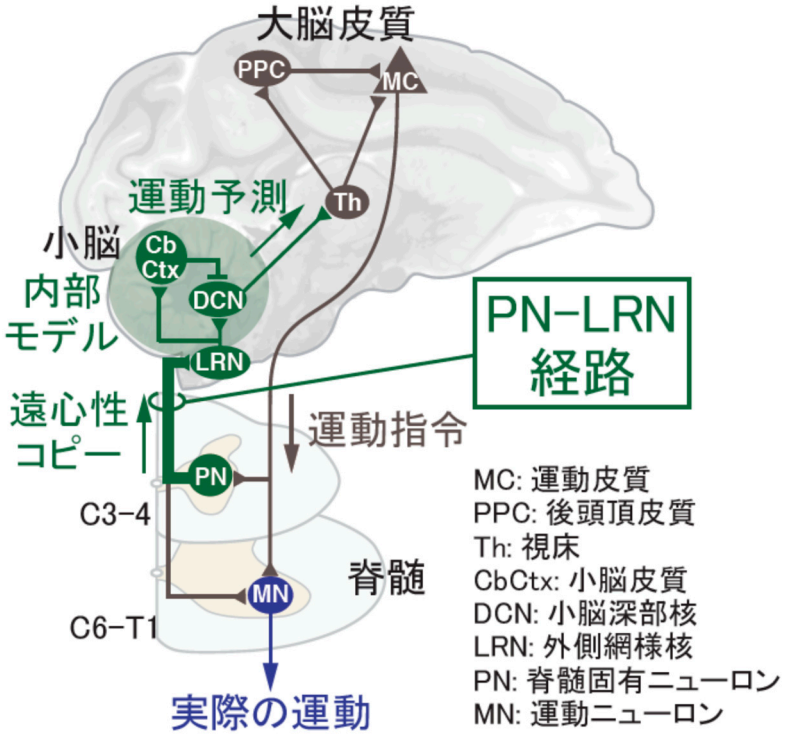
39　脊髄損傷後の運動機能回復における脊髄小脳路の機能	武井　智彦

【目的】脊髄損傷後の運動機能障害から回復する場合、失われた神経連絡や神経機能の「復元」を目指す一方で、患者自身が「思い通りに動かない身体」を受容し、それに対して適切に行動を適応させていくことが重要である。これまでのネコにおける急性電気生理学的実験から脊髄固有ニューロン（propriospinal neuron：PN）が脳幹外側網様核（lateral reticular nucleus：LRN）を介して小脳に投射する間接脊髄小脳経路（PN－LRN 経路）が運動指令の遠心性コピーを表現して、運動の結果を予測しているという説が有力である（図）。そこで本研究では、霊長類を対象としてウィルスベクターを用いて PN-LRN 経路を選択的に遮断する技術を確立することで、PN－LRN 経路が健常状態での運動制御および脊髄損傷からの機能回復過程にどのように貢献しているのかを明らかにすることを目的とした。

【方法】健常なマカクザル（2 頭）を対象として脊髄 C3-T1 に順行性ベクター（AAVDJ-hSyn-hM4Di-mCherry または AAV2.1-hSyn-hM4Di-mCherry）を注入し、脊髄上行路に抑制性人工受容体（hM4Di）を発現させた。さらにターゲット部位である LRN に人工受容体のリガンド（DCZ 溶液）を注入することによって PN から LRN へのシナプス伝達を選択的に阻害し、その効果を麻酔下電気生理学実験および行動学的実験により評価した。

【結果】まず免疫組織学的検討によって同側 LRN への神経軸索にレポータータンパク質の発現を認めた。これにより頸髄から同側 LRN へ投射する間接脊髄小脳経路の軸索に hM4Di を発現させることに成功した。一方、リガンド注入によりこの経路を抑制した効果を電気生理学的および行動学的に解析したが神経応答および行動指標いずれも有意な変化は認められなかった。この要因として麻酔下電気生理学的な神経伝達抑制効果の評価方法、および人工受容体の発現量の問題などによる可能性が考えられた。これらの結果は人工受容体による経路選択的な操作法を確立する上で検討すべき要因を特定するための有用な知見を与えた。

間接脊髄小脳路の機能仮説



39. 脊髄損傷後の運動機能回復における脊髄小脳路の機能

武井　智彦

*京都大学 白眉センター／大学院医学研究科 高次脳科学講座 神経生物学分野

Key words：脊髄小脳路，霊長類，化学遺伝学，遠心性コピー，運動機能

緒　言

これまでの脊髄損傷に関する研究では、いかに元々の神経連絡や運動機能を「復元」するかということに主眼が置かれてきた。しかし、現段階の技術では完全な神経再生は難しく、また他の神経経路による機能代償も限定的である。そのため、このような不完全な神経回路のもとでは患者自身が「思い通りに動かない身体」を受容してそれに対して自分の行動を適応させること、すなわち運動機能の「復元」ではなく「再獲得」を目指していくことが重要である。

この「思い通りに身体が動かない状態」とは、運動制御理論の枠組みでは脳内にある身体の「内部モデル」が実際の身体と乖離した状態と表現できる（図 1）。「内部モデル」とは、中枢神経系から発せられた運動指令が、実際にどのような身体運動を引き起こすのかを脳内でシミュレート（予測）するための機構であり（図 1a）、その際に受け取る運動指令のコピーは「遠心性コピー」と呼ばれる。脊髄損傷などで運動障害が生じた場合、この「内部モデル」によって「予測された運動」と「実際の運動」の間に誤差が生じてしまうため、正しい運動指令が生成できなくなる（図 1b）。そのため、脊髄損傷からの運動機能回復をする場合、新しい身体状態（損傷した神経回路）に合った「内部モデル」を素早く再学習して、この「誤差」を修正することが不可欠である。

問題はこれらの「内部モデル」や「遠心性コピー」が中枢神経系のどこで計算処理されているのかである。従来の研究によって、頸髄第 3 節から第 4 節に存在する脊髄固有ニューロン（proprio- spinal neuron：PN）から延髄にある脳幹外側網様核（lateral reticular nucleus：LRN）を介して小脳に投射する間接脊髄小脳経路（PN－LRN 経路）が運動指令の「遠心性コピー」を小脳へと伝えているという説が有力である［1］。そこで本研究では、霊長類（マカクザル）を対象として、1. ウィルスベクターを用いて PN-LRN 経路を選択的に遮断する技術を確立し、2. 機械学習を用いた詳細な行動評価を行い、さらに 3. 運動制御理論に基づくコンピュータシミュレーションを組み合わせることで、PN－LRN 経路が健常状態での運動制御および脊髄損傷からの機能回復過程にどのように貢献しているのかを明らかにすることを目的とした。

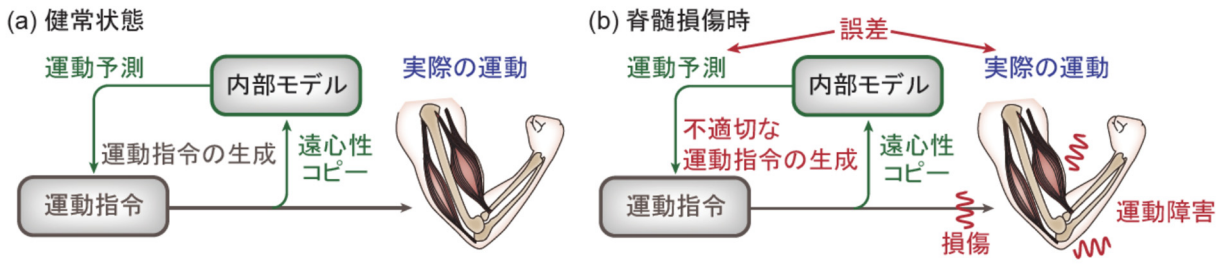


図 1.「内部モデル」を用いた運動制御理論

a）健常な状態では、「内部モデル」が運動指令のコピー（「遠心性コピー」）を受け取って実際に起こる運動を正確に予測し、適切な運動指令を生成する。

b）一方、脊髄損傷などで運動障害が生じた場合、「予測した運動」と「実際の運動（障害された運動）」の間に「誤差」が発生し、適切な運動指令を生成することができなくなってしまう。

*現在の所属：玉川大学 脳科学研究所 基礎脳科学研究センター

方　法

被験体のニホンザルは文科省バイオリソースプロジェクトから入手し、動物の飼養と実験は本学動物委員会の承認を得た上で行った。サルは十分に行動課題を訓練した後、全身麻酔下・無菌的操作によって頭部固定具およびチャンバーを取り付け、MRI および CT 画像を用いて外側網様核（LRN）の三次元位置を脳定位的に同定し、ガドジアミド水和物の微量の注入によって注入部位を確認した（図 2）。

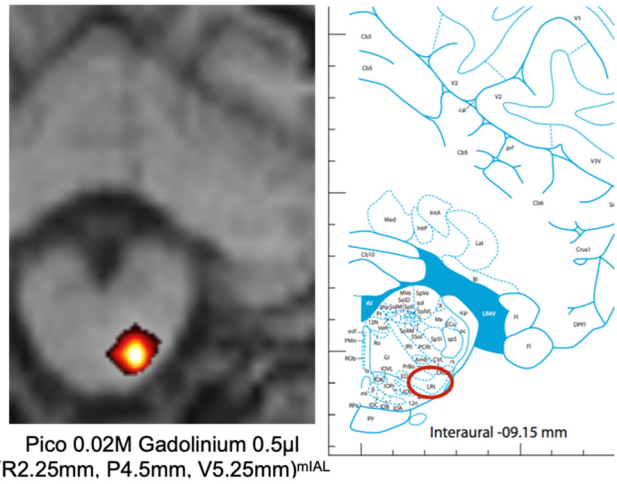


図 2.　LRN の脳定位的同定

ガドジアミド水和物（0.02 M Gadolinium、0.5 μl）を注入後、MRI撮影を行った（左）。

参照したアトラスでのLRNに正確に注入できていることが確認できる（右、赤丸）。

行動課題としてはケージから約 20 cm 離れた距離にあるイモ片（幅約 0.5 および 6.0 cm）を取る課題（到達把握課題）を訓練した。十分に行動課題を訓練した後、全身麻酔下・無菌的操作により脊髄（頸髄第 2 節から胸髄第 1 節）の右側中間層へと約1 mm 間隔で、hSyn プロモーターの下に抑制性人工受容体である hM4Di と赤色蛍光色素（mCherry）を発現する AAV ベクター（AAVDJ もしくは AAV2.1）の注入を行った。手術後、発現のために 4 週間待機してから行動学的実験を開始した。

行動学実験では、まずメデトミジンとミダゾラムにより導入麻酔を行い、LRN にリガンド注入用のカニューレ（28 G、Hamilton 社）を刺入した。その後、hM4Di の高感度リガンドである Deschloroclozapine（DCZ）［2］を 0.5 μl 注入し、カニューレを取り外した後、サルをケージに戻してメデトミジン拮抗薬（アチパメゾール）を投与した。覚醒後、約 120 分後に到達把握課題を行い、その動作を、ビデオカメラ（ソニー、FDR-X3000）を用いて 120 fps のフレームレートで撮影した。ビデオ映像から手先の位置情報を解析するため深層学習を用いた姿勢推定システムである DeepLabCut［3］を用いて動作の解析を行った。

実験終了後、導入遺伝子の発現を確認するため組織学的な検討を行った。4%パラフォルムアルデヒド溶液にて灌流固定後、脳幹を取り出して 30%スクロース溶液でスクロース置換したのち、スライディングミクロトームにて 40 μm に薄切した。その後、蛍光色素に対する免疫組織染色を行い、さらに対比染色としてニッスル染色による細胞体の染色を行った。

結果および考察

まず図 3 にリガンド注入部位付近での組織切片の写真（左）とその拡大図（右）を示す。左の全体図からわかるように、右の脊髄からの延髄への投射軸索は同側（右側）に選択的であり、特に腹外側部にある外側網様核（LRN）の細胞体の周りに高密度な投射を持っていることが分かった。これはこれまでネコで得られた急性実験及び解剖学的な知見と一致するものであった［4］。

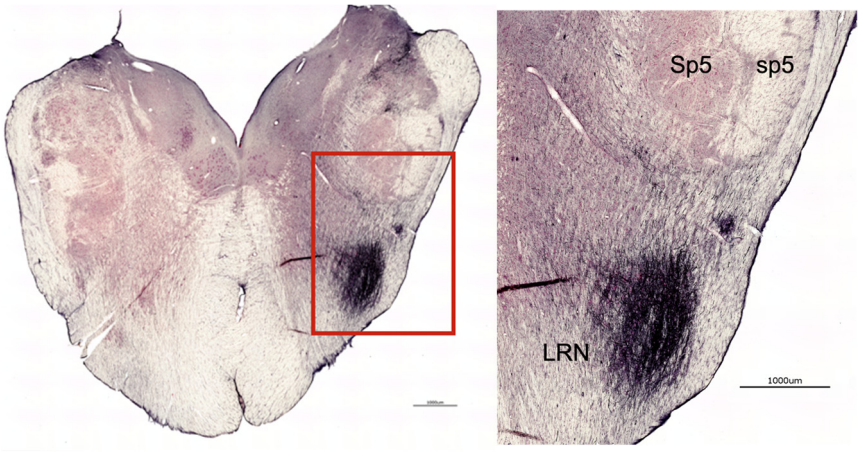


図 3. 免疫染色による脊髄延髄路の投射線維の同定
黒色の線維が蛍光色素への免疫染色したもの。対比染色として細胞体をニッスル染色により赤色に観察される。細胞同側（右側）脊髄から延髄のLRNに豊富な線維投射があることが認められる。

続いて、図 4 に行動学的な解析結果を示す。リガンドである DCZ 溶液の濃度を 1 μM から 1 mM まで変えて、また対象条件としてリガンドの基剤のみを注入する条件（Vehicle 条件）と比較した。ビデオ画像から DeepLabCut を用いて手先の位置を測定し、それを三階微分することで動きの滑らかさを示すジャークを算出した。我々のシミュレーションによるパイロット実験から、もし「遠心性コピー」が減少すると小さいターゲットへの到達運動に選択的にジャークが増大する、すなわち運動の滑らかさが損なわれることが確認されている。LRN に高濃度の DCZ 溶液（100 μM）を注入した場合、ジャークが増加する傾向が見られたが、その他の有効濃度とされる 1～10 μM ではジャークおよび他のパラメータに有意な差は認められなかった（t-test、$p > 0.2$）。また同様に、ターゲット大条件においても有意な行動の変化は認められなかった。

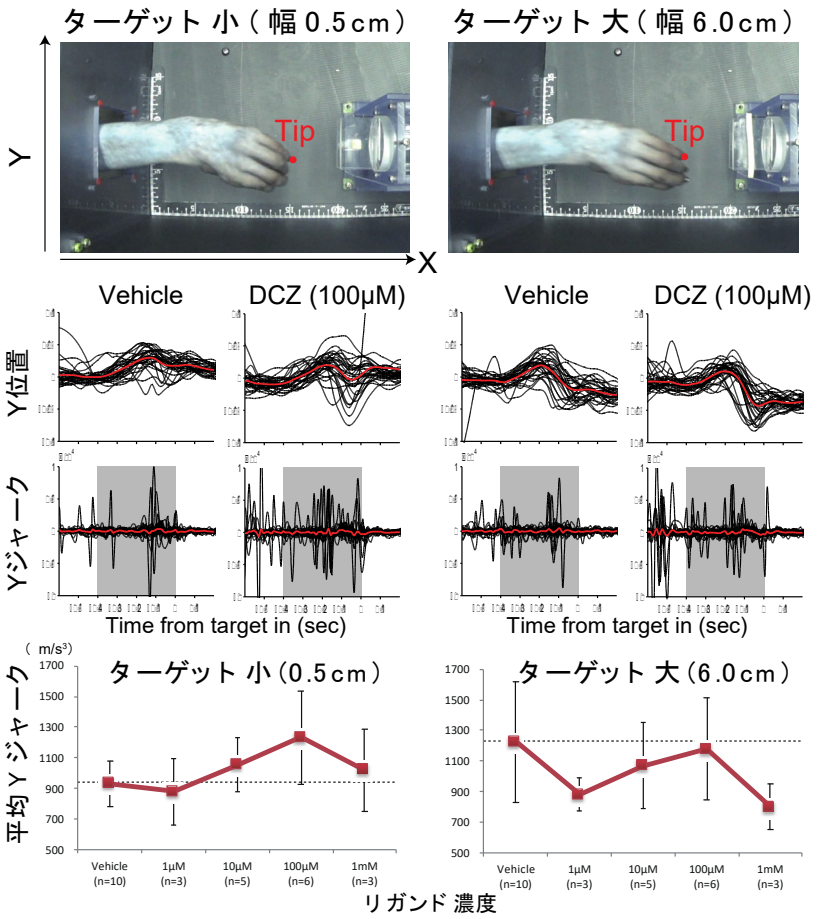


図 4. リガンド投与による間接脊髄小脳路の抑制による到達運動の障害

小さいイモ（左）および大きいイモ（右）への到達運動の様子。いずれの条件においても、LRNに基剤のみを注入した条件（Vehicle条件）とDCZ溶液を注入した際の手先のジャーク（手先位置の三階微分）は認められなかった。エラーバー：標準誤差。

このように、免疫組織学的な検討によりターゲットである脊髄から脳幹網様核（LRN）への神経細胞に遺伝子を導入し目的タンパクを発現させることに成功した。一方、リガンドの投与によって行動学的な結果が認められなかった。この可能性として 2 つの原因が考えられる。まず一つ目は発現量が十分でない可能性がある。これに関して、異なるセロタイプによる感染効率の比較や Tet-OFF システムなど［5］による発現量の増幅などを検討する必要がある。二つ目の可能性は、生じている運動障害を現在の運動課題および評価システムで正しく評価出来ていない可能性である。我々のシミュレーションの結果では、遠心性コピーの影響は本研究で使用した外力のない到達運動よりも、外力を加えた運動においてより顕著な障害が認められた。そのため外力に対する運動応答を検討するため、マニピュランダムを用いた運動課題による運動評価の研究を進めている。今回の組織学的及び行動学的な実験の結果は、今後人工受容体による経路選択的な操作法を確立する上で検討すべき要因を特定するための有用な知見を与えた。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、京都大学大学院医学研究科の伊佐正教授、脳機能総合研究センター尾上浩隆特定教授、高等研究院山口玲欧奈特定助教である。本稿を終えるに当たり、本研究をご支援いただきました上原記念生命科学財団に深謝いたします。

文　献

1) Alstermark B, Lindström S, Lundberg A, Sybirska E. Integration in descending motor pathways controlling the forelimb in the cat. 8. Ascending projection to the lateral reticular nucleus from C3-C4 propriospinal also projecting to forelimb motoneurones. Exp Brain Res. 1981;42(3–4):282–98. PMID: 6263663 DOI: 10.1007/bf00237495

2) Nagai Y, Miyakawa N, Takuwa H, Hori Y, Oyama K, Ji B, Takahashi M, Huang X-P, Slocum ST, DiBerto JF, Xiong Y, Urushihata T, Hirabayashi T, Fujimoto A, Mimura K, English JG, Liu J, Inoue K, Kumata K, Seki C, Ono M, Shimojo M, Zhang M-R, Tomita Y, Nakahara J, Suhara T, Takada M, Higuchi M, Jin J, Roth BL, Minamimoto T. Deschloroclozapine, a potent and selective chemogenetic actuator enables rapid neuronal and behavioral modulations in mice and monkeys. Nat Neurosci. 2020 Jun 18;23(9):1157–67. PMID: 32632286 DOI: 10.1038/s41593-020-0661-3

3) Mathis A, Mamidanna P, Cury KM, Abe T, Murthy VN, Mathis MW, Bethge M. DeepLabCut: markerless pose estimation of user-defined body parts with deep learning. Nature neuroscience. 2018 Aug 18;1–12. PMID: 30127430 DOI: 10.1038/s41593-018-0209-y

4) Alstermark B, Ekerot C-F. The lateral reticular nucleus; integration of descending and ascending systems regulating voluntary forelimb movements. Frontiers in computational neuroscience. 2015 Aug 5;9:5453–12. PMID: 26300768 DOI: 10.3389/fncom.2015.00102

5) Watakabe A, Kato S, Kobayashi K, Takaji M, Nakagami Y, Sadakane O, Ohtsuka M, Hioki H, Kaneko T, Okuno H, Kawashima T, Bito H, Kitamura Y, Yamamori T. Visualization of Cortical Projection Neurons with Retrograde TET-Off Lentiviral Vector. Plos One. 2012;7(10):e46157. PMID: 23071541 DOI: 10.1371/journal.pone.0046157