

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20500365

研究課題名(和文) 歩行運動中枢を構成する脊髄抑制性ニューロンの同定と生理学的解析

研究課題名(英文) Electrophysiological characterization of locomotor-related inhibitory neurons in the spinal cord

研究代表者

西丸 広史 (NISHIMARU HIROSHI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・准教授

研究者番号：20302408

研究成果の概要(和文)：本研究では、遺伝子改変マウスを用いて歩行の際の運動パターンの形成に重要な役割を担っている脊髄抑制性ニューロンの電気生理学的性質解析を行った。この結果、運動ニューロンと反回抑制回路を構成する抑制性ニューロン Renshaw 細胞が、運動出力の際に運動ニューロンへの興奮性入力の高さに比例した抑制性入力を受けていることを明らかにした。これにより運動出力の大きさに合わせて運動ニューロンへの反回抑制の強さがダイナミックに調節されていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the mammalian spinal cord, Renshaw cells (RCs) are excited by axon collaterals of motoneurons, and in turn provide recurrent inhibition of MNs. However, a large part of the synaptic modulation of RCs during motor behaviors such as locomotion remains unclear. In this study, synaptic inputs to RCs in the lumbar segment during motor activity were examined. These results indicate that RCs are strongly inhibited by the spinal network during movements and the strength of the inhibition is related to the magnitude of the motor activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生理学

科研費の分科・細目：神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：ニューロン・シナプス・神経回路

## 1. 研究開始当初の背景

歩行運動は足のそれぞれの筋肉が各関節をリズムかつスムーズに曲げ伸ばしすることで生み出されているが、これはそれぞれの筋群を支配する脊髄運動ニューロンがそれぞれ決まったタイミングでリズムに発火することによって実現されている。こ

のときの運動ニューロンの基本的な発火パターンを形成しているのは脊髄に局在する歩行運動神経回路網である。しかし、哺乳類においてこの回路はその複雑さや実験手技の難しさなどからその作動メカニズムの解明は遅れていた。近年この脊髄神経機構の研究に広く用いられるようになったのはラッ

トやマウスの新生児の脊髄摘出標本である。この脊髄と後肢の筋群を摘出した標本において、実際に動物が歩くときと非常によく似た筋活動パターンが観察される（歩行運動様リズム活動）。この標本は *in vivo* の動物と比較して、単一ニューロンの安定した電気活動の記録が容易で薬理的なアプローチがしやすいという利点がある。その一方でこれまで主に用いられていたラットでは、活動を記録する脊髄介在ニューロンをあらかじめ同定することは難しく、哺乳類においてマウスを中心に発達してきた遺伝子改変技術を使った細胞の可視化技術やノックアウト動物を用いることができず、神経回路を構成するニューロンの種類の同定は難しかった。申請者らはマウスでも同様の標本を用いて NMDA とセロトニンなどの灌流投与で歩行運動様活動を誘発できることを初めて示した (Nishimaru and Kudo 2000)。さらに GABA 作動性の抑制性ニューロンに蛍光タンパク質 GFP を細胞特異的に発現させた GAD67-EGFP ノックインマウスを用いて、抑制性ニューロンを顕微鏡下に同定し、ホールセル・パッチクランプ記録をすることで、神経回路網をほぼ正常に保ったままで極めて効率的に抑制性ニューロンのシナプス活動を記録できることを見いだした (Nishimaru et al. 2005, 2006)。このような背景から、同標本において歩行運動に関連した腰髄の抑制性ニューロンを同定し、その詳細な電気生理学的性質を明らかにすることを計画するに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、(1) 歩行運動に関連した脊髄の抑制性ニューロンとして運動ニューロンと反回抑制回路を形成している抑制性ニューロンである Renshaw 細胞に注目し、運動出力の際の、細胞膜の興奮性を調節するシナプス入力の電気生理学的性質を明らかにする。(2) Renshaw 細胞以外の抑制性ニューロンに関しても、その歩行運動の際の膜電位活動やシナプス入力、さらにはその形態を解析することで、これらのニューロンの歩行運動を生み出す神経回路におけるその役割を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 遺伝子改変マウス

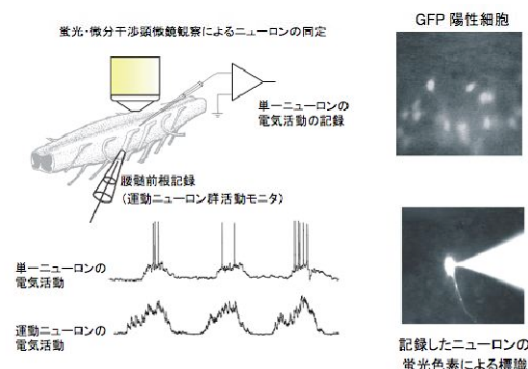
本研究には GAD67-GFP マウスを用いた。このマウスは抑制性神経伝達物質 GABA の合成酵素であるグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) のアイソフォーム GAD67 を発現する細胞に蛍光タンパク質 GFP を発現させたノックインマウスである。

### (2) 脊髄摘出標本

生後 0-4 日のマウス新生児および胎生 17-18

日のマウス胎児より脊髄を摘出し、酸素で飽和した人工脳脊髄液で灌流し、灌流槽においた。運動出力は腰髄の前根にガラス吸引電極を装着して記録した。この条件下で通常 6-8 時間神経回路の活動を記録することが可能であった。

### (3) この標本を正立顕微鏡下に置き、脊髄腹



側にある GFP 陽性細胞を微分干渉・蛍光顕微鏡下で観察し、ホールセル・パッチクランプ記録を行った (上図)。このうち、近傍の脊髄前根を電気刺激して短い潜時の興奮性応答を示すものを Renshaw 細胞として同定し、その膜電位変化およびシナプス電流を記録した。またパッチクランプ用電極内液に記録した細胞を標識するためのトレーサー色素ニューロビオチンおよび蛍光色素をあらかじめ入れておき、記録終了後に標本をホルマリン固定した。その後、これらの細胞の形態を顕微鏡下で観察した。

また運動ニューロン群における歩行運動様リズム活動は NMDA およびセロトニンの灌流投与によって誘発し、第二腰髄および第五腰髄の前根で記録した。

## 4. 研究成果

(1) Renshaw 細胞への抑制性シナプス入力の解析: 脊髄摘出標本において、ホールセルパッチクランプ法で Renshaw 細胞の膜電位を記録すると、運動ニューロン群が興奮していない状態でも膜電位の変動 (平均 5 mV 前後) が観察された。次に膜電位固定法でシナプス電流を記録すると、主に、自発性の抑制性シナプス入力を受け、その頻度は同様に観察される自発性の興奮性のシナプス入力に比べて 20 倍程度高く、振幅も大きいことを見いだした。このシナプス入力 Renshaw 細胞の膜電位変動を引き起こしている主な原因であり、Renshaw 細胞でも多くの抑制性の入力を受けていることが示唆された。

Renshaw 細胞は運動ニューロンからの興奮性入力を受けてバースト発火することが知られている。そこで、この脊髄摘出標本で運動ニューロン軸索の束である腰髄前根を電気刺激してバースト発火を誘発させ、こう

した抑制性入力がどのように Renshaw 細胞活動を調節しているのかを調べた。この結果、Renshaw 細胞の膜電位が抑制性シナプス入力を受けて過分極した際には一つのバースト中のスパイク（活動電位）の数が有意に少なくなることが明らかになった。運動ニューロンからの興奮入力を受けたときの膜電位と、ひとつのバースト中の活動電位の数の間には正の相関が認められた。これらの結果から、この実験で観察された自発的な抑制性入力は、Renshaw 細胞の興奮性を制御していることが示唆された。

(2) Renshaw 細胞同士の相互抑制の解析：こうした Renshaw 細胞への抑制性入力が、他の Renshaw 細胞からの抑制性入力によるものかどうかを検討した。これには、他の Renshaw 細胞への運動ニューロンからの入力を、ニコチン性アセチルコリン受容体の阻害薬によって遮断した効果を観察した。この結果、自発性の抑制性シナプス入力の頻度や振幅もほとんど変化せず、阻害薬の影響ほとんど見られなかった。この結果、これらの抑制性入力は他の Renshaw 細胞ではなく、他の抑制性ニューロンによることが示唆された。

(3) 運動ニューロンの興奮と Renshaw 細胞の抑制の関連性：この脊髄摘出標本では運動ニューロン群にも自発発火が見られる。前根で記録される運動ニューロン群のスパイクをトリガーとして Renshaw 細胞が受ける抑制性シナプス入力の振幅を加算平均したところ、運動ニューロンが発火するタイミングでシナプス入力の振幅が大きくなっていることが明らかになった。これは運動ニューロンが興奮するときに Renshaw 細胞が抑制性入力を受けていることを示唆している。以上の結果は運動ニューロンが興奮すると同時に Renshaw 細胞は抑制性入力を受け、その細胞膜の電気的な興奮性を制御されていることが明らかになった。

(4) マウス新生児の Renshaw 細胞の形態学的解析：こうした記録した Renshaw 細胞はニューロピオチンでの軸索の走行を光学顕微鏡下に観察した。この結果、多くのニューロンで軸索が 2-3 髄節の範囲に渡って伸長しており、細胞体が位置する近傍の運動ニューロン群だけではなく、広い範囲の脊髄前角のニューロンを支配していることが示唆された。

以上の結果は、脊髄の運動中枢が運動ニューロンの反回抑制回路をダイナミックに制御して運動出力を制御していることを示唆していた。このことは Renshaw 細胞が運動ニューロンからの出力の調節に重要な役割を担っていることを示唆している。

(5) Renshaw 細胞以外の GABA 作動性抑制ニューロンの歩行運動の際の発火パターンの解析：脊髄腹側のニューロンのうち、脊髄前根

の電気刺激に応答しないものについて、歩行運動様リズム活動の際の膜電位変化と発火パターンを解析した。この結果、その大部分でリズム的な発火パターンが観察された。これらのニューロンはそれぞれ屈筋が活動するタイミング、および伸筋が活動するタイミングでスパイクが増加するものに分けられた。これらのニューロンの多くは Renshaw 細胞よりも外側に位置しており、そのほとんどが軸索を脊髄の同側に投射していた。これらのことから、歩行運動神経回路のなかでも、脊髄片側のパターン形成に関わっている可能性が示唆された。

## 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 3 件)

1. Saito K, Kakizaki T, Hayashi R, Nishimaru H, Furukawa T, Nakazato Y, Takamori S, Ebihara S, Uematsu M, Mishina M, Miyazaki J, Yokoyama M, Konishi S, Inoue K, Fukuda A, Fukumoto M, Nakamura K, Obata K, Yanagawa Y. The physiological roles of vesicular GABA transporter during embryonic development: a study using knockout mice. *Molecular Brain* 3:40 (2010) (査読有り)

2. Nishimaru H, Koganezawa T, Kakizaki M, Ebihara T, Yanagawa Y. Inhibitory synaptic modulation of rensaw cell activity in the lumbar spinal cord of neonatal mice. *J Neurophysiol.* 103:3437-3447, 2010. (査読有り)

3. Nishimaru H, Kakizaki M. The role of inhibitory neurotransmission in locomotor circuits of the developing mammalian spinal cord. *Acta Physiol (Oxf)*. 197:83-97, 2009. (査読有り)

[学会発表] (計 13 件)

1. Kakizaki M, Sakagami H, Yanagawa Y, Nishimaru H. Morphological characterization of GABAergic interneurons in the developing mouse lumbar ventral spinal cord” 第 88 回日本生理学会大会、2011. 3. 28-30 横浜

2. Tani Y, Kakizaki M, Iwasato T, Itohara S, Nishimaru H. Coordinated rhythmic motor activity in a single lumbar segment of the developing a-chimerin knockout mouse spinal cord” 第 88 回日本生理学会大会、2011. 3. 28-30 横浜

3. Nishimaru H. Elucidating the organization and function of motor circuits in the mammalian spinal cord. 第 88 回日本生理学会大会、2011. 3. 28-30 横浜

4. 西丸広史 遺伝子改変マウスを用いた哺乳類脊髄神経回路網の機能解析 定量生物学の会 第三回年会 2010. 11. 28. 東京 (シンポジウム発表)

5. Nishimaru H. Synaptic modulation of recurrent inhibition in the mouse spinal motor circuit. Leading Graduate Schools International Conference. 2010. 11. 1. つくば (シンポジウム発表)

6. Nishimaru H., Kakizaki M, Yanagawa Y. Characterization of locomotor-related GABAergic interneurons in the ventrolateral lumbar spinal cord in the developing mouse. 第 33 回神経科学学会大会 2010. 9. 4. 神戸

7. 西丸広史、小金澤禎史、柿崎美代、海老原達彦、柳川右千夫. マウス脊髄 Renshaw 細胞の脊髄運動神経回路網による制御様式。包括脳・夏のワークショップ, 2010. 7. 28. 札幌

8. 西丸広史、「マウス脊髄反回抑制回路制御のシナプス基盤」平成 22 年度生理学研究所研究会「第 4 回 Motor Control 研究会」、2010.5.29. 岡崎 (シンポジウム発表)

9. Nishimaru H., Kakizaki M, Yanagawa Y, Inhibition of Renshaw cells during motor activity in neonatal mouse spinal cord. 第 87 回日本生理学会大会, 2010. 5. 21. 盛岡

10. Nishimaru H., Kakizaki M, Yanagawa Y, Synaptic modulation of GABAergic interneurons by the locomotor CPG in the ventrolateral spinal cord of the neonatal mouse in vitro. The Society for Neuroscience (Neuroscience 2009), 2009. 10. 19, Chicago USA

11. Nishimaru H., Kakizaki M, Yanagawa Y., The role of NMDA receptors in recurrent inhibition of motoneurons in the neonatal mouse spinal cord. The 36th International Congress of Physiological Sciences (IUPS2009), 2009. 7. 31. Kyoto.

12. 西丸広史、遺伝子改変マウスを用いた運動制御の研究の展開、平成 21 年度生理学研

究所研究会「第 3 回 Motor Control 研究会」、2009.5.29. 岡崎 (シンポジウム発表)

13. 西丸広史、マウス新生児脊髄反回抑制回路におけるシナプス結合様式、平成 20 年度生理学研究所研究会「新たなコンセプトでシナプス伝達機構を考える」、2008.9.19、岡崎 (シンポジウム発表)

[図書] (計 1 件)

Nishimaru H. Left-Right Coordination, Locomotion. In Encyclopedia of Neuroscience, Springer, 2141-2143, 2009

[その他]

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/chs/ikagaku/nishimaru.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西丸 広史 (NISHIMARU HIROSHI)  
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・  
准教授  
研究者番号：20302408

### (3) 連携研究者

清末 和之 (KIYOSUE KAZUYUKI)  
産業技術総合研究所・脳神経情報部門・  
主任研究員  
研究者番号：50356903