

本論文「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)」は、5章から構成され、第1章：序論、第2章： $\delta 2$ 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、第3章：Cbln1 ノックアウトマウスにおける歩行失調、第4章：Cbln1 の注入による歩行失調改善効果、第5章：総合論議となっている。

歩行を安定して、かつ、様々な外部環境の変化に適応して行うための神経制御機構についての知見は未だ十分ではない。ヒトを対象とした生理学的研究、また神経疾患患者などを対象にした臨床的バイオメカニクス領域における研究においては数多くの研究成果が報告されているが、実験手法の制約上、神経制御機構の詳細な解析は難しい。小脳に病変をもつ患者は重篤な歩行失調を呈し、また、小脳変性を有するミュータントマウスにおいても、歩行失調を呈する。ところで、小脳変性をもつミュータントマウスおよびノックアウトマウスにおいて、その歩行失調の解析は床上歩行時の足跡の観察や回転棒上での歩行時間の解析など簡便な評価系にて調べられているのみで、どのような動作の障害が歩行失調の要因となっているのか不明である。本論文では、小脳皮質神経回路において、顆粒細胞の軸索である平行線維とプルキンエ細胞間のシナプスの発達異常を有する2種類のマウス、 $\delta 2$ 型グルタミン酸受容体 (GluD2) 変異マウス (*ho15J*マウス) と Cbln1 ノックアウトマウスを対象にトレッドミル歩行時の後肢の動作解析を行い、それらが呈する歩行失調について調べた。

第2章では、小脳プルキンエ細胞に特異的に発現する GluD2 の変異マウスの一種の *ho15J*マウスにおけるトレッドミル歩行時の後肢の動作について詳細に調べた。*ho15J*マウスは C3H 系統をバックグラウンドとするため、比較対照群として正常野生型の C3H マウスを用いた。トレッドミル速度は 8, 16, 24 m/min に設定し、歩行時の後肢の動きを高速度カメラによって撮影し、膝関節、足関節などの関節角度変位や歩行周期持続時間などを解析した。*ho15J*マウスは野生型マウスと比較して歩行周期のすべてにわたり足関節の過屈曲が観察され、また遊脚相におけるつま先の過度な挙上が認められた。接地時には、*ho15J*マウスの膝関節角度は野生型マウスよりもより屈曲していた傾向が観察された。歩行周期持続時間などの時間的変数に、両グループ間で顕著な差異は観察されなかった。平行線維とプルキンエ細胞間のシナプスの電子顕微鏡による形態解析の結果、野生型マウスのプルキンエ細胞のほとんどすべてのスパインは平行線維終末とシナプスを形成していたが、*ho15J*マウスにおいては多くのフリースパインが観察され、平行線維—プルキンエ細胞間シナプスの形成不全が観察された。これらの結果から、小脳変性を有する *ho15J*マウスの歩行失調は足関節の過屈曲と遊脚相におけるつま先の過度な挙上が特徴とされることが結論された。

第3章では、Cbln1 ノックアウトマウスにおけるトレッドミル歩行時の後肢の動作について詳

細に調べた。Cbln1 は C1q ファミリーに属し、小脳では平行線維終末から分泌されプルキンエ細胞の GluD2 のリガンドの 1 つとして機能すると考えられている。Cbln1 ノックアウトマウスにおいては、平行線維—プルキンエ細胞間シナプスの形成不全が *ho15J* マウスより重篤で、正常型スパインは約 20% となっている。Cbln1 ノックアウトマウスは C57BL/6 系統をバックグラウンドとするため、比較対照群として正常野生型の C57BL/6 マウスを用いた。トレッドミル速度は 8, 16, 24 m/min に設定したが、Cbln1 ノックアウトマウスは 16, 24 m/min のトレッドミル速度では安定な歩行ができないために、8 m/min での歩行時の後肢の動きを高速度カメラによって撮影し、膝関節、足関節などの関節角度変位や歩行周期持続時間などを解析した。Cbln1 ノックアウトマウスは野生型マウスと比較して歩行周期持続時間、接地相・遊脚相持続時間が有意に短縮されていた。Cbln1 ノックアウトマウスは歩行周期を通して足関節のみならず膝関節が野生型マウスよりも過度に屈曲した変位パターンを示した。Cbln1 ノックアウトマウスにおいても *ho15J* マウスと同様に遊脚相中につま先が高く拳上し、このつま先の拳上には足関節および膝関節の過屈曲が起因していると考えられた。これらの結果から、小脳変性を有する Cbln1 ノックアウトマウスの歩行失調は足関節および膝関節の過屈曲と遊脚相におけるつま先の過度な拳上が特徴とされることが結論され、歩行中の膝関節と足関節の関節間協調が障害されていることが示唆された。

第 4 章では、Cbln1 ノックアウトマウスの小脳に Cbln1 を投与することによる歩行失調の改善効果について調べた。先行研究においては、成熟した Cbln1 ノックアウトマウスの小脳クモ膜下腔に Cbln1 を注入すると、その 2-4 日後には回転棒上での歩行能力に改善が見られ、電子顕微鏡的にも平行線維—プルキンエ細胞間シナプス数が正常化することが報告されている。Cbln1 ノックアウトマウスの小脳正中のクモ膜下腔に Cbln1 注入を行うと、短縮していた歩行周期持続時間が野生型マウスレベルにまで改善し、接地相持続時間の増加が寄与していた。また、Cbln1 注入後には過屈曲していた膝関節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、Cbln1 注入の 4 日後と非常に短期間に生じるが、この効果は一時的なもので注入 1 カ月後には元に戻ることが観察され、Cbln1 注入による歩行失調の改善は主に平行線維—プルキンエ細胞間シナプスの再形成によるものと示唆された。小脳虫部および中間部は歩行中、脊髄のリズム生成回路および種々の体性感覚系の受容器由来の情報を腹側および背側脊髄小脳路を經由して受けており、これらの情報は小脳皮質において顆粒細胞、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—プルキンエ細胞シナプスの形成が障害されている *ho15J* マウスおよび Cbln1 ノックアウトマウスの歩行失調は歩行時に脊髄から小脳に送られる種々の情報が十分にプルキンエ細胞に伝送されていないと予想され、そのために足関節および膝関節における運動障害が生じると示唆された。

以上をまとめると、論文提出者は本研究において、小脳皮質における平行線維—プルキンエ細胞間シナプスの発達異常を有する 2 種類のマウスが呈する歩行失調について、トレッドミル歩行における後肢の動作特性について詳細な解析を行い、重要な新知見を提供した。これらの結果は、神経科学、身体運動科学において有意義な貢献をするものと認められる。

したがって、本審査委員会は博士(学術)の学位を授与するにふさわしいものと認定する。