

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06695

研究課題名(和文) 哺乳類の歩行運動を形成する脊髄神経モジュールの同定と再構築

研究課題名(英文) Identification and reconstruction of a modular locomotor network in the mammalian spinal cord

研究代表者

西丸 広史(Nishimaru, Hiroshi)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・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

研究成果の概要(和文)：本研究では、マウス新生仔から腰髄1髄節を摘出した組織標本の運動ニューロン群に、それぞれの個体の後肢の実際の歩行と類似した活動パターンをもつリズム活動誘発できることを見出した。これによりリズムを形成するモジュールが脊髄1髄節内に局在していることが示唆された。また、単一運動ニューロンから記録された膜電位の変化を元に、歩行運動の際のシナプス入力を推定する方法を開発した。これにより、歩行運動の際には、それぞれの運動ニューロンにおいて、支配する筋が収縮するタイミングで興奮性シナプス入力が、弛緩するタイミングで抑制性シナプス入力が強くなることでリズムが形成されていることが推定できた。

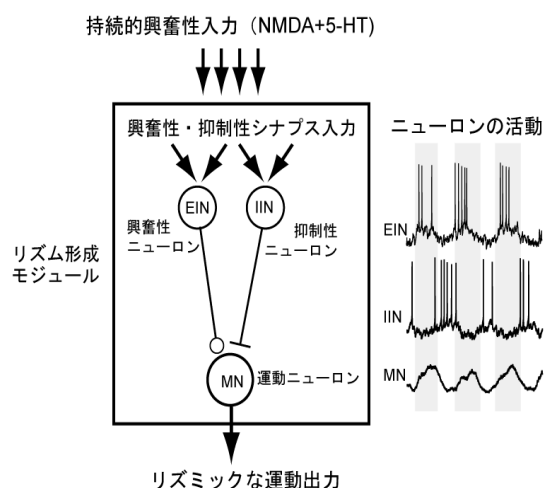
研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the output pattern of rhythmic motor activity in the left and right sides of a single segment preparation taken from the spinal cord of neonatal mice. Rhythm activity with patterns similar to actual walking can be induced in the motor neuron group in such preparation suggesting that a modular network that forms the rhythm is localized in a single segment. We estimated the average variations in excitatory and inhibitory synaptic conductance during a locomotion cycle from a single voltage trace. We found that the peak of excitatory conductance occurred during the active phase of the locomotor cycle, while the peak of inhibitory conductance occurred during the non-active phase. These results suggest that the locomotor-like activity is generated by push-pull modulation via excitatory and inhibitory synaptic inputs.

研究分野：神経科学

キーワード：脊髄 歩行 マウス

### 1. 研究開始当初の背景

歩行運動の際の四肢の関節の屈筋と伸筋のリズミクな協調パターンは脊髄に局在するニューロン群で形成されることが明らかになっている。これまで、除脳ネコや遺伝子改変マウスを用いて、この回路を構成するニューロンがいくつか同定され、その役割が調べられている (Nishimaru and Kakizaki, 2009; Kiehn 2011)。しかし依然としてリズムの形成回路内の機能結合様式は明らかではない。また、これまでにシミュレーションによって歩行の際の関節の周期的な屈曲伸展を形成するしくみの理論モデルがいくつか提案されているが (McRea and Rybak, 2008)、特に局所回路におけるシナプス結合様式および個々のニューロンの細胞膜の電気特性の詳細が明らかではないために、実験データを元に機能的な回路を再構築するには至っていない。その妨げとなっている要因として、この回路を構成する機能単位 (モジュール) そのものが明らかになっていないことが挙げられる。そこで、マウス後肢を支配する神経回路が局在する腰髄において、協調したリズム活動が実験的に観察できる最も小さいサイズの組織片を実験的に切り出し、そこから得られる電気生理学的なデータを元に、計算論的に歩行運動のリズム形成に必要な神経回路 (リズム形成モジュール) を同定し、このモデルを基盤として後肢の歩行神経回路を再構築することを構想するに至った (下図)。



歩行運動を形成する脊髄神経回路は上位中枢からのリズミックではない入力を受けて末梢の筋にリズミックな出力を形成できる回路である。生後間もないマウス新生児の脊髄と後肢の筋群を摘出した標本を人工脳脊髄液で灌流し、薬理的に刺激すると実際に動物が歩くとときと非常によく似た筋活動パターンが観察される。この実験モデルと遺伝子改変技

術を用いて人為的に特定のニューロン群の欠損させたマウス、あるいは回路内の神経結合の異常を引き起こしたマウスに適用することで、脊髄前角のニューロン群の歩行運動発現における役割が明らかになりつつある (Nishimaru et al. 2011; Borgius, et al. 2014; Goulding 2009)。しかしこれらのニューロンがどのように機能的に結合して回路出力を形成しているのかについては依然として不明のままであり、新たなアプローチを取る必要があった。

### 2. 研究の目的

これまで、中枢神経系の局所回路のシナプス結合のしくみに関する研究は主にスライス標本を用いて行われて来た。スライス標本は目的とするニューロンにアプローチしやすいという大きな利点があるが、その反面、スライスを作製する際に神経軸索や神経結合を切断してしまうという欠点がある。機能的結合を保ったままの詳細なシナプス活動の記録は、近年 *in vivo* のげっ歯類の脳における単一ニューロンのパッチクランプ記録を用いた研究結果が報告され始めているが、この方法で記録できる脳神経部位は限られており、脊髄腹側に位置するニューロンから精密なニューロン活動の計測を行なうのは現時点でも極めて困難である。本研究では、スライス標本の利点を最大限に生かしつつ、機能的出力を生み出すことができブロック組織標本を検証、運動発現のための機能的な神経モジュールを同定することを目的とした。これにより、リズミックな運動ニューロン群の活動を示す最小の脊髄組織片を用いた実験モデルを確立することを目指した。

このようにして得られた実験データをもとに、歩行運動の際の運動ニューロンの発火パターンを形成する局所回路からのシナプス入力的大小とタイミングを計算論的に推定することを目的とした。近年、単一の膜電位測定記録からシナプス入力を大きさとその時間変化を推測するために、いくつかの方法が提案されており (Kobayashi ら、2011; Lankarany ら、2013)、こうした方法を用いて、脊椎動物ではカメの引っかき反射を引き起こす脊髄のリズム形成神経回路におけるシナプス入力の推定が行われている (Berg and Ditlevsen 2013)。これらの方法で推定するためには、リズム活動中の運動ニューロンの電気活動の記録に加えて、リークコンダクタンスなど、他の細胞膜の電気生理学的パラメータを測定する必要がある。しかしながら、微

小電極を用いた電気生理学的測定手法を用いて、マウスやラットなどのげっ歯類の脊髄において、これらのパラメータを測定することは非常に困難である (Endo and Kiehn 2008)。この研究では、リークコンダクタンスをはじめとする電気生理学的パラメータの値が不明の場合でも、歩行運動中の運動ニューロンの膜電位記録のみを用いて興奮性および抑制性シナプスコンダクタンスの変動を推定する方法を開発し、歩行運動の際の興奮性および抑制性シナプス入力様式を計算論的アプローチで明らかにすることをめざした。

(参考文献)

- (1) Berg and Ditlevsen, J Neurophysiol. 110:1021-34, 2013
- (2) Borgius et al. J Neurosci. 34:3841-53, 2014
- (3) Kiehn, Curr Opin Neurobiol. 21:100-9, 2011.
- (4) Endo and Kiehn, J Neurophysiol. 2008 100:3043-54, 2008
- (5) Goulding, Nat Rev Neurosci. 10:507-18, 2009
- (6) Kobayashi et al. Neural Comput. 23:3070-93, 2011
- (7) Lankarany et al. Front Comput Neurosci. 7:109, 2013
- (8) McCrea and Rybak, Brain Res Rev. 57:134-46, 2008
- (9) Nishimaru and Kakizaki, Acta Physiol. 197:83-97, 2009 Nishimaru et al. J. Neurophysiol. 106:1782-92, 2011

### 3. 研究の方法

#### (1) 歩行運動のための脊髄内神経モジュールの同定

本研究では、野生型マウス (C57/B6) およびキメラ遺伝子欠損マウスの新生仔 (生後 0-2 日) の尾側胸髄から吻側腰髄から 1 髄節標本を作製した。摘出した標本を記録灌流に動かないように固定し、運動ニューロン群の活動を髄節の前根からガラス吸引電極で複合活動電位を記録した。N-methyl-D-aspartate (NMDA) と 5-hydroxytryptamine (5-HT) を加えたリングル溶液を灌流投与することによって歩行運動様のリズム活動を左右の運動ニューロン群に誘発した。誘発した歩行運動様リズム活動について、左右の運動ニューロン群の活動に相関が見られるかどうかを検討するために、左右の前根から記録されたリズムの位相差について調べた。

#### (2) 歩行運動発現のシナプス入力推定

本研究ではまず、野生型マウス (C57/B6) の新生仔マウス (生後 0-2 日) から単離された脊髄

摘出標本において、運動ニューロンの細胞パッチクランプ記録を行った。パッチクランプ電極先端にはグルコン酸カリウムを主成分とするピペット溶液を充填した。腰髄の腹側に局在する比較的大きなニューロンを微分干渉顕微鏡で可視下に同定し、同じ髄節の前根をガラス吸引電極で電気刺激して逆行性の活動電位が誘発されることを確認し、運動ニューロンとして同定した。NMDA と 5-HT を加えたリングル溶液を灌流投与することによって歩行運動様のリズム活動を運動ニューロン群に誘発し、このときの運動ニューロンの膜電位変化を前根の活動と同時に記録した。

以上の方法で記録した運動ニューロン活動の神経膜電位から、歩行周期における興奮シナプスおよび抑制性シナプスのコンダクタンスの変動を推定する方法を開発した (下図)。まず、膜電位の自己相関関数から総コンダクタンス ( $g_{tot}$ ) を算出した。次に、平均膜電位と総コンダクタンスから、一周期における興奮性シナプスコンダクタンス ( $g_E$ ) および抑制性シナプスコンダクタンス ( $g_I$ ) 変化を推定する公式を導出した。この公式を用いることにより、興奮性および抑制性シナプスコンダクタンス変化を抽出した。また、人工データ (シミュレーションデータ) にこの手法を適用した。その結果、開発手法はシナプスコンダクタンス変化を正確に抽出できることを確認した。

### 4. 研究成果

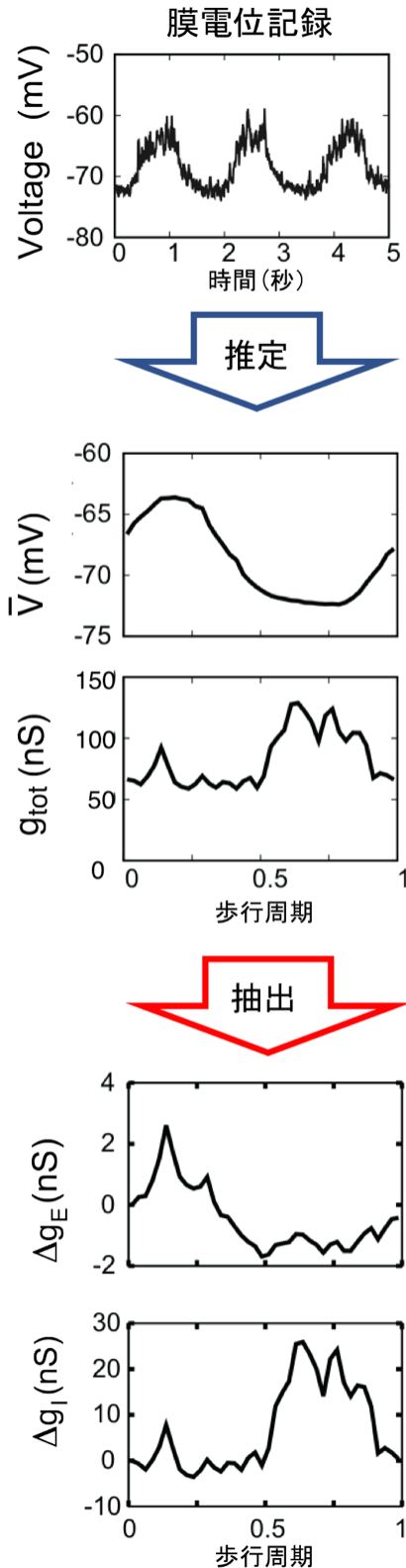
#### (1) 歩行運動のための脊髄内神経モジュールの同定

本研究では、新生仔マウス脊髄から *in vitro* でリズム的な運動ニューロン活動を形成できる局所回路を単離し、正常の歩行を示す野生型マウスと左右肢が同期した異常なウサギ様跳躍歩行を示すキメラ遺伝子欠損マウスでその出力パターンを比較した。この結果、第 1 髄節のみの *in vitro* 標本においても二系統のマウスでそれぞれの実際の歩行と同様の活動パターンを示すことを見出した。この結果は、特定の筋群を支配する運動ニューロン群とその近傍に局在する介在ニューロン群で構成される局所神経回路網において、歩行運動の際のリズム的な筋活動を裏打ちするシナプス活動が形成されていることを示唆した。このことは、歩行の神経メカニズム研究のための新たな実験モデルを確立したことを意味し、この実験モデルを用いて、局所回路とそれを構成するニューロンの同定とその結合様式や神経伝達物質の種類を調べることにより

歩行神経回路を構成する要素やメカニズムの解明に役に立つと考えられる。

## (2) 歩行運動発現のシナプス入力推定

本研究では、脊髄摘出標本において誘発された歩行運動様リズムの際に単一運動ニューロンからホールセルパッチクランプ法によって記録された膜電位の変化を元に、歩行運動の際のシナプス入力を推定する方法を開発した。



この方法では、運動ニューロンの細胞膜の基本的な電気生理学的パラメータを測定することなく、またリズム活動の際の活動電位のバーストが発生している膜電位記録においてもシナプス入力の大きさとタイミングを推定することができる(上図)。この方法により、マウスの脊髄の歩行運動の際には、それぞれの運動ニューロンにおいて、支配する筋が収縮するタイミングで興奮性シナプス入力、弛緩するタイミングで抑制性シナプス入力が強くなる、いわゆる push-pull 様式でリズムが形成されていることが推定できた。

## 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 2 件)

- (1) Kobayashi R, Nishimaru H, Nishijo H, Lansky P. A single spike deteriorates synaptic conductance estimation. *Biosystems* 161:41-45, 2017.
- (2) Kobayashi R\*, Nishimaru H\* (co-first, co-corresponding author), Nishijo H. Estimation of excitatory and inhibitory synaptic conductance variations in motoneurons during locomotor-like rhythmic activity. *Neuroscience*. 335:72-81, 2016.

[学会発表] (計 2 件)

- (1) 西丸広史, 井上賢太, 小林亮太, ヴィディエジャ セルヒオ, 松本惇平, 糸原重美, 岩里琢治, 西条寿夫,  $\alpha$ キメラリノックアウトマウスのウサギ様跳躍歩行を引き起こす局所パターン形成神経回路の探索, 第38回日本神経科学学会大会, 神戸, 2016
- (2) 西丸広史, 井上賢太, 松本惇平, 糸原重美, 岩里琢治, 西条寿夫,  $\alpha$ キメラリノックアウトマウスの脊髄歩行神経回路における胸髄及び腰髄の局所回路の機能解析, 第93回日本生理学会大会, 札幌, 2016

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西丸 広史 (NISHIMARU, HIROSHI)  
富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)  
・准教授

研究者番号: 20302408

### (2) 連携研究者

小林 亮太 (KOBAYASHI, RYOTA)  
国立情報学研究所・情報学プリンシプル  
研究系・助教

研究者番号: 70549237