

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21460

研究課題名（和文）脳脊髄液を感知する神経回路の機能の解明

研究課題名（英文）Elucidating structures and functions of cerebrospinal fluid-contacting neurons in mice

研究代表者

上野 将紀（Ueno, Masaki）

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号：40435631

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、中心管周囲で脳脊髄液に接する未知の細胞、脳脊髄液接触ニューロンの構造と接続、機能の解明を目的とした。まずマウス脳室内のAAV投与により、同ニューロンの特異的な標識法を見出した。本手法と組織学的解析、透明化、1細胞標識、3次元電子顕微鏡、電気生理学的解析を組み合わせ、同ニューロンは軸索を腹索、吻側、中心管周囲へ伸ばし、吻側の同ニューロンと接続することを見出した。また体幹筋の運動ニューロンおよび運動性脊髄介在ニューロンとの接続も見出した。化学遺伝学的に活動を抑制すると、トレッドミルでの走行異常が認められた。本成果から、脳脊髄液接触ニューロンの脊髄内回路網と歩行運動への寄与を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳脊髄液接触ニューロン(CSF-cNs)は、脊髄の中心管直下に整列し樹状突起を脳脊髄液へ接する奇妙な細胞として100年近く前に発見された。脳脊髄液の情報を探知し、中枢神経内へ伝達する細胞群であると想定されたが、特に哺乳類において、その機能は長らく不明のままであった。本研究では、CSF-cNsの特異的な標識・操作法を独自に見出したことで、CSF-cNsのもつ細胞構造と脊髄内の接続様式、さらに歩行運動に関わる機能をはじめ明らかにした。本法を用いたCSF-cNsの実体解明は、生体-脳脊髄液-中枢神経をつなぐ新たな情報伝達システムの理解へつながると期待される。

研究成果の概要（英文）：Cerebrospinal fluid-contacting neurons (CSF-cNs) are enigmatic neurons residing around the central canal in the spinal cord. This study aimed to elucidate the structure, connections, and function of CSF-cNs in mice. We first found a method to specifically label CSF-cNs by intracerebroventricular injection of AAV. Combining this method with histological analysis, tissue clearing, single-cell labeling, 3D electron microscopy, and electrophysiological analysis, we found that CSF-cNs extended axons ventro-rostrally and back to the central canal to connect with rostral CSF-cNs. We also found connections with axial muscle motor neurons and premotor spinal interneurons. Chemogenetic suppression of CSF-cNs activity resulted in abnormal running on the treadmill. The data in this study revealed the structure, intraspinal network, and locomotor functions of mouse CSF-cNs.

研究分野：神経科学

キーワード：脳脊髄液接触ニューロン 脳脊髄液 神経細胞 脊髄 運動 歩行

1. 研究開始当初の背景

脳脊髄液接触ニューロン Cerebrospinal fluid-contacting neurons (CSF-cNs) は、脊髄の中心管直下に整列し、樹状突起を脳脊髄液へ接する奇妙な神経細胞群として 100 年近く前に発見された^{1,2} (図 1A)。脳脊髄液と接することから、脳脊髄液の情報を探知する細胞群であることが想定されたが、その機能は長らく不明のままであった³。近年、ゼブラフィッシュ幼生やヤツメウナギでは、CSF-cNs が脳脊髄液の pH の化学受容や、脳脊髄液、脊髄の動きの機械受容をにない、遊泳運動や姿勢を制御することが明らかにされてきた⁴⁻⁶。一方、哺乳類における CSF-cNs の解析は大きく立ち遅れてきた。CSF-cNs は、マウスにおいて陽イオンチャネル PKD2L1 を発現する細胞として再発見され⁷、Pkd2l1-Cre マウスの利用が可能となった。しかし特異性がやや低く、CSF-cNs のもつ構造や接続、機能は多くがわかっていなかった。

私たちは、脳・脊髄の神経接続や機能を調べる研究の過程で、マウス脊髄の中心管直下で神経細胞マーカーの TuJ1 抗体に染まり、神経突起を脳脊髄液内へ伸ばす奇妙な神経細胞を偶然見出した。さらにその後、大脳皮質と脊髄をつなぐ皮質脊髄路を標識するため、蛍光タンパクを発現するアデノ随伴ウイルス (Adeno-associated virus; AAV) を大脳皮質へ接種する実験を行うと (Ueno et al., Cell Rep 2018)⁸、脊髄の中心管直下で同様の細胞群が標識されるケースがあることを、また偶然見出した。接種の際、脳脊髄液に漏れた AAV が感染し CSF-cNs を標識した可能性を考え、脳室内へ AAV を直接投与してみたところ、この方法で CSF-cNs を選択的に標識できることを発見した (図 1B)。この手法は、CSF-cNs に任意の遺伝子を導入し、可視化や操作を可能とすることから、未知のままである CSF-cNs の神経構造や機能を理解する突破口になると考えた。

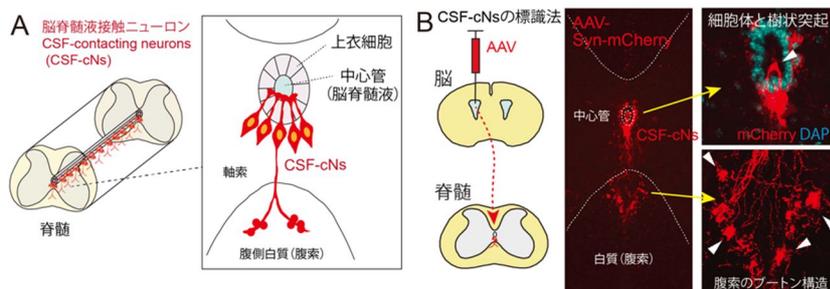


図 1. 脳脊髄液接触ニューロン Cerebrospinal fluid-contacting neurons (CSF-cNs). A. CSF-cNs の位置と構造. B. AAV による標識法の確立.

2. 研究の目的

本研究では、脳脊髄液に接し、100 年来機能が未知のままである CSF-cNs の構造や接続、機能を明らかにすることを目的とした。独自に見出した CSF-cNs の特異的標識法を足がかりとして、多様な標識と操作法を確立することで、CSF-cNs の実体解明をおこなった。中枢神経に内在する新たな細胞システムの理解へつなげると考えた。

3. 研究の方法

(1) CSF-cNs の標識・操作法の確立: 麻酔下において、各種のプロモーター下で蛍光タンパク質を発現する AAV をマウス脳室内へ注入し、CSF-cNs を選択的に標識する条件を探索した。条件を確かめた後、CSF-cNs の標識と操作を可能とする AAV ライブラリーを作製した。

(2) CSF-cNs の細胞構造の解明: 上記の蛍光タンパク質発現 AAV を用いた方法で、CSF-cNs を標識し、脊髄切片で組織学的解析を行った。また CUBIC 法を用いて脊髄を透明化

し、CSF-cNs の 3 次元構造を観察した。1 細胞標識では、Cre 発現 AAV を lox-stop-lox-Tomato レポーターマウスの脳室内に注入し、3 次元構造を観察した。

(3) 電子顕微鏡による細胞構造の解明： AAV を用い、CSF-cNs にミトコンドリア標識 COX4-dAPEX2 あるいはプレシナプス標識 SYP-HRP を発現させて標識した後、DAB 染色し、Serial Block Face SEM (SBF-SEM) を行い、3 次元的な電子顕微鏡観察を行った。

(4) CSF-cNs 接続の電気生理学的解析： Pkd2l1-Cre;lox-stop-lox-EGFP マウスにおいて、脊髄後部に位置する CSF-cNs にチャンネルロドプシンを発現させた後、前方の脊髄スライスを作製した。吻側へ伸びる CSF-cNs の軸索を光刺激し、EGFP 標識 CSF-cNs においてパッチクランプを行い、その応答を記録した。

(5) CSF-cNs の脊髄内回路の接続様式の解明： CSF-cNs が作る脊髄内神経回路網を明らかにするため、各種脊髄介在ニューロンを標識する Cre;lox-stop-lox-EGFP マウスにおいて、AAV で蛍光標識した CSF-cNs と EGFP 標識脊髄介在ニューロンの接続を組織学的に観察した。また各筋に逆行性の EGFP 発現 AAV を注入して運動ニューロンを標識し、AAV で蛍光標識した CSF-cNs との接続を組織学的に観察した。

(6) CSF-cNs の機能の解明： AAV で CSF-cNs に Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs (DREADD) である hM4Di を発現させ、clozapine N-oxide (CNO) を投与して化学遺伝学的に活動を抑制した。活動抑制により起こる運動機能の変化を各種の運動テストで解析した。マウスのトレッドミル上での走行をハイスピードカメラで撮影し、DeepLabCut を用いて各関節の座標情報を自動的に抽出し、3 次元キネマティック解析を行った。またはしごや棒上での歩行能力を解析した。

4 . 研究成果

(1) マウス CSF-cNs の標識法の確立： 蛍光タンパク質発現 AAV を側脳室に直接注入すると、中心管周囲において、樹状突起を中心管内へ伸ばす細胞を特異的に標識できた (図 1 B)。この細胞は PKD2L1 を発現しており、CSF-cNs を特異的に標識できる方法とわかった。特に Synapsin プロモーター、血清型 1/2 の AAV で標識できるとわかった。一方この手法は、脳弓下器官 (subfornical organ, SFO) や終板器官 (organum vasculosum laminae terminalis, OVLT)、最後野 (area postrema, AP) など、脳室周囲器官も標識することがわかった。そこで、DIO 配列をもつ AAV を、Pkd2l1-Cre マウスの脳室内に投与することで、さらに特異的な標識を可能とした。この方法は、Pkd2l1 mRNA を発現するオリゴデンドロサイトの標識も排除できた。

(2) マウス CSF-cNs の構造の解明： 次に、AAV による蛍光タンパク質標識法を用いて、CSF-cNs の細胞構造の詳細を観察した。細胞体は、中心管を裏打ちする上皮細胞の直下に整列し、繊毛様構造を持つ樹状突起を脳脊髄液面に伸ばしていた。一方軸索は、正中腹側の白質内 (腹索) へ伸び、GABA プレシナプスマーカー (GAD65 など) を発現する bouton が集まった房状構造を持つことがわかった (図 1 B)。脊髄を透明化し 3 次元で観察すると、腹索では、軸索が束を作り前後軸に伸びていることがわかった。さらに、1 細胞の標識を試みたところ、頸髄から仙髄に至る 71 個の細胞構造の追跡ができた。腹索では 1800 ~ 7800 μ m におよぶ無髄線維を吻側へ伸ばし、その後、複数の側枝を中心管へ戻していくことがわかった (図 2 A)。さらにこの側枝は、中心管周囲で他の CSF-cNs へ接続していることがわかった (図 2 A)。SYP-HRP や COX4-dAPEX2 で CSF-cNs を標識し、SBF-SEM で 3 次元の電子顕微鏡観察を行なったところ、CSF-cNs は、他の CSF-cNs の軸索末端の入力を受け、

シナプス構造をつくるとわかった。さらに、電気生理学的に解析すると、脊髄後部から伸びるチャンネルロドプシン発現 CSF-cNs 軸索の光刺激により、吻側 CSF-cNs で抑制性シナプス後電流 (IPSC) を引き起こすことがわかった。以上から、CSF-cNs は吻側の CSF-cNs の活動を抑制する反回性の回路を持つことがわかった(図 2C)。

(3) CSF-cNs による運動制御機能の解明：最後に、マウスの CSF-cNs が運動の制御に関わるか調べるため、運動に関連する脊髄ニューロンとの接続を調べた。まず、脊髄前角の内側に位置し、体幹筋を支配する運動ニューロンが、樹状突起を中心管周囲と腹索へ伸ばし、CSF-cNs の軸索とシナプス接続することを組織学的に見出した(図 2B)。さらに運動の制御に関わることが知られるアセチルコリン作動性およびグルタミン酸作動性 V2a 介在ニューロンとシナプス接続することを組織学的に見出した。そこで CSF-cNs が運動の制御に関わるのか調べるため、化学遺伝学的手法を用い、CSF-cNs の活動を抑制して運動中におこる変化を観察した。さまざまな運動テストを行い観察したところ、トレッドミルにおいて走行できる速度が

顕著に低下することがわかった(図 2B)。特にステップ頻度の低下と歩幅の増加が認められた。さらに、はしご上での歩行にも異常が認められた。以上から、マウスの CSF-cNs は、スムーズな歩行運動の遂行に必要であることが明らかとなった。

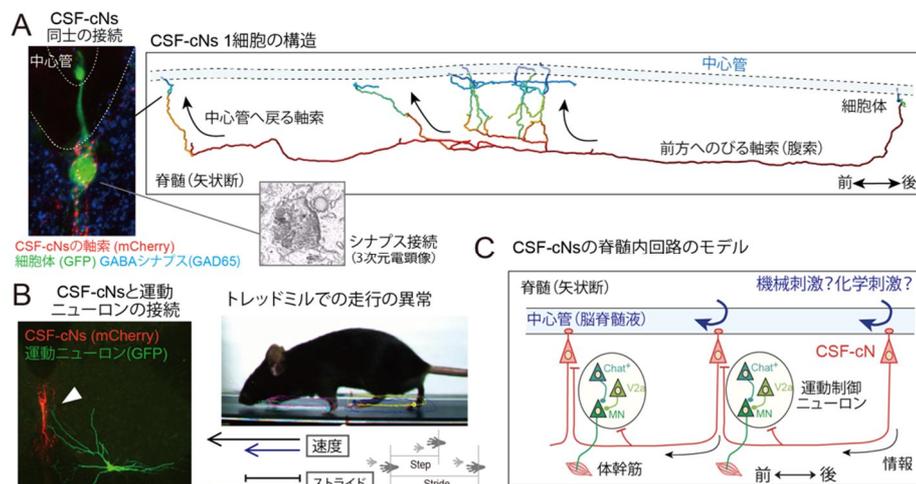


図 2. CSF-cNs の接続様式と機能 . A. CSF-cNs の 1 細胞標識による構造と接続 . B. CSF-cNs の運動関連ニューロンとの接続と不活化によるトレッドミル走行の異常 . C. CSF-cNs の持つ脊髄内の接続様式 (モデル) .

ズな歩行運動の遂行に必要であることが明らかとなった。

(4) まとめと今後の展望：本研究では、マウス CSF-cNs の特異的な解析方法を確立することで、CSF-cNs の持つ脊髄内の接続様式と歩行運動への関与が明らかとなった (Nakamura et al., eLife 2023)⁹。本成果発表と同時期には同様の報告もなされ¹⁰、CSF-cNs は CSF-cNs 同士の反回制御や運動に関連するニューロンの抑制制御によって、歩行に関わるニューロンの発火やタイミングを調節すると示唆された(図 2C)。ゼブラフィッシュ幼生では、機械受容により遊泳中の体軸の変化を感知し、遊泳の運動回路を制御することが報告されている^{4-5,11}。マウスをはじめとする哺乳類では、四肢の固有感覚系が発達しているが、CSF-cNs が何の入力を受け情報伝達するのか、化学受容の可能性も含め不明のままである。CSF-cNs は延髄後部から脊髄に広範に存在することから、脳脊髄液の情報を広く探知し、また本成果から、脊髄内で巨大なネットワークを形成して情報伝達していると考えられた。本研究で見出した手法は、脳脊髄液-中枢神経回路をつなぐ CSF-cNs の仕組みの更なる解明に貢献すると考えられる。

< 引用文献 >

1. Agduhr E. (1922). Über ein zentrales Sinnesorgan (?) bei den Vertebraten. Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte 66, 223-360.

2. Kolmer W. (1921). Das Sagittalorgan der wirbeltiere. *Zeitschrift Anat Entwicklungsgesch* 60, 652-717.
3. Vigh B., Manzano e Silva MJ., Frank CL, et al. (2004). The system of cerebrospinal fluid-contacting neurons. Its supposed role in the nonsynaptic signal transmission of the brain. *Histol Histopathol* 19, 607-628.
4. Böhm UL, Prendergast A, Djenoune, L, et al. (2016). CSF-contacting neurons regulate locomotion by relaying mechanical stimuli to spinal circuits. *Nat Commun* 7, 10866.
5. Fidelin K, Djenoune L, Stokes C, et al. (2015). State-dependent modulation of locomotion by GABAergic spinal sensory neurons. *Curr Biol* 25, 3035-3047.
6. Hubbard JM, Bohm, UL, Prendergast A, et al. (2016). Intraspinal sensory neurons provide powerful inhibition to motor circuits ensuring postural control during locomotion. *Curr Biol* 26, 2841-2853.
7. Huang AL, Chen X, Hoon MA, et al. (2006). The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature* 442, 934-938.
8. Ueno M, Nakamura Y, Li J, et al. (2018). Corticospinal circuits from the sensory and motor cortices differentially regulate skilled movements through distinct spinal interneurons. *Cell Rep* 23, 1286-1300.e1287.
9. Nakamura, Y., Kurabe, M., Matsumoto, M., Sato T, Miyashita S, Hoshina K, Kamiya Y, Tainaka K, Matsuzawa H, Ohno N, Ueno M. (2023). Cerebrospinal fluid-contacting neuron tracing reveals structural and functional connectivity for locomotion in the mouse spinal cord. *eLife*, 12: e83108, 2023.
10. Gerstmann K, Jurčić N, Blasco E, Kunz S, de Almeida Sassi F, Wanaverbecq N, Zampieri N. (2022). The role of intraspinal sensory neurons in the control of quadrupedal locomotion. *Curr Biol* 32, 2442-2453.
11. Orts-Del'Immagine A, Cantaut-Belarif Y, Thouvenin O, et al. (2020). Sensory neurons contacting the cerebrospinal fluid require the Reissner fiber to detect spinal curvature in vivo. *Curr Biol* 30, 827-839.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1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 Nakamura Y, Kurabe M, Matsumoto M, Sato T, Miyashita S, Hoshina K, Kamiya Y, Tainaka K, Matsuzawa H, Ohno N, Ueno M	4. 巻 12
2. 論文標題 Cerebrospinal fluid-contacting neuron tracing reveals structural and functional connectivity for locomotion in the mouse spinal cord.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e83108
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.83108	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 中村由香、上野将紀	4. 巻 55
2. 論文標題 脳脊髄液接触ニューロン：脳脊髄液センサーとしての可能性を探る	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 32-36
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Ueno M
2. 発表標題 Exploring sensorimotor circuits in the spinal cord.
3. 学会等名 オース大学DANDRITE研究所-新潟大学脳研究所連携シンポジウム（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nakamura Y, Kurabe M, Matsumoto M, Sato T, Miyashita S, Hoshina K, Kamiya Y, Tainaka K, Matsuzawa H, Ohno N, Ueno M
2. 発表標題 Structural and functional connectivity of cerebrospinal fluid-contacting neurons to regulate locomotion in the mouse spinal cord.
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会
4. 発表年 2023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
研究 分担 者	倉部 美起 (Kurabe Miyuki) (30635579)	新潟大学・医歯学系・助教 (13101)	

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