

論文内容の要旨

論文題目

平行線維-プルキンエ細胞間シナプスの発達異常が
歩行動作に及ぼす影響

Effects of developmental abnormalities
in parallel fiber-Purkinje cell synapse formation on locomotor movements

竹内 絵理

【研究の背景】

小脳は姿勢や歩行の適応制御に重要な役割を果たす脳部位であり、円滑な歩行動作の生成に貢献している。小脳皮質の虫部・中間部は脊髄との入出力関係が強く、脊髄と小脳は脊髄小脳ループを形成しオンラインで歩行制御に関わっている(Arshavsky, 1983; Orlovsky, 1999)。小脳皮質唯一の出力細胞であるプルキンエ細胞は、延髄下オリーブ核を起始とする登上線維および顆粒細胞の軸索である平行線維から興奮性入力を受ける。現在までのところ、これらの興奮性入力の歩行制御に対する役割の全容は明らかとなっていない。平行線維-プルキンエ細胞間シナプスの後膜には数種類の受容体が存在し、そのなかでも $\delta 2$ 型グルタミン酸受容体 (GluD2) は小脳のプルキンエ細胞のみに特異的に発現しており、他の脳部位には発現していない。GluD2 変異マウス (GluD2 ノックアウトマウス、*hotfoot* など) は、平行線維-プルキンエ細胞間シナプス数の減少、登上線維の多重支配といった構造的異常に加え、電気生理学的解析から長期抑圧の障害といった機能的異常を呈することが報告されている (Kashiwabuchi et al., 1995; Kurihara et al., 1997; Motohashi et al., 2007)。これまで GluD2 はオーファン

受容体とされていたが、そのリガンドがセレベリン 1 (Cbln1)であることが報告された(Matsuda et al., 2010)。Cbln1 は主に小脳の顆粒細胞から分泌されるサイトカインで、平行線維-プルキンエ細胞間シナプスの形成と維持に重要な働きをしている(Ito-Ishida et al., 2008; Yuzaki, 2008, 2009)。Cbln1 ノックアウトマウスは平行線維-プルキンエ細胞間シナプス数の著しい減少、登上線維の多重支配、長期抑圧の障害といった GluD2 変異マウスと類似した表現型を示すことが報告されている(Hirai et al., 2005)。これまでに小脳性歩行失調は主としてヒトにおいて臨床神経学的に調べられてきたが、小脳失調マウスにおける歩行失調についての研究は足跡の軌跡や回転棒課題といった簡単な評価によるものがほとんどであり、歩行動作がどのように障害されているのか動作学的に解析した研究はほとんどない。また、現在までのところ平行線維-プルキンエ細胞間シナプスの形成および機能不全が歩行制御にどのような影響を与えるのかは不明である。そこで本博士論文では、平行線維-プルキンエ細胞間シナプスの発達異常を有する GluD2 変異マウスと Cbln1 ノックアウトマウスの歩行失調を動作学的に調べ、平行線維-プルキンエ細胞間シナプスの発達異常が歩行動作に与える影響について調べることを目的とした。

【第 2 章 82 型グルタミン酸受容体変異マウス, *ho15J* マウスにおける歩行失調】

GluD2 タンパク質をプルキンエ細胞の細胞体に保持するが、GluD2 が樹状突起に発現していない *ho15J* マウス(C3H background, n=8)を用い、右後肢 5 箇所(大転子、膝、外果、第 5 中足指節関節、つま先)にマーカーを取り付け、トレッドミル上を歩行させた。その様子を高速度ビデオカメラ(200 frames/sec)を用いて撮影し、得られた映像から時間的変数(歩行周期持続時間など)および空間的変数(関節角度など)を算出した。比較対照群として正常野生型の C3H マウス(n=8)を用いた。トレッドミル速度は 8 m/min, 16 m/min, 24 m/min に設定したが、*ho15J* マウスは 24 m/min において約半数の個体が安定した歩行を示せなかったため 24 m/min は解析結果から除外した。

電子顕微鏡解析から、*ho15J* マウスは正常型の平行線維 - プルキンエ細胞間シナプス数が野生型マウスの約 40%にまで減少し、残りの多くは平行線維とシナプス結合がないフリースパインとなっていた。トレッドミル歩行中の後肢の動作学的解析から、*ho15J* マウスは野生型マウスと比較し足関節角度が過度に屈曲し、遊脚相中につま先が高く拳上していた。また、接地時において野生型マウスと比較し、膝関節および足関節角度が大きく屈曲する様子が観察され、膝関節と足関節の関節間協調が変化していることが明らかとなった。大転子の高さは歩行周期を通して野生型マウスよりも低かった。一方で、時

間の変数には野生型マウスとの間に有意な差は認められなかった。以上の結果から、足関節の過屈曲を原因とする遊脚相中のつま先の過度な拳上、および膝関節と足関節の関節間協調の障害が *ho15J* マウスの歩行失調の主な要因であると考えられる。

【第3章 Cbln1 ノックアウトマウスにおける歩行失調】

Cbln1 ノックアウトマウスは、平行線維 - プルキンエ細胞間シナプス数が正常野生型マウスの約 20% と重篤な発達異常を示す (Hirai et al., 2005)。このマウスは歩行失調を示すことが報告されているが、どのように歩行動作が障害されているのかは明らかにされていない。そこで第2章同様に、Cbln1 ノックアウトマウス (C57BL/6 background, n=14) においてトレッドミル歩行中の肢の動作解析を行った。比較対照群として正常野生型の C57BL/6 マウス (n=13) を用いた。トレッドミル速度は 8 m/min, 16 m/min, 24 m/min に設定したが、Cbln1 ノックアウトマウスはトレッドミル速度が 16 m/min, 24 m/min において安定した歩行を示せなかったため解析結果は除外した。

Cbln1 ノックアウトマウスは野生型マウスと比較し、歩行周期、接地相、そして遊脚相持続時間が有意に短かった。また、Cbln1 ノックアウトマウスは野生型マウスと比較し、歩行周期を通して膝関節および足関節角度が屈曲した変位パターンを示すことが明らかとなった。さらに、Cbln1 ノックアウトマウスは遊脚相中につま先が高く拳上し、このつま先の拳上は膝関節および足関節の過屈曲が原因であると考えられる。Cbln1 ノックアウトマウスは、歩行中の膝関節と足関節の関節間協調が損なわれることが明らかとなり、特に接地相において膝関節と足関節の動きの範囲が小さくなることが明らかとなった。この関節間協調の障害が Cbln1 ノックアウトマウスの歩行失調の主な要因であると考えられる。

【第4章 Cbln1 の注入による歩行失調改善効果】

先行研究から、Cbln1 ノックアウトマウスの小脳虫部に Cbln1 を注入すると、一時的に平行線維 - プルキンエ細胞間シナプスが形成されることが報告されている (Ito-Ishida et al., 2008)。歩行運動のパフォーマンスとしても足跡の軌跡および回転棒課題の成績がシナプスの形成と時間的に一致して回復することが示されている。しかしながら、どのように歩行動作が改善するのか動作学的に証明されていない。第4章では、小脳クモ膜下腔への Cbln1 注入が Cbln1 ノックアウトマウスの歩行動作に与える影響を動作学的解析に調べた。

Cbln1 ノックアウトマウスに Cbln1 を注入すると、歩行周期持続時間が野生型マウスレベルにまで増加した。これは接地相持続時間の増加が原因であった。また、Cbln1 注入後には屈曲していた膝関節角度変位が野生型マウスの変位パターンに近づくことが確認された。Cbln1 ノックアウトマウスにおいて観察された歩行失調の改善効果は、先行研究により報告されていた Cbln1 注入による平行線維-プルキンエ細胞間シナプスの構造変化と時間的に一致しており、歩行失調の改善は Cbln1 注入 4 日後と非常に短期間に生じることから、改善効果は主に平行線維-プルキンエ細胞間シナプスの形成によるものと考えられる。しかしながら、これらの効果は一時的なもので注入 1 か月後には元に戻る事が明らかとなった。歩行における時間的制御および少なくとも膝関節の適切な動作の生成には平行線維からプルキンエ細胞へのシナプス伝達が重要な役割を果たしていることが示唆された。

【まとめ】

ho15J マウスおよび Cbln1 ノックアウトマウスは、歩行中の後肢の関節間協調が障害されることが明らかとなった。さらに、平行線維-プルキンエ細胞間シナプス数が *ho15J* マウスより減少している Cbln1 ノックアウトマウスにおいては、歩行周期持続時間が野生型マウスよりも短く、歩行の時間的制御も障害されていることが明らかとなった。Cbln1 ノックアウトマウスに Cbln1 を注入すると、時間的変数および歩行時の膝関節動作が一時的に改善されることが明らかとなった。小脳虫部および中間部のプルキンエ細胞には、脊髄より種々の感覚フィードバック情報および歩行リズム生成機構からの遠心性コピー等の情報が脊髄小脳路を経由して送られている。これらの情報は小脳皮質神経回路内において、苔状線維-顆粒細胞-平行線維を介してプルキンエ細胞に伝達される。平行線維-プルキンエ細胞間シナプスの発達異常を有するマウスは、脊髄から小脳プルキンエ細胞への情報伝達が障害されることで関節間協調の障害が引き起こされ、それが歩行失調の主な要因であると考えられる。