小脳モジュールの最も重要な構成要素であるプルキンエ細胞の軸索投射パターンを、単一軸索レベルにおいて明らかにした。この結果、小脳皮質-小脳核間の機能モジュールの構築をシステムティックに決定することができた。この成果は、小脳モジュールに関する電気生理学的実験を進めるための解剖学的な基盤として重要な成果である。

次年度は、小型の霊長類であるマーモセットの小脳における小脳モジュールの解明に関して大きな成果が得られた。マーモセット小脳のすべての縦縞に関して、ラットのどの縦縞と相同であるかが確認できた。マーモセット小脳の分子発現パターンに見られる縦縞構造は、哺乳類共通の基本的構築を示すと同時に、部分的に種に固有の特徴を持っていることが明らかになった。ヒトにより近縁である霊長類の小脳においてそのモジュール構築を明らかにすることで、齧歯類で得られた小脳の機能的構築の理解をヒトに応用する上で大変重要な成果が得られた。

最終年度は、小脳投射ニューロン（苔状線維）と小脳モジュールの構築との関係に関して特に大きな成果が得られた。その内容は、小脳への主要な入力である苔状線維と小脳モジュールとの関係に関するものである。機能の分かっている苔状線維が小脳モジュールに対してどのような関係で入力するかを明らかにすることが小脳モジュールの構築と基本動作機構の理解につながる。上肢・体感・下肢等の異なる体部位からの触覚と深部感覚の中継核である後索核から小脳への投射軸索の投射パターンは体部位局在および感覚種によって異なり、それぞれの線維は、幾つかの体性感覚に関係する特定のモジュールに投射することが明らかになった。これにより、個々のモジュールが異なる体性感覚機能に関わるということが明らかになり、かつ、どのモジュールの組み合わせがどの感覚に関わるかという小脳の機能構築の基盤が明らかになった。

その他、縦縞模様状にマーカーが発現している 2 種類の遺伝子改変マウス（1 NM13, Aldc-Vns）を用いた解析結果に関して現在発表準備中である。以上により、小脳モジュール構築とその動作機構の解析に関して一定の成果をあげた。これらにより、プルキンエ細胞軸索、苔状線維系、登上線維系の投射パターンを小脳の分子発現パターンと関連させて系統的に解析し、小脳全体におけるモジュール構成の詳細を解明しつつある。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線）

〔雑誌論文〕（計 11 件）

（原著論文）

1. Quy, P.N., Fujita, H., Sakamoto, Y., Na, J., Sugihara, I. (2011) Projection patterns of single mossy fiber axons originating from the dorsal column nuclei mapped on the aldolase C compartments in the rat cerebellar cortex. *J. Comp. Neurol.* **519**:874-899.
2. Namba K, Sugihara I, Hashimoto M. 2011. (in press) Close correlation between the birthdate of Purkinje cells and the longitudinal compartmentalization of the mouse adult cerebellum. *J. Comp. Neurol.* 2011.
3. Fujita, H., Oh-Nishi, A., Obayashi, S., Sugihara, I. (2010) Organization of the marmoset cerebellum in three-dimensional space: lobulation, aldolase C compartmentalization and axonal projection. *J. Comp. Neurol.* **518**: 1764-1791.
4. Sugihara, I., Fujita, H., Na, J., Quy, P. N., Li, B. Y., Ikeda, D. (2009) Projection of reconstructed single Purkinje cell axons in relation to the cortical and nuclear aldolase C compartments of the rat cerebellum. *J. Comp. Neurol.* **512**: 282-304.
5. Heitz, S., Gautheron, V., Lutz, Y., Rodeau, J. L., Zanjani, H. S., Sugihara, I., Bombarde, G., Richard, F., Fuchs, J. P., Vogel, M. W., Mariani, J., Bailly, Y. (2008) BCL-2 counteracts Doppel-induced apoptosis of prion-protein-deficient Purkinje cells in the Ngsk Prnp^{0/0} mouse. *Dev. Neurobiol.* **68**:332-348.

（総説など）

1. Sugihara, I. (in press) Compartmentalization of the deep cerebellar nuclei based on afferent projections and aldolase C expression. *Cerebellum* 2011.
2. Brown KM, Barrionuevo G, Canty AJ, De Paola V, Hirsch JA, Jefferis GS, Lu J, Snippe M, Sugihara I, Ascoli GA. (in press) The DIADEM data sets:

Representative light microscopy images of neuronal Morphology to advance automation of digital reconstructions. *Neuroinformatics*, 2011.

3. Sugihara, I. (in press) Bright field neuronal preparation optimized for automatic computerized reconstruction, a case with cerebellar climbing fibers. *Neuroinformatics*, 2011
4. 杉原 泉 (2011) 小脳の入出力神経回路と分子発現. *Medical Science Digest* **37**: 126-127.
5. 杉原 泉 (2009) 小脳の局在—その構造的基盤. *Clinical Neuroscience* **27**: 765-768.

[学会発表] (計 17 件)

1. 杉原 泉 (2011) 入出力神経ネットワークに基づく小脳の機能構築. 平成 22 年度生理学研究所研究会「行動制御における脳領域間の機能連関」、愛知県岡崎市 生理学研究所、平成 23 年 1 月 7 日.
2. Fujita, H., Sugihara, I. (2010) Longitudinal compartmentalization in the marmoset cerebellum. *Program No. 785.16. Neuroscience Meeting Planner. San Diego, CA: Society for Neuroscience, 2010. Online.* (The 40th annual meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, 2010 /11/17.
3. 杉原泉 (2010) 小脳の機能、眼球運動に対する小脳の関わり. 第 32 回日本めまい平衡機能検査技術者会における招待講演、東京、千代田区、学術総合センター、平成 22 年 10 月 2 日.
4. Fujita, H., Furuichi, T., Sugihara, I. (2010) Development of cerebellar parasagittal compartmentalization studied in a transgenic mouse strain carrying the LacZ composite gene. *Neurosci. Res.*, 68, Suppl 1, page e130. (The 33rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Kobe, 2010/9/02)
5. Sugihara, I. (2010) Significance and origin of the longitudinal stripe organization in the cerebellar cortex. *Neurosci. Res.*, 68, Suppl 1, page e38. (The 33rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Kobe, 2010/9/04)

6. 杉原 泉. (2010) 小脳の軸索投射と縦縞構造. CBIR 若手シンポジウム. 2010/02/01.
7. Sugihara, I. (2010) Formation and malformation of climbing fibers: Single axon morphology tells the difference. Invited Lecture in DIADEM conference, HHMI Janelia Research Campus, Ashburn, VA, U.S.A., 2010/08/30.
8. Sugihara, I., Cerminara, N., Apps, R. (2009) Subzonal organization of olivo-cortico-nuclear circuits in the rat. (Second International Congress of the Society for Research on the Cerebellum, Chicago, 2009/Oct./16)
9. Sugihara, I. (2009) Development and differentiation of the cerebellum: normal and abnormal morphogenesis of climbing fibers. *Neurosci. Res.*, 65, Suppl 1, S33. (The 32nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Nagoya, 2009/9/18).
10. Sugihara I., Hirofumi Fujita, Pham Nguyen Quy, Asuka Maki (2009) Anatomical basis for cerebellar functional localization: lobules, stripes, micromodules and axonal connections. *36th International Congress of Physiological Sciences (IUPS 2009), Kyoto, Japan, (July 27-August 1, 2009).* (Poster presentation on July 31)
11. 杉原 泉 (2008) 「小脳の構築と機能」. 第 23 回日本大脳基底核研究 (平成 20 年 7 月 5-6 日、精進マウントホテル、〒401-0336 山梨県南都留郡富士河口湖町精進 301、TEL 0555-87-2200 FAX 0555-87-2122) における招待講演 (6 日).
12. Sugihara, I., Shinoda, Y. (2008) Functional significance of aldolase C expression pattern in the cerebellar cortex and cerebellar nuclei. *Neural Mechanisms in Control of Eye, Head and Limb Movements, A Satellite Symposium to the 25th Barany Society Meeting, Abstract p29, Ohtsu.* (2008/03/30)

[図書] (計 2 件)

1. 杉原 泉 (2010) 小脳皮質の部位局在性. 鈴木則宏、祖父江元、荒木信夫、宇川義一、川原信隆編、Annual Review 2010 神経、東京、中外医学社、pp 9-16。

2. Sugihara, I., Fujita, H. (2010) A computer-aided light microscopy system for three-dimensional reconstruction of axonal projections. In: A. Méndez-Vilas and J. Díaz eds. Microscopy: Science, Technology, Applications and Education, Microscopy Book Series No. 4., Badajoz: Formatex. pp. 813-819.

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等：

<http://www.tmd.ac.jp/med/phy1/phy1.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉原 泉 (東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授)

研究者番号：60187656

(2) 研究分担者 なし
()

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし
()

研究者番号：

(4) 研究協力者

藤田 啓史 (東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・大学院博士課程学生)