

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500460

研究課題名(和文)哺乳類の歩行運動機能成熟における脊髄神経回路制御機構の発達

研究課題名(英文)Functional maturation of the control of the mammalian spinal locomotor network

研究代表者

西丸 広史(Nishimaru, Hiroshi)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：20302408

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では皮質脊髄路と脊髄内の神経回路の形成異常および歩行異常を示す遺伝子改変マウスを用いて、発達期の歩行運動出力を担う脊髄神経回路が大脳皮質運動野をはじめとする上位中枢によってどのように制御されているのかを調べた。この結果、発達中のマウスの歩行運動発現においては、大脳皮質からの入力脊髄の歩行神経回路の制御の発達にはあまり大きな役割を担っておらず、脊髄内のEphA4陽性興奮性ニューロンが重要な役割を担っていることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In this study we used genetically-modified mice that show abnormal gait to investigate the function and maturation of the locomotor network in the spinal cord especially how it is controlled by the supraspinal structures. Our findings suggest that the corticospinal tract plays little role in the development of the spinal locomotor network and that a population of EphA4-positive spinal excitatory neurons play a significant role in the normal development of the mammalian locomotor circuit.

研究分野：神経生理学

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経・筋肉生理学

キーワード：神経回路 歩行 運動 マウス 脊髄

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 哺乳類の歩行、特に四足動物においては、大脳皮質運動野が主に外乱や環境への適応を、脳幹は歩容の選択や平衡の維持を、そして脊髄は推進力(協調したリズム的な筋活動パターン)の生成を担っていると考えられている。これらの知見は主にネコやサルなどの個体の *in vivo* 標本 (*in vivo* 個体モデル) を用いて、それぞれの部位の破壊実験や、単一ニューロンの細胞内記録によるアプローチによって明らかにされてきた。しかしこれらの回路内のニューロンが運動出力中にどのように制御されているのかという重要な部分に関しては不明な点が多い。この理由として、個体レベルの実験モデルで脊髄前角に局在する神経回路に関連したニューロンのシナプス活動を効率良く安定して記録することが困難であることが挙げられる。本研究課題では運動を制御する脊髄神経回路として主に歩行の中枢パターン形成回路(central pattern generator; CPG)に着目した。我々は近年、遺伝子改変マウス新生児の脊髄を摘出し、酸素で飽和したリンゲル液で灌流する標本 (*in vitro* 神経組織モデル) を用いて脊髄神経回路を正常に近い状態に保ったままで、歩行中枢をはじめとする運動中枢を構成するニューロンを同定し、その活動をシナプス・イオンチャンネルレベルで解析している (Nishimaru et al. *Journal of Neurophysiology* 2010 他)。特に遺伝子改変マウスを用いた研究などから、歩行 CPG を構成するニューロンの同定やその電気生理学的性質が徐々に明らかにされつつある (Nishimaru and Kakizaki, *Acta Physiologica* 2009)。本研究では、上記の機能的な神経回路同士の結合様式を明らかにする糸口として、その機能発達に着目した。ヒトでは、運動中枢を構成する神経回路間の相互作用は生後の環境で生きていくのに適した形で発達すると考えられている。自立歩行は生後1年ほどで発現し、皮質脊髄路による運動制御は小児期に10年以上かけて成熟することが知られている (Martin et al. *Encyclopedia of Neuroscience* 2009)。マウスではこの発達が約1カ月以内に起こるため、上位中枢と脊髄神経回路の相互作用の発達様式を効率的に解析するのに適している。マウス脊髄の歩行 CPG の基本的な回路はすでに生直後に形成されているものの (Nishimaru and Kakizaki, 2009)、まだ上位中枢からの入力未完成で筋骨格系も発達途上のため自分で体重を支えて歩くことができない。その後、生後2-3週に離乳するころまでに目が開き、自らの体重を支え採餌できるようになる。こうした行動様式の変化のタ

イミングに合わせて、皮質脊髄路の軸索の脊髄への投射が完成することが主に形態学的な研究によって明らかにされている。

(2) マウスの発達期において、一側の皮質脊髄路ニューロンの軸索はそのほとんどが、延髄で反対側に交叉し脊髄後索を下行する。脊髄内においてこの軸索は再び交叉することなく下行した側の脊髄灰白質に投射する。発達期の皮質脊髄路のニューロンおよび一部の脊髄介在ニューロンの軸索は受容体型チロシンキナーゼの一つ EphA4 を発現している。これらの軸索が脊髄の正中に達すると、EphA4 が正中線上に発現しているそのリガンド EphrinB3 に結合する。この結果、軸索は退縮し反対側には伸長しない (Kullander et al. *Science* 2003)。私たちは最近、軸索誘導因子 キメリン遺伝子の全身性欠損マウス (Chn-KO マウス) で、この EphA4-ephrinB3 のシグナリングの異常によって、皮質脊髄路ニューロンおよび一部の脊髄介在ニューロンの軸索が脊髄内において反対側に異常投射を起こすことを報告した (Iwasato et al. *Cell* 2007)。さらに、Chn-KO マウスは野生型の左右交代性の歩行パターンと異なるウサギ様の跳躍歩行を示し、新生児の脊髄摘出標本を用いた *in vitro* 実験により歩行 CPG の神経回路の左右結合の異常があることを明らかにした。一方で、成熟動物において、異常歩行に皮質脊髄路あるいは脊髄の興奮性ニューロンの軸索投射異常がどのように関与しているのかは不明であった。そこで、この Chn-KO マウスと野生型のマウスの歩行様式を比較することで、脊髄神経回路および上位中枢との相互作用を明らかにできると考えた。特に、歩行 CPG のしくみ、と皮質脊髄路について、生直後(1週齢以下)から機能的に成熟した動物(3週齢以降)までの異なるステージにおいて解析することで、上位中枢の脊髄運動神経回路の制御機構を調べるという着想に至った。

2. 研究の目的

本研究課題では、皮質脊髄路や脊髄神経回路を構成する興奮性ニューロンの軸索投射異常を示す遺伝子改変マウスの歩行運動について、*in vivo* および *in vitro* の機能解析を行うことによって以下のことを明らかにすることを目的とした。

(1) 野生型マウス、Chn-KO マウス、大脳皮質特異的キメリン欠損マウス (CxChn-KO マウス) および小胞型グルタミン酸輸送体 2 型 (vesicular glutamate transporter type 2;

VGLUT2)陽性興奮性ニューロン特異的キメリン欠損マウス (VGLUT2Chn-KO マウス)のそれぞれの発達ステージで、歩行運動の際の四肢の活動パターンおよび発達に伴う変化を明らかにする。これによって、それぞれのニューロン群が歩行運動の発現にどのように寄与するのかを明らかにする。

(2)上述の遺伝子改変マウスの脊髄に局在する歩行 CPG についても *in vitro* 標本を用いて詳細な電気生理学的・薬理的解析によって、その機能と発達を調べた。

3. 研究の方法

(1) 使用した遺伝子改変マウス：本研究には野生型マウス (C57/B6 系統) の他に以下の遺伝子改変マウスを用いた。

a)全身性キメリンノックアウトマウス：軸索誘導因子キメリンを全身性に欠損するマウス(ChnKO, Iwasato et al. 2007)。

b)大脳皮質特異的キメリンノックアウトマウス (CxChn-KO マウス)：転写因子 Emx1 は発生期に後脳の興奮性ニューロンに特異的に発現する。そこで Emx1 陽性細胞が Cre リコンビナーゼを発現する Emx1cre マウス (Iwasato et al. Journal of Neuroscience 2008) とキメリン遺伝子を Cre の標的配列 loxP で挟んだ配列を持つ Chn-floxed マウスを交配して CxChn-KO マウスを作出した。

c)興奮性ニューロン特異的キメリンノックアウトマウス (VGLUT2Chn-KO マウス)：哺乳類の中樞神経系において、VGLUT2 は興奮性ニューロンの一部、特に脊髄においては興奮性ニューロンの大部分に発現している。VGLUT2 陽性細胞が Cre リコンビナーゼを発現する Vglut2cre マウス(Borgius et al. Molecular Cellular Neuroscience 2010)と上述の Chn-floxed マウスを交配して作出した。

(2) *in vivo* の歩行パターン解析：それぞれの遺伝子改変マウスを縦 80cm × 横 10cm × 高さ 15cm の透明なアクリル製の箱の中を自由に歩かせてビデオカメラ (30 フレーム/秒) で撮影した。歩行中の各足の着地のタイミングをフレームごとに解析し、各歩行周期の着地相と遊脚相を同定した。これを元に、一側の着地相が、対応する反対側の歩行周期においてどの時点で開始しているのかを測定し、それを元に左右肢の位相差を算出した。一つの歩行周期の長さを 1.0 としたとき、左右の位相差の値が 0.25-0.75 のとき二つの前根の活動が交代した活動、その他の値のとき同期性と定義した。それぞれの動物で、交代性パターンと同期したパターンの数、それぞれのパターンと歩行周期の長さとの関係を調べた。また、体重を支えることができない新生児マウスは頭部および体幹を保持し、ピンセ

ットで軽く尾をつまんで刺激することで誘発されるステップ様活動を観察・記録した。

(3) *In vitro* 脊髄摘出標本の歩行運動様リズム活動の解析：上述のマウスの新生児より脊髄を摘出し、酸素で飽和した人工脳脊髄液で持続的に灌流した記録槽に保定した。左右の第二腰髄 (L2) および第五腰髄 (L5) の前根にガラス吸引電極を装着して運動ニューロン群からの出力を記録した。歩行運動様リズム活動はセロトニンおよび NMDA 型グルタミン酸受容体の作動薬である NMDA を灌流することによって誘発させた。左右の L2 間および同側の L2(屈筋の活動を反映)-L5(伸筋を反映)の誘発リズム活動の位相差を(2)と同様に算出した。さらに、左右の位相差とリズムの頻度および誘発に用いた NMDA の濃度との間の関係を調べた。

4. 研究成果

(1) *In vivo* 歩行

成熟 ChnKO マウスでは、歩行は 2-10Hz の周波数 (歩行周期の逆数) のものが見られた。前肢後肢ともに主に左右同期した活動が見られたが、少数ながら交代性の活動も観察された。周波数が 4Hz 以上の速い歩行と 4Hz 未満の遅いものとに分け、歩行パターンの違い (同期性と交代性の割合) を調べたところ、後肢では有意な差は見られなかったが、前肢では遅い歩行において有意に交代性のものが多かった。新生児マウスでも前肢と後肢に見られたステップ活動は成熟動物と同様に左右同期したパターンが多かった。

成熟 CxChnKO マウスでは、前肢後肢ともに主に左右交代した活動が見られ、同期した活動はほとんど見られなかった。新生児マウスでも前肢と後肢に見られたステップ活動は成熟動物と同様に左右交代したパターンが多かった。

成熟 Vglut2ChnKO マウスでは、どのスピードの歩行でも前肢後肢ともに左右同期したパターンが観察されたが、特に遅い歩行の際に交代性の活動も多く観察された。前肢・後肢ともに、遅い歩行の方が有意に交代性のものが多かった。新生児マウスでもステップ活動は成熟動物と同様に左右同期および交代したパターンの両方が観察された。

野生型マウスにおいては、10Hz 以下の歩行運動では左右同期した活動はほとんど見られなかった。

(2) *In vitro* 誘発歩行

ChnKO マウスの脊髄摘出標本では、すでに報告されているとおり、腰髄後根において左右同期したパターンが大部分を占める歩

行運動様リズム活動が誘発された (Iwasato et al. 2007)。少数ながら左右交代性の活動も観察された。これは成熟動物の in vivo 歩行と同様の傾向であった。

CxChnKO マウスの脊髄摘出標本では、腰髄の後根において、左右交代性のパターンを示す歩行運動様リズム活動が誘発された。これはこのマウスの成熟動物の in vivo 歩行と同様の傾向であった。

Vglut2ChnKO マウスの脊髄摘出標本では、左右同期したパターンと交代性のパターンを示すリズム活動 (周波数約 0.3-1.5Hz) が観察されたが、特にリズムの周波数が高いもの (1Hz 以上) において同期したものが約 80% を占めた。対照群では同様の傾向は見られなかった。

以上の結果から、発達中のマウスの歩行運動発現においては、大脳皮質から脊髄に直接下行する皮質脊髄路の軸索投射の異常は新生児および成熟マウスの歩行パターンにはほとんど影響を及ぼさず、大脳皮質からの入力歩行運動の制御にはあまり大きな役割を担っていないことが示唆された。一方、VGLUT2 陽性の興奮性ニューロンのキメリン欠損によるこれらのニューロンの EphA4/EphrinB3 シグナリング不全が起きた結果、発達期をとおして異常歩行が見られた。この表現型は脊髄 CPG の異常に起因している可能性が高く、EphA4 陽性の脊髄興奮性ニューロンが歩行運動の発現および正常の回路形成に重要な役割を担っていることが明らかになった。

(3) 本研究成果は、哺乳類の神経回路の機能解析に最も広く用いられている実験モデルの一つであるマウスにおいて、歩行運動の際の大脳皮質運動野からの下行性の司令の役割の一端を明らかにした。また脊髄神経回路を構成する重要な因子として、EphA4 および VGLUT2 陽性の興奮性ニューロンを同定した画期的なものである。本研究のように、運動の発現のための回路形成過程を生物学的な観点から明らかにすることで、回路の理論モデル化や歩行ロボットなどへの応用、さらには運動障害の治療法の開発、脊髄損傷の神経再生の研究のための生理学的基盤を提供することができると考えている。また、中枢神経系の神経回路がお互いにどのように結合し、様々な運動出力パターンの形成に関与しているのか、それがどのように機能発達するのかを知ることは、我々ヒトをはじめとする哺乳動物の行動原理を明らかにしていく上でも非常に有効なアプローチだと考えられる。

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4件)

Borgius L*, Nishimaru H* (shared 1st authors), Caldeira V, Kunugise Y, Low P, Reig R, Itohara S, Iwasato T, Kiehn O. Spinal glutamatergic neurons defined by EphA4 signaling are essential components of normal locomotor circuits. *Journal of Neuroscience* 34:3841-3853, 2014 査読有

Toyoda Y, Shinohara R, Thumkeo D, Kamijo H, Nishimaru H, Hioki H, Kaneko T, Ishizaki T, Furuyashiki T, Narumiya S. EphA4-dependent axon retraction and midline localization of Ephrin-B3 are disrupted in the spinal cord of mice lacking mDia1 and mDia3 in combination. *Genes to Cells*, 18, 873-885, 2013 査読有

西丸広史、哺乳類脊髄神経回路網の作動機序と機能発達。ブレインサイエンス・レビュー(クバプロ)、83-106, 2012 査読無し

西丸広史、歩行運動発現における脊髄抑制性ニューロンの役割。Clin Neurosci、30, 1371-1374, 2012 査読無し

[学会発表](計7件)

西丸広史、哺乳類歩行運動神経回路における興奮性ニューロンの役割:キメリンノックアウトマウスの機能解析 からわかること。第91回日本生理学会大会、2014年3月17日、鹿児島大学、鹿児島

西丸広史 他、サル頸髄前角におけるレンショウ細胞の分布:免疫組織学的解析 Rostrocaudal distribution of calbindin D28k positive cells in the ventral horn of the cervical spinal cord in monkeys. 36回日本神経科学学会大会、2013年6月20日、京都国際会議場、京都、

Nishimaru H 他、Abnormal output pattern of the spinal locomotor circuit of the VGLUT2-positive-neuron-specific-chimerin knockout mouse. The Society for Neuroscience 42nd Annual Meeting, 2012年10月16日、New Orleans USA

西丸広史、シンポジウム「運動の出力パターンを形成する脳幹・脊髄介在ニューロンの機能発達」マウス脊髄運動中枢における抑制性介在ニューロンの機能と発達分化。第35回日本神経科学学会大会、2012年9月18日、名古屋国際会議場、名古屋

西丸広史、哺乳類の歩行中枢パターン発生回路の機能的構成、第6回 Motor Control 研究会シンポジウム「CPG研究の現状と展望:これまでにわかっていること・わかっていないこと」、2012年6月22日、岡崎コンフ

アレンスセンター、岡崎市

梶瀬佑果 他、興奮性ニューロン特異的 -
キメリンノックアウトマウス脊髄における
歩行中枢の機能解析 Altered left-right
activation pattern in the spinal
locomotor circuit of the excitatory
neuron-specific alpha-chimerin knockout
mouse、第 89 回日本生理学会大会、2012 年
3 月 31 日、長野県松本文化会館、松本市

Borgius L 他 , The excitatory
EphA4-related population is involved in
coordinating the mammalian locomotor CPG.
The Society for Neuroscience 41st Annual
Meeting 2011 年 11 月 14 日、Washington D.C.
USA

6 . 研究組織

(1)研究代表者

西丸 広史 (NISHIMARU, HIROSHI)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号 : 20302408

(2)研究分担者

小金澤 禎史 (KOGANEZAWA, TADACHIKA)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号 : 80431691