

単一ニューロン記録からわかる小脳神経回路の正常と異常

石 川 太 郎

東京慈恵会医科大学薬理学講座

CEREBELLAR CIRCUIT PHYSIOLOGY AND PATHOPHYSIOLOGY REVEALED BY SINGLE CELL RECORDINGS

Taro ISHIKAWA

Department of Pharmacology, The Jikei University School of Medicine

Basic research on the function of the cerebrocerebellar connection has recently advanced. Using in vivo patch-clamp and optogenetic manipulations, we provide functional evidence that direct trigeminal signals and indirect signals from the primary somatosensory cortex converge on the same granule cells in the cerebellum. We show that this integration affects not only granule cell spiking, but also Purkinje cell spiking. Furthermore, we show that climbing fiber inputs to Purkinje cells also depend on activity in the primary somatosensory cortex. We addressed the clinically relevant pathophysiology of the recently identified spinocerebellar ataxia type 42 (SCA42). We used knock-in mice with a point mutation in the *Cacna1g* gene, which encodes the T-type voltage-gated calcium channel CaV3.1, corresponding to the mutation identified in the SCA42 family. Patch-clamp analysis of Purkinje cells in acute cerebellar slices from these mice showed that the point mutation altered the voltage dependence of CaV3.1 channel activation and reduced rebound action potentials after hyperpolarization. Furthermore, in the inferior olivary nucleus of knock-in mice the membrane potential resonance of neurons was decreased. These results indicate that the point mutation in CaV3.1 affects climbing fiber signaling to Purkinje cells. Taken together, our findings promote a better understanding of the cerebellum, the area of the brain whose functions remain unclear.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2023;138:19-31)

Key words : cerebrocerebellar connection, in vivo patch-clamp, optogenetics, spinocerebellar ataxia type, voltage-gated calcium channel

I. は じ め に

本報告では2部構成で、小脳神経回路の正常と異常について、筆者が得た最近の研究結果について説明する。第1部では大脳小脳連関についての基礎的研究¹⁾について、第2部では脊髄小脳変性症42型の病態生理学的研究²⁾について説明する。これらにより、小脳の機能の本質に迫る基礎的研究と、臨床的疾患の治療に関連する研究の双方についての最新の知見を概観する。

II. 第 1 部 緒 言

大脳と小脳の間を相互に結ぶ神経経路があることは古くから解剖学的に知られており、近年のウイルス性トレーサーを使った研究により詳細の確認が進められている³⁾⁻⁵⁾。機能的な神経活動のつながりについても、1970年代のサルやネコを使った電気生理学的研究により、神経連絡が存在することが知られていた⁶⁾⁻⁸⁾。近年では、ヒトのfMRIを使った研究で、大脳と小脳の特定の部位同士の活動性が相関することも知られている⁹⁾。大脳皮

質と小脳の結合は双方向的であり、大脳皮質からは橋核でニューロン交代して小脳皮質に投射する経路（皮質橋小脳路）が主要であり、大脳皮質から橋核に投射する線維はヒトで4千万あると言われており、錐体路を形成する線維（約2百万本）より圧倒的に多い¹⁰⁾。逆に小脳からは、小脳核から出た線維が視床外側腹側核（VL核）でニューロン交代して大脳皮質へ投射する経路が存在する。本報告では前者の皮質橋小脳路に主に着目するとともに、もう一つの小脳への入力経路である下オリブ核を経由する経路についても言及する。

小脳皮質への入力線維として、顆粒細胞に投射する苔状線維とプルキンエ細胞に投射する登上線維の2種類がある。苔状線維の主要な一群は、上述の皮質橋小脳路として、脳幹の橋核から投射するものである。これに加えて、脊髄や三叉神経核などの脳幹核から発生し、末梢からの感覚信号を直接伝達する苔状線維も多く存在する。1970年代以降の研究により、脊髄や三叉神経核に起始して身体の一部からの体性感覚信号を伝達する苔状線維と、これと同じ体部位に対応する大脳皮質体性感覚野からの信号を伝達する大脳皮質・橋系の苔状線維が、小脳の同じ部位に投射することが明らかにされた⁸⁾¹¹⁾¹²⁾。しかし、これらの入力異なる顆粒細胞群に投射されるのか、あるいは同一の顆粒細胞に収束するのかは、単一細胞レベルではまだ明らかでなく、小脳回路がどのような信号処理を行っているのかを理解するために重要な問題である。

小脳顆粒細胞は電氣的にコンパクトな細胞であり、少数（平均4本程度）の苔状線維からシナプス入力を受けている。逆に見ると、1本の苔状線維は、多数（数百以上）の顆粒細胞に投射している¹³⁾¹⁴⁾。このような特徴から、MarrとAlbusは苔状線維-顆粒細胞系が情報の神経表現を拡張するという仮説をそれぞれ独自に提唱した¹⁵⁾¹⁶⁾。この考えは、拡張再符号化（expansion recoding）仮説と呼ばれ、個々の顆粒細胞は、異なる種類の信号を伝える苔状線維のほぼランダムな組み合わせから入力を受け、それによって多数の組み合わせパターンが作られるとしている。この仮説を実験的に検証することは長年技術的に難しかったが、近年のin vivoパッチクランプ記録法の進歩により、

アプローチできる道が開けた。本報告では、三叉神経からの直接信号と一次体性感覚野（S1）からの間接信号が同一の顆粒細胞に収束することを、in vivoパッチクランプと光遺伝学的操作によって機能的に証明するとともに、プルキンエ細胞への登上線維入力もS1の活動に依存することを示す。

III. 第 1 部 方法

近年の神経科学では、光遺伝学（optogenetics）が広範に応用されている。藻類クラミドモナスから得られた光感受性イオンチャネルであるチャネルロドプシン2を遺伝子導入して、特定のニューロンを光照射により活性化する方法である¹⁷⁾。本報告では、小胞GABAトランスポーターのプロモーターによりGABA性ニューロンにeYFPと改変ChR2（hChR2-H134R）を発現するトランスジェニックマウス（VGAT-ChR2 マウス, Jackson Laboratory #014548）¹⁸⁾を用いた。このマウスの脳では、光照射により抑制性ニューロンが活性化するため、周辺のニューロン全てが抑制される。これにより、瞬時に時限的に特定の領域のみを抑制することができる。光照射には高出力青色LED（470 nm）に接続した光ファイバを用いた（Fig. 1）。

動物実験は、東京慈恵会医科大学動物実験規程に則り、同委員会の審査を経て学長の承認を得て行った（動物実験計画番号2015-054 および2017-001）。VGAT-ChR2マウスのヘミ接合体（生後3~8週、雌雄）を使用した。ケタミン（86 mg/kg）とキシラジン（10 mg/kg）の混合液でマウスを麻酔し、その後ケタミン（70 mg/kg/h）とキシラジン（8 mg/kg/h）の持続投与で、自発呼吸を維持するレベルに麻酔を維持した。頭蓋骨に接着したヘッドポストによりマウスの頭部を所定の位置に固定し、開頭術により左小脳のcrus II領域と右大脳皮質体性感覚野を露出した。硬膜除去後は露出した脳表面をHEPES緩衝食塩水で湿らせた。覚醒マウスからの記録では、記録の3日以上前に手術により固定具を取り付け、記録日にイソフルラン麻酔下で開頭術を行った。その後、マウスを記録環境に1時間以上順応させてから記録を開始した。

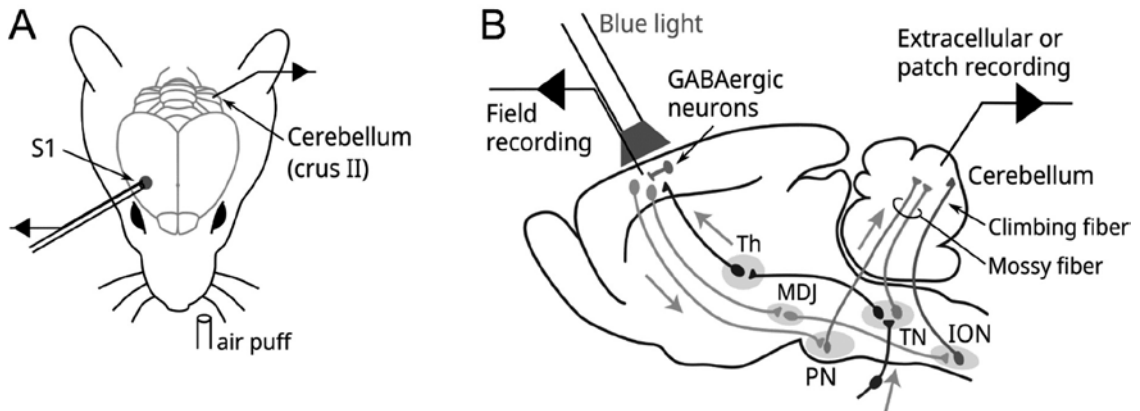


Fig.1. Experimental scheme and cerebrocerebellar connection. (A) Tactile stimulation (air puff) was applied to the left upper lip while field potentials were recorded from the granule cell layer of the ipsilateral cerebellar crus II and the upper lip area of the contralateral S1. S1 was optogenetically suppressed in alternating trials. (B) Schematic of the neural circuit involved in this study.

小脳皮質の crus II の 200–400 μm の深さの顆粒細胞から、既報¹⁹⁾と同様に抵抗誘導（ブラインド）法により、*in vivo* パッチクランプ記録を行った。顆粒細胞は、膜容量が小さく、膜抵抗が高く、周期的な自発発火がないことを基準として同定した。プルキンエ細胞からの細胞外ユニット記録は、生理食塩水を満たしたガラス電極（5 M Ω ）を用いて行い、単純スパイク（SS）と複雑スパイク（CS）の発生により同定した。大脳皮質の電場電位は、一次体性感覚野の上唇の感覚受容野において 500–600 μm の深さで、タングステン電極（1M Ω ）を用いて記録した。マウスの上唇にプラスチックチューブから 50 ミリ秒の短い空気圧刺激を与えることで、触覚刺激を惹起した。

IV. 第 1 部 結果

三叉神経核から直接投射する苔状線維と大脳皮質と橋核を経由して投射する苔状線維が個々の顆粒細胞に収束しているかどうかを調べるために、麻酔下マウスの小脳 crus II の顆粒細胞から電位固定ホールセル・パッチクランプ記録を行った。上唇の刺激によって誘発される興奮性シナプス後電流（EPSC）は、Figure 2A の典型例に見られるように、S1 の応答よりも先に現れる早い EPSC と、S1 の応答より後に現れる遅い EPSC の 2 つの成分を有していた。遅い EPSC は S1 の光遺伝学的抑制によりほとんど消失した（Fig. 2B）。このことから、

遅い成分は S1 由来であり、このような 2 成分を持つ顆粒細胞には、三叉神経核小脳路と橋小脳路の 2 種類の苔状線維が収束していることが示された。このような 2 成分を示す応答は、50 %（24 個中 12 個）の顆粒細胞で見られた。しかし、他の顆粒細胞では、早い応答のみ（12.5 %）または遅い応答のみ（25 %）を示した。残りの 12.5 % の顆粒細胞では上唇刺激に対する反応がなかった（0.5 個の EPSC イベント/トライアルを閾値とした）（Fig. 2C）。これらの結果から、顆粒細胞は 2 種類の苔状線維から収束的な入力を受けているが、そのバランスは細胞によって異なることがわかった。

このようなシナプス入力が顆粒細胞の活動電位発火にもたらす影響を知るために、電流固定で膜電位記録を行ったところ、早い成分で生じた脱分極は、遅い成分のタイミングまで維持されていた。このことは、遅い成分のタイミングにおける活動電位の発火が時間的加重によって促進される可能性を示唆していた。さらに、現実的な顆粒細胞の計算モデルを用いてシミュレーションを行ったところ、時間的加重によって遅い相の発火が促進されることが確認された。

次に、S1 の抑制が、小脳回路において顆粒細胞の下流に位置するプルキンエ細胞の発火にどのような影響を与えるかを検討した。一般に、プルキンエ細胞の単純スパイク（SS）は自発的に発生し、平行線維（すなわち顆粒細胞軸索）からの

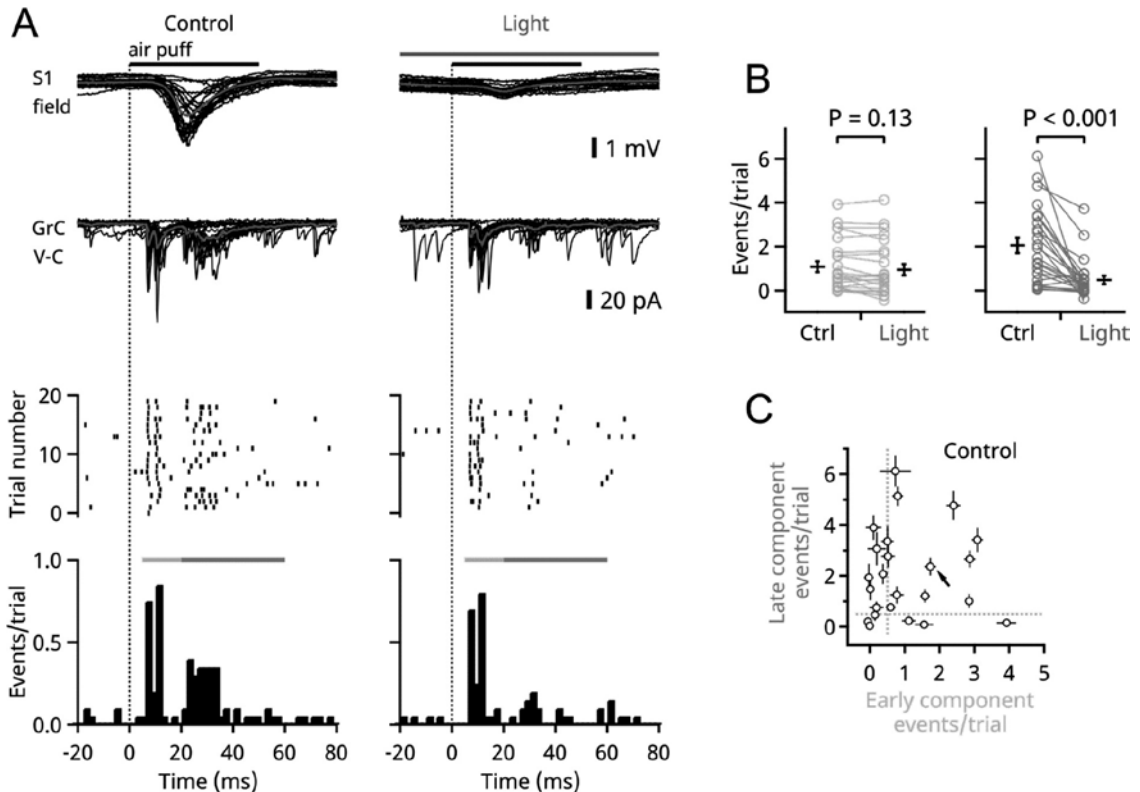


Fig.2. In vivo whole-cell recordings from granule cells revealed convergent synaptic inputs. (A) Representative recordings; simultaneous field potential recording from S1 (top) and whole-cell voltage-clamp recordings from a granule cell (bottom); 20 consecutive traces are superimposed. The averaged traces are shown in red. Detected EPSC events are shown in raster plots (middle) and time histograms (bottom). Light and dark grey bars indicate early and late phases, respectively. Trials under control (left) and light (right) conditions were interleaved. (B) The number of evoked EPSC events in the early and late phases was compared in 24 cells. Error bars indicate SEMs (trial-by-trial variation). (C) The number of EPSC events was compared for the early phase (left) and the late phase (right) ($n = 24$). Error bars indicate SEMs. The arrow points to the cell recorded in A.

興奮性シナプス入力と分子層の介在ニューロンからの抑制性シナプス入力の影響を受ける。一方で、複雑スパイク (CS) は登上線維入力のみによって惹起される。コントロール条件下 (S1 抑制なし) では、マウスの上唇への刺激による SS には、早い興奮相 (刺激開始後 10 ms 以内)、早い抑制相 (10–20 ms 前後)、遅い興奮相 (20–30 ms 前後)、遅い抑制相 (30–60 ms) の 4 相が存在した (Fig. 3A–C)。CS は SS の遅い抑制相のタイミングと一致した。S1 の光抑制は SS の早い 2 つの相に影響を与えず、遅い興奮相と抑制相を消失させた (Fig. 3C)。これらの結果は、顆粒細胞への三叉神経核からの直接入力に SS の早い興奮相と抑制相を引き起こし、後者はおそらく分子層介在ニューロン

の活性化によってもたらされることを示唆しており、SS の遅い応答は S1 からの入力を反映していることも示唆している。さらに興味深いことに、S1 の光抑制により CS も消失した (Fig. 3C)。引き続き、新皮質の複数の部位で光抑制の効果を検証したところ、対側の S1 の上唇領域の抑制が小脳プルキンエ細胞の CS の遮断に最も有効であることがわかった (Fig. 3D)。また、長い光刺激 (10 秒) で S1 を抑制すると、CS の自発発火が抑制され、光を消した後にリバウンド活性化が誘発されたことから、登上線維の起始核である下オリーブの自発活動は S1 の強い制御下にあることが示唆された。

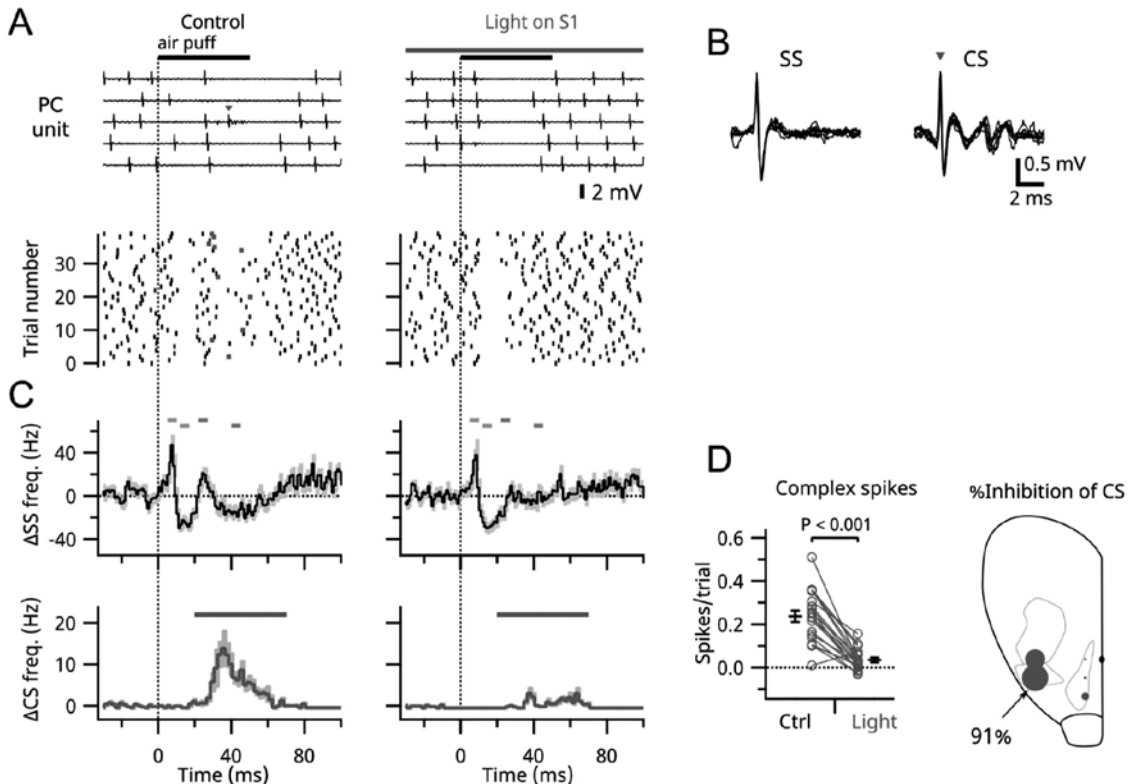


Fig.3. Effects of S1 photoinhibition on SS and CS in Purkinje cells. (A) Representative extracellular unit recordings from a Purkinje cell; five traces are shown (top). Simultaneous field potential recordings from S1 are not shown. SS (black) and CS (grey squares) are shown in the raster plots (bottom). (B) Enlarged views of SS and CS from the unit shown in A; six traces each have been aligned and superimposed. (C) Averaged time histograms of SS (1 ms bin) and CS (2 ms bin) from 20 Purkinje cells. Shading indicates SEMs. Vertical dotted lines indicate the onset of stimulation as in A. (D) Bubble size indicates the magnitude of inhibition of cerebellar CS when blue light was applied to each point in the right cerebral hemisphere. The magnitude of inhibition correlated significantly with the size of the field potential at each site ($P = 0.011$, $n = 5$ sites). Data from six animals were pooled. Each spot is the average of 3-6 animals.

V. 第 1 部 考察

本研究では、電気生理学と光遺伝学の高い時間分解能を生かして、crus IIの小脳顆粒細胞が末梢から直接入力と、S1を介した間接入力を受けていることを示す生理学的な証拠を得た。約半数の顆粒細胞が両方の経路から収束的な信号を受け取っていた。また、プルキンエ細胞への小脳の入力が、S1の同じ領域を経由していることも明らかにした。

最近の複数の実証的研究³⁾¹⁹⁾²⁰⁾では、顆粒細胞が異なる種類の情報を運ぶ苔状線維から入力を受けるというMarrとAlbusの従来の仮説^{15), 16)}が支持されている。しかし、個々の顆粒細胞は1種類

の入力しか受けていないという説を支持する実験結果も報告されている^{21)~23)}。本研究では、一つの触覚刺激で三叉神経核からの直接路と大脳皮質経由の両方の信号が誘発されるが、これらの信号は小脳に至る経路で異なる修飾を受けるため、相対的に異なるものであると考えられる。例えば、麻酔や覚醒といった大脳皮質の状態によって両信号は異なる影響を受け、試行間の揺らぎも異なる。さらに、マウスのS1は脳幹に直接求心性の運動信号を送っているため、我々が観測した大脳皮質の信号は、実際には運動指令の求心性コピーである可能性がある。このように、三叉神経と大脳皮質の信号の違いは大きいことから、我々の結果はMarrとAlbusの仮説に合致すると言える。

さらに、本研究ではプルキンエ細胞が大腦皮質から苔状線維-平行線維経路だけでなく、登上線維を経由して信号を受け取っていることが明らかになった。このことは、6+コンパートメント (D1バンド) のプルキンエ細胞が、腹側主オリーブ核からの登上線維からの入力を受けるという解剖学的観察結果と一致している²⁴⁾。また、本研究は、ネコやサルにおいて、特定の大脳皮質領域から苔状線維と登上線維の信号が小脳の同じ領域に収束することを示した古典的な生理学的研究⁶⁾²⁵⁾と軌を一にするものである。しかし、我々の知る限り、S1が感覚誘発性の登上線維応答を中継することを直接的に証明したのは本研究が初めてである。一方、他の最近の研究では、マウスで大腦皮質を抑制してもCSは抑制されることが報告されている²⁶⁾。この相違の理由は不明であるが、彼らが大腦皮質の内側部分のみを抑制したことが原因かもしれない。この大腦皮質-下オリーブ-小脳経路の生理的意義は、特にそれに付随する大腦皮質-橋-小脳経路を考えると、興味深い。このような2重の経路の存在は、大腦皮質が小脳の信号処理に対して強力な制御を行っていることを示唆している。例えば、大腦皮質-橋-小脳経路と大腦皮質-下オリーブ-小脳経路で平行線維と登上線維が同時に活性化されると、大腦皮質からの信号がプルキンエ細胞のシナプス可塑性を誘発する可能性がある。このようなトップダウンのシグナル伝達は、覚醒時だけでなく、オフライン活動として睡眠中に起こる可能性もあるだろう²⁷⁾。

VI. 第2部 緒言

脊髄小脳失調症42型 (SCA42) は、最近発見された優性遺伝型の脊髄小脳失調症であり、主に若年成人期に発症する。小脳の萎縮と小脳プルキンエ細胞の変性を伴う緩徐進行性運動失調であり、主に小脳純粋型として報告されている²⁸⁾²⁹⁾。電位依存性カルシウムチャネルのサブユニットの α_1G (*CACNA1G*) の点変異c.5144G>A (p.Arg1715His) が原因であることが判明している。

電位依存性カルシウムチャネルは、電位依存性活性化の閾値に基づいて、低電位活性化型 (T型) と高電位活性化型 (L型, P/Q型, N型, R型) に

分類される³⁰⁾。*CACNA1G*は、T型電位依存性カルシウムチャネルの一つであるCav3.1をコードし、小脳プルキンエ細胞に加えて、小脳核、視床、海馬、下オリーブ核 (ION) のニューロン等に発現する³¹⁾。Cav3.1は、これらのニューロンのリバウンドバースト発射など、カルシウムの流入および膜電位調節における重要な役割を担っている³²⁾。そのため、Cav3.1の変異は、SCA42以外にも、特発性全般化てんかん、自閉症スペクトラム障害、小児発症性小脳萎縮症などの様々な障害と関連している。このようにCav3.1変異による表現型は多様であるため、p.Arg1715His変異とSCA42の表現型との因果関係を明らかにすることは非常に重要である。

報告者と共同研究を行っている横浜市立大学医学部神経内科学・脳卒中医学のグループが、ヒトのp.Arg1715His変異に対応するp.Arg1723His変異を保有するノックイン・マウス (*Cacnalg-Arg1723His-KI* マウス) を作成した。このモデルマウスでは、運動失調とプルキンエ細胞の変性が認められ、これはヒトの患者における観察結果を再現していると言える。本報告では、このマウスを用いた電気生理学的解析の結果を報告する。Cav3.1チャネルの電位依存性の変化、プルキンエ細胞およびIONニューロンの活動電位発火特性の変化が示された。これらの結果からSCA42が*CACNA1G*の点変異に起因する「チャンネル病」であることを証明する。

VII. 第2部 方法

動物実験は、東京慈恵会医科大学動物実験規程に則り、同委員会の審査を経て学長の承認を得て行った (動物実験計画番号2017-015)。CRISPR/Cas9技術を使用して作成されたノックイン・マウスである*Cacnalg Arg1723His-KI* マウスを使用した²⁾。プルキンエ細胞からの電位依存性Ca²⁺電流の記録には、未熟な (生後6~9日齢) マウスを用いた。これは、成熟マウスでは樹状突起が伸びているため、電位固定による膜電位の制御が困難なためである。出生後の成熟度と脳スライスでの細胞生存率の最適なバランスを考慮し、プルキンエ細胞からの電流固定記録には12~18日齢、

それ以外の記録には19~24日齢のマウスを用いた。マウスをイソフルランによる深麻酔下で断頭し、小脳矢状断スライス(厚さ300 μm)またはIONを含む脳幹横断スライス(厚さ300 μm)をビブラトームを用いて切断した。インキュベーションと記録用の人工脳脊髄液の組成は(mM単位にて)、125 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 Na_2HPO_4 , 1 MgCl_2 , 2 CaCl_2 , 2 Na pyruvate, 3 myo-inositol, 0.5 Na ascorbate, 26 NaHCO_3 および 10 D-glucose であり、95% O_2 と 5% CO_2 でバブリングした。 Ca^{2+} 電流は、カリウム、AMPAおよびGABA電流を薬理的に遮断することにより単離した。 $\text{Ca}_v3.1$ 電流を単離するために、 ω -agatoxin IVA (400 nM) と ω -conotoxin GVIA (2 μM) を投与して他の Ca^{2+} 電流を遮断し、P/6プロトコルを用いてリーク電流と容量性電流を差し引いた。電流電圧曲線(IV曲線)は、200msの電位ステップによるT型 Ca^{2+} 電流を正規化して平均にしたものである。活性化曲線はボルツマン方程式でフィッティングした。プルキンエ細胞とIONニューロンから電流クランプ記録を行った。

IONニューロンの共鳴は、1 μM TTX存在下で、一定振幅(400 pA)の正弦波電流を20秒間に1 Hzから18 Hzまで徐々に周波数を変化させながら注入することにより測定した。複素インピーダンスの大きさは、電位応答の高速フーリエ変換を、注入電流の大きさで割ることで算出した。共鳴強度は、1 Hzでのインピーダンスの大きさで正規化したときの最大インピーダンスの大きさとして定義した³³⁾。

プルキンエ細胞からの興奮性シナプス後電流(EPSC)の記録においては、抑制性シナプス電流をブロックするため、細胞外液に100 μM のピロトキシンを添加した。平行線維EPSCの記録では-70 mVに、登上線維EPSCの記録では-20 mVにプルキンエ細胞を電位固定した。

VIII. 第2部 結果

*Cacnalg*は小脳プルキンエ細胞に高発現している。 $\text{Ca}_v3.1$ 変異がチャンネル機能に与える影響を調べるため、急性小脳スライスのプルキンエ細胞からT型 Ca^{2+} 電流のホールセル電位固定記録を行っ

た。P/Q型およびN型 Ca^{2+} チャンネルのブロッカーの存在下で、プルキンエ細胞の脱分極ステップによって誘発される電流はT型 Ca_v2+ 電流であると考えられる(Fig. 4A)。実際、T型 Ca^{2+} チャンネルブロッカーTTA-P2 (3 μM)により、残りの電流は大部分が遮断された。T型 Ca^{2+} 電流の最大振幅は、*Cacnalg*遺伝子型の間で同程度であった。しかし、コマンド電位に対して電流振幅をプロットすると、変異型*Cacnalg*では曲線が右側にシフトしていることがわかった(Fig. 4B)。半活性化電位(half-activation potential)は、ホモ接合体変異マウスでは野生型マウスより陽性であったが、ヘテロ接合体変異マウスでは野生型マウスと有意差はなかった(Fig. 4C)。Half-inactivation potential や slope factor には変異の有意な影響は見られなかった。また、活性化、不活性化、脱活性化速度にも有意差は認められなかった(各遺伝子型につきn = 6細胞)。これらの結果は、p.Arg1723His変異がプルキンエ細胞のT型 Ca^{2+} 電流の電位依存性を変化させることを明らかにした。

$\text{Ca}_v3.1$ 変異による Ca^{2+} 電流の電位依存性の変化が発火特性に与える影響を調べるために、プルキンエ細胞から電流固定下での電位記録を行った。静止膜電位および自発発火の頻度は、野生型、ヘテロ接合体およびホモ接合体の間で差がなかった(Fig. 5A-C)。また、自発発火のインターバルの規則性も遺伝子型間で差がなかった。電流注入時(-1 nAから3 nA)の平均発火頻度にも、野生型、ヘテロ接合体、ホモ接合体KIマウスで差がなかった(Fig. 5D)。しかし、過分極電流注入後のリバウンド発火では、ヘテロ接合体およびホモ接合体のプルキンエ細胞では、野生型プルキンエ細胞のレベルに比べ、スパイクの発生が著しく減少していた(Fig. 5E)。なお、すべての遺伝子型において、TTA-P2投与によりリバウンド発火の回数が減少したことから、T型 Ca^{2+} チャンネル活性がリバウンド発火に重要であることが示された。また、Ih電流を反映するsag比は、遺伝子型間で有意な差はなかった(Fig. 5F)。これらの結果は、 $\text{Ca}_v3.1$ p.Arg1723His変異が過分極直後のプルキンエ細胞の興奮性を減衰させることを示唆している。

なお、プルキンエ細胞へ入力するシナプスの伝達を電位固定下で調べたところ、平行線維EPSC

および登上線維EPSCのどちらも、野生型と変異型マウスで差がなかった。さらに、平行線維EPSCのLTDにも異常は検出されなかった。

次に、登上線維の起始核であるIONにおける神経細胞の性質に変化があるかどうかを評価した。IONのCa_v3.1は、膜電位の「共鳴」と呼ばれる性質の増幅に重要な役割を果たすことが示唆されている。共鳴とは、その細胞にとって最適の周波数で膜電位の振動を増強する（つまりインピーダンスを増加させる）性質である³⁴。この特性を評価するために、TTX存在下で専用のコマンド電流を用いた正弦波電流注入を行った（方法参照）。

インピーダンスが最も高くなる周波数は、野生型マウス（Fig. 6A）、ヘテロ接合体（Fig. 6B）およびホモ接合体変異マウス（Fig. 6C）でほぼ同じで6~8 Hz付近であった。インピーダンスの大きさを評価するために、共鳴強度を定義したところ（方法参照）、野生型マウス（ 6.0 ± 0.9 ）と比べてホモ接合体変異マウスでは有意に低かった（ 2.7 ± 0.4 ）。ヘテロ接合体マウスの共鳴強度（ 3.8 ± 0.7 ）はこれらの間に位置した（Fig. 8E）。この結果は、Arg1723His Ca_v3.1変異がIONニューロンの発火を乱し、プルキンエ細胞への登上線維シグナル伝達に影響を与えている可能性を示唆している。

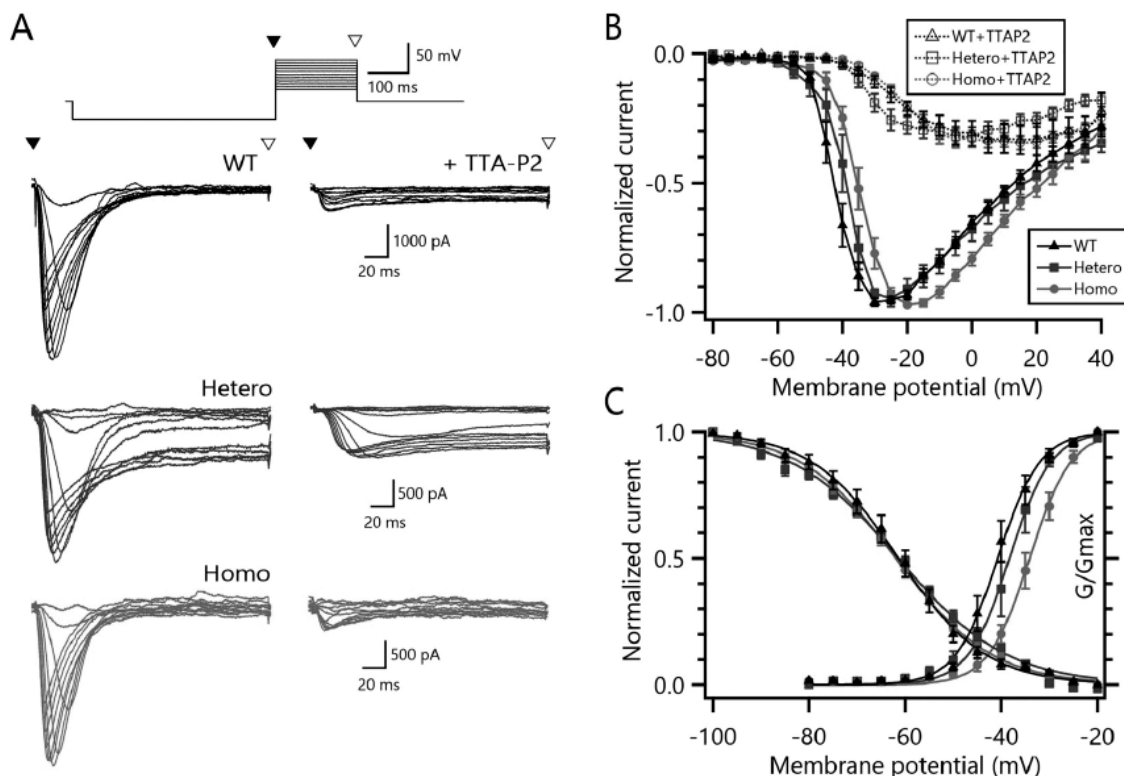


Fig.4. Voltage-clamp analysis of T-type Ca²⁺ currents from WT and Arg1723His mutant Ca_v3.1 channels. (A) T-type Ca²⁺ currents were recorded from Purkinje cells. The top panel represents command voltage steps (5 mV increments) for 200 ms, preceded by a hyperpolarizing step to -100 mV. Traces are representative Ca²⁺ current recordings from WT, heterozygous, and homozygous knock-in (KI) mice before (left) and after (right) 3 μ M TTA-P2 treatment, respectively. Representative traces between -50 and 0 mV are shown (5 mV increments). (B) Current-voltage (IV) plots. Normalized IV plots of T-type Ca²⁺ currents from Purkinje cells of WT, heterozygous, and homozygous KI mice with (dashed symbols) or without (solid symbols) TTA-P2 treatment show a positive shift of the activation voltage in mutant Ca_v3.1. (C) Steady-state activation and inactivation voltage curves. Half-activation potentials were -40.2 ± 1.10 mV in WT mice ($n = 9$ cells from 7 mice), -38.3 ± 1.46 mV in heterozygous KI mice ($n = 8$ cells from 8 mice), and -34.1 ± 1.08 mV in homozygous KI mice ($n = 9$ cells from 8 mice) (WT vs. Homo, $P = 0.0035$; Tukey's multiple comparison test), while slope factors were similar. (figure adapted from ref.2)

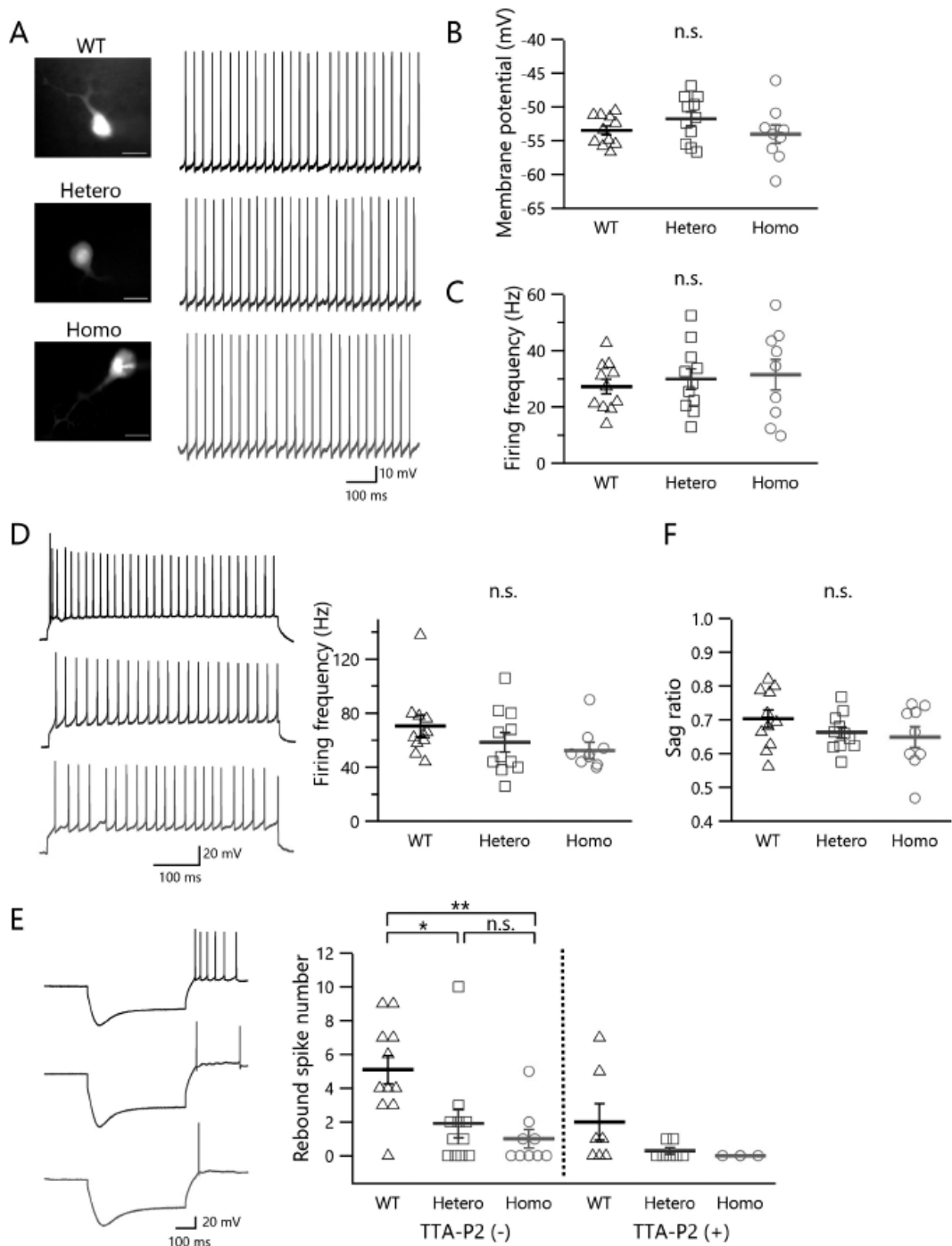


Fig.5. Action potential firing in Purkinje cells from WT and Arg1723His Cav3.1 channels. (A) Spontaneous firing activity in Purkinje cells from wild-type (WT) (top), heterozygous (Hetero) (middle), and homozygous (Homo) (bottom) KI mice. Left panels show fluorescence images of representative Purkinje cells (scale bar, 25 μ m). (B, C) Resting membrane potential (mV) (B) and spontaneous firing frequency (Hz) (C) of Purkinje cells. (D) Left, Representative Purkinje cell firing activity in WT, heterozygous, and homozygous mice in response to depolarizing current injection at 0.5 nA from -70 mV. Right, Mean firing frequency calculated from the number of spikes during 500-ms steps of 0.5 nA currents. (E) Rebound spikes in each genotype. Right, Number of rebound spikes from Purkinje cells before (left) and after (right) TTA-P2 treatment. WT vs. Hetero, $P = 0.031$, WT vs. Homo, $P = 0.0046$; Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison test. (F) Sag ratio distribution in each genotype when a current of -1.0 nA was injected. There was no significant difference among genotypes. Error bars indicate SEM. (figure adapted from ref.2)

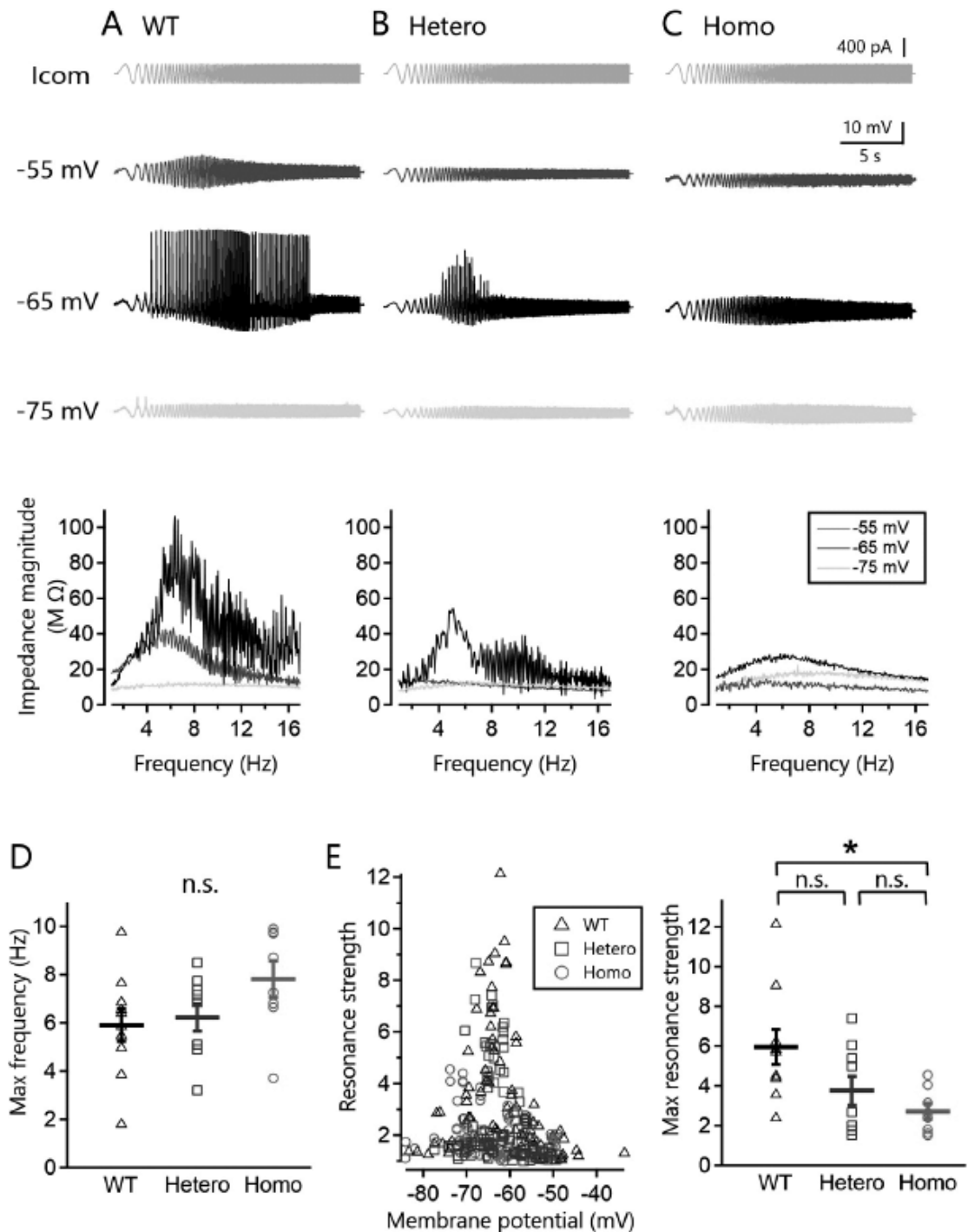


Fig.6. Resonance in ION neurons. (A) Representative voltage waves in response to stimulus current (top gray, 400 pA amplitude) at -55 mV, -65 mV, and -75 mV in wild type. Bottom panel shows the impedance-frequency profile calculated from the above traces. (B) Same as A, but ION neurons from hetero mutant mouse. (C) Same as A, but ION neurons from homo mutant mouse. (D) Maximum frequency, defined as the frequency at which the impedance peaked, is plotted for each genotype. (E) Left, Resonance strength, defined as the ratio of the maximum impedance amplitude to the impedance amplitude at 1 Hz, is plotted against membrane potential. All recordings at different membrane potentials from multiple cells are superimposed. Right, summary plot of maximum resonance strength. Each data point represents the maximum resonance strength for a given cell. Tukey's multiple comparison test. Asterisk indicates $P < 0.05$. Error bars indicate SEM. (figure adapted from ref.2)

IX. 第2部 考察

p.Arg1715His変異によって引き起こされるCav3.1の電位依存性の右方移動はHEK293T細胞の発現系でも報告されている²⁸⁾²⁹⁾。本報告では、この変異が実際にネイティブ組織のプルキンエ細胞において同じように変化させることを示した(Fig. 4)。Arg1715は、脱分極に応答して外向きに移動するS4セグメントに位置し、中心孔の開口を開始するとされており、このようなArg1715の構造的役割が、上述のCa²⁺チャネルの電位感受性の変化の背景にあると考えられる。SCA6はP/Q型Ca²⁺チャネルをコードする遺伝子であるCACNA1AのトリヌクレオチドCAGリピート伸長によって生じるが、この変異ではCa²⁺電流には検出できる変化を生じない³⁵⁾。この点で、本研究はSCA42の病態生理学的基盤がSCA6とは明確に異なることを示している。SCA42では生理的発現レベルのCav3.1のミスセンス変異が、チャネル特性の変化、進行性運動失調、プルキンエ細胞変性などを直接引き起こすことを示した。

さらに本報告では、過分極後のプルキンエ細胞のリバウンド発火が変異マウスで有意に減少することを見出した(Fig. 5)。この結果は、T型Ca²⁺チャネルの電位依存性のわずかな変化でも、プルキンエ細胞のリバウンド発火に大きな影響を与えることを示唆している。T型Ca²⁺チャネルは、視床やDCNにおいて低電位活性化(LVA)カルシウム電流やリバウンドバースト放電を生成することにより、神経細胞出力をバーストモードに変換すると考えられており、小脳のプルキンエ細胞においても同様の役割を担っている可能性がある³⁶⁾。一般に、T型Ca²⁺チャネルの不活性化は過分極状態において解除され、膜電位が静止状態に戻るとT型Ca²⁺チャネルの活性化により膜電位がさらに脱分極し、リバウンド発火が誘発されると考えられる。変異型Cav3.1は開口するより大きな脱分極を必要とするため、SCA42モデルマウスではリバウンド発火が減弱していると考えられる。

一般に、IONニューロンのT型Ca²⁺チャネルは、その共鳴周波数で閾値下膜電位の振動を増幅し、それによって活動電位の発生を促進する重要な役割を果たすとされている³³⁾。成熟した動物では、

各プルキンエ細胞は、IONに細胞体を持つ1本の登上線維から神経支配を受けている。このため、IONの投射ニューロンの発火パターンが変化すれば、プルキンエ細胞の活動に直接影響を与えることになる。タイミング制御と複雑な時間パターンの生成におけるオリブ小脳回路のオッシレーション活動の重要性を考えると、本研究で明らかになったIONの特性(Fig. 6)は、SCA42の病因のとして重要な可能性がある。

以上より、ヒトCACNA1G p.Arg1715Hisに対応するCacnalg p.Arg1723His変異は、プルキンエ細胞だけでなくIONニューロンにおいても電気生理学的異常を引き起こし、運動機能障害を引き起こしていることが示唆された。しかし、これらの異常はプルキンエ細胞細胞死の直接的な原因とは考えにくいため、プルキンエ細胞の変性に至る直接的な病態生理はまだ明らかではない。今後、このモデルマウスを利用して、さらに病態生理を精査するとともに、治療薬の効果の評価を行うことができる。

X. 結 語

本報告では、第1部において正常マウスでの小脳の動作原理を探る基礎的研究について、第2部において脊髄小脳変性症モデルマウスでのニューロン活動の異常を探索する研究について、いずれも進行中の研究プロジェクトからの知見を紹介した。本稿でも紹介したような近年の様々な技術的進歩により、マウスを使った基礎研究は今後もさらに充実して行くことが期待できる。特に、小脳および大脳小脳連関の機能的意義を追求することは、これまで原因不明とされてきた様々な中枢神経疾患の病態解明や治療開発に貢献できる可能性がある。

著者の利益相反(conflict of interest: COI) 開示:

本論文の研究内容に関連して特に申告なし

文 献

- 1) Shimuta M, Sugihara I, Ishikawa T. Multiple signals evoked by unisensory stimulation converge onto cerebellar

- granule and Purkinje cells in mice. *Commun Biol.* 2020; 3: 381.
- 2) Hashiguchi S, Doi H, Kunii M, Nakamura Y, Shimuta M, Suzuki E, et al. Ataxic phenotype with altered CaV3.1 channel property in a mouse model for spinocerebellar ataxia 42. *Neurobiol Dis.* 2019; 130: 104516.
 - 3) Huang C-C, Sugino K, Shima Y, Guo C, Bai S, Mensh BD, et al. Convergence of pontine and proprioceptive streams onto multimodal cerebellar granule cells. *Elife.* 2013; 2: e00400.
 - 4) Henschke JU, Pakan JM. Disynaptic cerebrocerebellar pathways originating from multiple functionally distinct cortical areas. *Elife.* 2020; 9: e59148.
 - 5) Bostan AC, Strick PL. The basal ganglia and the cerebellum: nodes in an integrated network. *Nat Rev Neurosci.* 2018; 19: 338–50.
 - 6) Sasaki K, Oka H, Kawaguchi S, Jinnai K, Yasuda T. Mossy fibre and climbing fibre responses produced in the cerebellar cortex by stimulation of the cerebral cortex in monkeys. *Exp Brain Res.* 1977; 29: 419–28.
 - 7) Brown IE, Bower JM. The influence of somatosensory cortex on climbing fiber responses in the lateral hemispheres of the rat cerebellum after peripheral tactile stimulation. *J Neurosci.* 2002; 22: 6819–29.
 - 8) Allen GI, Tsukahara N. Cerebrocerebellar communication systems. *Physiol Rev.* 1974; 54: 957–1006.
 - 9) Buckner RL. The cerebellum and cognitive function: 25 years of insight from anatomy and neuroimaging. *Neuron.* 2013; 80: 807–15.
 - 10) Schwarz C, Thier P. Binding of signals relevant for action: towards a hypothesis of the functional role of the pontine nuclei. *Trends Neurosci.* 1999; 22: 443–51.
 - 11) Morissette J, Bower JM. Contribution of somatosensory cortex to responses in the rat cerebellar granule cell layer following peripheral tactile stimulation. *Exp Brain Res.* 1996; 109: 240–50.
 - 12) Bower JM, Beermann DH, Gibson JM, Shambes GM, Welker W. Principles of organization of a cerebro-cerebellar circuit. Micromapping the projections from cerebral (SI) to cerebellar (granule cell layer) tactile areas of rats. *Brain Behav Evol.* 1981; 18: 1–18.
 - 13) Cayco-Gajic NA, Silver RA. Re-evaluating circuit mechanisms underlying pattern separation. *Neuron.* 2019; 101: 584–602.
 - 14) Eccles JC, Ito M, Szentágothai J. *The Cerebellum as a neuronal machine.* NY: Springer Science & Business Media; 1967.
 - 15) Marr D. A theory of cerebellar cortex. *J Physiol.* 1969; 202: 437–70.
 - 16) Albus JS. A theory of cerebellar function. *Mathematical Biosciences.* 1971; 10: 25–61.
 - 17) Deisseroth K. Optogenetics. *Nat Methods.* 2011; 8: 26–9.
 - 18) Zhao S, Ting JT, Atallah HE, Qiu L, Tan J, Gloss B, et al. Cell type-specific channelrhodopsin-2 transgenic mice for optogenetic dissection of neural circuitry function. *Nat Methods.* 2011; 8: 745–52.
 - 19) Ishikawa T, Shimuta M, Häusser M. Multimodal sensory integration in single cerebellar granule cells in vivo. *Elife.* 2015; 4: e12916.
 - 20) Chabrol FP, Arenz A, Wiechert MT, Margrie TW, DiGregorio DA. Synaptic diversity enables temporal coding of coincident multisensory inputs in single neurons. *Nat Neurosci.* 2015; 18: 718–27.
 - 21) Bengtsson F, Jörntell H. Sensory transmission in cerebellar granule cells relies on similarly coded mossy fiber inputs. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106: 2389–94.
 - 22) Dean P, Porrill J, Ekerot CF, Jörntell H. The cerebellar microcircuit as an adaptive filter: experimental and computational evidence. *Nat Rev Neurosci.* 2010; 11: 30–43.
 - 23) Spanne A, Jörntell H. Questioning the role of sparse coding in the brain. *Trends Neurosci.* 2015; 38: 417–27.
 - 24) Sugihara I, Shinoda Y. Molecular, topographic, and functional organization of the cerebellar cortex: a study with combined aldolase C and olivocerebellar labeling. *J Neurosci.* 2004; 24: 8771–85.
 - 25) Allen GI, Azzena GB, Ohno T. Somatotopically organized inputs from fore- and hindlimb areas of sensorimotor cortex to cerebellar Purkinje cells. *Exp Brain Res.* 1974; 20: 255–72.
 - 26) Kubo R, Aiba A, Hashimoto K. The anatomical pathway from the mesodiencephalic junction to the inferior olive relays perioral sensory signals to the cerebellum in the mouse. *J Physiol.* 2018; 596: 3775–91.
 - 27) Miyamoto D, Hirai D, Fung CCA, Inutsuka A, Odagawa M, Suzuki T, et al. Top-down cortical input during NREM sleep consolidates perceptual memory. *Science.* 2016; 352: 1315–8.
 - 28) Coutelier M, Blesneac I, Monteil A, Monin ML, Ando K, Mundwiller E, et al. A Recurrent mutation in CACNA1G Alters Cav3.1 T-type calcium-channel conduction and causes autosomal-dominant cerebellar ataxia. *Am J Hum Genet.* 2015; 97: 726–37.
 - 29) Morino H, Matsuda Y, Muguruma K, Miyamoto R, Ohsawa R, Ohtake T, et al. A mutation in the low voltage-gated calcium channel CACNA1G alters the physiological properties of the channel, causing spinocerebellar ataxia. *Mol Brain.* 2015; 8: 89.
 - 30) Simms BA, Zamponi GW. Neuronal voltage-gated calcium channels: structure, function, and dysfunction.

- Neuron. 2014; 82: 24-45.
- 31) Talley EM, Cribbs LL, Lee JH, Daud A, Perez-Reyes E, Bayliss DA. Differential distribution of three members of a gene family encoding low voltage-activated (T-type) calcium channels. *J Neurosci.* 1999; 19: 1895-911.
- 32) Zamponi GW, Striessnig J, Koschak A, Dolphin AC. The Physiology, pathology, and pharmacology of voltage-gated calcium channels and their future therapeutic potential. *Pharmacol Rev.* 2015; 67: 821-70.
- 33) Matsumoto-Makidono Y, Nakayama H, Yamasaki M, Miyazaki T, Kobayashi K, Watanabe M, et al. Ionic basis for membrane potential resonance in neurons of the inferior olive. *Cell Rep.* 2016; 16: 994-1004.
- 34) Hutcheon B, Yarom Y. Resonance, oscillation and the intrinsic frequency preferences of neurons. *Trends Neurosci.* 2000; 23: 216-22.
- 35) Bavassano C, Eigentler A, Stanika R, Obermair GJ, Boesch S, Dechant G, et al. Bicistronic CACNA1A gene expression in neurons derived from spinocerebellar ataxia type 6 patient-induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev.* 2017; 26: 1612-25.
- 36) Molineux ML, McRory JE, McKay BE, Hamid J, Mehaffey WH, Rehak R, et al. Specific T-type calcium channel isoforms are associated with distinct burst phenotypes in deep cerebellar nuclear neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103: 5555-60.

