

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03348

研究課題名(和文)皮質脊髄路が両側性投射を持つ遺伝子改変マウスを用いた同側性投射線維の役割解明

研究課題名(英文)Studies on the corticospinal tract functions in a mutant mouse with bilateral projection

研究代表者

榎 正幸 (Masu, Masayuki)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：20243032

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：皮質脊髄路は随意運動を制御する主要な下行路であり、マウスでは一次運動野から投射した神経線維が延髄錐体部で正中交差した後、脊髄へ至る。本研究は、錐体交差に異常があるため皮質脊髄路が両側性投射になった遺伝子改変マウスを用いて、片側の運動野を人工受容体を用いて可逆的に抑制した時、および、凍結損傷により不可逆的に抑制した時に両側前肢の運動がどのように障害を受けるかを調べ、同側へ投射する神経線維の役割を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、一次運動野を障害した時の前肢運動障害が皮質脊髄路が両側性投射になることによりどのような修飾を受けるかを明らかにした。また、皮質脊髄路が両側性投射になった遺伝子改変マウスにおいて左右が同期した運動が増加することを明らかにした。これらの成果は、皮質脊髄路による運動制御機構の基礎的な原理を明らかにすることのみならず、脳卒中における麻痺の回復や遺伝性鏡像運動症についても示唆を与えるものである。

研究成果の概要(英文)：The corticospinal tract is a major descending trajectory that regulates voluntary movement. In mice, the axons originate from the primary motor cortex, cross the midline at the caudal medulla, and descend to the spinal cord. In this study, we used a genetically-modified mice that have bilateral projection of the corticospinal tract owing to the defects in the pyramidal decussation, and examined the impairment of the skilled forelimb movement after reversible suppression of the primary motor cortex by DREADDs or irreversible injury of the primary motor cortex to reveal the possible roles of the ipsilaterally-projecting axons in voluntary movement.

研究分野：神経科学

キーワード：皮質脊髄路 遺伝子改変マウス 両側性投射 運動機能

1. 研究開始当初の背景

皮質脊髄路は大脳皮質 5 層の錐体ニューロンに起始し脊髄へ投射する主要な下行性経路であり、脊髄運動ニューロンの活動を制御する。皮質脊髄路は内包、大脳脚を経て延髄腹側部を下行し、錐体部で正中交差した後、脊髄へ投射する。皮質脊髄路は、種を超えて共通の特徴を持ちつつ、種間で異なる点も多い。例えば、ヒトでは大多数 (70%) の線維が錐体交差して脊髄側索を下行し反対側を支配するが、一部の線維は正中交差せずに同側の側索または前索を下行し同側を支配する。一方、マウスではほとんど全ての線維が錐体交差して後索を下行し反対側に投射するが、少数 (~5%) の線維は交差せずに前索を下行する。非交差線維がどのような生理的役割を担っているのかは十分には理解されていない。

これまでに、皮質脊髄路の形成に異常を持つ変異マウスが複数報告されている。研究代表者らは、ヘパラン硫酸エンドスルファターゼ Sulf1 と Sulf2 を破壊したダブルノックアウト (DKO) マウスにおいて皮質脊髄路の形成異常があることを報告している (Okada et al. Sci. Rep. 2017)。Sulf1/2 DKO マウス胎児では、視床下部付近の脳表基底膜に Slit2 蛋白質が異常に蓄積し皮質軸索を強く反発するため、皮質脊髄路が中脳で大きく背側へ偏位していた。当初用いた C57BL/6 純系 DKO マウスは生後直ぐに死亡するため、生後の発達、特に錐体交差と脊髄への投射について調べることができなかった。その後、ICR 系統と交配した雑種 DKO マウスが成獣まで生存することが分かり、そのマウスを用いて成獣脳の解剖と機能を調べた (Aizawa et al., 2020)。順行性トレーサー (BDA) を用いて一次運動野 (M1) からの投射を調べると、DKO マウスの錐体部において約半数の線維は正中交差したが、残りの線維は交差せずに脊髄へ下行した。交差線維は、正常マウスと同様、後索を下行して反対側の灰白質へ投射したが、非交差線維は側索を下行し同側の灰白質へ投射した。そこで、M1 を電気刺激して前肢の筋肉から筋電図を測定したところ、野生型マウスでは反対側の筋肉のみから誘発筋電図が記録されたが、DKO マウスでは両側の筋肉で反応が見られた。従って、野生型マウスでは M1 ニューロンが反対側の運動ニューロンを制御するのにに対し、DKO では両側性の制御を行っていることになる。この投射異常により運動機能に障害が起こるかどうかを調べるために、Grid walking test、Staircase test、Single pellet reaching test を実施した。いずれもマウスで運動機能を評価するために用いられる行動実験であるが、DKO マウスはいずれの試験でも野生型マウスより成績が悪かった。歩行は正常であり、Rotarod test でも正常であることから、粗大な運動、協調運動、定型的運動、運動学習などには異常が無いが、手指などを用いる精細な運動の調節に異常があると考えられた。

先天性鏡像運動症 (congenital mirror movement: CMM) は、片側の upper limb の随意運動を行うと反対側 upper limb に鏡像運動が出現する稀な遺伝性疾患である。神経病態は十分には分かっていないが、皮質脊髄路の形成異常が基盤にあると考えられ、非交差線維の割合が大きくなること、非交差線維が脊髄に入ってから反対側へ分岐を投射することなどが発症に関連している。近年の研究で、DCC と Netrin-1 遺伝子の突然変異により CMM が生じることが明らかにされた。これらの患者では錐体交差不全のため非交差線維が増加しており、経頭蓋磁気刺激 (TMS) で M1 を刺激すると両側 upper limb に運動誘発電位が観察される。従って、Sulf1/2 DKO マウスと類似の神経回路異常が生じていることになるが、DKO マウスが CMM の病態を示すかどうかは不明である。

2. 研究の目的

本研究では、皮質脊髄路の同側性投射線維の役割が何かを明らかにすることを目的とした。このために、Sulf1/2 DKO マウスにおいて化学遺伝学的方法と凍結損傷により M1 を可逆的または不可逆的に抑制する実験により片側性に M1 の活動を抑制した場合に、同側性投射線維が運動障害を軽減させるのか、悪化させるのかなどを検証する。さらに、CMM との関連も明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 凍結損傷を用いた M1 の不可逆的抑制

麻酔したマウスを定位脳固定装置に固定し、頭皮を切開して頭蓋骨を露出させた。次いで、液体窒素で冷やした金属性プローブを M1 直上の頭蓋骨に押し当て、大脳皮質を損傷させた。損傷前、損傷後 4 日、11 日に行動実験を行い、回復過程を調べた。

(2) DREADD を用いた M1 の可逆的抑制

麻酔したマウスを定位脳固定装置に固定し、右 M1 へ AAV-hM4Di-mCherry ウイルスを微量注入し、抑制性 DREADDs である hM4Di を発現させた。3 週間後に、DREADD agonist C21 を腹腔内投与して行動実験を行い、野生型と Sulf1/2 DKO 間の違いを定量的に比較した。対照群としては M1 に AAV-mCherry ウイルスを注入したマウスを用いた。あるいは、AAV-hM4Di-mCherry ウイルスを注入したマウスに C21 の代わりに生理食塩水を腹腔内投与した。

(3) 行動実験

前肢の運動を調べるために、以下の行動実験を行った。

- ① Grid walking test
高さ 50 cm に設置した金網の上を歩かせ、左右の前肢、後肢が網を踏み外した数を計測した。
- ② Cylinder test
透明な円筒の中にマウスを入れ、立ち上がった際に左右の前肢を使った時間（割合）を計測した。また、立ち上がる際に両手を同時に使う割合を計測した。
- ③ Tape removal test
手掌部に柔らかい 3 mm 角のテープを貼り付けた後、マウスを透明なケースに入れ、テープを剥がし終わるまでの時間を計測した。
- ④ Staircase test
階段状のくぼみに置いた小さなエサを前肢を使って取って食べた個数を調べた。

(4) 組織学的解析

凍結損傷実験においては、実験終了後にマウスを灌流固定して脳を取り出し、損傷の範囲と程度を調べた。脳切片を抗マウス IgG 抗体で染めることにより、血液脳関門が破壊された損傷部位を可視化した。大脳皮質 5 層の錐体ニューロンに蛍光蛋白を発現する Thy1-YFP (line H) を Sulf1/2 DKO マウスと交配した野生型と DKO マウスを作製することにより、染色をせずに損傷範囲、及び皮質脊髄路線維の減少を知ることができた。また、PKC γ 、GFAP、Iba1 の免疫染色を行った。

hM4Di 発現実験においては、行動実験終了後にマウスを灌流固定して脳を取り出し、mCherry の発現を調べることにより M1 へ注入できていることを確認した。この場合にも、Thy1-YFP (line H) を用いることにより、大脳皮質 5 層の錐体ニューロンに hM4Di を発現させることができていたかどうかを確認することができた。目的とする領域に正しく導入されていない個体は、解析から除外した。

4. 研究成果

(1) 凍結損傷実験

凍結損傷 12 日後の脳切片では、損傷側の運動野の錐体ニューロンが脱落し、変性した軸索が観察された。同じマウスの延髄と脊髄の切片を皮質脊髄路軸索のマーカーである PKC γ で免疫染色すると、損傷側の錐体路の線維および反対側の脊髄後索の線維が減少していた。また、損傷を与えた大脳皮質では、GFAP 陽性の活性化アストロサイト、Iba1 陽性のミクログリアが増加していた。

Grid walking test では、野生型、DKO とも、損傷前と比べて損傷 4 日後に、反対側の踏み外しの割合が高く、その傾向は損傷後 11 日まで続いた。

Cylinder test では、野生型で損傷 4 日後に、障害側の前肢の使用が顕著に増加し、反対側の前肢の使用が僅かに減少したが、DKO では大きな変化が観察されなかった。

Tape removal test では、野生型と DKO で障害と反対側で成績の低下が、DKO では僅かに同側で成績の低下が観察された。

(2) hM4Di 発現実験

Grid walking test と Staircase test において、野生型マウスで、C21 投与後に、反対側の成績のみ低下したが、DKO では変化が見られなかった。

Cylinder test では、野生型、DKO とも大きな変化は見られなかったが、立ち上がり時の両前肢同時使用（左右同期性）が DKO で野生型より有意に高かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Miya Ken, Keino-Masu Kazuko, Okada Takuya, Kobayashi Kenta, Masu Masayuki	4. 巻 15
2. 論文標題 Expression of Heparan Sulfate Endosulfatases in the Adult Mouse Brain: Co-expression of Sulf1 and Dopamine D1/D2 Receptors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroanatomy	6. 最初と最後の頁 726718
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnana.2021.726718	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 Kerever Aurelien, Nagahara Fumina, Keino-Masu Kazuko, Masu Masayuki, van Kuppevelt Toin H, Vives Romain R, Arikawa-Hirasawa Eri	4. 巻 31
2. 論文標題 Regulation of fractone heparan sulfate composition in young and aged subventricular zone neurogenic niches	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Glycobiology	6. 最初と最後の頁 1531 ~ 1542
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/glycob/cwab081	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Tsuji Yusuke, Kerever Aurelien, Furukawa Toshiki, Kamagata Koji, Saito Yuya, Aoki Shigeki, Hata Junichi, Okano Hideyuki, Kobayashi Kenta, Okada Takuya, Miya Ken, Keino-Masu Kazuko, Masu Masayuki, Arikawa-Hirasawa Eri	4. 巻 88
2. 論文標題 Diffusion magnetic resonance tractography-based evaluation of commissural fiber abnormalities in a heparan sulfate endosulfatase-deficient mouse brain	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Magnetic Resonance Imaging	6. 最初と最後の頁 123 ~ 131
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mri.2022.01.017	査読の有無 有
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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 辻祐介、Kerever Aurelien、齋藤勇哉、鎌形康司、青木茂、畑純一、榎正幸、榎和子、平澤恵里
2. 発表標題 Sulf1/2欠損マウスにおける拡散テンソル画像による脳梁異常の解析
3. 学会等名 日本神経学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kazuko Keino-Masu, Takuya Okada, Sayaka Hashimoto, Masayuki Masu
2. 発表標題 Sulf1/2 double-knockout mice show the tendency not to lose in the tube test
3. 学会等名 日本神経科学大会 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takuya Okada, Marika Kato, Satoshi Aizawa, Kazuko Keino-Masu, Akira Tamaoka, Masayuki Masu
2. 発表標題 Bilateral projection and motor control of the corticospinal tract in mice lacking the heparan sulfate endosulfatases Sulf1/2
3. 学会等名 日本神経科学大会 (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

筑波大学医学医療系 分子神経生物学グループ http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/molneurobiol/
--

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	榎 和子 (Keino-Masu Kazuko) (50344883)	筑波大学・医学医療系・講師 (12102)	

6. 研究組織（つづき）

	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	岡田 拓也 (Takuya Okada) (60451697)	筑波大学・医学医療系・助教 (12102)	
研究分担者	小金澤 禎史 (Tadachika Koganezawa) (80431691)	筑波大学・医学医療系・助教 (12102)	

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