

平成21年 6月 6日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007 - 2008

課題番号：19500494

研究課題名（和文）成熟後および発育期における運動習慣が小脳シナプスの機能と運動スキルに及ぼす影響

研究課題名（英文）The influence of physical activity on the cerebellar synaptic function and the motor skill in adult and developmental stages.

研究代表者

柳原 大 (Dai Yanagihara)

東京大学・大学院情報学環・准教授

研究者番号：90252725

研究成果の概要：

成熟しすでに脳における回路形成が一旦完成し、固定化された後でも廃用症候群や慢性的な運動不足により運動の制御・学習機能の低下が生じるが、そのような原因の一つとして下オリーブ核・登上線維 プルキンエ細胞シナプスの機能低下が関与している可能性がある。本研究では、マウスおよびラットを用いた動物実験により、下オリーブ核・登上線維系の小脳機能への影響を明らかにし、また、不活動に伴う登上線維 プルキンエ細胞シナプスの機能への影響について調べた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成19年度	2,700,000	810,000	3,510,000
平成20年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・身体教育学

キーワード：小脳、下オリーブ核、運動学習、運動スキル

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究の背景

小脳皮質における神経回路の主役であり唯一の出力細胞であるプルキンエ細胞は、平行線維と登上線維の2つの経路を介して興奮性のシナプス入力を受ける。この2つの入力がかつ時間的に一致して、かつ反復して起きたとき、平行線維とプルキンエ細胞の間のシナプスに伝達効率の持続的な低下、すなわち長期抑圧が生じる。この長期抑圧は、運動の学習・記憶における細胞レベルでの基礎的メカニズムであると考えられている。プルキンエ細胞への苔状線維 顆粒細胞 平行線維系の入力は、プルキンエ細胞の主たる発火活動の源であり、細胞外記録した場合には単純スパイクとして観察される。一方、下オリーブ核からの登上線維入力は、複雑スパイクとして細胞外記録され、実行した運動の誤差情報をプルキンエ細胞に伝えていると推察されている。たとえば、四足動物の歩行中に複雑スパイクを記録した場合には、外乱を加えない通常の床上歩行やトレッドミル歩行においては、その発火頻度は1 Hz以下と非常に低く、かつその発火パターンもランダムである (Andersson & Armstrong, 1987; Yanagihara & Udo, 1994; 柳原, 2000)。ところが、歩行中に外乱を肢に加えると複雑スパイクはその外乱により特異的に引き起こされる (Andersson & Armstrong, 1987; Yanagihara & Udo, 1994; 柳原, 2000)。このような外乱に応じた複雑スパイク、すなわち下オリーブ核からの登上線維によるプルキンエ細胞へのシナプス入力は、プルキンエ細胞において電位依存性カルシウムチャンネルを活性化し、細胞内カルシウム濃度の増大を引き起こし、長期抑圧を発現させるのに必要不可欠であることが *in vitro* 小脳スライス標本による研究で判明している。2005年に、申請者らは、成熟したマウスにおいて、登上線維からプルキンエ細胞へのグルタミン酸作動性の入力を、拮抗剤を用いて約1週間持続的に阻害すると、形態学的にはプルキンエ細胞に絡みつくように形成されている登上線維が退縮し、電気生理学的には登上線維終末からのグルタミン酸の放出が減弱されることを発見した (Kakizawa et al., 2005)。この事実は、運動の学習、運動スキルの獲得に必要な登上線維からプルキンエ細胞へのシナプス結合、情報伝達は大人になっても固定的なものではなく、活動依存的に変化することを示唆している。さらには、例えば歩行中にはプルキンエ細胞への登上線維入力は低頻度でランダムに起こるが、これは *on line* での

運動制御には貢献していないと考えられるが、シナプスの機能の維持においては大変重要な現象であることを推測させる。

(2) 本研究の着想、動機

上述した登上線維 プルキンエ細胞間シナプスの退縮現象はプルキンエ細胞上に存在するグルタミン酸受容体の阻害薬 (NBQX) を投与するという非常に人工的な実験であり、Natural な現象とは言えない。ヒトの発達期における運動習慣・運動経験の差異、成熟した後での運動習慣の差異、特に生活不活発病とも呼称される廃用症候群などにより運動スキルの獲得機能 (運動の学習機能) に大きな影響が及ぼされるということは臨床的、経験的にはよく知られている。しかしながら、それらの本質的メカニズムについては未だ明らかではない。そこで、それらの生理学的・分子生物学的メカニズムの解明と、さらには予防としての運動の効用について科学的に理解・提案するために研究を着想、計画するに至った。

2. 研究の目的

成熟後の廃用症候群を模擬した不活動、発育・発達期における運動習慣の差異が、下オリーブ核 登上線維・プルキンエ細胞シナプスの機能と運動スキルの獲得・発現に及ぼす影響について明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

マウスおよびラットを用いた動物実験モデルにより行動学的、電気生理学的、免疫組織化学的に解析した。これらの動物における運動の制御・学習機能については、小脳が歩行運動の適応制御に重要な役割を果たしていることから、床平面上での歩行 (ラット) トレッドミル歩行 (マウス) 回転棒上での歩行課題 (マウスおよびラット) を用いて、歩行中の肢の kinematics ならびに四肢の協調性について高速度カメラを用いた記録・解析により詳細に調べた。電気生理学的には、マウスのプルキンエ細胞の発火活動を *in vivo* にて細胞外記録し、登上線維入力による複雑スパイクを記録・解析した。下オリーブ核に蛍光色素を注入し、プルキンエ細胞への登上線維シナプスの形態の変化を組織化学的に光学顕微鏡レベルにて解析した。廃用症候群・運動不足モデルとして、狭小ケージにて4週間飼育した成熟マウスおよび後肢のギプス固定により後肢の不活動を課し

た成熟ラットを用いた。さらに、登上線維の起始核である下オリブ核を薬理的に破壊したマウスおよびラットにおいて、歩行運動の解析および恐怖条件付け徐脈の発現について詳細に調べた。

4. 研究成果

下オリブ核・登上線維系を選択的に薬理破壊すると、歩行の適応制御および恐怖条件付け徐脈の発現に顕著な障害が観察された。ラットにおいては、平面上での歩行およびその上に設置された障害物を跨ぎ越す際の歩行動作の解析を行ったが、下オリブ核・登上線維系破壊前に比べ破壊後は歩行周期持続時間ならびに接地相持続時間が増大した(図1)。

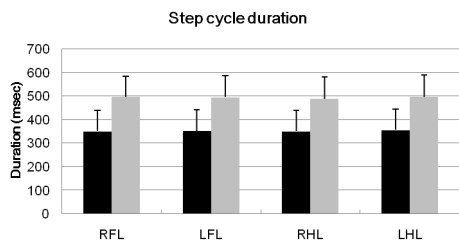


図1 歩行周期持続時間の変化

黒色 = Pre-lesion 灰色 = Post-lesion

また、歩行パターンにおいて、破壊後に各肢間の接地、離地のタイミングが不安定になり同側肢間・対側肢間・対角肢間の肢間協調が障害されていた。破壊後の右後肢のkinematicsでは、遊脚相中の後肢つま先が過度に持ち上がっていた(図2)。平面歩行中の各関節において、破壊前に比べて破壊後では遊脚相中の股関節、膝関節が過度に屈曲して肢内協調が崩れていた(図3)。

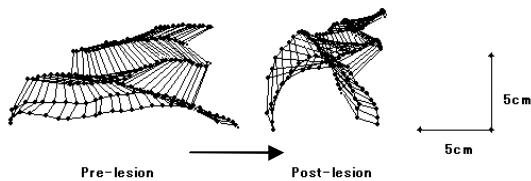


図2 遊脚相中のスティックピクチャー

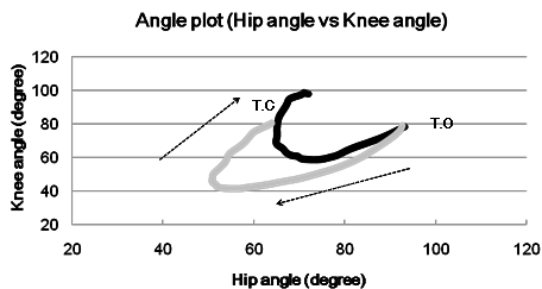


図3 遊脚相における股関節と膝関節の角度関係

黒色 = Pre-lesion 灰色 = Post-lesion
T.C=接地 T.O=離地

障害物を跨ぎ越す際の後肢つま先の軌跡において、破壊前ではLead limb(障害物を先に跨ぎ越す肢)・Trail limb(障害物を後に跨ぎ越す肢)とも安定した動作を示したが、破壊後では不安定な軌跡を示した(図4)。また、障害物を越えている時の後肢つま先の最大拳上高は、破壊前・後で障害物の高さに応じた増加が観察されたが、破壊後では過度に増加している傾向が顕著であった。加えて、破壊後ではつま先の軌跡の試行間での変動が大きくなった。

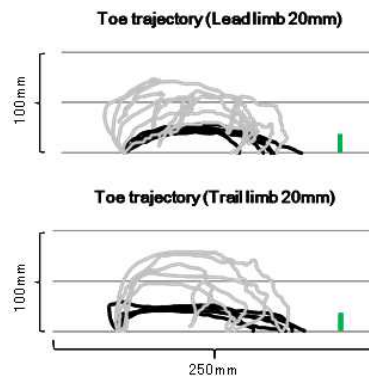


図4 障害物(2cm)回避時の後肢つま先の軌跡

黒色 = Pre-lesion 灰色 = Post-lesion

障害物の高さや位置は目安として表示している。

回転棒上での歩行課題においては、下オリブ核破壊後には棒上での歩行時間が顕著に減少した。また、マウスにおいては、平面での歩行ではなく、トレッドミル上での歩行を課し、同様に動作解析を行った結果、ラットにおける平面上での歩行動作の障害と同様な症状が観察された。これらの結果より、下オリブ核・登上線維からプルキンエ細胞へのシナプス入力の欠損は、平面歩行時の歩行制御のみならず、障害物を回避(跨ぎ越し)する動作の生成に機能的障害を生じることが結論された。

さらに小脳が条件付け徐脈発現の発現に関与していることから、これに対する下オリブ核破壊の影響を観察したところ、下オリブ核を薬理的に破壊したマウスでは、条件付け徐脈が発現されないことが判明した。

廃用症候群・運動不足モデル動物として、成熟マウスを狭小ケージ内で4週間、歩行運動における動作、ならびに登上線維の形態には顕著な影響は観察されなかった。また、ラット後肢のギプス固定により後肢の不活動を課したラットにおいては、後肢骨格筋の萎縮は観察されたが、歩行における動作および登上線維によるプルキ

ン工細胞へのシナプス形成に光学顕微鏡レベルでは顕著な影響は現在までのところ観察されていない。

本研究の遂行により、小脳皮質プルキン工細胞への重要な情報伝達を行っている、下オリブ核・登上線維系の運動の制御及び学習機能における新たな所見が発見されたが、身体運動の不活動、特に後肢骨格筋活動の減少による登上線維シナプスへの影響を観察するためには実験条件の設定の変更が必要とされるかもしれないと考えられ、今後の問題として残っている。また、発育・発達期における不活動の影響についても今後検討する予定である。

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2件)

1. Endo, S., Shutoh, F., Dinh, T. L., Okamoto, T., Ikeda, T., Suzuki, M., Kawahara, S., Yanagihara, D., Sato, Y., Yamada, K., Sakamoto, T., Kirino, Y., Hartell, N. A., Yamaguchi, K., Itoharu, S., Nairn, A. C., Greengard, P., Nagao, S., and Ito, M.: Dual involvement of G-substrate in motor learning revealed by gene deletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 3525-3530, 2009. (査読有)
2. 柳原 大: 歩行と小脳. *Brain Medical* 19, 349-358, 2007. (査読無)

[学会発表](計10件)

1. 竹内絵理、山浦 洋、柳原 大、石田 綾、柚崎通介. Cbln1 ノックアウトマウスにおける歩行失調. 第8回姿勢と歩行研究会、2009年3月21日、東京.
2. 佐藤 和、青木 祥、柳原 大、境 和久、端川 勉. ラットの障害物歩行における下オリブ核 登上線維系破壊の影響. 第8回姿勢と歩行研究会、2009年3月21日、東京.
3. 柳原 大. 脳と運動・スポーツ 運動が脳を育てる. 第47回全国学校体育研究大会(特別講演). 2008年10月30日、岩手.
4. 佐藤 和、持永 新、柳原 大. ラットの障害物回避歩行における下オリブ核-登上線維系破壊の影響. 第16回日本運動生理学会大会、2008年8月2日、奈良.
5. 竹内絵理、柳原 大、石田 綾、柚崎通介. 歩行制御における Cbln1 の役割. 第16回日本運動生理学会大会、2008年8月2日、奈良.
6. 古田島浩子、柳原 大、鳴海 栄、柚崎通介. 恐怖条件付け心拍応答における小脳2型グルタミン酸受容体の役割. 第16回日

本運動生理学会大会、2008年8月2日、奈良.
7. 柳原 大、古田島浩子、竹内絵理、境 和久、端川 勉. 恐怖条件付け心拍応答における下オリブ核-登上線維系の役割. 第16回日本運動生理学会大会、2008年8月3日、奈良.

8. 柳原 大. 運動スキルの脳神経科学 適応制御に関わる小脳機能. ロボティクス・メカトロニクス講演会 2008. 2008年6月5日、長野.

9. 山浦 洋、竹内絵理、柳原 大、伊藤宏司、平井宏和、寅嶋 崇、小山知穂. ヒト脊髄小脳変性症3型モデルマウスにおける姿勢の障害. 第7回姿勢と歩行研究会、2008年3月29日、東京.

10. 柳原 大. モータースキル遺伝子の発掘のための基礎的研究と今後の展開. 第62回日本体力医学会大会、2007年9月15日、秋田.

[図書](計1件)

1. 柳原 大. 運動スキル、スキルトレーニングと小脳皮質. 身体トレーニング 運動生理学からみた身体機能の維持・向上(宮村実晴編集). 真興交易(株)医書出版部、2009, 10(30-39).

6. 研究組織

(1)研究代表者

柳原 大

東京大学・大学院情報学環・准教授

90252725

(2)研究分担者

(3)連携研究者

柿澤 昌

長崎大学・医学部・講師

40291059