様　式　C－19、F－19、Z－19　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 27 年　7 月 13 日現在

機関番号：82611
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2013～2014
課題番号：25871057

研究課題名（和文）大脳皮質の複数の運動関連領野による脊髄運動性神経回路の制御機構の解明

研究課題名（英文）Comprehensive analysis of cortico-motoneuronal pathways of adult rats using virus vectors

研究代表者
梅田　達也（Umeda, Tatsuya）

独立行政法人国立精神・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）　3,300,000円

研究成果の概要（和文）：アデノ随伴ウイルスでトリ白血病ウイルス受容体（TVA）と狂犬病Gタンパク質をラット上肢筋に注入する事で、頚髄運動ニューロンに特異的に発現させ、TVAのリガンドEnvAでコートされた組換え狂犬病ウイルスを脊髄に注入した。その結果、いまだ成功例が報告されていない成熟ラットにおいて、premotor neuronをラベルすることに成功した。更に、大脳皮質から脊髄胸髄まで網羅的にpremotor neuronの分布を観察・定量解析したところ、延髄網様体から胸髄にかけての脊髄・後根神経節においてpremotor neuronが検出された。

研究成果の概要（英文）：Expression of a receptor (TVA) for subgroup A envelope (EnvA) of avian sarcoma and leukosis virus into forelimb motoneurons enabled specific infection of a recombinant rabies virus coated with EnvA into motoneurons in adult rats. By additional expression of rabies G protein in motoneurons, we were able to label premotor neurons in the adult rats. We analyzed the distribution of premotor neurons from the cerebral cortex to the thoracic spinal cord and revealed that motoneurons received monosynaptic inputs from the brainstem, the spinal cord and the dorsal root ganglia, but not from the cerebral cortex and the red nucleus.

研究分野：神経解剖学

キーワード：運動ニューロン　ラット　ウイルスベクター

１．研究開始当初の背景

上肢の随意運動では、大脳皮質高次運動野からの運動コマンドが、一次運動野を経て脊髄運動ニューロンに伝達され筋活動が誘発される。しかしながら、頸髄レベルの脊髄には大脳皮質の複数の領野が軸索を投射しており（He et al., 1993, JNS）、一次運動野以外の領野からの入力の機能的な意義や、複数の領野からの入力の情報処理の詳細な機構についてはいまだにわかっていない点が多い。研究代表者は、幼若時に片側の大脳皮質を除去するといった脳損傷を行ったラットでの一連の仕事において、2 か所の脊髄投射領野で再編成の仕方が異なっていることを見つけた。そこでの知見から脊髄への入力の運動制御における役割も大脳皮質の領野ごとに異なっていると考え、それらの処理機構の解剖学的基盤を明確にするため、本研究を着想した。

霊長類以外の動物では、大脳皮質からの活動が脊髄内の介在ニューロン（spinal premotor neuron）を介して運動ニューロンに伝達される。一方、霊長類でも、運動ニューロンに直接投射する神経細胞は主に一次運動野に局在し、他の領野からの投射は spinal premotor neuron を介して行われている（Rathelot and Strick, 2009, PNAS）。さらに、spinal premotor neuron が精密把持運動において重要な役割を果たしていることが明らかとなった（Kinoshita et al., 2012, Nature）。すなわち、哺乳類一般的に、大脳皮質からの情報を集約し運動ニューロンに分配する spinal premotor neuron が運動機能に重要な役割を果たしているといえる。

そこで、大脳皮質からの信号を運動ニューロンまで伝達しうる回路網を包括的に理解するには、各皮質領野からの入力が spinal premotor neuron でどのように処理されうるか調べる事が重要である。そのためには、個々の皮質領野と spinal premotor neuron との結合様式を解剖学的に抽出し、詳細な回路網を記述することが必要である。

２．研究の目的

上肢の随意運動では、大脳皮質運動前野などの高次運動野からの運動コマンドが一次運動野を介して、脊髄運動ニューロンへと伝わり運動が遂行される。一方、一次運動野以外の高次運動野も脊髄に軸索投射しているが、これらの領野からの入力が一次運動野からの入力と、脊髄でどう統合されているのかわかっていない。本研究では、ラットにおいて大脳皮質から入力をうけ運動ニューロンに出力する脊髄内の介在ニューロン（spinal premotor neuron）を特異的にラベルすることで、大脳皮質の複数の脊髄投射領野と spinal premotor neuron の結合様式を解剖学的に調べ、脊髄投射領野から脊髄運動性神経回路への情報処理機構を明らかにする。

３．研究の方法

皮質領野と spinal premotor neuron の結合様式を解剖学的に調べるため、spinal premotor neuron を特異的にラベルする方法を開発する。近年、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、成熟時のラットでの premotor neuron の同定はいまだに報告がない。原因としてウイルスの筋肉から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 の結合を利用する事で組換え狂犬病ウイルスを運動ニューロンに特異的に感染させ（図 1）、premotor neuron を GFP の発現でラベルする方法を開発する。

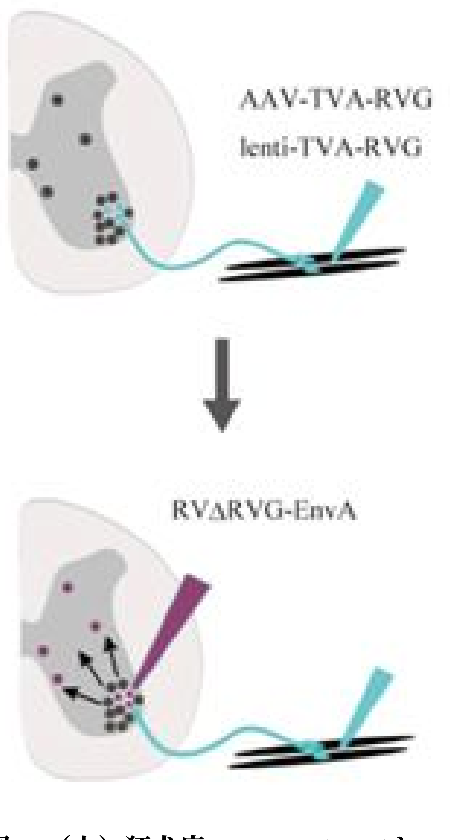

図 1：（上）狂犬病 G protein(RVG)と TVA を発現するウイルスを筋肉に注入し運動ニューロンに逆行性に感染させる。
（下）EnvA でコートされた RVG 欠損狂犬病ウイルスを脊髄に注入し、TVA 陽性運動ニューロンのみに感染させる。狂犬病ウイルスは premotor neuron に感染が広がる。（Stepien et al., Neuron 2010 を基に改変した図）

４．研究成果

（１）運動ニューロンへの遺伝子導入ウイルスベクターの同定

はじめに、TVA を運動ニューロンに高効率に発現させる必要がある。そのためには、運動ニューロンへの感染効率の高いウイルスベクターを同定する必要があり、その条件検討を行った。EGFP を発現するアデノ随伴ウイルス（AAV）のセロタイプ 1,2,5,6,DJ を、生後 8・21 日齢のラットの三頭筋に注入し、その 4 週間後に脊髄をかん流固定し、EGFP 発現細胞を観察した。EGFP を発現する運動ニューロン数を数えた結果、8・21 日齢にウイルス注入したラットのいづれにおいても、アデノ随伴ウイルスセロタイプ 1（AAV1）が最も EGFP 発現細胞数が多かった。一方、後根神経節の感覚神経細胞においても EGFP の発現がみられ、純粋に運動ニューロンにのみ感染するわけではなかった。そこで、次に運動ニューロン特異的に遺伝子発現を行うことを目的として、運動ニューロン特異的プロモーターとして報告されている HB9 promoter を用いて、運動ニューロン特異的発現のシステムを検討した。HB9 promoter を組み込んだ AAV1 を用いて EGFP の発現を試したところ、脊髄において EGFP の発現は検出されなかった。HB9 が発生期において機能する転写因子ゆえに、大人では効果がなかったと推察される。

さらに、AAV のほかに、レンチウイルスを用いて運動ニューロンへの遺伝子導入効率を検討した。21 日齢ラットの三頭筋に AAV と同様に注入し、4 週間後に EGFP の発現を観察した。その結果、単一細胞あたりの EGFP の発現量は AAV1 よりも低く、免疫染色しないと検出する事が出来なかった。さらに、免疫染色を行って EGFP 発現細胞を同定したところ、発現細胞数も AAV1 よりも少なかった。以上の結果から、AAV1 が効率的に運動ニューロンに導入できるウイルスであるということがわかった。

（２）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

次に、AAV1 を用いて運動ニューロンに TVA と RVG を発現させ、さらに RVG 欠損狂犬病ウイルスを感染させる実験を行った。まず、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、頚髄から胸髄にかけての脊髄、後根神経節で premotor neuron が検出された（図 2）。一方、脊髄に軸索を投射する大脳皮質や赤核では、premotor neuron が検出されなかった。このことから、ラットにおいて、三頭筋の運動ニューロンに monosynaptic な入力は延髄・脊髄・後根神経節の神経細胞からによるものであることがわかった。

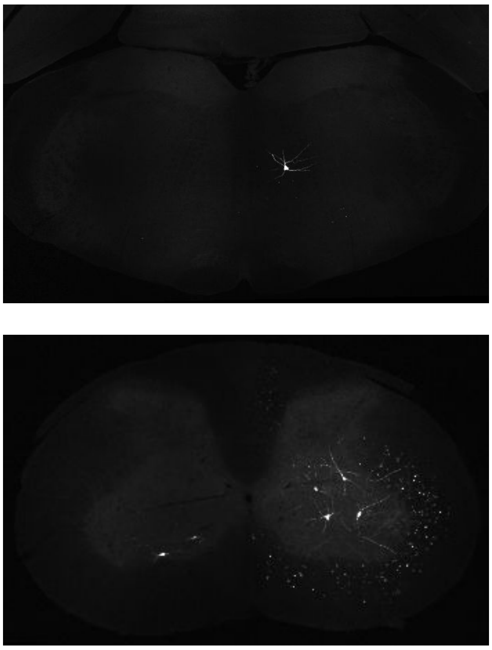

図 2:EGFP を発現する premotor neuron。（上：延髄、下：脊髄）

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１件）
１．梅田　達也、小林　憲太、小林　美樹、高橋　俊貴、船越　健悟　アデノ随伴ウイルスベクターを用いた運動ニューロンへの遺伝子導入　第 37 回日本神経科学大会　2014 年 9 月 12 日、パシフィコ横浜（横浜）

〔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

(2)研究分担者　なし

(3)連携研究者　なし

(4)研究協力者
　小林　憲太（KOBAYASHI Kenta）
　独立行政法人　自然科学研究機構　生理学研究所　ウイルスベクター開発室

　森　琢磨　（MORI Takuma）
　国立大学法人　信州大学　医学部　生理学教室