

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 29 日現在

機関番号：82660

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670676

研究課題名(和文) 腰髄歩行運動出力形成回路におけるグリア細胞の役割

研究課題名(英文) The role of astrocytes in generation of locomotive rhythm in the lumbar spinal cord

研究代表者

三上 裕嗣 (Mikami, Yuji)

独立行政法人国立病院機構村山医療センター(臨床研究部)・電気生理学研究室・共同研究員

研究者番号：20306749

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：アストロサイトが歩行神経出力形成に関与しているとの仮説を提唱、検証した。新生ラットから摘出脊髄標本作製し、薬剤で誘発した歩行神経出力を腰髄L5前根から記録しつつ、共焦点顕微鏡を用いたカルシウムイメージングにより腰髄前角の細胞活動を計測した。通常の計測の後、標本にTTXを投与すると、ニューロン活動のみが抑えられ、さらに、灌流液のカリウム濃度を0.2 mMへ低下させるとアストロサイトのみが興奮性を呈したことから、ニューロンとアストロサイトを分別した。解析の結果、腰髄前角内に、歩行神経出力と同期した活動を呈するアストロサイトが見出され、アストロサイトの歩行リズム形成への関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Locomotion is one of the most important motor functions to maintain activity of daily life. Neural locomotor output is generated in the lumbar spinal cord, yet the cellular mechanism underlying the locomotor output generation is not elucidated. We have proposed a hypothesis that astrocytes are actively involved in generation of locomotive rhythm in the lumbar spinal cord. To examine this hypothesis, we conducted calcium imaging in the isolated lumbar spinal cord preparation of the neonatal rat. Fictive locomotion was induced with NMDA and 5-HT. Cellular activities in the L5 ventral horn were captured under a confocal microscope simultaneously with neural locomotive output from L5 ventral roots. Recorded cells were classified into neurons and astrocytes on the basis of calcium responses to low potassium in the presence of TTX. We found astrocytes that were synchronous with neural locomotive output. We suggest that astrocytes are functionally involved in generation of locomotive rhythm.

研究分野：脊椎脊髄外科学

キーワード：歩行  
ロコモーション 脊髄 腰髄 カルシウムイメージング グリア細胞 アストロサイト ニュー

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 自立した日常生活を送るためには、下肢による歩行運動 (locomotion) 機能の維持が必要であり、基礎整形外科学としても locomotion に関わる脊髄神経機構の解明は、重要課題である。locomotion は、腰髄前角の歩行運動神経回路 (central pattern generator; CPG) によりその神経出力が形成される。すなわち、主に第二腰髄レベルの神経回路により屈曲運動の、主に第五腰髄レベルの神経回路により伸展運動の出力が形成され、左右の下肢で交互にこの屈曲・伸展がなされることによって locomotion が実現される。ただし、腰髄前角内において下肢の屈曲と伸展を規定する神経細胞群の局在部位は完全には分かれていない。

(2) 最近、グリア細胞、特にアストロサイトは、ニューロンと相互に密接に情報交換を行い、中枢神経系の様々な機能の発現において積極的な役割を果たしていることが明らかになってきた (文献 )。

(3) しかし、これまでのところ、locomotion 神経出力形成機構におけるアストロサイトの役割は、全くと言ってよいほど、検討がなされていなかった。

(4) locomotion 出力形成神経機構を細胞レベルで理解するには、腰髄 locomotion CPG を構成する細胞の活動を解析する必要がある。しかし、ヒトではもちろん、動物実験であっても、下肢運動中の脊髄から微小電極で個々の細胞活動を計測することは困難で、単一細胞での細胞内電位計測の報告はなされてはいるが、in vivo 環境では組織が動くなど技術的制約のため多数の細胞活動を同時に計測した報告はない。そのため、locomotion 出力形成神経機構は、これまでのところ、十分には解明されていない。

(5) 一方、近年、摘出脊髄を用いた in vitro 標本の開発により、in vivo 動物では不可能であった細胞活動の計測が可能となってきた。すなわち、若齢ラット、マウスより、腰髄を含む脊髄を摘出し、酸素化人工脳脊髄液で灌流することにより in vitro 環境で組織生存性を維持したうえで、標本にグルタミン酸受容体刺激薬 (NMDA) およびセロトニン受容体刺激薬 (5-hydroxytryptamine・セロトニン) を投与することにより、locomotion 神経活動 (fictive locomotion) を惹起することが可能となった (文献 )。

## 2. 研究の目的

本研究では、腰髄前角の歩行運動 CPG において、アストロサイトが関与しているか否かを摘出脊髄標本を用いた検討により明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 下肢歩行運動を規定する腰髄神経回路 (CPG) の動作機構におけるアストロサイトの役割を明らかにするため、下肢歩行運動 (fictive locomotion) 神経出力を惹起させた in vitro 脊髄標本において腰髄 L4/5 の前根活動を記録しつつ、腰髄 CPG のアストロサイトとニューロンの活動をカルシウムイメージング法により計測した。

(2) 実験では、脊髄尾側端を L5 レベルで横切断し、その断面から前角 CPG 領域にカルシウム蛍光色素 Oregon Green を注入し、NMDA およびセロトニンで誘発した L4/5 からの fictive locomotion 神経出力を記録しつつ、共焦点顕微鏡下で前角 CPG 領域の細胞活動を計測した。通常的人工脳脊髄液による灌流下でのコントロール計測の後、標本に TTX を投与し、ニューロン活動のみを抑え、さらに、灌流液のカリウム濃度を 0.2 mM へ低下させて、アストロサイトのみに興奮性を呈させるようにして、計測された細胞をニューロンとアストロサイトとに分類した (文献 )。計測された細胞と fictive locomotion 神経出力との相関から、計測された各細胞の活動における locomotion 様の要素の有無を解析した。

## 4. 研究成果

(1) 腰髄前角内に、歩行神経出力と同期した活動を呈するアストロサイトと、同期活動を呈さないアストロサイトとが見出された。

(2) これらアストロサイトは、TTX でニューロン活動を抑えても自発的な活動性を呈した。

(3) これらアストロサイトは、ニューロンに依存しない自律的なリズム形成能を有しており、locomotion 神経出力の形成に積極的に関与していると考えられた。

(4) 本研究の成果にもとづき、健康人であっても、より安定して歩行を行なうためにはグリア細胞機能を向上させることが重要であると示唆された。

(5) また、循環障害や機械的圧迫などにより高齢者でしばしば認められる腰髄機能障害に伴う歩行機能の低下は、各人の活動度および生活の質を低下させるが、本研究の成果は、この問題を解決するためにはグリア細胞を対象とした病態生理学的解析が重要であることを示すとともに、低下した歩行機能を改善するためのグリア細胞を標的とした薬剤の開発が必要であることを示した。

(6) さらに、現在、iPS 細胞を用いた再生医学として、脊髄損傷患者の機能回復を目指した研究が世界中で進行中である。動物実験で

は、iPS 細胞からニューロンにのみ分化しうる神経幹細胞集団を損傷部位へ移植しても locomotion 機能は回復しないが、ニューロンにもアストロサイトにも分化しうる未分化な神経幹細胞集団を移植すると locomotion 機能が回復することが報告されている(文献)。本研究の成果は、locomotion 機能の回復を目指した脊髄再生医学においてアストロサイトに注目する必要があることを示すとともに、脊髄機能回復におけるアストロサイトの役割の理解も含め再生医学の進歩に貢献すると期待される。

#### <引用文献>

Okada Y, Sasaki T, Oku Y, Takahashi N, Seki M, Ujita S, Tanaka KF, Matsuki N, Ikegaya Y. Preinspiratory calcium rise in putative pre-Bötzinger complex astrocytes. *Journal of Physiology* 590(19): 4933-4944, 2012.

Nishimaru H, Sakagami H, Kakizaki M, Yanagawa Y. Locomotor-related activity of GABAergic interneurons localized in the ventrolateral region in the isolated spinal cord of neonatal mice. *J Neurophysiol* 106(4): 1782-1792, 2011.

Dallwig R, Deitmer JW. Cell-type specific calcium responses in acute rat hippocampal slices. *J Neurosci Methods* 116(1): 77-87, 2002.

Tsuji O, Miura K, Okada Y, Fujiyoshi K, Mukaino M, Nagoshi N, Kitamura K, Kumagai G, Nishino M, Tomisato S, Higashi H, Nagai T, Katoh H, Kohda K, Matsuzaki Y, Yuzaki M, Ikeda E, Toyama Y, Nakamura M, Yamanaka S, Okano H. Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 12704-12709, 2010.

#### 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1件)

福士 勇人, 堀内 城司, 岡田 泰昌. 低酸素換気応答におけるアストロサイトの役割. *自律神経*、査読有、54(2): 109-117, 2017.

##### [学会発表](計3件)

Yazawa I, Okazaki S, Yokota S, Takeda K, Mikami Y, Fukushi I, Onimaru H,

Okada Y. Rhythmic activity of astrocytes synchronized with alternating motor output during fictive locomotion. Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Neuroscience2017) November 11-15, 2017, Washington, DC, USA. (発表予定)

岡崎 俊太郎, 三上 裕嗣, 矢沢 格, 武田 湖太郎, 鬼丸 洋, 岡田 泰昌. ロコモーション様腰髄神経出力に同期したアストロサイト活動: 新生ラット摘出脊髄標本におけるカルシウムイメージング解析 (2017). 第40回日本神経科学大会, 7月20日~23日, 千葉. (発表予定)

岡崎 俊太郎, 三上 裕嗣, 矢沢 格, 武田 湖太郎, 鬼丸 洋, 岡田 泰昌. 状態空間モデルによるロコモーション様腰髄細胞 Ca 活動と神経出力間の因果解析演題名. 第94回日本生理学会大会, 2017年3月28日~30日, 浜松.

[図書](計0件)

[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

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

三上 裕嗣 (MIKAMI, Yuji)  
独立行政法人国立病院機構村山医療センター・臨床研究部・共同研究員  
研究者番号: 20306749

(2) 研究分担者

岡田 泰昌 (OKADA, Yasumasa)  
独立行政法人国立病院機構村山医療センター・臨床研究部電気生理学研究室・室長  
研究者番号：80160688

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

鬼丸 洋 (ONIMARU, Hiroshi)  
矢澤 格 (YAZAWA, Itaru)  
岡崎 俊太郎 (OKAZAKI, Shuntaro)