

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06749

研究課題名(和文) 霊長類における皮質脊髄路の並列的情報処理機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of parallel computing of the corticospinal pathways in the primates

研究代表者

梅田 達也 (Umeda, Tatsuya)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 モデル動物開発研究部・室長

研究者番号：90376723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ラットにおいて、組換え狂犬病ウイルスを用いて premotor neuron を同定することには成功したが、成功確率が低かった。そのため、マカクサルで premotor neuron を同定するまでいたらなかった。また、GFP reconstitution across synaptic partners (GRASP) を用いて大脳皮質 脊髄介在ニューロン間の結合をラットで検出を試みたが、検出できなかった。マカクサルにおける大脳皮質運動野からの投射経路を解析したところ、一次体性感覚野への投射を検出することができた。

研究成果の概要(英文)：We labeled premotor neurons of rats using recombinant rabies virus in the pilot experiments. However, the labeling efficiency is quite low so that we could not try to label premotor neurons in macaque monkeys using the same labeling method. We tried to detect a connection between cortical neurons and spinal interneurons using GFP reconstitution across synaptic partners (GRASP) but did not any signals arose from GRASP. We examined the distribution of projection fibers of neurons in the primary motor cortex of a macaque monkey. We detected labeled fibers in the primary somatosensory cortex, which is considered to function in conveying efference copy signals to the somatosensory system.

研究分野：神経科学

キーワード：皮質脊髄路

研究開始当初の背景

精密把持といった手指を巧みに扱う運動機能は、系統発生において旧世界ザル以降のみ示す機能である。これらの動物においてのみ一次運動野から脊髄運動ニューロンへの直接的な伝達経路があり、手指の独立した運動制御に機能し、巧緻運動を生み出していると考えられている。一方、一次運動野からの多くの投射は介在ニューロン (premotor neuron) に対して行われており (Rathelot and Strick, 2009, PNAS) 複数の筋肉の協働的な活動を制御していると考えられている (Takei and Seki, 2010, JNS)。このように一次運動野から脊髄運動ニューロンに至るまで機能的に異なると考えられる経路が並列的に構成され、上肢の複雑な運動を作り出している。従来の研究では、個々の伝導路を切断することで各経路の機能が調べられてきた。しかしながら、一次運動野から多くの入力を受ける髄節内介在ニューロンと運動ニューロンは同じ伝導路からの入力を受けるため切り分けられず、ゆえに、直接路と間接路の全体的な構成はいまだ不明である。

そこで、一次運動野と premotor neuron・運動ニューロンとの結合を解剖学的に抽出し、各々の結合を定量的に記述することで、一次運動野から運動ニューロンに至る経路における直接路・間接路の構成とそれが作り出す筋活動の制御様式を明らかにすることができると考え、本研究を着想した。

2. 研究の目的

(1) 直接路と間接路の機能的特性の解明

直接路では独立した筋肉の働きを、間接路では協働的な筋肉の働きに関与していると言われる。そこで、直接路と間接路が入力する運動ニューロンの支配筋の数を定量解析し、直接路・間接路の機能的特性の解剖学的な背景を明らかにする。

(2) 上肢筋肉の制御様式の特徴の解明

末梢側の筋肉は手の巧緻性に重要であり、中枢側の筋肉は巧緻性にはあまり関与しないと考えられる。そこで、末梢筋・中枢筋の運動ニューロンに対して、直接路と間接路が運動ニューロンに与える影響の度合いをそれぞれ定量的に明らかにする。そして、目標(1)で示した直接路・間接路の機能的特性を考慮して、末梢筋・中枢筋の制御様式の違いを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 運動ニューロンに投射する神経細胞の同定

マカクサルで運動ニューロンに投射する細胞を特異的にラベルする方法を開発する。近年、継シナプス性ウイルスである組換え狂犬病ウイルスを用いて1シナプスだけを介したシナプス前神経細胞をラベルする手法が開発され (Wickersham et al., 2007, Neuron) げっ歯類で premotor neuron が同定されている

(Stepien et al., 2010, Neuron)。しかしながら、先行研究では幼若時でしか成功しておらず、まして、霊長類での成功例はない。原因として狂犬病ウイルスの感染効率の低さが考えられる。そこで、トリ白血病ウイルス受容体 (TVA) とそのリガンド EnvA の結合を利用して、運動ニューロンに特異的に感染する手法を開発し運動ニューロンに投射する細胞をラベルする。

(2) 一次運動野投射細胞の入力を受ける神経細胞の同定

2つの相補的な GFP フラグメントで2つの神経細胞が結合するシナプスを同定することができる (GFP reconstitution across synaptic partners (GRASP); Feinberg et al., 2008, Neuron)。この手法を用いて、皮質投射細胞からの入力をうける premotor neuron・運動ニューロンを同定する。

4. 研究成果

(1) 組換え狂犬病ウイルスを用いた premotor neuron のラベル方法の開発

TVA 遺伝子をコードするアデノ随伴ウイルス (AAV) を上肢筋肉に注入し、逆行性に脊髄運動ニューロンに遺伝子導入を行い、その後、EnvA で覆われた狂犬病ウイルスを脊髄に注入し、TVA を発現する運動ニューロンに特異的に感染させる手法で premotor neuron がラベルを試みる。マカクサルは使用する頭数が限られ、条件検討を行うことが難しいため、はじめにこの手法を用いた premotor neuron の同定をラットで行った。21日齢のラットの三頭筋に TVA と RVG を発現する AAV1 を注入し、その4週間後に脊髄に EGFP を発現する RVG 欠損狂犬病ウイルスを注入した。1週間後に観察したところ、運動ニューロン以外にも EGFP を発現する脊髄神経細胞が検出された。注入部位と対側の脊髄の神経細胞も EGFP を発現し、premotor neuron と考えられる。更に、大脳皮質から胸髄レベルまで網羅的に観察を行ったところ、延髄網様体、頸髄から胸髄にかけての脊髄、後根神経節で premotor neuron が検出され、ラットにおいて脊髄や延髄において premotor neuron の同定に成功した。しかしながら、注入方法がまだ最適化されていないためか、16匹の動物に対して premotor neuron を同定することができた動物は3匹だけであり、効率が低かった。このため、限られた数しかできないマカクサルには、同じ実験系を使用することが難しいと判断した。

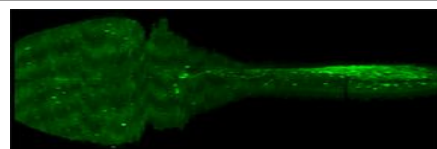


図1: EGFP を発現する premotor neuron。大脳皮質から脊髄までを示す。

(2) GRASP を用いた大脳皮質 - 脊髄介在ニューロン間のシナプスのラベル方法の開発

大脳皮質から脊髄介在ニューロン間のシナプスを GRASP の手法を用いた同定をラットを用いて試みた。一次運動野に GRASP の一部を発現する AAV1 を、脊髄にその相補的な GRASP を発現する AAV1 を感染させた。しかしながら、AAV 感染から 4 週間後に一次運動野と脊髄介在ニューロン間での GRASP による蛍光は脊髄において検出されず、シナプス結合の同定を行うことはできなかった。バックグラウンドが高く、所有する蛍光顕微鏡ではバックグラウンドとシグナルを分離することが困難であることが原因であると考えられる。

(3) マカクサルにおける大脳皮質運動野からの投射経路の解析

以上の結果から、Premotor neuron の同定や GRASP におけるシナプス結合の同定が技術的に難しいことがわかったため、マカクサルにおける大脳皮質一次運動野の投射パターンを調べることから着手した。

まず、神経トレーサー Biotinylated dextran amine (BDA) をマカクサルの一次運動野に注入した。皮質内微小電気刺激を用いて手の領域を同定し、10%BDA を手の領域に注入した。その結果、一次運動野にトレーサーを注入することに成功した。皮質内投射を調べたところ、一次運動野から一次体性感覚野への投射ファイバーを新たに見出した(図2)。一次運動野から一次体性感覚野への投射は、近年げっ歯類において多数報告されている。一方、霊長類においては、一次体性感覚野から一次運動野への投射はこれまで多数報告があるが、一次運動野から一次体性感覚野についてはあまり報告がなされていない。今回のトレーサー注入実験において、霊長類におい

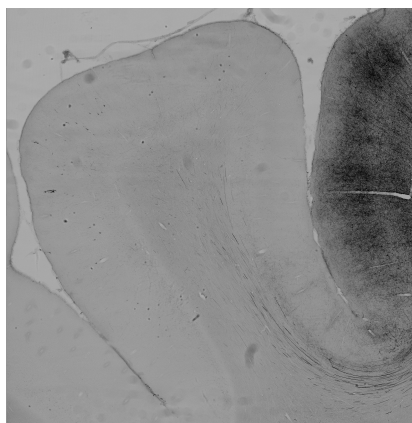


図2: 一次体性感覚野における一次運動野の投射ファイバー。一次運動野(右端)から BDA でラベルされた軸索が検出される。

ても一次運動野から一次体性感覚野への経路を確認することができた。次に、機能的な連絡があるか調べるために電気生理学的手法を用いた実験を行った。麻酔下の1頭のマカクサルの一次運動野の手の領域をまず皮質内微小電気刺激により同定した。そして同定された手の領域を電気刺激し、その応答を一次体性感覚野のユニット活動およびフィールド活動の記録を行った。その結果、一次体性感覚野からは電気刺激に対する応答を示すニューロン活動を記録することができなかった。以上の結果から、解剖学的な結合で見出された一次運動野から一次体性感覚野の経路は、なんらかの抑制がかかっているものと推察される。

また、一次運動野からの投射軸索は、脊髄への投射軸索を検出できたものの、延髄楔状束核への投射は観察されなかった。これまで、一次運動野から延髄楔状束核への投射はマカクサルにおいて報告があるが、今回検出されなかったのは手の領域に限局して神経トレーサーを導入したことが考えられる。そこで、逆行性のトレーサーである Cholera toxin subunit B を1頭のマカクサルの延髄楔状束核に注入した。末梢感覚神経を電気刺激し、その体性感覚応答が記録できた場所に、逆行性トレーサーを注入した。逆行性にラベルされた神経細胞が、一次運動野・一次体性感覚野・高次体性感覚野で検出された。一次運動野においては、手指の領域と考えられる場所にはラベルされた細胞が検出されなかった。このことから、一次運動野の手指の領域以外の箇所が、延髄楔状束核へと軸索投射をしていることが考えられる。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

梅田 達也 (UMEDA, Tatsuya)

国立研究開発法人 国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・モデル動物開発研究部・室長

研究者番号：90376723