

博士学位論文

脊髄小脳変性症 3 型トランスジェニックマウスにおける姿勢障害

Postural dysfunction in spinocerebellar ataxia type 3 transgenic mice

東京大学大学院総合文化研究科
広域科学専攻 生命環境科学系

山浦 洋

目次

第1章 序論	5
1.1 小脳と姿勢	5
1.2 小脳疾患とマウスモデル	6
1.3 姿勢制御	7
1.3.1 外乱に対する姿勢のフィードバック制御	7
1.3.2 姿勢のフィードフォワード制御	9
1.4 本研究の目的.....	11
第2章 マウスの姿勢課題の構築.....	12
2.1 緒言.....	12
2.2 実験方法	13
2.2.1 実験動物.....	13
2.2.2 実験装置.....	13
2.2.3 姿勢課題.....	14
2.2.4 計測方法および解析.....	15
2.3 結果.....	17
2.3.1 安静立位時.....	17
2.3.2 水飲み時.....	19
2.3.3 口の到達動作課題	21
2.4 考察.....	24
第3章 脊髄小脳変性症3型トランスジェニックマウスおよび後肢筋萎縮マウスの姿勢	25
3.1 緒言.....	25
3.2 実験方法.....	27
3.2.1 脊髄小脳変性症3型トランスジェニックマウス.....	27
3.2.2 免疫組織化学的検査.....	27
3.2.3 後肢固定手順.....	27

3.2.4	姿勢課題および計測.....	28
3.2.5	統計	28
3.3	結果.....	29
3.3.1	脊髄小脳変性症 3 型トランスジェニックマウス.....	29
3.3.2	後肢筋萎縮マウス	31
3.3.3	安静立位時.....	33
3.3.4	水飲み時.....	38
3.3.5	口の到達動作課題	43
3.4	考察.....	51
第 4 章 口の到達動作課題時の筋電図解析		53
4.1	緒言.....	53
4.2	実験方法	54
4.2.1	実験動物.....	54
4.2.2	筋電図計測および解析.....	54
4.2.3	統計	54
4.3	結果.....	56
4.4	考察.....	59
第 5 章 総合論議		60
5.1	マウスにおける姿勢課題	60
5.2	小脳の機能障害と静的な姿勢制御	62
5.3	小脳の機能障害と随意運動に伴った姿勢制御	66
5.4	小脳性姿勢障害の改善に向けて	71
謝辞		73
参考文献.....		74

略語表

1C2, expanded polyglutamine

APAs, anticipatory postural adjustments

BF, biceps femoris, 大腿二頭筋

BMI, Brain Machine Interface, ブレインマシンインターフェース

DSCT, dorsal spinocerebellar tract, 背側脊髄小脳路

FES, Functional Electrical Stimulation, 機能的電気刺激

GA, gastrocnemius, 腓腹筋

HA, hemagglutinin, 血球凝集素

P, postnatal day,

RMS, root mean square, 2乗平均平方根

SCA1, spinocerebellar ataxia type 1, 脊髄小脳変性症1型

SCA3, spinocerebellar ataxia type 3, 脊髄小脳変性症3型

SCA6, spinocerebellar ataxia type 6, 脊髄小脳変性症6型

SCA3Tg, transgenic mouse of spinocerebellar ataxia type 3, 脊髄小脳変性症3型トランスジェニックマウス

Sol, soleus, ヒラメ筋

TA, tibialis anterior, 前脛骨筋

Tg, transgenic, トランスジェニック

VL, vastus lateralis, 外側広筋

VSCT, ventral spinocerebellar tract, 腹側脊髄小脳路

WT, wild-type, 正常野生型

第1章 序論

1.1 小脳と姿勢

日常生活において、我々は、立位姿勢をとる・立位で作業する・移動する等の動作を当たり前のように行っている。しかしながら、これらの動作は中枢神経系の傷害により著しく障害される。中枢神経系の中で小脳は姿勢制御および歩行制御、さらにはそれらの適応制御に重要な役割を果たしている (Ito, 1984; Yanagihara and Kondo, 1996; Morton and Bastian, 2004)。様々な動作を行う際、姿勢制御は無くてはならない要素である。

小脳疾患患者を用いた多くの先行研究が、小脳の傷害が重篤な姿勢障害を呈することを示してきた。立位姿勢における研究は、足圧中心の変位または身体重心軌跡の変位を用いて評価されてきた。小脳疾患患者は、健常者と比べて足圧中心の変位 (Mauritz et al., 1979; Dichgans and Mauritz, 1983; Diener et al., 1984; Diener and Dichgans, 1992) および身体重心軌跡の変位 (Ilg et al., 2009) が大きいことが示されている。足圧中心動揺の周波数解析を行うと小脳疾患患者は 3 Hz 帯にパワーのピークが検出され、その特有の揺れは小脳を介した長潜時反応ループの障害の結果だと考えられている (Hayashi et al., 1997)。また、体幹の動きを計測できる装置を用いた研究において、小脳疾患患者は健常者よりも体幹の動きが大きいことが報告されている (van de Warrenburg et al., 2005)。

立位時の外乱に対する反応に関しても、小脳疾患患者を用いた研究が行われている。被験者を 8 方向に傾く台の上に立位させ、台の傾きに対する身体重心の変位および関節角度変位を解析した結果によると、小脳疾患患者は健常者と比べて後方および横方向の台の傾きに対して身体重心の変位が大きくなり、その際に膝の屈曲の減少・骨盤および体幹の動作の増加が報告されている (Bakker et al., 2006)。Nashner は、台が後方に水平に動く・台が後方に回転するという外乱に対する適応を調査している (Nashner, 1976)。台が後方に回転するという外乱に対して、健常者は試行を重ねると腓腹筋の筋活動が減少し、後方へ倒れないように適応する。一方で、小脳疾患患者は試行を重ねても腓腹筋の減少が起こらない。Horak と Diener は台が後方に水平に動く外乱に対する適応を調査している (Horak and Diener, 1994)。彼らの実験装置は、台の動く距離 (5 種類)、台の動く速度 (4 種類) を設定することができる。実験パラダイムとしては、台の動く速度が一定のもと動く距離が同じ条件において 10 回連続で 5 種類の動く距離の試行を

行うもの、5種類の動く距離がランダムに決められ試行を行うものである。台が後方へ動くときの足関節トルクおよび腓腹筋の筋電図を計測すると、健常者は台の動く距離に応じた姿勢反応ができるが、小脳疾患患者は台の動く距離に応じた姿勢反応ができない。ランダムの試行においては、健常者および小脳疾患患者どちらも台の動く距離に応じた姿勢反応ができない。Horak と Diener の実験結果より小脳は予測による適応的な姿勢制御に重要な役割を果たしていると示唆される。音刺激を条件刺激として、その数秒後に台が傾く課題を用いて古典的条件付けを行ったとき、健常者では脚の筋活動で条件反応が確立されたのに対し小脳疾患患者は条件反応が確立されなかった (Kolb et al., 2004)。この研究結果も、小脳が姿勢の適応制御に関与していることを示唆している。

1.2 小脳疾患とマウスモデル

小脳疾患は、散発的に起こる傷害と遺伝的な原因により発症するものに分けることができる (Manto and Marmolino, 2009a; Seidel et al., 2012)。遺伝性疾患として、脊髄小脳変性症があり、原因遺伝子によって1から36のタイプに分類できる (Seidel et al., 2012)。地域ごとに発症するタイプに特徴があり、日本においては、脊髄小脳変性症3型 (Spinocerebellar ataxia type 3; SCA3)、脊髄小脳変性症6型 (Spinocerebellar ataxia type 6; SCA6) が多い (Schols et al., 2004)。近年の逆進性遺伝学の発展により、遺伝性小脳疾患のマウスモデルを作製することが可能である (Yamada et al., 2008; Manto and Marmolino, 2009b)。これらのマウスは、神経変性のメカニズムを調べるためおよび疾患の治療法を試験するために用いられる。

小脳疾患の症状を改善するための様々な試みが研究されている。臨床研究において、小脳疾患患者に対し、トレッドミル上での歩行トレーニング (Cernak et al., 2008; Vaz et al., 2008)、長期間の集中的な協調トレーニング (Ilg et al., 2009, 2010) 等の理学療法を行った際の改善効果が調査されている。臨床試験および研究室試験の評価項目において改善はみられているが、小脳疾患患者が日常生活において不自由なく行動できるまでには至っていない。マウスモデルを用いた研究では、遺伝子治療法の検討がされ運動失調の改善効果も報告されている (Torashima et al., 2008)。最近では、脊髄小脳変性症1型 (Spinocerebellar ataxia type 1; SCA1) の変異遺伝子ノックインマウスに対して運動療法を行ったところ、運動能力の有意な改善はみられなかったが、寿命が延長するという効果がみられた (Fryer et al., 2011)。この研究では、運動療法を行うことが上皮細胞増殖

因子 (EGF) を増加し、疾患の経過をさらに悪化させないようにしていることが示唆されている。

前述のように、マウスを用いた研究では小脳傷害の症状の改善方法が検討されている。それらの研究は、特に分子・細胞レベルにおいて顕著な成果を上げている。一方で、治療法の介入によってマウスの動作がどのような影響を受けたか個体レベルにおいて評価する必要がある。しかしながら、トランスジェニックマウスおよびノックアウト・ノックインマウスの運動能力評価は、**footprint** および回転棒課題を用いたものがほとんどである (Lalonde and Strazielle, 2007; Brooks and Dunnett, 2009)。Footprint はマウスの足底にインクを付けて紙上を歩かせ足跡を評価するものであり、回転棒課題は回転する筒の上にマウスを乗せ滞在時間を計るものである。これらの評価方法からでは、肢の関節角度の変位等の詳細な解析はできない。姿勢制御の研究において、マウスの運動学的解析および筋電図解析を行ったものはほとんどない。運動学的解析および筋電図解析は、運動課題をどのように解決するのか、運動をどのように組み立てるのか等を解明していくために非常に重要な評価方法である。また、中枢神経系の疾患により運動がどのように障害されるのか、治療を行った際運動にどのような影響があるのか等を評価するのにも有益な方法だと考えられる。

1.3 姿勢制御

姿勢制御には2つの様式があると考えられている (Deliagina et al., 2012)。フィードバック制御およびフィードフォワード制御である。立位時のように体性感覚情報に基づき姿勢を維持し続けるような姿勢調節は、主としてフィードバック制御によるものと考えられる。一方、ヒトが立位時に遠くの物に手を伸ばす際、中枢神経系は手を伸ばす主動作によって引き起こされる内乱および重心動揺を事前に予測し、全身の姿勢を安定させる必要がある。このような随意運動に随伴した姿勢調節は、予測的な姿勢制御でありフィードフォワード制御によるものと考えられる。

1.3.1 外乱に対する姿勢のフィードバック制御

外部からの予期せぬ外乱を受けその外乱に対する姿勢の安定について調べる実験パラダイムは、フィードバック制御の役割を分析することに視座を置いた実験系として広く研究されている。前述した被験者が立位している台が突然傾き、この傾きによ

り誘発された種々の感覚情報によって姿勢調節が行われるというのが、外乱に対するフィードバック姿勢制御の典型例である。外乱に対するフィードバック姿勢制御を研究するための実験系は、ヒトおよび動物において確立されている。ヒトにおいては、被験者が立位している台が水平に動く等の外乱に対する姿勢調節が、運動学的解析、床反力解析および筋電図解析により調査されている (Ting and McKay, 2007)。動物実験においては、ネコおよびウサギといった四足動物が用いられてきた。実験としては、四肢での立位姿勢を台の上で維持しているネコに対して、不意に台を水平に動かした際の姿勢調節を筋電図解析および床反力解析により調査するものである (Macpherson, 1988; Stapley et al., 2002)。また、4つの床反力計を用意し、それぞれの床反力計の上に各肢を乗せて四肢での立位姿勢を維持させているが、不意に4つの床反力計のどれか1つが下方に落ちるといった課題があり、ネコは残り三肢で姿勢を維持しなければならない (Stapley and Drew, 2009)。さらに別の課題として、ネコまたはウサギが台の上で四肢での立位姿勢を維持しており、台が正中を軸として外側に周期的に傾くもので、ネコまたはウサギは傾きに対して台が上昇する側の肢は屈曲させ、台が下降する側の肢は伸展させることで姿勢調節を行い、体幹位置を維持しようとする (Beloozerova et al., 2003a; Deliagina et al., 2006a, 2006b)。

外乱に対するフィードバック姿勢制御における中枢神経系の関与は、動物を用いた電気生理学的研究において調査されている。Stapley と Drew は、ネコの肢の下の床反力計のどれか1つが落下するという外乱の課題において、橋延髄網様体のニューロン活動を計測し、橋延髄網様体のニューロンが外乱に対する姿勢調節のための肢の筋活動と相関をもって活動していることを示した (Stapley and Drew, 2009)。Deliagina らは台が正中を軸として外側に周期的に傾く課題を用いて、ネコおよびウサギのニューロン記録を行うことで姿勢制御と中枢神経系の役割を研究している。ウサギの運動皮質前肢領域の錐体路ニューロンが、台の傾きに相関して活動を修飾していることが示された (Beloozerova et al., 2003b)。さらに、ウサギにおいては、中脳歩行誘発野および腹側被蓋が台の傾きに対する姿勢調節に関与していることが報告されている (Musienko et al., 2008)。同様の課題を用いて、ネコにおいてニューロン記録を行った研究でも、錐体路ニューロン (Beloozerova et al., 2005 Karayannidou et al., 2008) および赤核脊髓路の赤核ニューロン (Zelenin et al., 2010) が傾きに相関した修飾を示し、それらの修飾は錐体路ニューロンおよび赤核ニューロンの標的とする肢からの感覚情報の関与により起こる

ことが示された (Karayannidou et al., 2008; Zelenin et al., 2010). 以上のように, 外乱に対するフィードバック姿勢制御における大脳皮質および脳幹の関与は電気生理学的手法により研究が進められている.

一方, 外乱に対するフィードバック姿勢制御における小脳の関与においては, 現在のところ電気生理学的手法による研究はほとんどなく, 小脳疾患患者の実験により小脳機能を評価する研究が行われている. 課題としては, 被験者が立位する台が傾く課題および台が水平に動くものである (Nashner, 1976; Horak and Diener, 1994; Timmann and Horak, 1997; Mummel et al., 1998; Kolb et al., 2004; Bakker et al., 2006). 前述したように, 小脳は予測に基づく適応制御に重要な役割を果たしている (Nashner 1976; Horak and Diener, 1994; Kolb et al., 2004). 外乱に対する被験者の反応をみると, 小脳疾患患者は健常者と比べ, 外乱により引き起こされる下肢筋活動の潜時は変わらないが, 筋活動の振幅が大きいことから, 小脳はゲイン調節に関与していることが示唆されている (Horak and Diener, 1994; Timmann and Horak, 1997; Mummel et al., 1998).

1.3.2 姿勢のフィードフォワード制御

フィードフォワード姿勢制御に関する研究も, ヒトおよび動物において広く調査されている. 立位時において随意的に腕を動かす際, 随意的な腕運動に随伴して姿勢調節を行う必要があり, anticipatory postural adjustments (APAs) と呼ばれる. APAs の生成にはフィードフォワード信号が重要な役割を果たすと考えられている (Gahery and Massion, 1981; Massion, 1992). 課題としては, ヒトが立位姿勢の状態から随意的なレバー引き (Cordo and Nashner, 1982), 随意的な肘の屈曲 (Friedli et al., 1984, 1988), 随意的な腕の挙上 (Bouisset and Zattara, 1981, 1987; Lee et al., 1987; Zattara and Bouisset, 1988; Aruin and Latash, 1995a) および随意的な腕の到達運動 (Leonard et al., 2009) を行った際の姿勢調節を調査している. いずれの課題においても, 意図する運動に先行して姿勢調節のための脚および体幹の筋活動, 足圧中心あるいは身体重心の変位が起こる. 動物実験においては, ネコを用いた APAs の課題が確立されている. 課題としては, ネコに四肢での立位姿勢を維持させ音が呈示されたら前肢のいずれかを挙げるように訓練したもの (Dufosse et al., 1982), ネコが前肢のいずれかを自発的に挙げる (Di Fabio, 1983), 四肢での立位姿勢から前肢による随意的な前方のエサへの到達課題 (Alstermark and Wessberg, 1985; Schepens and Drew, 2003, 2004, 2006) または随意的に前方のレバーを押

す課題 (Schepens et al., 2008; Yakovenko and Drew, 2009; Yakovenko et al., 2011) などである。立位時における全身の姿勢調節ではないが、ヒトにおいて腕の姿勢調節に関する研究も行われている (Viallet et al., 1992)。被験者がイスに座った状態で、一方の腕の肘を直角にして腕の姿勢を保ち、さらに重りが課せられている。他人が不意にその重りを取り除く場合と重りをのせて姿勢を維持している腕ではない手を使い自分自身で重りを取り除く場合の反応を比較するものである。自分自身で重りを取り除く場合にフィードフォワード的な腕姿勢の調節がみられる。

フィードフォワード姿勢制御における中枢神経系の関与は、動物を用いた中枢神経系の傷害実験および電気生理学的研究において調査されている。ネコの感覚運動皮質の傷害実験においては、四肢での立位姿勢を維持させ音が呈示されたら前肢のいずれかを挙げる課題の姿勢調節が傷害前と変化することが報告されている (Birjukova et al., 1989)。ネコの四肢での立位姿勢から前肢による随意的な前方のエサへの到達課題または随意的に前方のレバーを押す課題において、大脳皮質運動野のニューロン活動 (Yakovenko and Drew, 2009; Yakovenko et al., 2011) および橋延髄網様体のニューロン活動 (Schepens and Drew, 2003, 2004, 2006; Schepens et al., 2008) を計測した研究において、それぞれのニューロンが姿勢調節のための肢の筋活動と相関をもって活動していることを示した。橋延髄網様体は皮質領域および皮質下領域からの信号を受け、それらの信号を統合して出力する領域であると考えられ、大脳皮質運動野が橋延髄網様体へ姿勢調節の信号を送る上位中枢であると考えられる。実際、ヒトを対象とした腕の姿勢調節に関する研究において、大脳皮質運動野領域に傷害を持つ患者は、自分自身で重りを取り除く課題で腕の APAs が障害される (Viallet et al., 1992)。

同時に、フィードフォワード姿勢制御において小脳は重要な役割をはたしていることが示唆されている (Gahery and Massion, 1981; Massion, 1984, 1992)。ヒトの腕の姿勢調節の課題において、小脳は APAs のタイミング制御に関与していることが示唆されている (Diedrichsen et al., 2005)。小脳の姿勢制御に関わる領域は虫部であるが、小脳虫部が大脳皮質運動野から多くの投射を受けていることが最近のサル (Coffman et al., 2011) およびラット (Galgiani et al., 2011) を用いた解剖学的研究により明らかになり、機能的に小脳がフィードフォワード姿勢制御に関与している可能性が推測されている。しかしながら、小脳がフィードフォワード姿勢制御にどのように寄与するのかについてはほとんど解明されていない。

1.4 本研究の目的

本研究では、マウスにおける姿勢課題を新たに構築し、予測的な姿勢制御であると考えられる随意運動に随伴した姿勢制御における小脳の役割について小脳疾患マウスモデルを用いて明らかにすることを目的とした。

第2章 マウスの姿勢課題の構築

2.1 緒言

動作の特性を評価するための方法として、肢の運動学的解析はヒトあるいは動物において広く研究されている。健常者の動作特性と種々の中枢神経系の疾患患者とを比較することで、その対象となる動作に中枢神経系がどのような寄与をするかについて重要な知見をもたらす。小脳疾患患者 (Palliyath et al., 1998; Stolze et al., 2002; Ilg et al., 2007) あるいはパーキンソン病患者 (Knutsson, 1972; Murray et al., 1978) の歩行動作を健常者と比較することにより小脳あるいは大脳基底核の傷害が歩行動作に及ぼす影響について調べることができる。また動物ではネコにおいて、歩行動作および姿勢において肢の運動学的解析が行われている (Fung and Macpherson, 1995; Orlovsky et al., 1999)。ネコ等の動物は中枢神経系の物理的傷害あるいは薬理的傷害を行い、特定の動作における中枢神経系の寄与を研究することができる。近年では、逆進性遺伝学の発展により特定の遺伝子を操作することが可能となり、マウスを用いた研究が盛んに行われている。これにより、分子・細胞レベルでの事象とそれらと個体全体での運動の障害などとの関係について研究することが可能となっている。しかしながら、マウスにおける歩行運動の評価は、footprint および回転棒課題を用いたものがほとんどである (Lalonde and Strazielle, 2007; Brooks and Dunnett, 2009)。Footprint はマウスの足底にインクを付けて紙上を歩かせ足跡を評価するもの、回転棒課題は回転する筒の上にマウスを乗せ滞在時間を計るもので、運動時におけるマウスの肢の運動学的解析を行うことはできない。近年、マウスの歩行時の肢の運動学的解析を行った研究がいくつかあるが (Leblond et al., 2003; Akay et al., 2006; Takeuchi et al., 2012)、マウスの姿勢制御に焦点を当てて運動学的解析を行ったものはほとんど存在しない。

本章においては、本研究において新たに構築したマウスにおける姿勢課題について記述し、その運動学的解析の結果について示す。

2.2 実験方法

2.2.1 実験動物

本実験は、東京大学動物実験倫理委員会によって承認され、東京大学動物実験実施マニュアルおよびNIH (National Institutes of Health) 動物実験ガイドラインに従って行った。実験動物は、正常野生型 C57BL/6J マウス (wild-type マウス) を用いた。

2.2.2 実験装置

マウスの姿勢実験を行うために、実験装置として特注の透明なアクリル製ボックスを用いた (図 2-1)。姿勢実験用ボックスの空間 (幅 130 mm, 奥行き 60 mm, 高さ 150 mm) にマウスを入れる。姿勢実験用ボックスのマウスを入れる空間の下方には鏡が取り付けられている。鏡は垂直方向から 45°傾けて取り付けられており、横方向よりボックス内のマウスの腹側から 4 つの足の配置を観測することができる。また、姿勢実験用ボックスにはマウスが水を飲むための水筒および管を取り付けることができる。

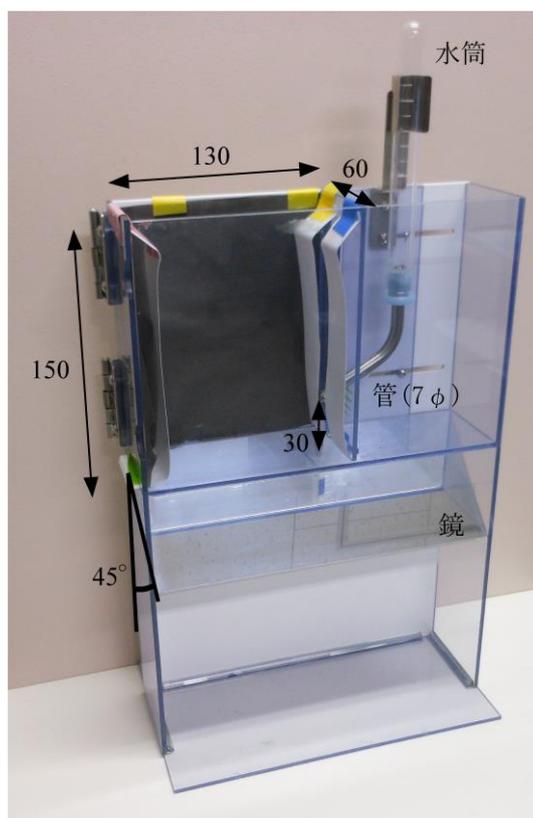


図 2-1, 姿勢実験用アクリルボックス

2.2.3 姿勢課題

本研究において3つの姿勢課題を設定した(図2-2)。1) 図2-2の左部のように姿勢実験用ボックスの床にマウスが4つの足を置いた状態で四肢での立位姿勢を維持する課題(安静立位時, “the stance task”)。安静立位時は5秒間行う。2) 図2-2の右部のように姿勢実験用ボックスの床にマウスが4つの足を置いて水筒の飲み口から水を飲んでいる状態で四肢での立位姿勢を維持する課題(水飲み時, “the drinking stance task”)。水飲み時は5秒間行う。3) 四肢での立位姿勢から水筒の飲み口にマウスが頸部を背屈させることにより口を運ぶ課題(口の到達動作課題, “the drinking stance task”)。図2-2が口の到達動作課題の一連のマウスの動作となる。水筒の飲み口は直径7 mmであり, 床から約30 mmの位置にある。3つの姿勢課題において実験を行う際, マウスは無拘束の状態であった。計測を開始する前にマウスを姿勢実験用ボックスに慣れさせた。

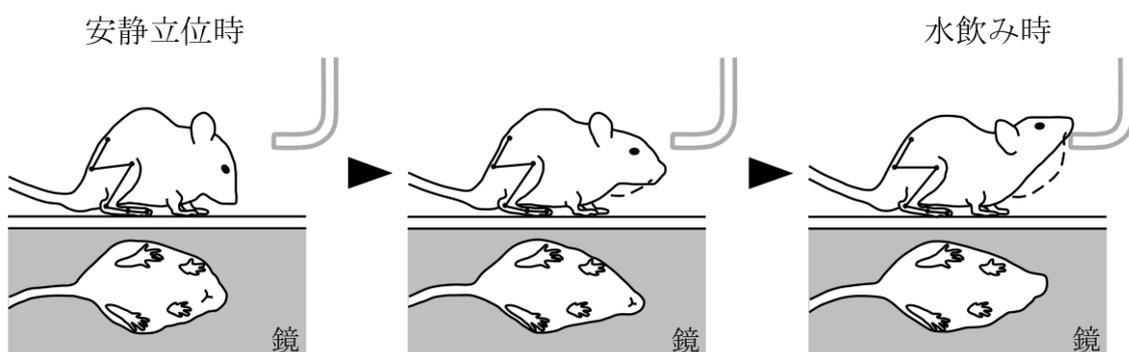


図2-2, マウスの姿勢課題

点線はマウスの口の軌跡を示す。マーカーが右後肢の腸骨稜, 大転子, 膝関節, 外果, 第5中足骨およびつま先に取り付けてある。解析はマウスの矢状面に限定する。姿勢実験用ボックスの下方に取り付けた鏡によりマウスの足の配置が観測できる。

2.2.4 計測方法および解析

マウスは、イソフルランを用いて麻酔がかけられた。イソフルランは、導入 3%、維持 2%とした。麻酔下のマウスの後肢および腰部の毛をそり、右後肢の腸骨稜、大転子、膝関節、外果、第 5 中足骨およびつま先に直径 2 mm の円形反射マーカールを取り付けた (図 2-3)。股関節 (Hip)、膝関節 (Knee) および足関節 (Ankle) の関節角度は図 2-3 のように定義した。姿勢実験用ボックスの側方に高速度デジタルカメラ (HAS-220, DITECT, Inc.) を配置し、課題時のマウスの動作を記録した。100 frames/second でマウスを側面より撮影し、画像は後の解析のためにパーソナルコンピュータに保存した。



図 2-3, マウス右後肢のマーカール位置と関節角度

動作解析は、矢状面に限定した。特注設計の解析ソフトウェア (DIPP-Motion Pro 2D, DITECT, Inc.) を用いて、各マーカーの変位および各関節角度 (股関節, 膝関節, 足関節), 口の軌跡を解析した。口の軌跡に関して、さらに解析を行った。ノイズの影響を除去するため、軌跡のデータは数値計算ソフトウェア (Matlab, MathWorks, Inc.) を用いて、3-Hz low-pass second-order Butterworth filter によりフィルター処理した。軌跡の速度, 加速度および躍度を計算した。軌跡の方向が変化する回数として、加速度より軌跡の変曲点の数を求めた。変曲点の数に関して、軌跡を水平方向 (x direction) および垂直方向 (y direction) に分けて求めた。口の運動の滑らかさの評価として、Jerk Index を計算した。口を水平 (x), 垂直 (y) 方向の位置で解析し、運動の滑らかさ J は下記数式とする。

$$J = \frac{1}{2} \int_0^{t_m} \left(\left(\frac{d^3 x}{dt^3} \right)^2 + \left(\frac{d^3 y}{dt^3} \right)^2 \right) dt$$

t_m は動作時間である。さらに、J を規格化し Jerk Index とする。

$$Jerk\ Index = \frac{J \cdot t_m^5}{D^2}$$

D は運動距離である。

本研究では、マーカーおよび関節角度の変動を各試行におけるマーカーおよび関節角度変位の 2 乗平均平方根 (root mean square; RMS) として定義した。

2.3 結果

2.3.1 安静立位時

図 2-3A は安静立位時において撮影開始時点の wild-type マウスの右後肢スティック線図の典型例である。解析のパラメータとして股関節 (Hip), 膝関節 (Knee) および足関節 (Ankle) の関節角度を評価した。関節角度の平均値を図 2-3B に示す。姿勢実験用ボックスの下方に取り付けてある鏡により 4 つの足の配置を観測することにより、後肢間距離および前肢間距離を計測した。肢間距離の平均値を図 2-3C に示す。

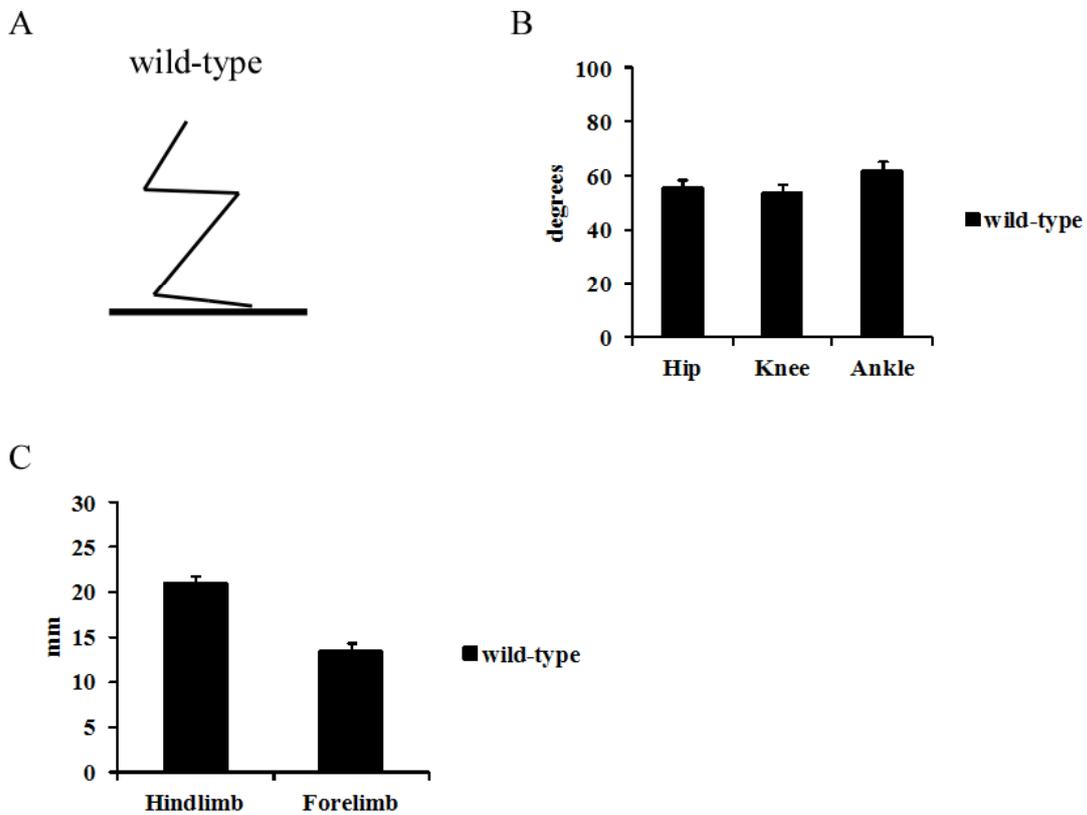


図 2-4, 安静立位時の解析パラメータ

A, wild-type マウスの瞬間の右後肢スティック線図. B, wild-type マウスの股関節 (Hip), 膝関節 (Knee) および足関節 (Ankle) の関節角度. C, wild-type マウスの後肢間距離 (Hindlimb) および前肢間距離 (Forelimb). wild-type マウス 13 匹のデータであり, 棒グラフは平均±標準誤差を表す.

図 2-4A は安静立位時 5 秒間の wild-type マウス右後肢のスティック線図の典型例である。5 秒間の右後肢の大転子位置および各関節角度の変動を評価するために大転子位置変位および各関節角度変位の 2 乗平均平方根を計算した。図 2-4B は大転子位置変位の 2 乗平均平方根の平均値を示す。位置の変位に関しては水平方向 (x direction) および垂直方向 (y direction) に分けて解析する。図 2-4C は股関節 (Hip), 膝関節 (Knee) および足関節 (Ankle) の関節角度変位の 2 乗平均平方根の平均値を示す。2 乗平均平方根を解析することでマーカー位置および各関節角度の変動を評価することとする。wild-type マウスは大転子位置および各関節角度が動いていないことが観察された。

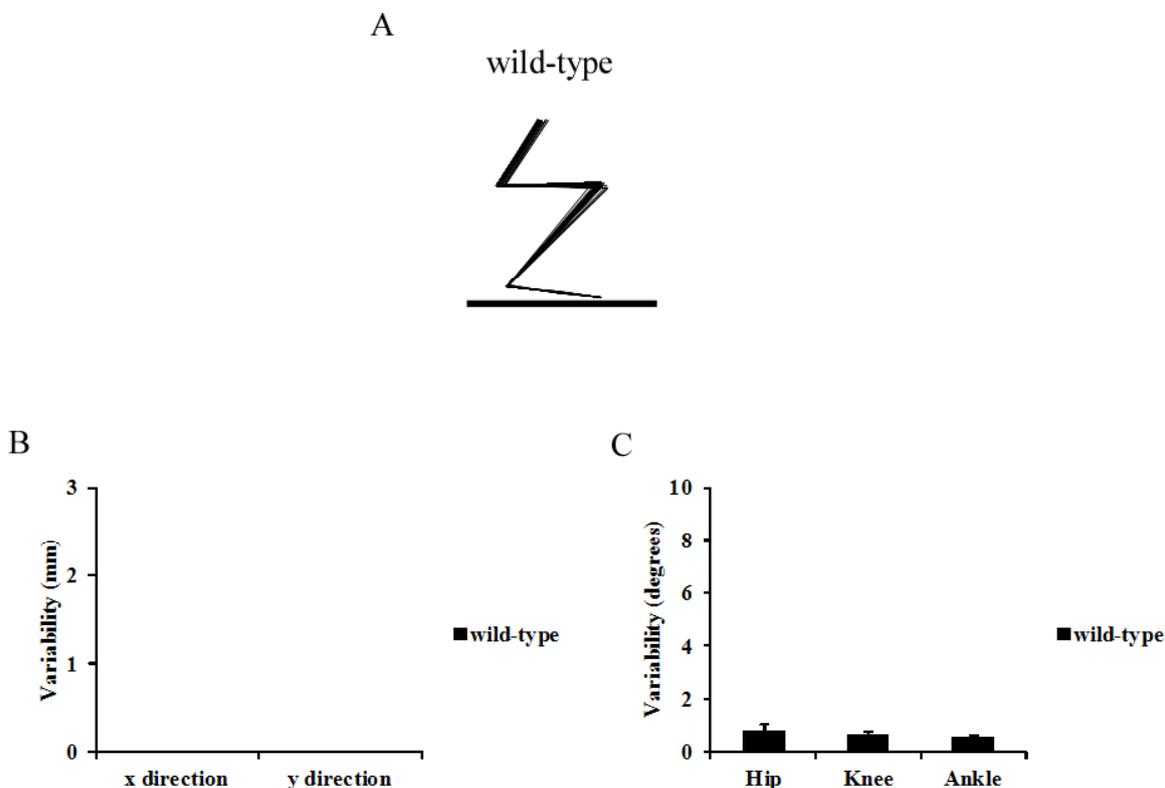


図 2-5, 安静立位時の解析パラメータ

A, wild-type マウスの安静立位時 5 秒間の右後肢スティック線図。 B, wild-type マウスの大転子位置 (水平方向 ; x direction, 垂直方向 ; y direction) の変動。 C, wild-type マウスの股関節 (Hip), 膝関節 (Knee) および足関節 (Ankle) の関節角度の変動。 wild-type マウス 9 匹のデータであり, 棒グラフは平均±標準誤差を表す。

2.3.2 水飲み時

水飲み時の立位は，安静立位時と比べてより姿勢維持が必要となる課題である．
図 2-5A は水飲み時において撮影開始時点の wild-type マウスの右後肢スティック線図の
典型例である．関節角度の平均値を図 2-5B に示す．肢間距離の平均値を図 2-5C に示す．

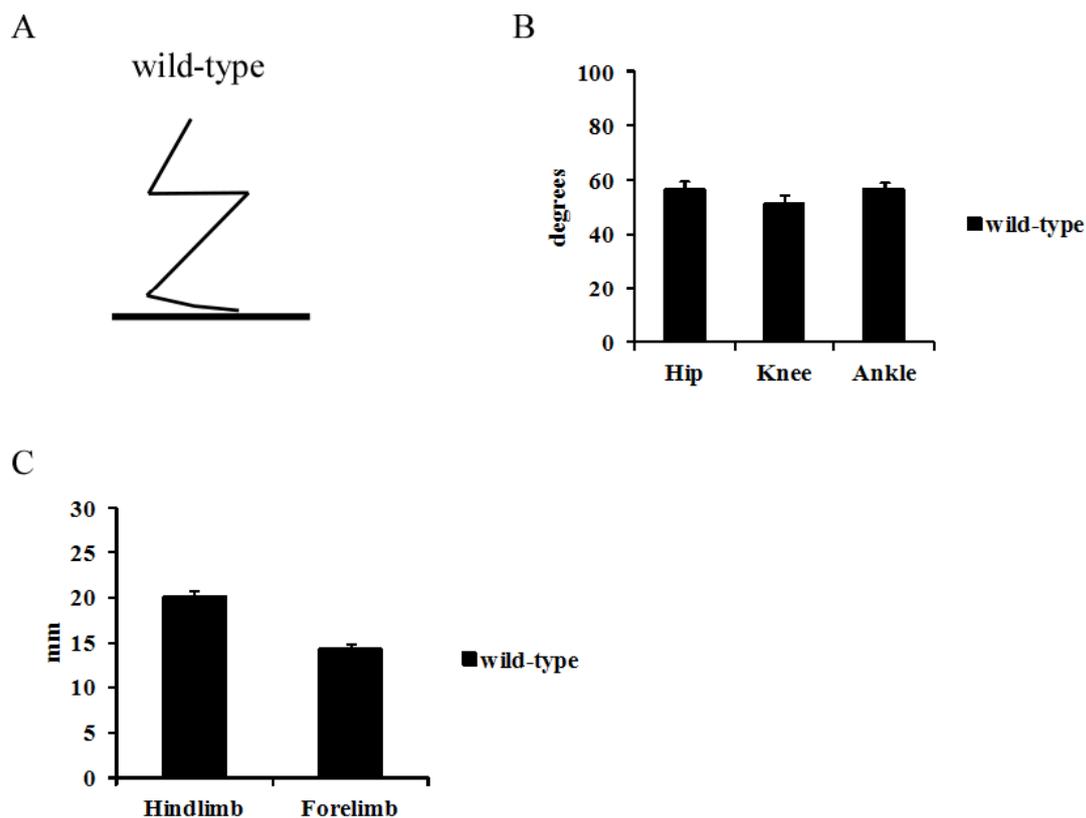


図 2-6, 水飲み時の解析パラメータ

A, wild-type マウスの瞬間の右後肢スティック線図. B, wild-type マウスの股関節 (Hip), 膝関節 (Knee) および足関節 (Ankle) の関節角度. C, wild-type マウスの後肢間距離 (Hindlimb) および前肢間距離 (Forelimb). wild-type マウス 14 匹のデータであり，棒グラフは平均±標準誤差を表す.

図 2-6A は水飲み時 5 秒間の wild-type マウス右後肢のスティック線図の典型例である。5 秒間の右後肢の大転子位置および各関節角度の変動を評価するために大転子位置変位および各関節角度変位の 2 乗平均平方根を計算した。図 2-6B は大転子位置変位の 2 乗平均平方根の平均値を示す。図 2-6C は股関節 (Hip), 膝関節 (Knee) および足関節 (Ankle) の関節角度変位の 2 乗平均平方根の平均値を示す。wild-type マウスは大転子位置および各関節角度が動いていないことが観察された。

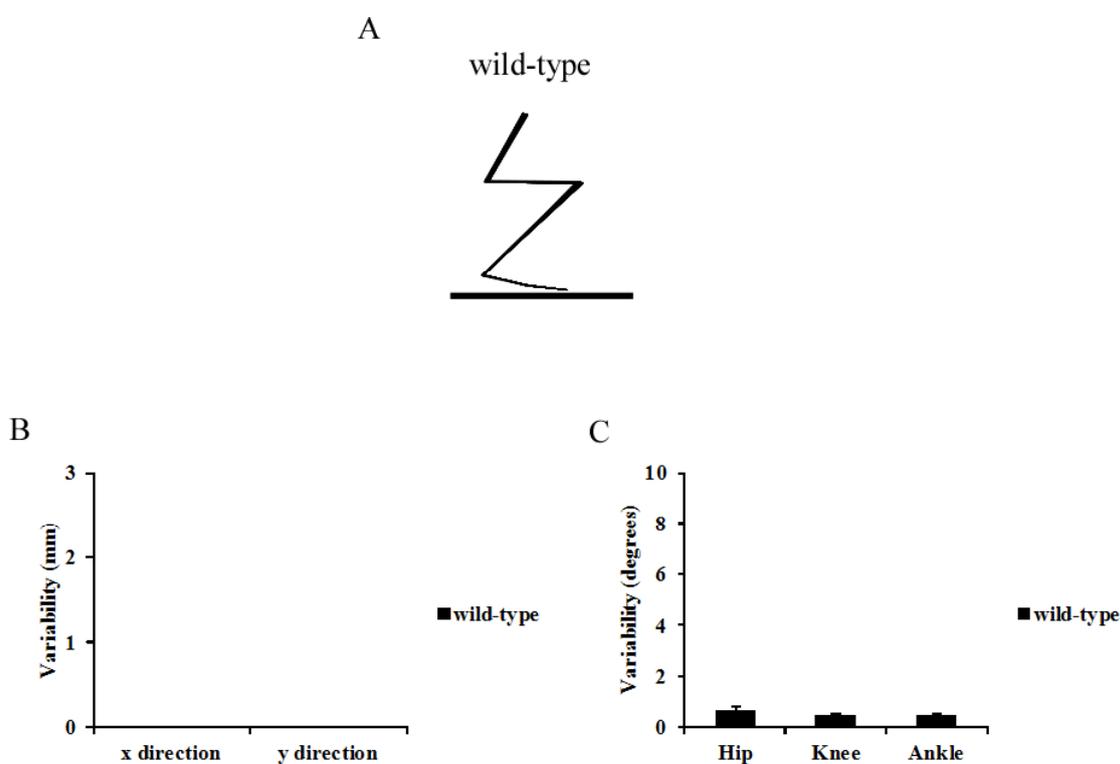


図 2-7, 水飲み時の解析パラメータ

A, wild-type マウスの水飲み時 5 秒間の右後肢スティック線図。 B, wild-type マウスの大転子位置 (水平方向 ; x direction, 垂直方向 ; y direction) の変動。 C, wild-type マウスの股関節 (Hip), 膝関節 (Knee) および足関節 (Ankle) の関節角度の変動。 wild-type マウス 9 匹のデータであり, 棒グラフは平均 \pm 標準誤差を表す。

2.3.3 口の到達動作課題

口の到達動作課題は、マウスが口を随意的に水筒の管に運ぶ到達運動である。解析として口の軌跡に着目する。口の到達動作課題時の wild-type マウスの口の軌跡を図 2-7A に示す。図 2-7A は 1 匹のマウスの典型例であり、色の違いは異なる試行を示している。課題の動作時間を求め、図 2-7B に平均を示す。口の軌跡の長さに関する評価として、実際の口の軌跡の長さを口の課題開始位置と終了位置の直線距離で割ることで trajectory length ratios を計算した (図 2-7C)。図 2-7D に trajectory length ratios の平均を示す。

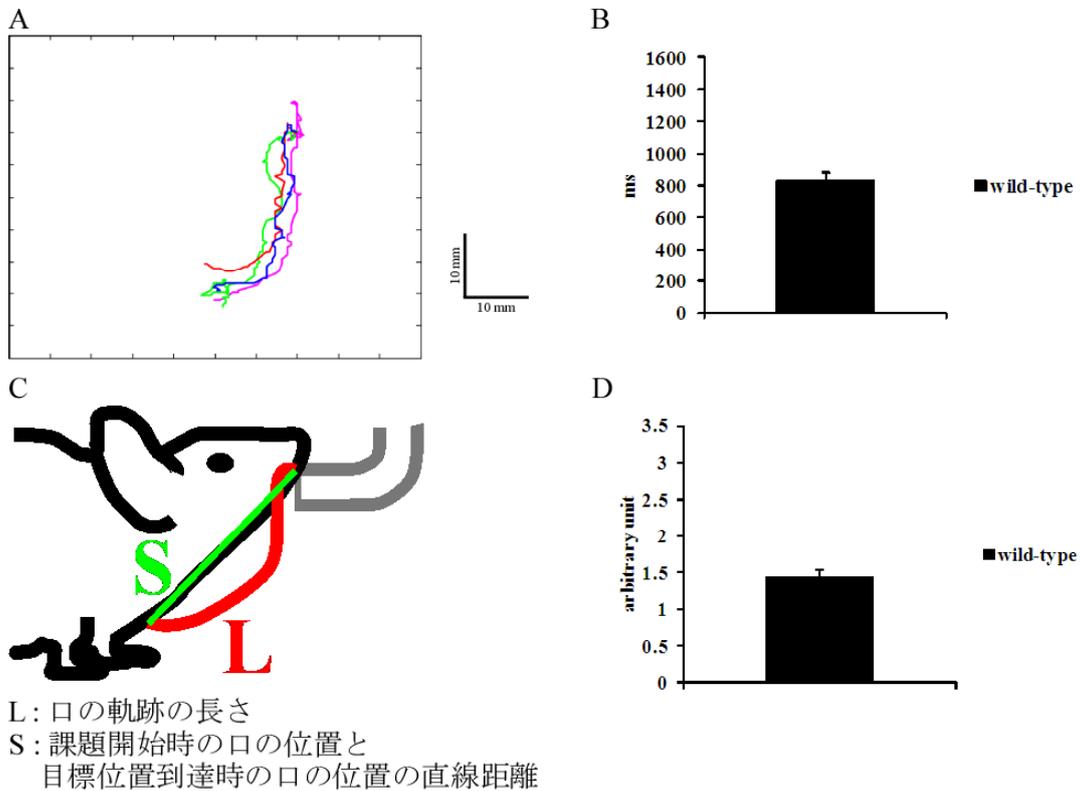


図 2-8, 口の到達動作課題の解析パラメータ

A, wild-type マウスの口の軌跡の典型例. B, wild-type マウスの到達動作課題の動作時間. C, trajectory length ratios の計算. D, wild-type マウスの trajectory length ratios. wild-type マウス 9 匹のデータであり, 棒グラフは平均±標準誤差を表す.

口の軌跡に関して、変曲点の数および運動の滑らかさの評価として Jerk Index を求めた。図 2-8A に変曲点の数の平均を示す。変曲点の数に関して、軌跡を水平方向 (x direction) および垂直方向 (y direction) に分けて求めた。図 2-8B に Jerk Index の平均を示す。

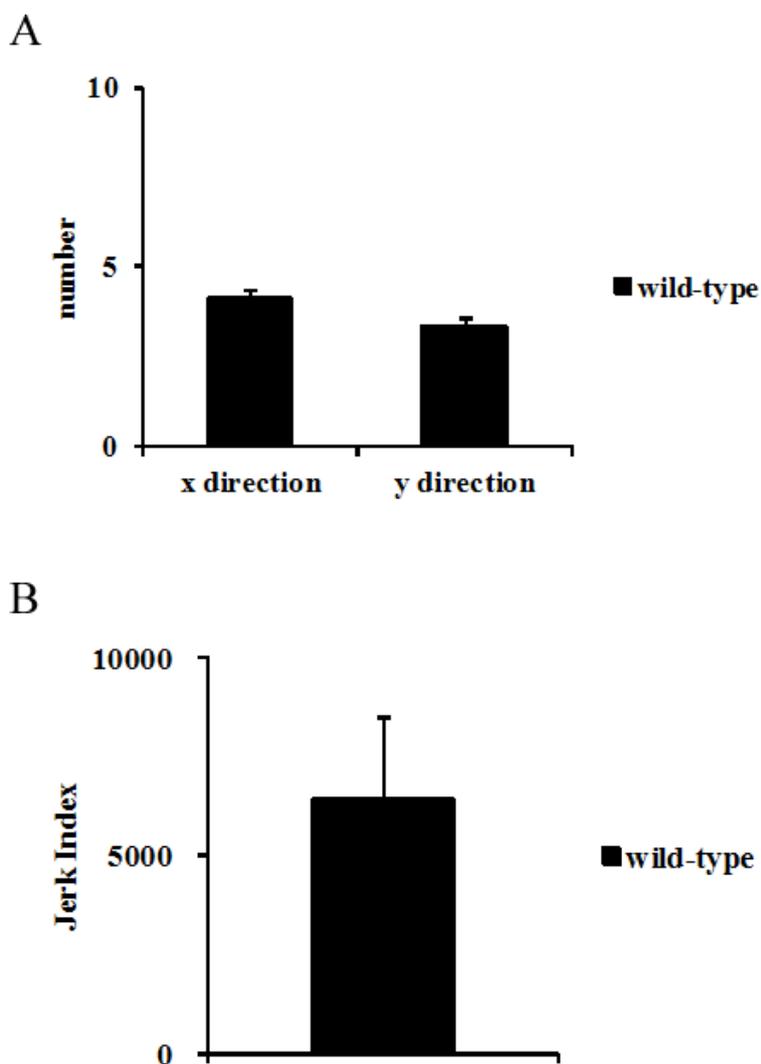


図 2-9, 口の到達動作課題の解析パラメータ

A, wild-type マウスの口軌跡の変曲点の数 (水平方向;x direction, 垂直方向;y direction).

B, wild-type マウスの Jerk Index. wild-type マウス 9 匹のデータであり, 棒グラフは平均 ±標準誤差を表す.

口の到達運動中のマウスの後肢を解析することで、姿勢調節に関して検討する。図 2-9A に口の到達動作課題時の wild-type マウスの大転子位置の変位を示す。図 2-9B に股関節 (Hip), 膝関節 (Knee) および足関節 (Ankle) の関節角度を示す。図 2-9B は股関節角度, 膝関節角度および足関節角度を軸とした 3 次元のグラフとして示した。口の到達動作課題中の後肢の変動を調査するため, 大転子位置変位および各関節角度変位の 2 乗平均平方根を計算した。図 2-9C は大転子位置変位の 2 乗平均平方根の平均値を示す。位置の変位に関しては水平方向 (x direction) および垂直方向 (y direction) に分けて解析する。図 2-9D は股関節 (Hip), 膝関節 (Knee) および足関節 (Ankle) の関節角度変位の 2 乗平均平方根の平均値を示す。2 乗平均平方根を解析することで, 主動作である口の到達運動中の後肢の変動を評価する。wild-type マウスは大転子位置および各関節角度が動いていないことが観察された。

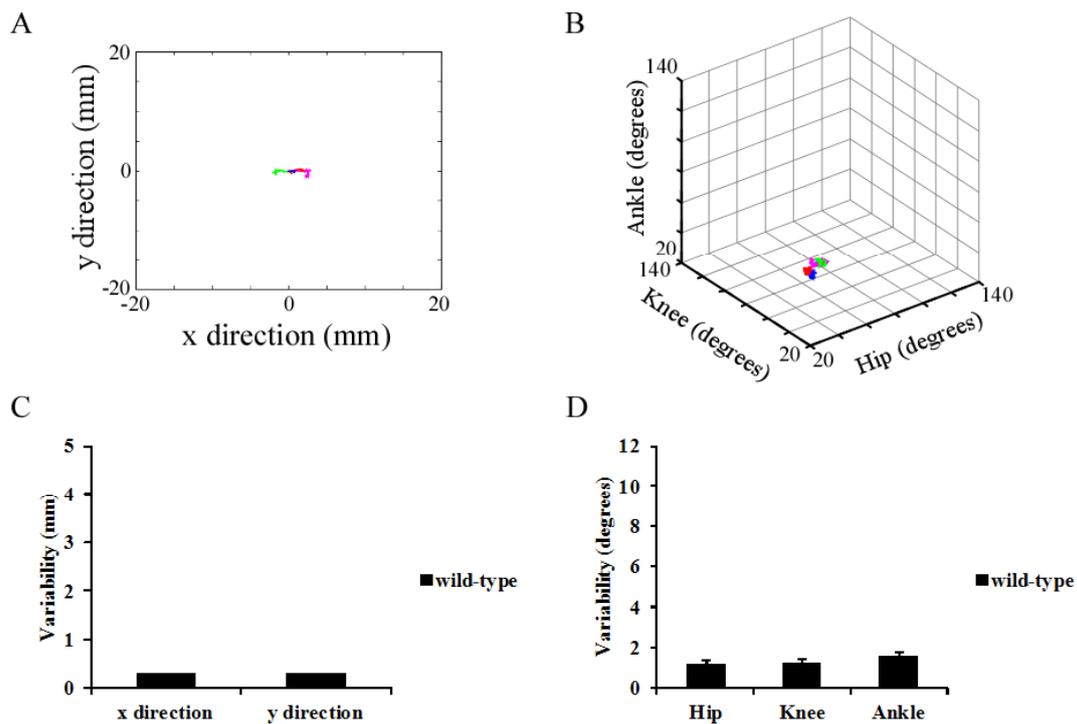


図 2-10, 口の到達動作課題の解析パラメータ

A, wild-type マウスの大転子位置変位の典型例. B, wild-type マウスの関節角度変位の典型例. C, wild-type マウスの大転子位置 (水平方向 ; x direction, 垂直方向 ; y direction) の変動. D, wild-type マウスの股関節 (Hip), 膝関節 (Knee) および足関節 (Ankle) の関節角度の変動. wild-type マウス 9 匹のデータであり, 棒グラフは平均±標準誤差を表す.

2.4 考察

本研究において、マウスの姿勢課題を設定し、右後肢の運動学的解析を行った。マウスにおける安静立位時および水飲み時は、立位時に姿勢を維持する必要がある課題である。ヒトにおける立位時の姿勢に相当する課題だと考えられる。マウスにおける口の到達動作課題は、口の随意的な到達運動に伴って全身を安定させることが必要となる課題である。ヒトが立位時に随意的に腕を上げるあるいは腕の到達運動を行う課題 (Gahery and Massion, 1981; Leonard et al., 2009)、四足動物であるネコが四肢での立位時に前肢の一方を随意的に上げるあるいは前肢の到達運動を行う課題 (Di Fabio, 1983; Schepens and Drew, 2003) に相当すると考えられる。

げっ歯類 (マウスおよびラット) を実験動物に用い、歩行時の運動学的解析を行った研究では、後肢の動作に焦点を当てて行われている (Leblond et al., 2003; Akay et al., 2006; Bolton et al., 2006; Pereira et al., 2006; Takeuchi et al., 2012)。また、げっ歯類において、重心は尾側にあると考えられ後肢による姿勢制御は重要であると考えられる。そのため、3つマウスの姿勢課題において運動学的解析は右後肢について行った。運動学的解析を右後肢に限定し、前肢の解析を行わなかった理由として方法論的限界が上げられる。マウスの前肢は小さくまた皮膚も動きやすいため、前肢の運動学的解析を行うのは困難だと言わざるを得ない。ヒトにおいては、運動学的解析だけでなく床反力を用いた研究も行われている。マウスにおいて床反力の計測を行うことは、マウスの体重が軽すぎて適切な信号を検知する床反力計が入手し難いとの理由により困難である。したがって、本研究では、マウスにおいて床反力の計測は行わなかった。

本章では、マウスにおいて安静立位時、水飲み時および口の到達動作課題の3つの姿勢課題を構築し、運動学的解析を行った。現在のところマウスの運動能力評価で行われている課題は、**footprint** によるマウスの足跡の評価または回転棒課題によるマウスが筒から落ちるまでの滞在時間である。本研究はマウスの右後肢の運動学的解析に限定されてはいるものの、マウスの姿勢に着目しマウスの肢運動を解析したという点に関しては新しい試みである。3つの姿勢課題において、**wild-type** マウスは課題中右後肢が動いていないことが観察される。動いていないことは、変動として定量的に評価することができた。課題時 **wild-type** マウスの後肢が動いていないことを基準として、運動失調を呈する種々のトランスジェニックマウスおよびノックアウト・ノックインマウスの姿勢障害を評価することが可能だと考える。

第3章 脊髄小脳変性症3型トランスジェニックマウスおよび後肢筋萎縮マウスの姿勢

3.1 緒言

小脳は姿勢制御に重要な役割を果たしており、小脳の傷害は重篤な姿勢障害を呈する (Diener and Dichgans, 1992; Morton and Bastian, 2004). 小脳疾患の1つに脊髄小脳変性症があり、脊髄小脳変性症3型 (Spinocerebellar ataxia type 3; SCA3) は脊髄小脳変性症の中でも最も一般的なタイプである。SCA3は遺伝性の小脳疾患であり、常染色体優性 Ataxin-3 遺伝子 (ATXN3) の変異が認められ (Kawaguchi et al., 1994), 小脳プルキンエ細胞の細胞死が生じる (Ikeda et al., 1996). 原因遺伝子が同定されているため、SCA3原因遺伝子を操作した SCA3 マウスモデルが多く作製されている (Cemal et al., 2002; Goti et al., 2004; Bichelmeier et al., 2007; Chen et al., 2008; Torashima et al., 2008; Boy et al., 2009; Colomer Gould, 2012). 他の遺伝性小脳疾患マウスモデル (Yamada et al., 2008; Manto and Marmolino, 2009b) と同様に、SCA3 マウスモデルは神経変性のメカニズムを調査するためおよび疾患の治療法の試験的研究を行うために用いられている。本研究においても、脊髄小脳変性症3型トランスジェニックマウス (SCA3Tg マウス) を用いて研究する。SCA3Tg マウスは L7 プロモーターを用いることで 69 回の CAG 繰り返し配列をもつ変異 ataxin-3 を小脳プルキンエ細胞のみに発現させている。

SCA3 マウスモデルにおける運動能力評価は、footprint および回転棒課題を用いたものがほとんどである (Lalonde and Strazielle, 2007; Brooks and Dunnett, 2009). 姿勢の評価として負の走地性テスト (Cemal et al., 2002) あるいは立ち直り反射テスト (Goti et al., 2004) を用い、SCA3 マウスモデルの姿勢障害を調査している。運動失調の改善効果の評価においても、以上のような評価方法が用いられることとなる。しかしながら、これらの評価方法において肢の関節角度の変位等の運動学的解析はほとんど行われていない。さらに、SCA3 マウスモデルの随意運動に随伴した姿勢制御に関しては調査されていない。

先行研究において、SCA3 患者は高い頻度で筋萎縮を呈することが報告されている (Watanabe et al., 1996; Maruyama et al., 1997; Schmitz-Hubsch et al., 2008). 本研究で用いる SCA3Tg マウスも筋萎縮を呈している可能性が考えられた。SCA3Tg マウスの後肢の筋肉 (腓腹筋, ヒラメ筋, 前脛骨筋) を実際に計量してみたところ、SCA3Tg マウスの後肢筋重量は wild-type マウスに比べ軽く、SCA3Tg マウスは後肢の筋肉の萎縮を呈した。後肢筋の萎縮は、歩行動作に影響を及ぼすことがラットにおいて示されている

(Canu et al., 2001). 後肢筋の萎縮が姿勢制御に及ぼす影響を調査するために, wild-type マウスの後肢を固定することで後肢筋萎縮マウス (muscle atrophy マウス) を作成した.

本章では, 第 2 章において新たに構築した姿勢課題を用い, wild-type マウス, SCA3Tg マウスおよび muscle atrophy マウスの姿勢を比較した.

3.2 実験方法

3.2.1 脊髄小脳変性症 3 型トランスジェニックマウス

本研究では、69 回の CAG 繰り返し配列をもつ NH₂ 末端が切断された ataxin-3 および NH₂ 末端血球凝集素エピトープを発現した脊髄小脳変性症 3 型トランスジェニックマウス (SCA3Tg マウス) を作製した (Yoshizawa et al., 2000). プルキンエ細胞特異的な L7 プロモーターにより導入遺伝子は小脳プルキンエ細胞にのみ発現する (Hirai et al., 2005).

3.2.2 免疫組織化学的検査

マウスはジエチルエーテル吸入により深麻酔を施した後、固定液 (電子顕微鏡的研究のため 0.1% glutaraldehyde を加えた 4% formaldehyde in 0.1 M phosphate buffer) を用いて心臓経由で還流固定した (Torashima et al., 2006). 抜脳した小脳は後固定 (0.1% glutaraldehyde を加えた 4% formaldehyde in 0.1 M phosphate buffer) を 3 時間行った. 免疫染色のために、小脳の矢状断切片 (40 to 100 μ m) をマイクロトーム (DOSAKA DTK-1000, Kyoto, Japan) により作成した. 切片は rabbit polyclonal anti-calbindin D-28K (1:200; Sigma, St Louis, MO) および mouse monoclonal anti-HA (1:1,000; InvivoGen, CA), および Alexa fluor 568- および Alexa-488-conjugated (10 μ g/ml; Invitrogen) または peroxidase-tagged secondary antibodies にて免疫染色した. 対照切片は normal mouse IgG (1 μ g/ml) にて、または 1 次抗体を省略することによって染色した. パラフィン包埋した組織切片はニッスル染色および expanded polyglutamine (1C2; mouse monoclonal, Chemicon, Temecula, CA; 1:10,000) による染色を行った (Hayashi et al., 2003).

3.2.3 後肢固定手順

先行手法においては石膏 (Booth and Kelso, 1973; Booth, 1977; Frimel et al., 2005) あるいは外科用ホッチキス (Caron et al., 2009) を用いラットまたはマウスの後肢を固定していたが、本研究は紙粘土を用いマウスの後肢を固定した. マウスは、イソフルランを用いて麻酔がかけられた. イソフルランは、導入 3%, 維持 2% とした. 麻酔下のマウスの後肢および腰部の毛をそり、両後肢をマウスの自然長で固定する. 固定は、両後肢を滅菌ガーゼで包み、紙粘土により固めた. 後肢の固定措置が完了した後マウスは飼育ゲージに戻した. 紙粘土を齧るなどして損傷させていないかを毎日観察した. 動作

実験の計測終了後、解剖し筋肉の重量を計量した。後肢の固定期間は2週間あるいは3週間と設定していた。計量した筋肉の重さが2週間固定群と3週間固定群との間に差がないと判断し、本研究では2週間固定群と3週間固定群を併合した。また、動作実験において除去後1日後では課題を行わないマウスがおり、固定除去後の回復期間を統一することができなかった。固定除去後の回復期間は1-3日となってしまったが、回復期間1日群、回復期間2日群および回復期間3日群の筋肉の重さに差がないと判断し、本研究では3群を併合した。

3.2.4 姿勢課題および計測

課題は第2章において構築した3つの姿勢課題とした。計測方法および解析は、第2章と同一とした。

3.2.5 統計

統計処理は統計ツール (SPSS Japan, Ins.) を用いた。筋重量、体重、関節角度、肢間距離、動作時間および変曲点の数は分散分析 (one-way analysis of variance; ANOVA) により行い、事後の多重比較は Bonferroni の信頼区間の調整方法により行った。有意水準は $P < 0.05$ とした。等分散性が仮定されなかったため、2乗平均平方根 (RMS), trajectory length ratios, Jerk Index, 水飲み時の足関節および水飲み時の前肢間距離のパラメータは Kruskal-Wallis one-way analysis of variance により比較し、事後の検定は Mann-Whitney U -test with Bonferroni adjustment (adjusted $P = 0.0167$) を用いた。本文中、 N はマウスの数、 n は全個体の総試行数を示す。

3.3 結果

3.3.1 脊髄小脳変性症 3 型トランスジェニックマウス

本研究は SCA3 を発症するヒト Ataxin-3 の切断型を発現する脊髄小脳変性症 3 型トランスジェニックマウス (SCA3Tg マウス) を作製した. wild-type マウスおよび SCA3Tg マウスの脳および小脳組織を図 3-1 に示す. wild-type マウスと比べ SCA3Tg マウスは小脳が著しく萎縮しているのがわかる (図 3-1A, B). 拡大したポリグルタミン凝集体 (1C2) が SCA3Tg マウスの小脳に観察された (図 3-1C, D). カルビンジン (calbindin) および切断型 Ataxin-3 に付加した N 末端血球凝集素 (hemagglutinin; HA) タグによる二重免疫染色を行った (図 3-1E, F). 変異タンパク質が SCA3Tg マウスの小脳プルキンエ細胞に蓄積していた (図 3-1F, 緑).

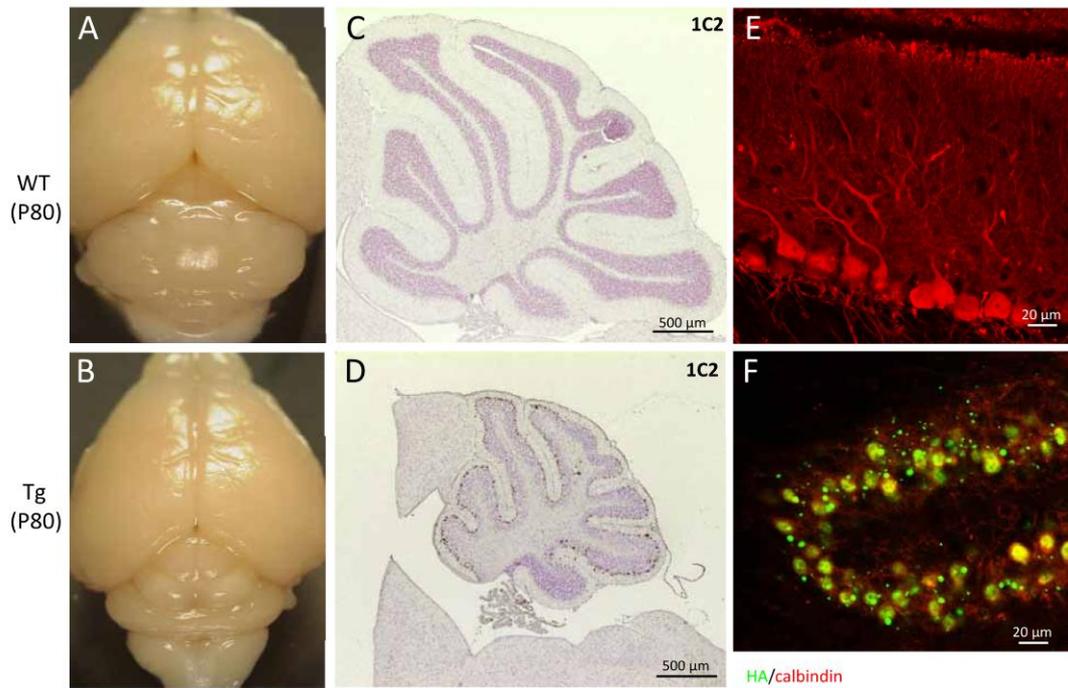


図 3-1, SCA3Tg マウスにおける小脳萎縮およびポリグルタミン凝集体の沈着

上部パネルは wild-type マウス (生後 80 日), 下部パネルは SCA3Tg マウス (生後 80 日) のものである. A-B, 脳全体の立体画像. C-D, anti-expanded polyglutamine antibody (clone; 1C2)を用いた免疫染色およびニッスル染色した小脳の矢状断切片. E-F, antibodies against calbindin (赤) および HA (緑) N-terminally tagged with truncated Ataxin-3 により二重免疫染色した小脳切片. Scale bar, 500 μm (C, D) and 20 μm (E, F).

3.3.2 後肢筋萎縮マウス

Wild-type マウスの後肢を固定することで、後肢筋萎縮マウス (muscle atrophy マウス) を作製した. muscle atrophy マウスの体重および腓腹筋 (gastrocnemius muscle; GA), ヒラメ筋 (soleus muscle; Sol) および前脛骨筋 (tibialis anterior muscle; TA) の重量を計測した. 体重に関しては, 3 群間で有意な差は認められなかった (wild-type = 24.4 ± 1.1 g; SCA3Tg = 22.9 ± 0.8 g; muscle atrophy = 21.3 ± 1.2 g; $F(2,25) = 1.926$, $P = 0.167$). 腓腹筋, ヒラメ筋および前脛骨筋の重量に関しては, SCA3Tg マウスのそれぞれの筋重量が wild-type マウスと比べて有意に軽かった. また, muscle atrophy マウスのそれぞれの筋重量が wild-type マウスと比べて有意に軽く, SCA3Tg マウスとの間に有意差は認められなかった (GA: wild-type = 120.0 ± 7.8 mg; SCA3Tg = 87.0 ± 4.4 mg; muscle atrophy = 85.8 ± 6.2 mg; $F(2,29) = 9.890$, $P = 0.001$. Sol: wild-type = 7.8 ± 0.7 mg; SCA3Tg = 5.9 ± 0.3 mg; muscle atrophy = 5.2 ± 0.8 mg; $F(2,29) = 5.394$, $P = 0.010$. TA: wild-type = 46.2 ± 2.0 mg; SCA3Tg = 35.6 ± 1.5 mg; muscle atrophy = 35.8 ± 3.8 mg; $F(2,29) = 7.822$, $P = 0.002$; 図 3-2). SCA3Tg マウスは後肢の各筋肉の萎縮が認められた. muscle atrophy マウスに関して, 後肢の固定が腓腹筋, ヒラメ筋および前脛骨筋の萎縮を引き起こし, それは SCA3Tg マウスの萎縮と同程度であることを示す. したがって, 後肢の固定処置をした muscle atrophy マウスは姿勢障害に筋肉の萎縮が影響するかを調査するための良いモデルとなり得る.

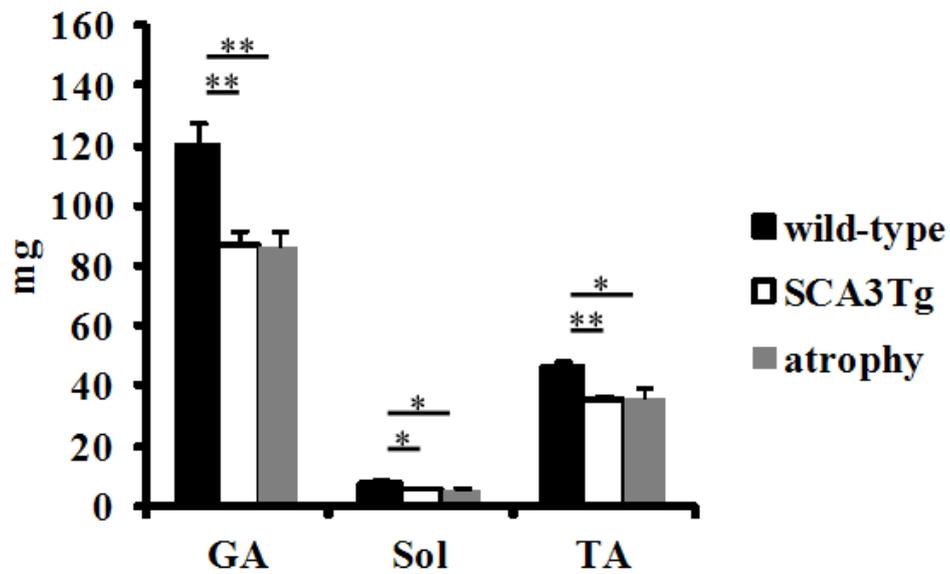


図 3-2, wild-type マウス, SCA3Tg マウスおよび muscle atrophy マウスの腓腹筋 (GA), ヒラメ筋 (Sol) および前脛骨筋 (TA) の重量

筋重量は wild-type マウス 11 匹, SCA3Tg マウス 14 匹および muscle atrophy マウス 7 匹のデータであり, 棒グラフは平均±標準誤差を表す. ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$.

3.3.3 安静立位時

安静立位時において wild-type マウス, SCA3Tg マウスおよび muscle atrophy マウスの後肢の運動学的解析を行った. 図 3-3 は撮影開始時点の wild-type マウスおよび SCA3Tg マウスの右後肢スティック線図の典型例である. 関節角度の平均値を図 3-4 に示す. SCA3Tg マウスの膝関節および足関節は wild-type マウスと比べ有意に大きいことが示されたが, wild-type マウスと muscle atrophy マウスとの間に有意差は認められなかった (Knee: wild-type = $53.8 \pm 3.1^\circ$; SCA3Tg = $66.4 \pm 3.2^\circ$; muscle atrophy = $58.3 \pm 2.5^\circ$; $F(2,29) = 4.656$, $P = 0.018$. Ankle: wild-type = $62.0 \pm 3.4^\circ$; SCA3Tg = $82.8 \pm 4.2^\circ$; muscle atrophy = $72.2 \pm 3.2^\circ$; $F(2,29) = 8.547$, $P = 0.001$; 図 3-4). muscle atrophy マウスの股関節は wild-type マウスと比べ有意に大きい (wild-type = $55.5 \pm 3.4^\circ$; SCA3Tg = $61.9 \pm 4.2^\circ$; muscle atrophy = $76.1 \pm 4.1^\circ$; $F(2,29) = 5.733$, $P = 0.008$; 図 3-4). 図 3-5 に肢間距離の平均値を示す. SCA3Tg マウスの後肢間距離は wild-type マウスと比べ有意に長く, SCA3Tg マウスの前肢間距離は wild-type マウスと比べ長い傾向が示された (Hindlimb: wild-type = 20.9 ± 0.8 mm; SCA3Tg = 26.0 ± 1.2 mm; muscle atrophy = 23.3 ± 1.5 mm; $F(2,29) = 6.177$, $P = 0.006$. Forelimb: wild-type = 13.3 ± 0.9 mm; SCA3Tg = 16.9 ± 1.3 mm; muscle atrophy = 12.5 ± 0.9 mm; $F(2,29) = 4.241$, $P = 0.024$; 図 3-5).

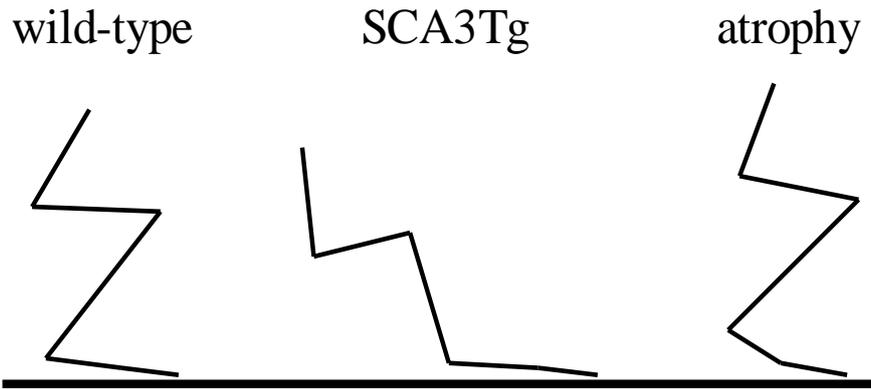


図 3-3, wild-type マウス (左) , SCA3Tg マウス (中央) および muscle atrophy マウス (右) の瞬間の右後肢スティック線図

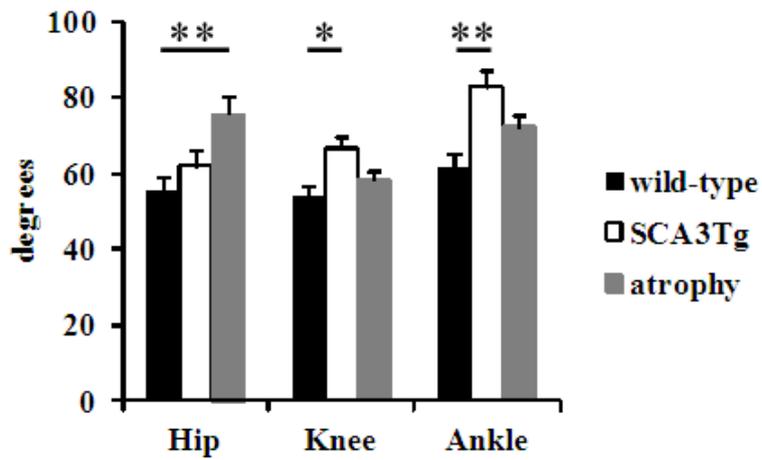


図 3-4, wild-type マウス, SCA3Tg マウスおよび muscle atrophy マウスの股関節 (Hip), 膝関節 (Knee) および足関節 (Ankle) の関節角度
wild-type マウス 13 匹, SCA3Tg マウス 12 匹および muscle atrophy マウス 7 匹のデータであり, 棒グラフは平均±標準誤差を表す. ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$.

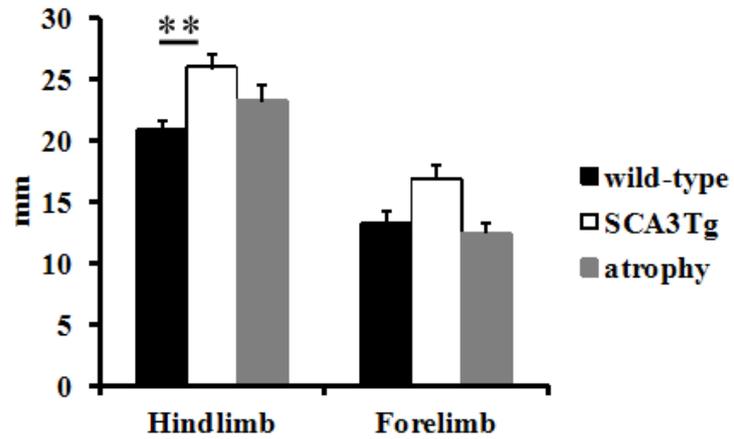


図 3-5, wild-type マウス, SCA3Tg マウスおよび muscle atrophy マウスの後肢間距離 (Hindlimb) および前肢間距離 (Forelimb)

wild-type マウス 13 匹, SCA3Tg マウス 12 匹および muscle atrophy マウス 7 匹のデータであり, 棒グラフは平均±標準誤差を表す. ** $P < 0.01$.

図 3-6 は wild-type マウスおよび SCA3Tg マウスの安静立位時 5 秒間のスティック線図の典型例である。大転子位置変位および各関節角度変位の 2 乗平均平方根を評価した。SCA3Tg マウスの大転子位置変位および各関節角度変位の 2 乗平均平方根は wild-type マウスに比べ有意に大きく、また、muscle atrophy マウスと wild-type マウスの間に有意差は認められなかった (表 3-1, 図 3-7, 3-8)。



図 3-6, wild-type マウス (左), SCA3Tg マウス (中央) および muscle atrophy マウス (右) の安静立位時 5 秒間の右後肢スティック線図

表 3-1, 大転子位置 (水平方向 ; x direction, 垂直方向 ; y direction) および股関節 (Hip), 膝関節 (Knee) および足関節 (Ankle) の関節角度の変動

	wild-type	SCA3Tg	muscle atrophy
Greater trochanter (x direction) [mm]	0.0 ± 0.0	1.8 ± 0.3 ^{#1, #2}	0.0 ± 0.0
Greater trochanter (y direction) [mm]	0.0 ± 0.0	0.9 ± 0.3 ^{#1, #2}	0.0 ± 0.0
Hip [degrees]	0.8 ± 0.2	2.3 ± 0.4 ^{#1, #2}	0.5 ± 0.1
Knee [degrees]	0.6 ± 0.1	4.3 ± 1.2 ^{#1, #2}	0.4 ± 0.1
Ankle [degrees]	0.6 ± 0.1	5.2 ± 1.1 ^{#1, #2}	0.8 ± 0.1

^{#1} Significance level: $P < 0.0167$ compared to wild-type.

^{#2} Significance level: $P < 0.0167$ compared to muscle atrophy.

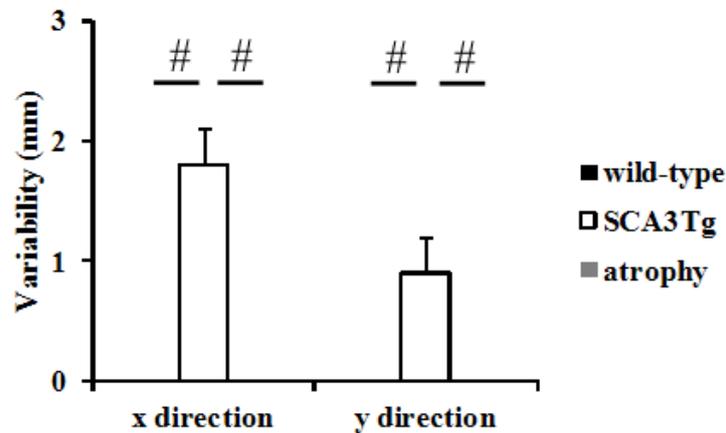


図 3-7, wild-type マウス, SCA3Tg マウスおよび muscle atrophy マウスの大転子位置 (水平方向 ; x direction, 垂直方向 ; y direction) の変動
wild-type マウス 9 匹, SCA3Tg マウス 9 匹および muscle atrophy マウス 7 匹のデータであり, 棒グラフは平均±標準誤差を表す. Mann-Whitney *U*-tests による統計的集団間の差は # によって示す.

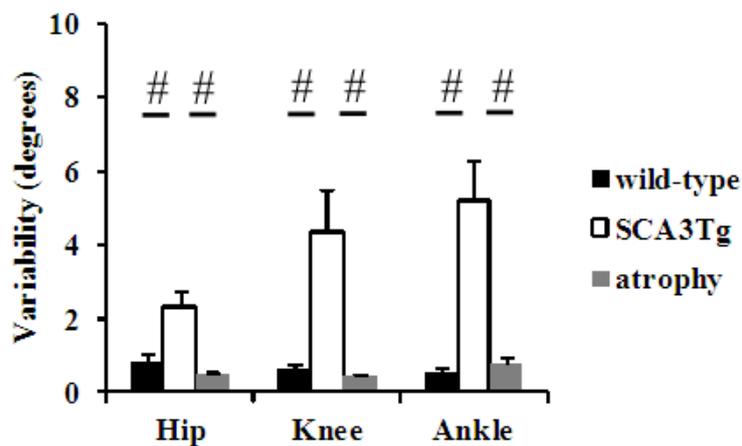


図 3-8, wild-type マウス, SCA3Tg マウスおよび muscle atrophy マウスの股関節 (Hip), 膝関節 (Knee) および足関節 (Ankle) の関節角度の変動
wild-type マウス 9 匹, SCA3Tg マウス 9 匹および muscle atrophy マウス 7 匹のデータであり, 棒グラフは平均±標準誤差を表す. Mann-Whitney *U*-tests による統計的集団間の差は # によって示す.

3.3.4 水飲み時

SCA3Tg マウスは転倒しやすく、5 秒間の姿勢維持課題達成が困難であり実験データを計測するのに時間を要した。実験結果に関しては転倒せずに 5 秒間姿勢を維持できた試行を解析した。図 3-9 は撮影開始時点の wild-type マウスおよび SCA3Tg マウスの右後肢スティック線図の典型例である。関節角度の平均値を図 3-10 に示す。SCA3Tg マウスおよび muscle atrophy マウスの足関節角度は wild-type マウスと比べ有意に大きい (wild-type = $56.5 \pm 2.7^\circ$; SCA3Tg = $84.9 \pm 5.7^\circ$; $U = 18$, $P < 0.001$; wild-type = $56.5 \pm 2.7^\circ$; muscle atrophy = $75.0 \pm 3.8^\circ$; $U = 4$, $P < 0.001$; 図 3-10)。膝関節角度は 3 群間に有意差は認められなかった (wild-type = $51.3 \pm 3.3^\circ$; SCA3Tg = $60.2 \pm 4.5^\circ$; muscle atrophy = $59.0 \pm 3.1^\circ$; $F(2,30) = 1.752$, $P = 0.191$; 図 3-10)。muscle atrophy マウスの股関節角度は wild-type マウスと比べ有意に大きい (wild-type = $56.9 \pm 3.2^\circ$; SCA3Tg = $62.3 \pm 4.1^\circ$; muscle atrophy = $75.8 \pm 4.4^\circ$; $F(2,30) = 5.172$, $P = 0.012$; 図 3-10)。図 3-11 に肢間距離の平均値を示す。SCA3Tg マウスの後肢間距離および前肢間距離は wild-type マウスと比べ有意に長い (Hindlimb: wild-type = 20.0 ± 0.7 mm; SCA3Tg = 26.8 ± 1.0 mm; muscle atrophy = 23.3 ± 1.4 mm; $F(2,30) = 13.858$, $P < 0.001$. Forelimb: wild-type = 14.2 ± 0.6 mm; SCA3Tg = 18.4 ± 1.2 mm; $U = 28$, $P = 0.003$; wild-type = 14.2 ± 0.6 mm; muscle atrophy = 12.7 ± 0.9 mm; $U = 30$, $P = 0.172$; 図 3-11)。

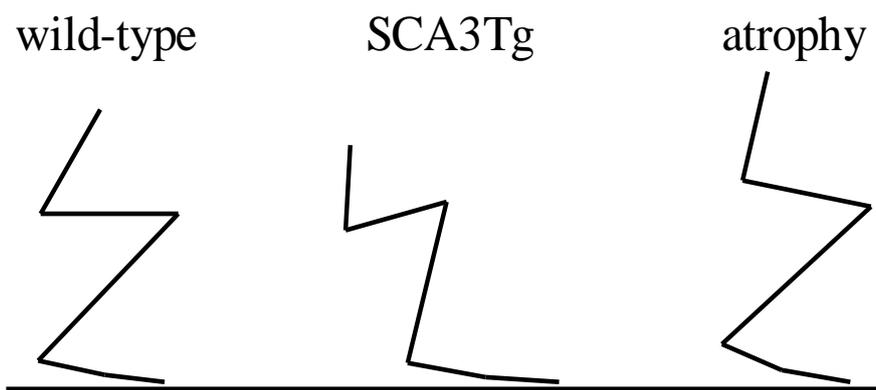


図 3-9, wild-type マウス (左), SCA3Tg マウス (中央) および muscle atrophy マウス (右) の瞬間の右後肢スティック線図

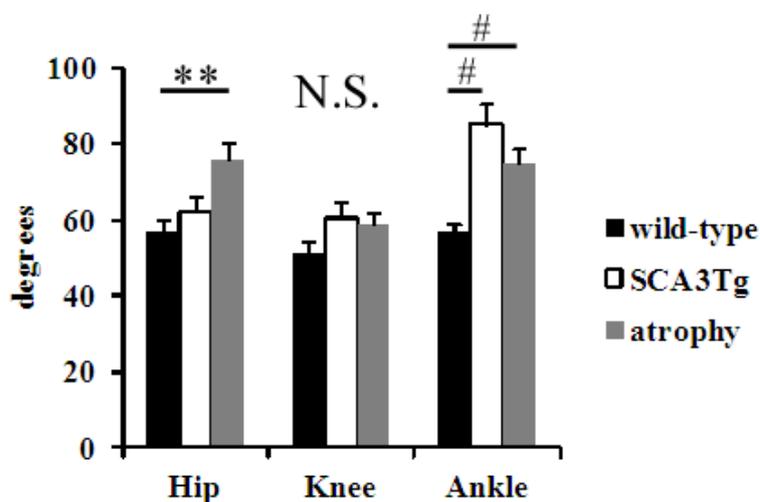


図 3-10, wild-type マウス, SCA3Tg マウスおよび muscle atrophy マウスの股関節 (Hip), 膝関節 (Knee) および足関節 (Ankle) の関節角度

wild-type マウス 14 匹, SCA3Tg マウス 12 匹および muscle atrophy マウス 7 匹のデータであり, 棒グラフは平均±標準誤差を表す. $**P < 0.01$. N.S. = not significant. Mann-Whitney *U*-tests による統計的集団間の差は # によって示す.

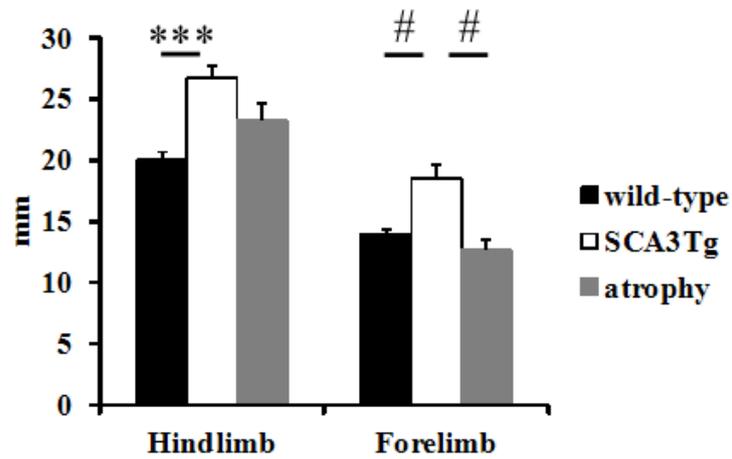


図 3-11, wild-type マウス, SCA3Tg マウスおよび muscle atrophy マウスの後肢間距離 (Hindlimb) および前肢間距離 (Forelimb)

wild-type マウス 14 匹, SCA3Tg マウス 12 匹および muscle atrophy マウス 7 匹のデータであり, 棒グラフは平均±標準誤差を表す. *** $P < 0.001$. Mann-Whitney U -tests による統計的集団間の差は # によって示す.

図 3-12 は wild-type マウスおよび SCA3Tg マウスの水飲み時 5 秒間のスティック線図の典型例である。大転子位置変位および各関節角度変位の 2 乗平均平方根を評価した。SCA3Tg マウスの大転子位置変位および各関節角度変位の 2 乗平均平方根は wild-type マウスに比べ有意に大きく、また、muscle atrophy マウスの大転子位置変位、股関節および膝関節角度変位の 2 乗平均平方根は wild-type マウス間に有意差は認められなかった (表 3-2, 図 3-13, 図 3-14)。muscle atrophy マウスの足関節角度変位の 2 乗平均平方根は wild-type マウスと比べ有意に大きかった (表 3-2, 図 3-14)。

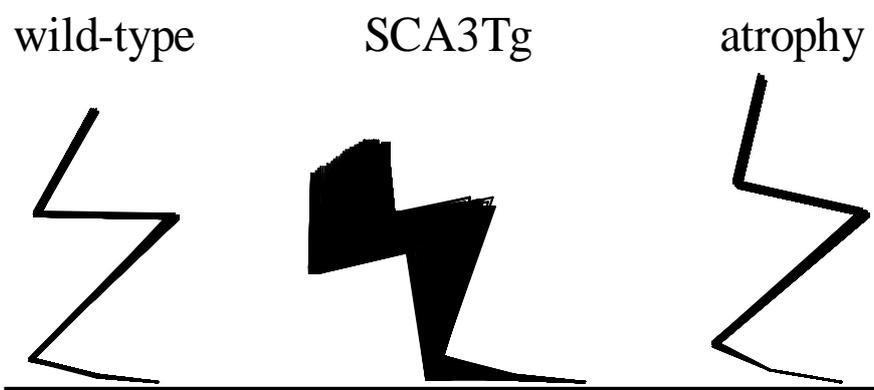


図 3-12, wild-type マウス (左), SCA3Tg マウス (中央) および muscle atrophy マウス (右) の水飲み時 5 秒間の右後肢スティック線図

表 3-2, 大転子位置 (水平方向 ; x direction, 垂直方向 ; y direction) および股関節 (Hip), 膝関節 (Knee) および足関節 (Ankle) の関節角度の変動

	wild-type	SCA3Tg	muscle atrophy
Greater trochanter (x direction) [mm]	0.0 ± 0.0	1.2 ± 0.3 ^{#1, #2}	0.3 ± 0.0
Greater trochanter (y direction) [mm]	0.0 ± 0.0	0.6 ± 0.0 ^{#1, #2}	0.0 ± 0.0
Hip [degrees]	0.7 ± 0.1	3.6 ± 0.6 ^{#1, #2}	0.4 ± 0.1
Knee [degrees]	0.5 ± 0.1	3.7 ± 0.6 ^{#1, #2}	0.6 ± 0.1
Ankle [degrees]	0.5 ± 0.1	3.9 ± 0.6 ^{#1, #2}	0.9 ± 0.1 ^{#1}

^{#1} Significance level: $P < 0.0167$ compared to wild-type.

^{#2} Significance level: $P < 0.0167$ compared to muscle atrophy.

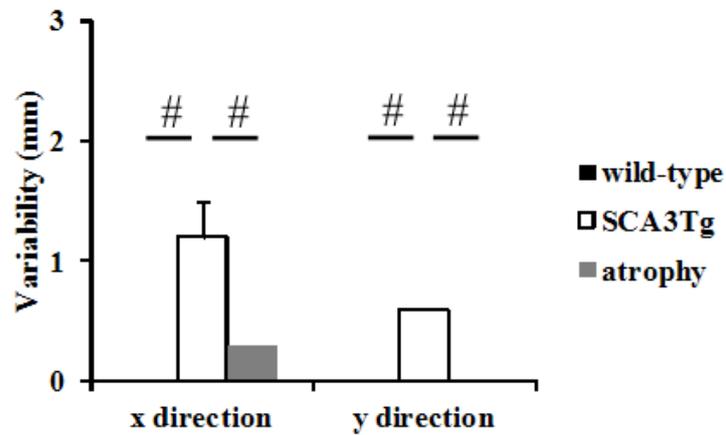


図 3-13, wild-type マウス, SCA3Tg マウスおよび muscle atrophy マウスの大転子位置 (水平方向 ; x direction, 垂直方向 ; y direction) の変動
wild-type マウス 9 匹, SCA3Tg マウス 7 匹および muscle atrophy マウス 7 匹のデータであり, 棒グラフは平均±標準誤差を表す. Mann-Whitney *U*-tests による統計的集団間の差は # によって示す.

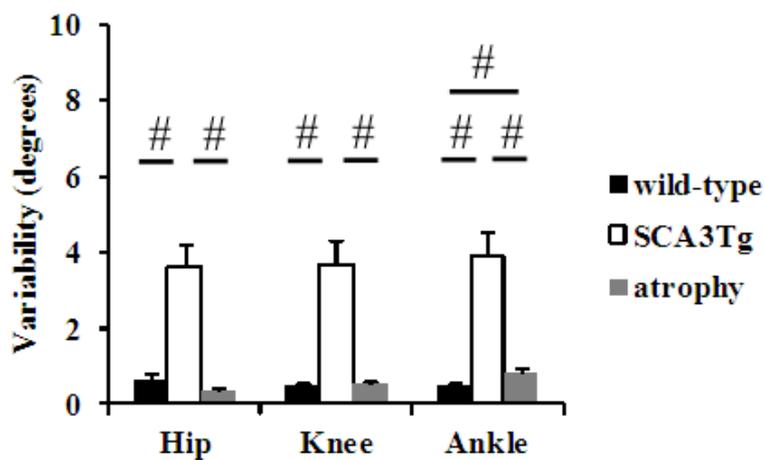


図 3-14, wild-type マウス, SCA3Tg マウスおよび muscle atrophy マウスの股関節 (Hip), 膝関節 (Knee) および足関節 (Ankle) の関節角度の変動
wild-type マウス 9 匹, SCA3Tg マウス 7 匹および muscle atrophy マウス 7 匹のデータであり, 棒グラフは平均±標準誤差を表す. Mann-Whitney *U*-tests による統計的集団間の差は # によって示す.

3.3.5 口の到達動作課題

SCA3Tg マウスは転倒しやすく、口の到達動作課題達成が困難であり実験データの計測に時間を要した。口の到達動作課題時の wild-type マウス、SCA3Tg マウスおよび muscle atrophy マウスの口の軌跡を図 3-15 に示す。図 3-15 はそれぞれ 1 匹のマウスの典型例であり、色の違いは異なる試行を示している。SCA3Tg マウスは wild-type マウスおよび muscle atrophy マウスと比べ軌跡の著しい変動を示す。口の到達動作課題において計測した試行 (wild-type マウス, $N = 9$, $n = 47$; SCA3Tg マウス, $N = 9$, $n = 53$; muscle atrophy マウス, $N = 7$, $n = 35$) において解析を行う。図 3-16 に課題の動作時間の平均を示す。SCA3Tg マウスの動作時間は wild-type マウスと比べ有意に長く、wild-type マウスと muscle atrophy マウスの間に有意差は認められなかった (wild-type = 840 ± 50 ms; SCA3Tg = 1290 ± 150 ms; muscle atrophy = 690 ± 50 ms; $F(2,22) = 9.950$, $P = 0.001$; 図 3-16)。実際の口の軌跡の長さを口の課題開始位置と終了位置の直線距離で割ることで trajectory length ratios を計算した。図 3-17 に trajectory length ratios の平均を示す。SCA3Tg マウスの trajectory length ratios は wild-type マウスと比べ有意に大きく、wild-type マウスと muscle atrophy マウスの間に有意差は認められなかった (wild-type = 1.4 ± 0.1 ; SCA3Tg = 2.9 ± 0.2 ; $U = 1$, $P < 0.001$; wild-type = 1.4 ± 0.1 ; muscle atrophy = 1.2 ± 0.04 ; $U = 10$, $P = 0.023$; 図 3-17)。口の軌跡に関して、変曲点の数および Jerk Index を解析した。軌跡の水平方向に関して、SCA3Tg の変曲点の数は wild-type マウスと比べ有意に多く、muscle atrophy マウスと wild-type マウスの間に有意差は認められなかった (x direction: wild-type = 4.1 ± 0.3 ; SCA3Tg = 5.7 ± 0.6 ; muscle atrophy = 2.9 ± 0.2 ; $F(2,22) = 10.289$, $P = 0.001$; 図 3-18)。軌跡の垂直方向に関して、SCA3Tg の変曲点の数は wild-type マウスと比べ有意に多く、muscle atrophy マウスと wild-type マウスの間に有意差は認められなかった (y direction: wild-type = 3.3 ± 0.3 ; SCA3Tg = 5.9 ± 0.7 ; muscle atrophy = 2.8 ± 0.4 ; $F(2,22) = 11.452$, $P < 0.001$; 図 3-18)。SCA3Tg マウスの Jerk Index は wild-type マウスに比べ有意大きく、muscle atrophy マウスは wild-type マウスに比べ有意に小さい (Jerk Index: wild-type = 6410 ± 2120 ; SCA3Tg = 71914 ± 31516 ; $U = 10$, $P = 0.006$; wild-type = 6410 ± 2120 ; muscle atrophy = 1537 ± 643 ; $U = 6$, $P = 0.005$; 図 3-19)。

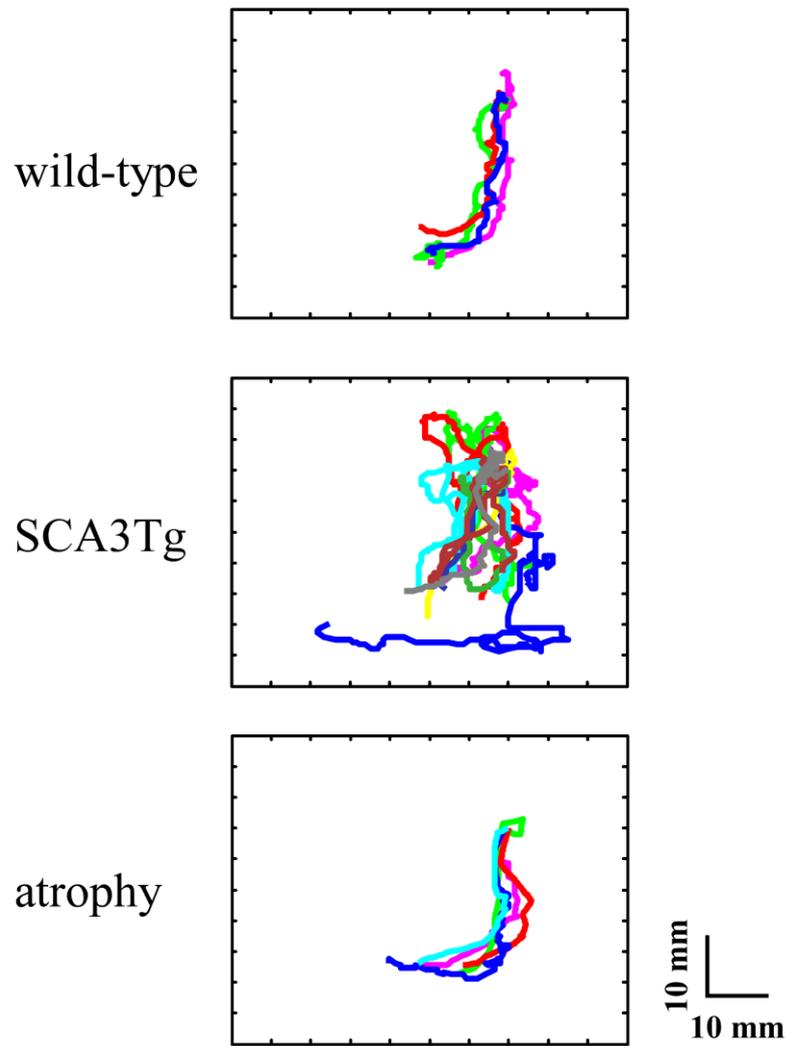


図 3-15, wild-type マウス (上部) , SCA3Tg マウス (中央) および muscle atrophy マウス (下部) の口の軌跡の典型例

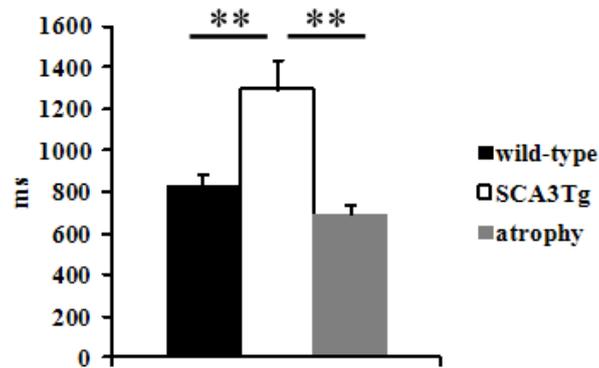


図 3-16, wild-type マウス, SCA3Tg マウスの muscle atrophy マウスの口の到達動作課題の動作時間

wild-type マウス 9 匹, SCA3Tg マウス 9 匹および muscle atrophy マウス 7 匹のデータであり, 棒グラフは平均±標準誤差を表す. $**P < 0.01$.

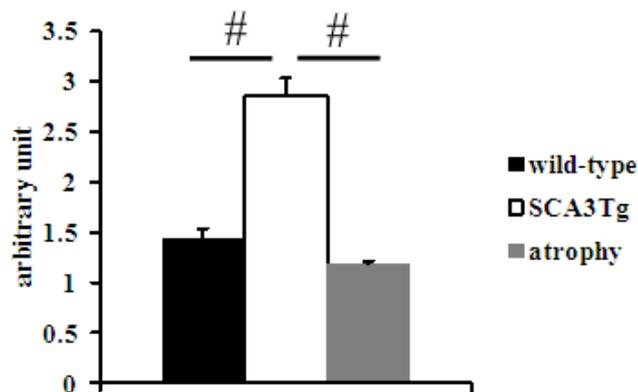


図 3-17, wild-type マウス, SCA3Tg マウスの muscle atrophy マウスの trajectory length ratios wild-type マウス 9 匹, SCA3Tg マウス 9 匹および muscle atrophy マウス 7 匹のデータであり, 棒グラフは平均±標準誤差を表す. Mann-Whitney *U*-tests による統計的集団間の差は # によって示す.

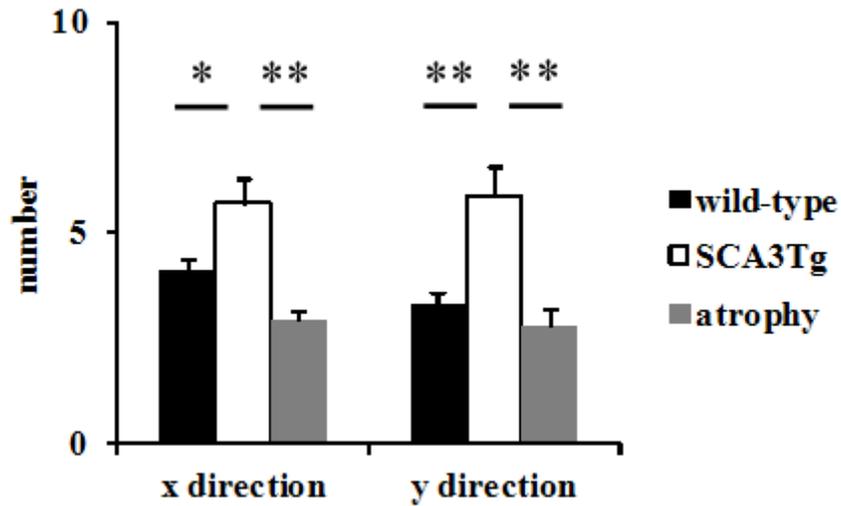


図 3-18, wild-type マウス, SCA3Tg マウスの muscle atrophy マウスの口軌跡の変曲点の数 (水平方向 ; x direction, 垂直方向 ; y direction)

wild-type マウス 9 匹, SCA3Tg マウス 9 匹および muscle atrophy マウス 7 匹のデータであり, 棒グラフは平均±標準誤差を表す. ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$.

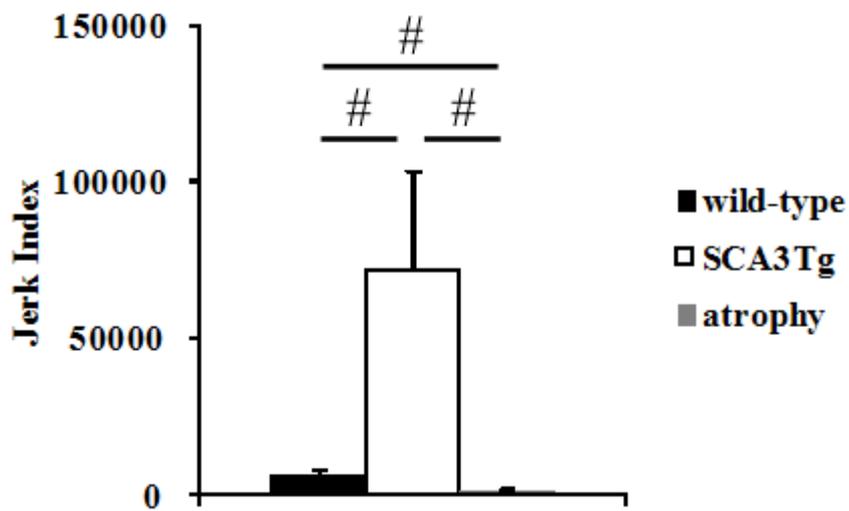


図 3-19, wild-type マウス, SCA3Tg マウスの muscle atrophy マウスの Jerk Index

wild-type マウス 9 匹, SCA3Tg マウス 9 匹および muscle atrophy マウス 7 匹のデータであり, 棒グラフは平均±標準誤差を表す. Mann-Whitney U -tests による統計的集団間の差は # によって示す.

口の到達動作課題時の wild-type マウス, SCA3Tg マウスおよび muscle atrophy マウスの大転子位置の変位を図 3-20 に, 関節角度の変位を図 3-21 に示す. 図 3-20 および図 3-21 はそれぞれ 1 匹のマウスの典型例であり, 色の違いは異なる試行を示している. 図 3-21 では股関節角度, 膝関節角度および足関節角度を軸とした 3 次元のグラフとして示した. SCA3Tg マウスの大転子位置変位および各関節角度変位の 2 乗平均平方根は wild-type マウスに比べ有意に大きく, また, muscle atrophy マウスと wild-type マウスの間に有意差は認められなかった (表 3-3, 図 3-22, 3-23). これらの結果は, 口の到達動作課題において, SCA3Tg マウスは著しい身体の揺れを呈することを示す. さらに, muscle atrophy マウスは SCA3Tg マウスのような著しい身体の揺れを示さない.

表 3-3, 大転子位置 (水平方向 ; x direction, 垂直方向 ; y direction) および股関節 (Hip), 膝関節 (Knee) および足関節 (Ankle) の関節角度の変動

	wild-type	SCA3Tg	muscle atrophy
Greater trochanter (x direction) [mm]	0.3 ± 0.0	3.0 ± 0.6 ^{#1, #2}	0.6 ± 0.0
Greater trochanter (y direction) [mm]	0.3 ± 0.0	0.9 ± 0.3 ^{#1, #2}	0.3 ± 0.0
Hip [degrees]	1.2 ± 0.2	4.3 ± 0.4 ^{#1, #2}	0.8 ± 0.1
Knee [degrees]	1.3 ± 0.2	6.5 ± 0.8 ^{#1, #2}	1.2 ± 0.2
Ankle [degrees]	1.5 ± 0.2	7.9 ± 0.6 ^{#1, #2}	1.5 ± 0.3

^{#1} Significance level: $P < 0.0167$ compared to wild-type.

^{#2} Significance level: $P < 0.0167$ compared to muscle atrophy.

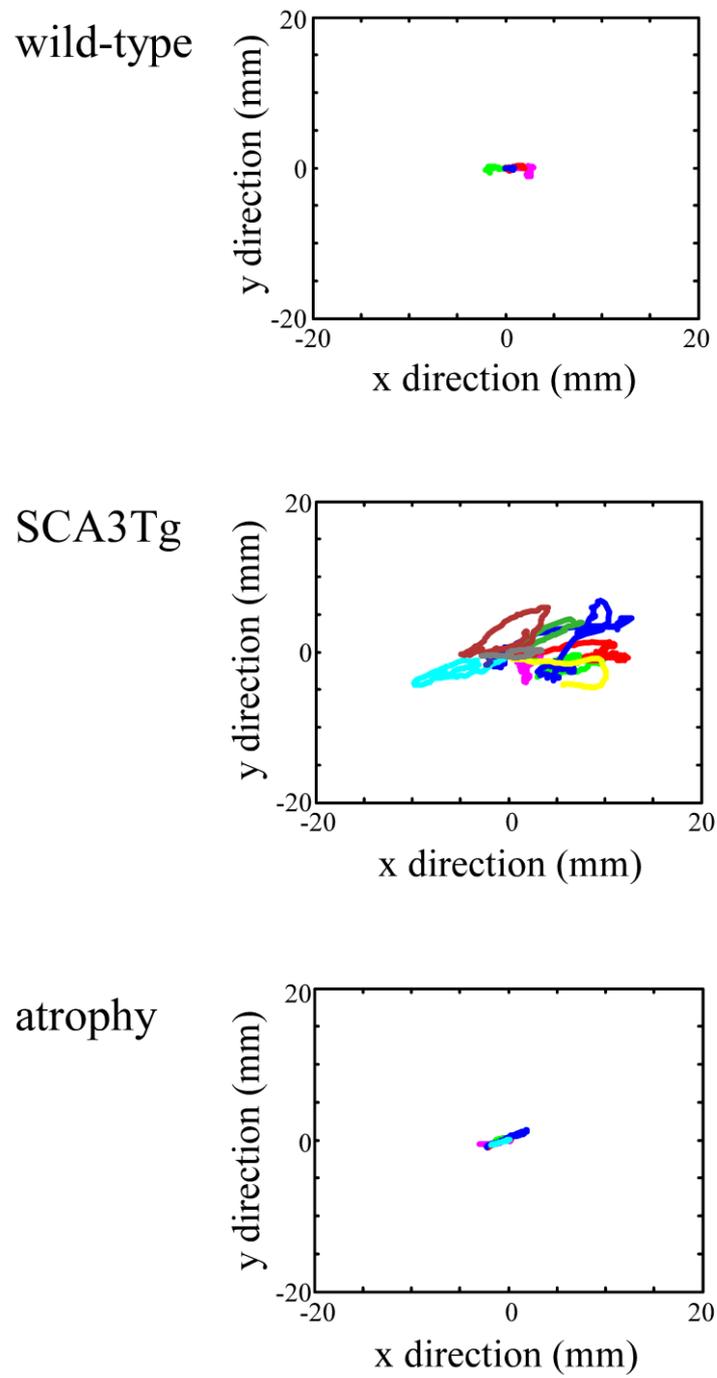
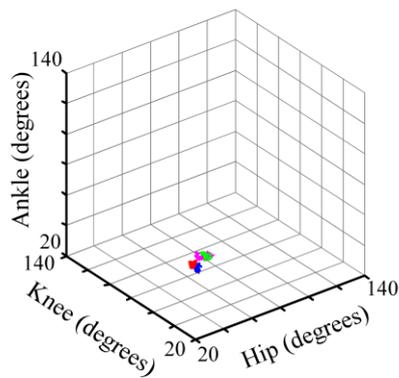
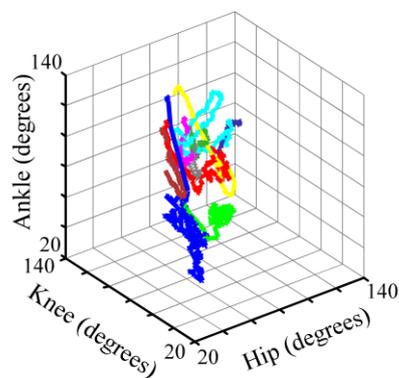


図 3-20, wild-type マウス (上部) , SCA3Tg マウス (中央) および muscle atrophy マウス (下部) の大転子位置変位の典型例

wild-type



SCA3Tg



atrophy

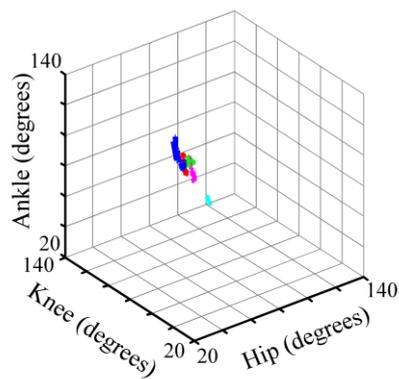


図 3-21, wild-type マウス (上部) , SCA3Tg マウス (中央) および muscle atrophy マウス (下部) の関節角度変位の典型例

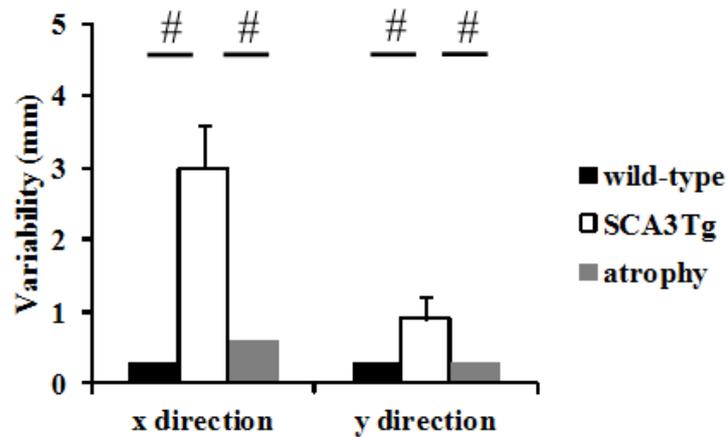


図 3-22, wild-type マウス, SCA3Tg マウスおよび muscle atrophy マウスの大転子位置 (水平方向 ; x direction, 垂直方向 ; y direction) の変動
wild-type マウス 9 匹, SCA3Tg マウス 9 匹および muscle atrophy マウス 7 匹のデータであり, 棒グラフは平均±標準誤差を表す. Mann-Whitney *U*-tests による統計的集団間の差は # によって示す.

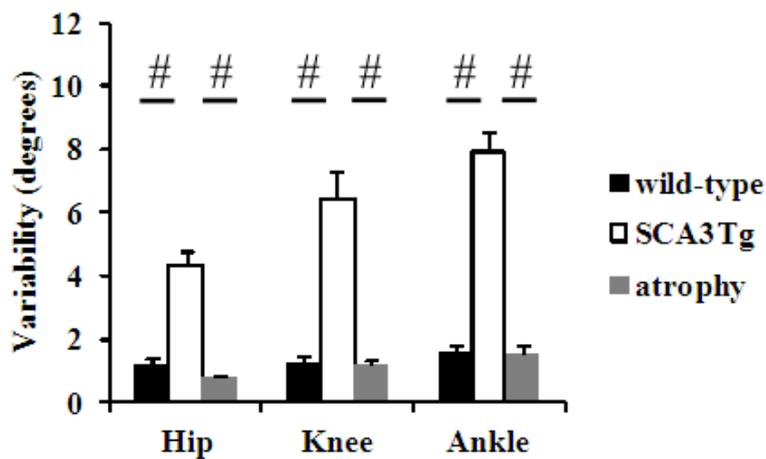


図 3-23, wild-type マウス, SCA3Tg マウスおよび muscle atrophy マウスの股関節 (Hip), 膝関節 (Knee) および足関節 (Ankle) の関節角度の変動
wild-type マウス 9 匹, SCA3Tg マウス 9 匹および muscle atrophy マウス 7 匹のデータであり, 棒グラフは平均±標準誤差を表す. Mann-Whitney *U*-tests による統計的集団間の差は # によって示す.

3.4 考察

SCA3Tg マウスは安静立位時および水飲み時の四肢での立位において wild-type マウスと比較して著しい後肢の変動を示した。これは、SCA3Tg マウスの身体の動揺を示していると考えられる。小脳疾患患者における研究において、立位時の足圧中心の変位 (Mauritz et al., 1979; Dichgans and Mauritz, 1983; Diener et al., 1984; Diener and Dichgans, 1992), 身体重心軌跡の変位 (Ilg et al., 2009) または体幹の動き (van de Warrenburg et al., 2005) を解析し、健常者と小脳疾患患者を比較している。小脳疾患患者は健常者と比べて足圧中心の変位, 身体重心軌跡の変位または体幹の動きが大きいことが報告されており、小脳疾患患者は身体の動揺を示す。解析項目との違いはあるけれども、安静立位時および水飲み時の SCA3Tg マウスの後肢の変動として表れた姿勢障害は小脳疾患患者の姿勢障害と類似しているといえる。SCA3Tg マウスの後肢の変動増加に加えて、SCA3Tg マウスは wild-type マウスと比べて後肢間距離が長いという特徴がある。足幅を広くした立位姿勢は、小脳疾患患者 (van de Warrenburg et al., 2005) および SCA3 マウスモデル (Bichelmeier et al., 2007) において観察された特徴と同じであり、本研究において定量化できた。

本研究の SCA3Tg マウスは小脳プルキンエ細胞特異的な L7 プロモーターを用いているため、小脳のみが神経変性するという特徴を持っている。それに対して、ヒトの SCA3 患者は小脳だけではなく、多くの領域 (脳幹, 視床, 橋核, 大脳基底核, 脊髄) に関しても損傷を引き起こすことが磁気共鳴画像法および病理解剖学的研究において確認されている (Burk et al., 1996; Klockgether et al., 1998; Dohlinger et al., 2008; Rub et al., 2008; Schulz et al., 2010; Seidel et al., 2012)。SCA3Tg マウスはヒトの SCA3 のモデルであると厳密には言えないかもしれない。ここで脊髄小脳変性症の 1 つタイプである脊髄小脳変性症 6 型 (SCA6) について考えてみたい。SCA6 は優勢的に小脳プルキンエ細胞の神経変性を示す疾患である (Ishikawa et al., 1999; Ishiguro et al., 2010)。本研究で用いた SCA3Tg マウスは中枢神経系の病理学的特徴としては SCA6 により類似していると考えられる。SCA3Tg マウスは、小脳が運動制御および姿勢制御に及ぼす影響を議論できるだけでなく、小脳の特異的変性を持つ SCA6 のような疾患のモデルとして貴重な知見を提供できると考える。

マウスにおける口の到達動作課題において、口が目標到達運動の先端位置となる。ヒトにおける目標到達運動は主動作が腕で手先の軌跡を評価している。小脳疾患患

者は目標到達運動において手首の軌跡が健常者と比べて著しく変動する (Bastian and Thach, 1995; Bastian et al., 1996). 口の到達動作課題の主動作である口の軌跡を評価するために, trajectory length ratios, 変曲点の数および Jerk Index を求めた. Trajectory length ratios の評価より, SCA3Tg マウスは wild-type マウスと比べて軌跡の距離が長いこと, 変曲点の数の評価より SCA3Tg マウスは wild-type マウスと比べて口の軌跡の方向の変化が多いことが明らかとなった. Jerk Index の評価より SCA3Tg マウスは wild-type マウスと比べて口の軌跡の滑らかさが著しく失われていた. ネコの四肢での立位時における前肢の目標到達運動において, 小脳傷害を行うと到達運動の滑らかさが失われることが Jerk Index を評価することで示されている (伊佐・北澤, 1994). 口の到達動作課題における主動作は頸部の背屈運動であり, 単純な動作である. それにもかかわらず, SCA3Tg マウスは wild-type マウスと比べて口の軌跡の著しい変動を示した. 口の到達動作課題時において, SCA3Tg マウスの後肢は wild-type マウスと比べて著しく変動していた. 無拘束の状態のマウスが口の到達運動を円滑に行うためには随意運動に随伴した姿勢制御が重要であり, さらにその姿勢制御には小脳が重要な役割を果たしていることが示唆される.

Muscle atrophy マウスを作製し, 運動学的解析を行い wild-type マウスおよび SCA3Tg マウスと比較した. muscle atrophy マウスの特徴として立位時における股関節の伸展および後肢間距離が長い傾向がみられる. この特徴は後肢固定手法による影響だと考えられる. しかしながら, 安静立位時, 水飲み時および口の到達動作課題において, muscle atrophy マウスの大転子位置変位および各関節角度変位の 2 乗平均平方根の値が SCA3Tg マウスと比べて小さく, wild-type マウスと比べて違いがないことが示され, muscle atrophy マウスは SCA3Tg マウスのような姿勢障害を呈さない. したがって, SCA3Tg マウスの姿勢障害は筋肉の萎縮が原因で引き起こされているのではなく, 主に小脳の機能障害によって引き起こされていることが示唆される.

第4章 口の到達動作課題時の筋電図解析

4.1 緒言

本章では、マウスの口の到達動作課題に着目していく。マウスにおける口の到達動作課題は、随意的な頸部の運動に伴って全身を安定させることが必要となる課題であると考えられる。このような随意運動に伴った姿勢制御は、ヒトにおいて、立位時に遠くの物に手を伸ばすあるいは随意的に腕を上げるような随意的な腕の運動に伴って下肢の筋の筋緊張制御により姿勢を安定させる課題を用い広く研究されている (Bouisset and Zattara, 1981; Cordo and Nashner, 1982; Friedli et al., 1984; Lee et al., 1987; Zattara and Bouisset, 1988; Aruin and Latash, 1995a; Leonard et al., 2009)。ヒトの研究において、随意運動に伴った姿勢制御は筋電図解析により評価されている。いずれの課題においても、主動作となる腕の運動に先行して姿勢調節のための脚および体幹の筋活動が生じるという特徴がある。

随意運動に伴った姿勢制御において小脳は重要な役割をはたしていることが示唆されている (Gahery and Massion, 1981; Massion, 1984, 1992)。しかしながら、小脳が立位時において随意運動に伴った姿勢制御にどのように寄与するのかについてはほとんど解明されていない。本研究で構築した口の到達動作課題はマウスにおいて随意運動に伴った姿勢制御を調査するのに適した課題であると考えられる。さらに、SCA3Tg マウスは小脳プルキンエ細胞特異的な L7 プロモーターを用いているため中枢神経系の傷害は小脳に限られている。本章は、随意運動に伴った姿勢制御に小脳がどのように寄与するのか明らかにすることを目的とし、口の到達動作課題時の wild-type マウスおよび SCA3Tg マウスの筋電図解析を行った。

4.2 実験方法

4.2.1 実験動物

正常野生型 C57BL/6J マウス (wild-type マウス) および脊髄小脳変性症 3 型トランスジェニックマウス (SCA3Tg マウス) を用いた。

4.2.2 筋電図計測および解析

筋電図は背側の頸部の筋肉 (neck), 腓腹筋 (gastrocnemius muscle; GA), 前脛骨筋 (tibialis anterior muscle; TA), 大腿二頭筋 (biceps femoris muscle; BF) および外側広筋 (vastus lateralis muscle; VL) から記録した。マウスは、イソフルランを用いて麻酔がかけられた。イソフルランは、導入 3%, 維持 2%とした。麻酔下のマウスの頸部, 後肢および腰部の毛をそり, 双極テフロンコートステンレススチールワイヤー電極 (直径 76 μm , 絶縁膜を含めた直径 140 μm , A-M systems, Inc.) を記録する筋肉に埋め込んだ。電極の先端は 1 mm ほど絶縁膜を剥がした。電極間距離は 1–2 mm とした。後肢の電極挿入位置を図 4-1 に示す。筋電図信号はアンプにより増幅され (bandwidth 150 Hz–10 kHz), サンプリング周波数 10 kHz で記録した。高速度デジタルカメラと筋電図計測機器を同期させ画像および筋電図信号を記録した。

記録した筋電図信号は数値計算ソフトウェア (Matlab, MathWorks, Inc.) を用いて解析した。筋電図信号は全波整流し, 20-Hz low-pass second-order Butterworth filter によりフィルター処理した。筋電図信号の活動開始はベースラインから 6 SD より上にそれたときと定義した。ベースラインは口の到達動作開始前の安静立位時 500 ms の筋電図信号の平均と定義した。

4.2.3 統計

wild-type マウスと SCA3Tg マウスのデータの比較は Welch's *t*-test for unpaired data を用いて統計検定を行った。本文中, *N* はマウスの数, *n* は全個体の総試行数を示す。

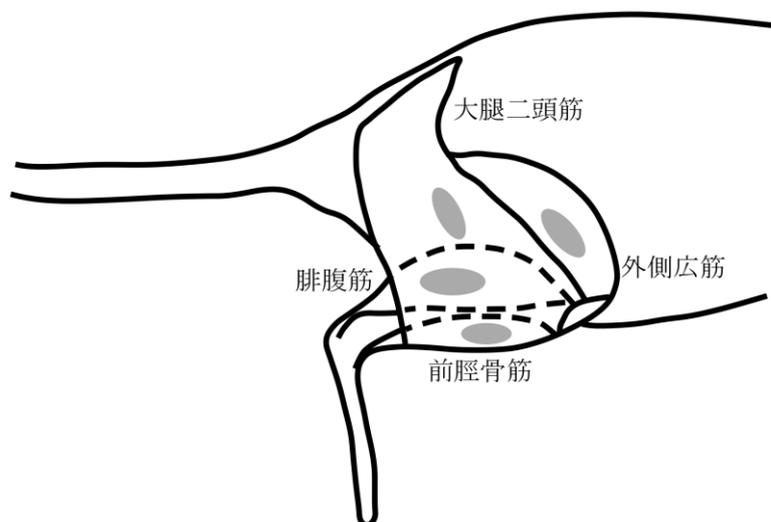


図 4-1, マウスの右後肢筋の双極電極挿入位置

灰色の楕円は腓腹筋, 前脛骨筋, 大腿二頭筋および外側広筋への電極挿入位置を示す.

4.3 結果

筋電図は背側の頸部の筋肉 (neck), 腓腹筋 (gastrocnemius muscle; GA), 前脛骨筋 (tibialis anterior muscle; TA), 大腿二頭筋 (biceps femoris muscle; BF) および外側広筋 (vastus lateralis muscle; VL) から記録した。図 4-2 は口の到達動作課題における wild-type マウスと SCA3Tg マウスそれぞれの筋電図の 1 試行の例である。図 4-2 において、筋電図波形は全波整流したものを示している。図 4-2 中の垂線はマウスの口が水筒の管に到達した瞬間を示す。本研究では、多くの APAs の研究において解析されているように課題開始の瞬間に着目した。頸部の筋肉および後肢の各筋肉の活動開始時刻を解析するために、全波整流した筋電図波形の包絡線を求めた。図 4-3 に wild-type マウスの包絡線を例として示す。図 4-3 の包絡線は図 4-2 の wild-type マウスの筋電図波形より求めたもので、さらに口と到達動作開始前後に着目している。図 4-3 の水平の破線は任意の閾値を示し、矢印は筋電図の活動開始時刻を示す。口の到達動作課題において計測した試行 (wild-type マウス, $N = 7, n = 40$; SCA3Tg マウス, $N = 8, n = 51$) において頸部の筋肉および後肢の各筋肉の活動開始時刻を求めた。さらに、頸部の筋肉の活動開始時刻に対する後肢の各筋肉の活動開始時刻を計算した。すなわち、値がマイナスならば頸部の筋の活動に先行した筋活動が生じ、プラスならば頸部の筋活動の後に筋活動が生じていることを示す。図 4-4 に頸部の筋肉の活動開始に対する後肢の各筋肉の活動開始の値の平均および標準誤差を示す (GA: wild-type = 13.2 ± 3.4 ms; SCA3Tg = 86.9 ± 15.0 ms; $F = 11.910, P = 0.002$. TA: wild-type = 18.6 ± 3.9 ms; SCA3Tg = 139.1 ± 36.7 ms; $F = 18.511, P = 0.013$. BF: wild-type = 20.7 ± 2.3 ms; SCA3Tg = 180.4 ± 53.4 ms; $F = 22.110, P = 0.020$. VL: wild-type = 4.3 ± 2.0 ms; SCA3Tg = 249.7 ± 61.9 ms; $F = 23.014, P = 0.005$). 口の到達動作課題において、wild-type マウスは後肢の各筋肉の活動開始と主動作となる頸部の筋肉の活動開始がほとんど同期した。SCA3Tg マウスの頸部の筋肉の活動開始に対する後肢の各筋肉の活動開始の値は wild-type マウスと比べて有意に遅れた。

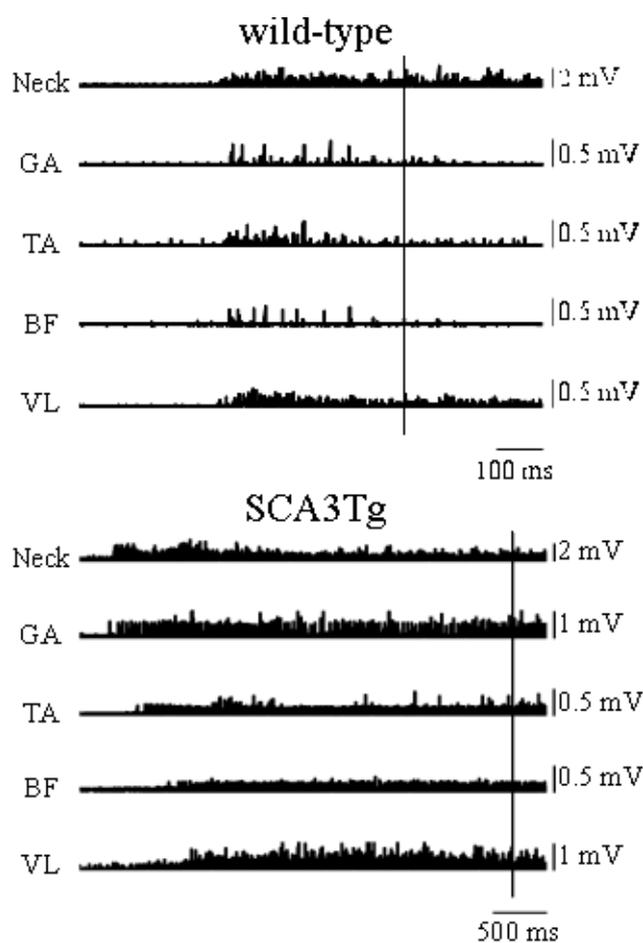


図 4-2, wild-type マウス (上部) および SCA3Tg マウス (下部) の筋電図波形の例
 垂線はマウスの口が水筒の管に到達した瞬間を示す。

Neck , 頸部 ; GA, 腓腹筋 ; TA, 前脛骨筋 ; BF, 大腿二頭筋 ; VL, 外側広筋

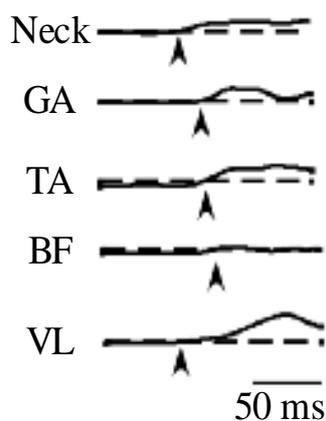


図 4-3, wild-type マウスの運動開始前後の筋電図波形の包絡線

水平の破線は任意の閾値を示し, 矢印は筋電図の活動開始時刻を示す。

Neck , 頸部 ; GA, 腓腹筋 ; TA, 前脛骨筋 ; BF, 大腿二頭筋 ; VL, 外側広筋

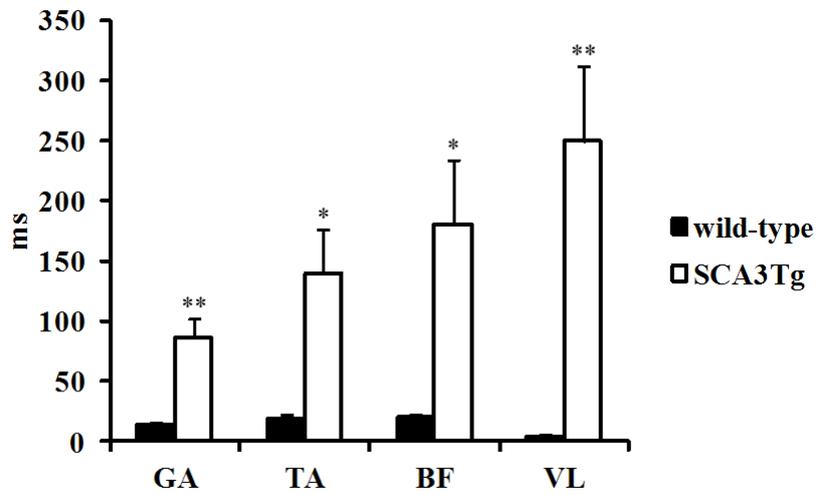


図 4-4, 頸部の筋肉の活動開始時刻を基準とした後肢の各筋肉の活動開始時間
 wild-type マウス 7 匹および SCA3Tg マウス 8 匹のデータであり, 棒グラフは平均±標準
 誤差を表す. GA, 腓腹筋; TA, 前脛骨筋; BF, 大腿二頭筋; VL, 外側広筋; ** $P < 0.01$;
 * $P < 0.05$.

4.4 考察

口の到達動作課題において、**wild-type** マウスは後肢の各筋肉の活動開始と主動作となる頸部の筋肉の活動開始がほとんど同期した。**Wild-type** マウスの結果は、ネコが四肢での立位姿勢から前肢による随意的な前方のエサへの到達課題を行った際、支持肢となる前肢の姿勢調節のための筋活動が同時に生じたという結果と類似したものである (Alstermark and Wessberg, 1985)。したがって、口の到達動作課題は、マウスにおいて随意運動に随伴した姿勢制御の研究を行うための実験パラダイムとして有益だと考えられる。**Wild-type** マウスが後肢の各筋肉の活動開始と主動作となる頸部の筋肉の活動開始が同時に生じていたのに対し、**SCA3Tg** マウスは後肢の各筋肉の活動開始が主動作となる頸部の筋肉の活動開始より遅れた。**Wild-type** マウスとの比較により、**SCA3Tg** マウスは口の到達動作課題において随意運動に随伴した姿勢制御を適切に行えていないことが示唆される。ヒトの場合、すなわち小脳疾患患者においても筋活動の遅れが観察されている (Timmann and Horak, 1998, 2001)。Timmann と Horak は前方への踏み出しの際の支持脚の姿勢調節を健常者および小脳疾患患者において調査したところ、小脳疾患患者は前脛骨筋の活動開始が遅れる傾向がみられた。随意運動に随伴した姿勢制御において、小脳からの下行性出力は筋緊張を生成するタイミングを適切に制御し、姿勢を安定させる役割を果たしていると考えられる。

最近の解剖学的研究における証拠は、小脳虫部が随意運動に随伴した姿勢制御に関与するという仮説を支持するものである。サル (Coffman et al., 2011) およびラット (Galgiani et al., 2011) において、小脳虫部は大脳皮質運動野から密な投射を受けることが示され、大脳皮質運動野から橋核を介した小脳虫部への投射は随意運動に随伴した姿勢制御の生成に重要であると仮説が立てられる。大脳皮質運動野から橋核を介した小脳虫部への投射が口の到達動作の運動指令のコピーを小脳虫部へ伝達するための経路となり得る。小脳虫部は口の到達動作の運動指令のコピーを受け取り脳幹の種々の下行路 (網様体脊髄路, 外側前庭核および赤核脊髄路) へ出力し、後肢の筋活動を調節すると考えられる。上記の小脳を介した神経回路が、随意運動に随伴した姿勢制御に重要な役割を果たしていると考えられる。

第5章 総合論議

5.1 マウスにおける姿勢課題

近年、逆進性遺伝学により運動失調を呈する種々のトランスジェニックマウスおよびノックアウト・ノックインマウスが作製されている。SCA1 あるいは SCA3 のマウスモデルは広く研究されている。マウスの運動能力評価として用いられているのは、footprint および回転棒課題である (Lalonde and Strazielle, 2007; Brooks and Dunnett, 2009)。これらの課題をマウスのバランス評価として用いた場合、footprint が乱れるあるいは回転棒に乗れないことをマウスがバランス障害を呈すると議論することがある (Lalonde and Strazielle, 2007)。さらに、SCA3 マウスモデルの姿勢の評価を行う課題として、負の走地性テスト (Cemal et al., 2002) あるいは立ち直り反射テスト (Goti et al., 2004) が用いられた。マウスは斜面板上に頭を下向きにしておくと、すぐに頭を上向きに変えて斜面を登り始めるという反射を示す。負の走地性テストは、その反射が見られるかを評価する。立ち直り反射テストは、マウスを背臥状態にし、腹臥状態に戻るまでの時間を評価するものである。マウスの運動能力評価課題の利点と欠点を考えてみたい。利点として、運動能力を簡易に評価できることが上げられる。また、実験装置も簡易なものでよく、計測を容易に行うことができる。欠点として、課題ができたかできないかを評価するのみであり、どのような動作に障害が生じているかわからず、運動制御のメカニズムを詳細に調べることはできないと考えられる。さらに、footprint および回転棒課題はマウスの歩行動作時のバランスを、負の走地性テストおよび立ち直り反射テストはマウスの反射反応を評価するものであり、マウスの立位時の姿勢を評価することはできない。

本研究において、マウスの姿勢課題として安静立位時、水飲み時および口の到達動作課題を新たに構築し、運動学的解析および筋電図解析を行った。マウスの安静立位時および水飲み時は、四肢での立位において姿勢維持を行っているときの右後肢の運動学的解析を行った。口の到達動作課題においては、頸部の背屈運動中の右後肢の運動学的解析および筋電図解析を行った。無拘束状態のマウスの立位姿勢を運動学的に評価したという点に関しては新規の実験パラダイムを構築することができた。小脳疾患マウスモデルである SCA3Tg マウスの姿勢障害を運動学的解析さらには筋電図解析により明らかにした点も新しい。本研究で構築したマウスの姿勢課題の利点と欠点を考えてみたい。利点としては、運動能力評価課題では行っていなかった運動学的解析により姿勢

の評価を行える点にある。さらに、口の到達動作課題において行った筋電図解析は姿勢制御の本態を明らかにすることができる重要な解析である。また、本研究の姿勢課題は非常に単純であり、動作と筋電図を対応させることが容易である。そのため、運動制御のメカニズムを探ることができると考えられる。さらに、SCA3Tg マウスのような脳疾患マウスモデルについて評価することで中枢神経系が運動制御にどのように関与するかを探ることが可能である。反対に、回転棒課題において回転する俵上で運動するマウスの動作は複雑で筋電図を計測したとしても動作と筋電図を対応させるのが困難であると考えられる。欠点として、マウスが無拘束状態であるため集中して課題を行わない、著しい運動失調を呈するマウスは課題をなかなか達成できない等の理由により実験データを計測するまでに長い期間を必要とする点が上げられる。

現在用いられているマウスの運動能力評価課題、本研究において構築した姿勢課題の運動学的解析および筋電図解析について、評価が簡易かどうか、計測が容易かどうかおよび運動制御のメカニズムを探ることができるかの項目をそれぞれ評価し、まとめたものを表 5-1 に示す。

表 5-1, マウスにおける姿勢課題

	評価が簡易	計測が容易	メカニズムを探る
footprint	○	○	×
回転棒	○	○	×
負の走地性	○	○	×
立ち直り反射	○	○	×
運動学的解析	△	×	○
筋電図解析	×	×	○

5.2 小脳の機能障害と静的な姿勢制御

小脳傷害が重篤な姿勢障害を呈することは小脳疾患患者の症状により、疑いようのない事実である。小脳は機能解剖学的に3つの縦方向の区画、虫部、中間部、外側半球部に分けることができる (Apps and Hawkes, 2009)。姿勢制御および歩行制御に重要な役割を果たしている領域は小脳虫部である。小脳虫部は脊髄小脳とも呼ばれ、主に脊髄からの求心性の入力を受け、小脳核である室頂核を經由して、脳幹の網様体および前庭核に出力する。立位時の足圧中心の変位、身体重心軌跡の変位または体幹の動きを計測した研究において、単なる安静立位時においても、小脳疾患患者は健常者と比べて足圧中心の変位、身体重心軌跡の変位または体幹の動きが大きいことが報告されている (Mauritz et al., 1979; Dichgans and Mauritz, 1983; Diener et al., 1984; Diener and Dichgans, 1992; van de Warrenburg et al., 2005; Ilg et al., 2009)。これらのヒトにおける症状は、評価方法は異なるが、本研究における SCA3Tg マウスの安静立位時および水飲み時において後肢の大転子位置および各関節角度が変動する症状と類似している。小脳疾患患者において、特に脊髄小脳の前葉に傷害を持つ患者は、前後方向の揺れが大きい (Diener and Dichgans, 1992)。小脳疾患患者においてバランス障害が顕著に表れている患者は、歩行の際、関節可動域の減少、歩行毎の関節角度変動の増加、膝関節と足関節の decomposition および歩行速度の減少等の典型的な歩行障害を呈することが報告されている (Morton and Bastian, 2003)。姿勢障害が小脳性歩行失調に与える影響は大きいと考えられる。

SCA3 患者は高い頻度で筋萎縮を呈する (Watanabe et al., 1996; Maruyama et al., 1997; Schmitz-Hubsch et al., 2008)。実際、本研究で用いた SCA3Tg マウスは、wild-type マウスと比べて後肢の腓腹筋、ヒラメ筋および前脛骨筋において萎縮した。筋肉の萎縮が姿勢制御に影響するかを調査するために、wild-type マウスの後肢を固定することで muscle atrophy マウスを作成し、安静立位時および水飲み時の運動学的解析を行った。結果として、安静立位時および水飲み時における大転子位置の変位および関節角度の変位の変動は wild-type マウスと比べ違いがなく、SCA3Tg マウスのような変動はみられなかった。マウスに対して筋萎縮を行った先行研究において詳細な解析はおこなっていないが、筋萎縮マウスは歩行運動を不自由なく行うことができるようである (Frimel et al., 2005; Caron et al., 2009)。したがって、後肢の筋萎縮がみられる SCA3Tg マウスの著しい身体の動揺は筋の萎縮によるものではなく、小脳の機能障害によって生じていると

考えられる。筋肉の萎縮あるいは筋力の低下は身体運動に少なからず影響を及ぼすことが考えられるが、それ以上に中枢神経系の傷害は身体運動に著しい影響を及ぼすといえる。

なぜ SCA3Tg マウスは後肢の筋肉の萎縮を呈するのであろうか。Open-field 試験 (Goti et al., 2004; Fryer et al., 2011) および歩行活動の調査 (Chou et al., 2008) において、小脳疾患マウスモデルは活動量が減少していることが示されている。本研究で用いた SCA3Tg マウスは生まれながらに小脳が変異しており、生後から wild-type マウスより動くことが困難であることが観察される。そのため、小脳変異という中枢神経系の傷害だけではなく、二次的な影響として日常活動の減退、さらに骨格筋の廃用性萎縮を引き起こしたのではないかと考えられる。

小脳疾患患者は健常者と比べ、歩行時において足幅が長いことが定量的に示されている (Stolze et al., 2002; Ilg et al., 2007)。種々の小脳変性マウスも後肢間の足幅を広くした歩行を呈することが報告されている。立位時においても足幅を広くした立位姿勢をとるという特徴が、小脳疾患患者の立位 (van de Warrenburg et al., 2005) においても、小脳疾患マウスモデルの四肢での立位 (Bichelmeier et al., 2007) においてもみられる。先行研究では、立位時の足幅を定量化していないが、本研究では、マウスの足幅を計測してみると SCA3Tg マウスは wild-type マウスと比べて有意に長いことが明らかとなった。立位姿勢において足幅を広くとることは、小脳に傷害を受けると必然的に起こる症状なのか、あるいは姿勢を安定させようとしてヒトあるいは動物が補償的にとる戦略なのかはわからない。

安静立位時および水飲み時のように姿勢を維持するためのフィードバック制御はあらゆる動作の基礎となる重要な要素である。特に歩行時において、姿勢制御は重要な役割を果たしていると考えられる。ラットの歩行シミュレーション研究においては、腰の高さを一定に保つ姿勢制御要素が組み込まれており、歩行運動に重要な役割を果たしていることが示された (Aoi et al., 2013)。シミュレーションにおける姿勢制御は小脳・脳幹における姿勢制御をモデルとしており、体性感覚情報に基づいた制御を行う。歩行時における姿勢維持と小脳機能に関して小脳変性マウスのトレッドミル歩行時の運動学的解析を行った研究があり、小脳変性マウスの大転子位置が 1 歩行周期を通して wild-type マウスより低いことが示されている (Takeuchi et al., 2012)。小脳変性マウスは小脳機能障害により wild-type マウスと同じ高さまで腰を上げることができず、その高

さを維持することも困難であることが示唆され、歩行時における姿勢制御が障害されている可能性が高い。ここで歩行に関する神経回路を考えたい。図 5-1 に、歩行における脊髓小脳ループを示す (Orlovsky et al., 1999)。小脳虫部は、主に脊髓からの求心性の入力を受け、小脳核である室頂核を経由して、脳幹の網様体および前庭核に出力する。図 5-1 においては、小脳中間部も含めてある。小脳中間部は歩行制御および肢運動に関する領域であり、脊髓からの求心性の入力を受け、小脳核である中位核を経由して、脳幹の赤核に出力する。脳幹の各領域は脊髓の運動ニューロンおよび介在ニューロンに出力し、歩行運動を生成する。脊髓から小脳への投射として腹側脊髓小脳路および背側脊髓小脳路があり、体性感覚受容器からの歩行中の感覚情報を小脳へと送る。背側脊髓小脳路は、歩行時において肢の運動学的パラメータ情報を符号化していることがネコを用いた実験で示唆されている (Bosco and Poppele, 1993, 1997; Bosco et al., 2006)。以上のように、歩行時、小脳は体性感覚情報に基づき姿勢を維持するための制御をしていると考えられる。同様に、本研究の安静立位時および水飲み時における静的な姿勢制御においても、小脳を組み込んだ図 5-1 の脊髓小脳ループが重要な役割を果たしていると考えられる。

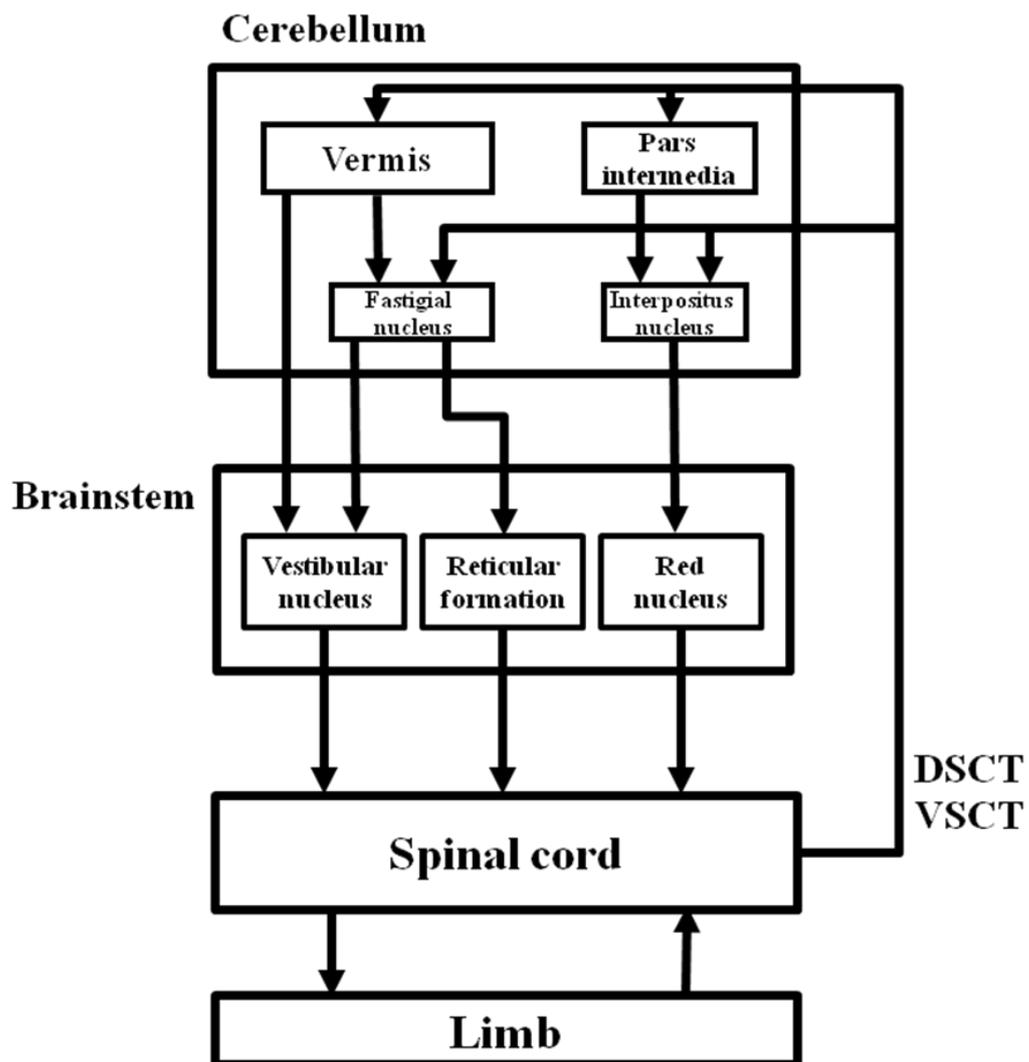


図 5-1, 歩行における脊髓小脳ループ

5.3 小脳の機能障害と随意運動に伴った姿勢制御

本研究では、マウスにおける口の到達動作課題を確立し、運動学的解析および筋電図解析を行った。課題としてはマウスが四肢における立位姿勢から前方にある水筒の飲み口に口を運ぶというものであり、マウスは随意的な頸部の背屈運動に伴って全身の姿勢を安定させる必要があり予測的な姿勢制御 (APAs) であると考えられる。実験では、マウスの頸部の筋、腓腹筋、前脛骨筋、大腿二頭筋、外側広筋の計測および解析を行った。wild-type マウスは、頸部の筋の活動開始に対して後肢のそれぞれの筋が同時に活動した。この結果は、ネコにおける研究と類似した結果である (Alstermark and Wessberg, 1985)。マウスは、ヒトの研究のようにはっきりと先行した姿勢調節のための筋活動を示さなかった。ヒトの2足による立位とマウスの4肢による立位における安定性の違いが可能性として考えられる。口の到達動作課題において、SCA3Tg マウスはwild-type マウスと比較して課題遂行中の大転子位置および各関節角度変位の変動が大きく、身体が顕著に動揺した。筋電図解析においては、SCA3Tg マウスは、頸部の筋の活動開始に対して後肢のそれぞれの筋活動開始が遅れた。muscle atrophy マウスは、口の到達動作課題の運動学的解析のみ行い筋電図解析は行っていないが、課題遂行中の大転子位置および各関節角度変位の変動に関して wild-type マウスと違いがなかった。したがって、安静立位時および水飲み時と同様に SCA3Tg マウスの口の到達動作課題における姿勢障害は後肢筋の萎縮によるものではなく、小脳の機能障害によって生じていると考えられる。

APAs に関与する中枢神経系の領域は古くから議論され続けている (Massion, 1992)。近年、ネコを用いて四肢での立位姿勢から前肢による随意的な前方のエサへの到達課題または随意的に前方のレバーを押す課題時の電気生理学的研究により中枢神経系の関与が明らかにされてきている。APAs に関与する領域として、橋延髄網様体があり、橋延髄網様体ニューロンが姿勢調節のための肢の筋活動と相関をもって活動していることが明らかになった (Schepens and Drew, 2004, 2006; Schepens et al., 2008)。APAs への関与が大きいと考えられていたのが、大脳皮質運動野である (Birjukova et al., 1989; Viallet et al., 1992)。大脳皮質運動野に関しても、ネコを用いて随意的に前方のレバーを押す課題時の電気生理学的研究により大脳皮質運動野ニューロンが姿勢調節のための肢の筋活動と相関をもって活動していることが示された (Yakovenko and Drew, 2009; Yakovenko et al., 2011)。橋延髄網様体は皮質領域および皮質下領域からの信号を受け、

それらの信号を統合して出力する領域であると考えられる。大脳皮質運動野は橋延髄網様体へ投射する上位中枢である。Yakovenko と Drew は大脳皮質運動野および橋延髄網様体を組み込んだ APAs に関する神経回路を考えている (Yakovenko and Drew, 2009)。その神経回路によると、大脳皮質運動野が主動作となる運動の指令さらに姿勢調節に関する指令を出力し、それらの指令は橋延髄網様体へも送られ橋延髄網様体はそれらの情報を統合し姿勢調節に関する指令を出力するというものである。一方、小脳も APAs へ関与する中枢神経系の候補として議論されている領域である (Gahery and Massion, 1981; Massion, 1984, 1992; Diedrichsen et al., 2005)。しかしながら、実験的証拠がほとんど得られていなかった。本研究で用いた SCA3Tg マウスは、L7 プロモーターにより小脳が特異的に変性したトランスジェニックマウスである。口の到達動作課題において、SCA3Tg マウスは大転子位置および関節角度変位が wild-type マウスと比べ著しく変動した。筋電図解析において、wild-type マウスが頸部の筋の活動開始に対して後肢のそれぞれの筋が同時に活動したが、SCA3Tg マウスは頸部の筋の活動開始に対して後肢のそれぞれの筋の活動開始が遅れた。したがって、APAs が必要だと考えられる口の到達動作課題において、小脳からの下行性出力は筋緊張を生成するタイミングを適切に制御し、姿勢を安定させる役割を果たしていると考えられる。

小脳を組み込んだ APAs に関する神経回路を構成する上で、大脳皮質運動関連領域から小脳への投射が重要な要素となることは十分に考えられる。解剖学的に、小脳外側半球部は大脳皮質から橋核を介した入力を受け、小脳核である歯状核、視床を介し大脳皮質に出力するという大脳皮質小脳ループを構成する。近年までは、大脳皮質運動野と密な相互接続を持つのは小脳外側半球部であると考えられてきた (Ramnani, 2006)。一方、小脳虫部は姿勢制御に重要な役割を果たす領域であるが、主な入力は脊髄からの上行性の投射であるとされてきた。しかしながら、最近の解剖学的研究において、小脳虫部は大脳皮質運動野からの投射を受けるという明確な知見が、サル (Coffman et al., 2011) およびラット (Galgiani et al., 2011) において示された。サルにおいては、小脳虫部 VB-VIII B 葉が 1 次運動野、補足運動野および帯状回運動野から密な投射を受けている。ラットにおいては、虫部 V 葉が運動前野領域に相当すると考えられる M2 野から投射を受けている。また、ラットの大脳皮質運動野に相当する M1 および M2 からの投射は議論していないが、ラットの小脳虫部 VII 葉が眼窩前頭皮質から投射を受けている (Suzuki et al., 2012)。このように、ヒトの前頭葉に相当する皮質領域からの投射は小脳外

側半球部だけでなく脊髄小脳として考えられていた小脳虫部に対しても投射していることが解剖学的に明らかになり、今後さらに研究が展開していくだろうと考えられる。

計算論的神経科学の分野において、巧みな運動を行うための機構として内部モデルが概念的に定義されている。内部モデルが存在する中枢神経系の部位として、小脳が最も有力な候補として考えられている (Miall et al., 1993; Wolpert and Miall, 1996; Wolpert et al., 1998; Ito, 2005, 2006)。また、概念的に定義されたものに遠心性コピーがあり、これは運動指令のコピーである。内部モデルは遠心性コピーを入力として受け運動を円滑に行うための計算を行うことができる。実験的課題の例として、球形の物体を手の親指および人差し指の先で握り、腕を上方へ動かすという課題がある (Kawato, 1999)。課題を遂行するためには、腕を上方へ動かすという動作を行いながら物体が滑らないよう指の力を制御しなければならない。ここで、指で物体を握る力を *grip force*、腕を動かす力を *load force* をすると、*grip force* は *load force* に先行して変位する。腕の運動指令により腕が制御され、同時に腕の運動指令の遠心性コピーを受けた内部モデルが指の運動制御を適切に制御するために重要な役割を果たすと考えられる。物体を持ちながら腕を動かす課題中の機能的核磁気共鳴画像法により、指および腕の制御に関連した活動が小脳前葉において確認された (Kawato et al., 2003)。腕の随意的な運動に伴って指の制御がフィードフォワード的に行われるというのは、立位時の随意運動に伴った予測的な姿勢制御と類似しているといえる。

以上のことを踏まえて、口の到達動作課題において考えられる神経回路は図 5-2 のようになる。脳幹から脊髄の運動ニューロンへの下行路として、脳幹網様体から脊髄への網様体脊髄路、外側前庭核から脊髄への外側前庭脊髄路および赤核から脊髄への赤核脊髄路が存在する。網様体脊髄路は体幹筋および近位筋、外側前庭脊髄路は抗重力筋および伸筋、赤核脊髄路は屈筋および遠位筋の筋緊張の調節に重要な役割を果たしている。小脳虫部は小脳核の室頂核を経て網様体脊髄路および外側前庭脊髄路に投射し、小脳中間部は小脳核の中位核を経て赤核脊髄路へ投射している。さらに、大脳皮質運動野から橋核を介して小脳虫部への投射が考えられる。大脳皮質運動野は皮質脊髄路により脊髄の運動ニューロンへ投射する下行路がある。口の到達動作課題においては、皮質脊髄路が随意的な頸部の筋の運動指令を脊髄に送り、小脳虫部へは頸部の筋の運動指令の遠心性コピーが送られるのではないかと考えられる。脳幹から種々の下行路は肢による姿勢調節のための信号を出力すると考えられる。小脳は頸部の筋の運動指令の遠心性

コピーに基づいて、フィードフォワード的に筋緊張を生成するタイミングを計算し脳幹の領域に送ると考えられる。橋延髄網様体へは大腦皮質からの投射があり、こちらの投射も機能的に重要であると考えられるが、SCA3Tg マウスにおける口の到達動作課題が著しい障害を受けることから、小脳の APAs へ関与が大きいことが示唆される。APAs において、大腦皮質から橋核を介し小脳虫部への経路さらに小脳虫部からの出力が重要な役割を果たしているのではないかと推測される。

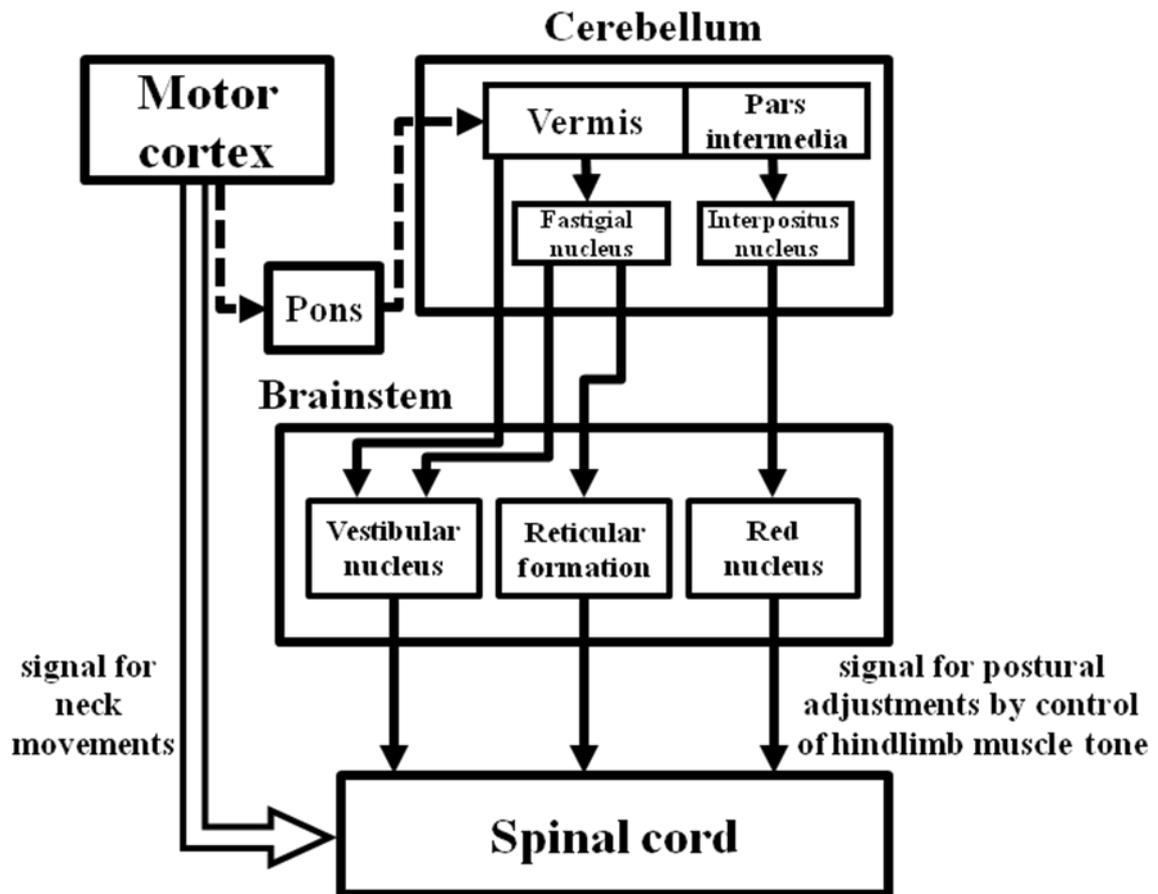


図 5-2, 口の到達動作課題における神経回路

5.4 小脳性姿勢障害の改善に向けて

小脳傷害は重篤な姿勢障害および歩行障害を呈し日常生活に著しい支障をきたすが、症状を改善するような治療法は未だ確立されていない (Morton and Bastian, 2004; Riess et al., 2008). 近年、小脳疾患患者の運動失調が理学療法により改善することが報告されている (Cernak et al., 2008; Vaz et al., 2008; Ilg et al., 2009, 2010). しかしながら、小脳疾患患者が不自由なく日常生活を送れるまでに改善するのかわからない. さらに、理学療法による運動失調の改善が中枢神経にどのような影響を及ぼしたために起こったのか疑問は残る (Morton and Bastian, 2009). このような疑問に答えるためには動物を用いた生理学的、電気生理学的あるいは薬理学的研究が有効であり、効果的な治療方法の試験的研究には動物実験が欠かすことができないと考えられる. 治療法としては、レンチウイルスベクターを用いた遺伝子治療法があり、臨床応用に向けて研究が進められている (Torashima et al., 2008). 本研究のようなマウスの運動学的解析および筋電図解析を用いて、遺伝子治療法等の種々の治療方法による影響を調査すれば、臨床応用上での重要な知見が得られるものと思われる.

最後に、遺伝子治療法とは別の治療方法の可能性を考えてみたい. 本研究において特に口の到達動作課題において明確に表れているが、小脳は筋緊張を生成するタイミングを適切に制御していることが示唆される. 口の到達動作課題において、随意的な頸部の運動に合わせて肢の筋活動を制御することができれば、姿勢を安定させることが可能ではないかと考えられる. この治療方法を実現するための手掛かりになるのが、ブレインマシンインターフェース (Brain Machine Interface; BMI) だと考えられる. 近年、BMI システムを構築する研究が盛んに行われている. サルを用いた研究において、大脳皮質運動野のニューロン活動を読み取り、ロボットアームを操作できることが示された (Velliste et al., 2008). また、前腕の神経を麻痺させ前腕が動かすことができないサルにおいて、大脳皮質運動野のニューロン活動を読み取り機能的電気刺激 (Functional Electrical Stimulation; FES) により筋肉を刺激し筋緊張を制御し、腕を動かしたい方向に動かすこと (Moritz et al., 2008)、物を把持すること (Ethier et al., 2012) が可能となっている. さらに四肢まひ患者が、パソコンのカーソルを動かす (Hochberg et al., 2006)、ロボットアームを操作する (Hochberg et al., 2012) など、大脳皮質運動野のニューロン活動を読み取り制御するシステムが構築されている. 大脳皮質運動野のニューロンを用いた BMI システムは、大脳皮質運動野のニューロン活動が運動方向および力を符号化し

ているという明確な研究結果に基づいたものである。小脳を介した BMI システムは、現在のところ構築されていない。小脳のニューロンがどのような情報を符号化しているかの明確な答えはないが、小脳には歩行様の筋活動を引き起こす小脳歩行誘発野 (Mori et al., 1999) が存在し、その領域は姿勢に関する筋緊張も生じる (Asanome et al., 1998)。小脳歩行誘発野は、小脳核である室頂核が関与している。水筒に口を運ぶという口の到達動作課題の際、マウスは頸部を背屈することで課題を遂行するが、頸部の動きと同時に後肢の筋活動を調節できれば体が動揺しないと考えられる。マウスの頸部の筋の活動あるいは大脳皮質運動野ニューロンの頸部領域の活動を常にモニターしておき、頸部の筋の活動あるいは大脳皮質運動野ニューロンの頸部領域の活動がある閾値を超えて活動した場合、それをトリガーとして小脳深部核を電気刺激し姿勢調節に関わる後肢の筋活動を引き起こすような BMI システムを構築することが可能ではないだろうか。小脳深部電気刺激による治療方法が小脳傷害の症状にどのような影響を及ぼすのか、本研究で構築した口の到達動作課題および SCA3Tg マウスを用いて調査するのが今後の展望である。

謝辞

本博士論文は、柳原大准教授の御指導のもと執筆したものです。柳原大准教授には、本研究の実験計画、実験方法、論文執筆に至るまで丁寧な御指導および御助言を頂きました。この場を借り、深く感謝致します。博士課程の短い期間において、貴重な研究に従事することができ、良い経験となりました。

本研究で用いた SCA3Tg マウスは、群馬大学大学院医学系研究科の平井宏和教授より分与して頂きました。本博士論文の実験結果は分与して頂いた貴重なマウスにより成り立っています。この場を借り、深く御礼申し上げます。

柳原研究室の皆様には、ゼミにおいて多くの御意見を頂きました。ゼミ以外でも、実験方法、解析方法および研究内容に至るまで有意義な議論をさせて頂いたことに心より感謝致します。皆様の研究にも刺激を受け、私自身の研究を進め、本博士論文をまとめられました。

学会において、本研究の発表に対し貴重な御意見および御質問をして頂いた皆様に、この場を借りて深く御礼申し上げます。違う視点からの御意見および御質問は研究をまとめていく上で参考になりました。

本研究を行うにあたり、多くの方々に御協力頂きました。この場を借りて、御礼申し上げます。

審査員の先生方には、博士論文審査会において貴重なご意見・ご指摘を頂きました。深く御礼申し上げます。

参考文献

- Akay T, Acharya HJ, Fouad K, Pearson KG (2006) Behavioral and electromyographic characterization of mice lacking EphA4 receptors. *J Neurophysiol* 96: 642–651.
- Alstermark B, Wessberg J (1985) Timing of postural adjustment in relation to forelimb target-reaching in cats. *Acta Physiol Scand* 125: 337–340.
- Aoi S, Kondo T, Hayashi N, Yanagihara D, Aoki S, Yamaura H, Ogihara N, Funato T, Tomita N, Senda K, Tsuchiya K (2013) Contributions of phase resetting and interlimb coordination to the adaptive control of hindlimb obstacle avoidance during locomotion in rats: a simulation study. *Biol Cybern* 107: 201–216.
- Apps R, Hawkes R (2009) Cerebellar cortical organization: a one-map hypothesis. *Nat Rev Neurosci* 10: 670–681.
- Aruin AS, Latash ML (1995a) Directional specificity of postural muscles in feed-forward postural reactions during fast voluntary arm movements. *Exp Brain Res* 103: 323–332.
- Aruin AS, Latash ML (1995b) The role of motor action in anticipatory postural adjustments studied with self-induced and externally triggered perturbations. *Exp Brain Res* 106: 291–300
- Asanome M, Matsuyama K, Mori S (1998) Augmentation of postural muscle tone induced by the stimulation of the descending fibers in the midline area of the cerebellar white matter in the acute decerebrate cat. *Neurosci Res* 30: 257–269.
- Bakker M, Allum JH, Visser JE, Grüneberg C, van de Warrenburg BP, Kremer BH, Bloem BR (2006) Postural responses to multidirectional stance perturbations in cerebellar ataxia. *Exp Neurol* 202: 21–35.
- Bastian AJ, Thach WT (1995) Cerebellar outflow lesions: a comparison of movement deficits

resulting from lesions at the levels of the cerebellum and thalamus. *Ann Neurol* 38: 881–892.

Bastian AJ, Martin TA, Keating JG, Thach WT (1996) Cerebellar ataxia: abnormal control of interaction torques across multiple joints. *J Neurophysiol* 76: 492–509.

Beloozerova IN, Zelenin PV, Popova LB, Orlovsky GN, Grillner S, Deliagina TG (2003a) Postural control in the rabbit maintaining balance on the tilting platform. *J Neurophysiol* 90: 3783–3793.

Beloozerova IN, Sirota MG, Swadlow HA, Orlovsky GN, Popova LB, Deliagina TG (2003b) Activity of different classes of neurons of the motor cortex during postural corrections. *J Neurosci* 23: 7844–7853.

Beloozerova IN, Sirota MG, Orlovsky GN, Deliagina TG (2005) Activity of pyramidal tract neurons in the cat during postural corrections. *J Neurophysiol* 93: 1831–1844.

Bichelmeier U, Schmidt T, Hübener J, Boy J, Rüttiger L, Häbig K, Poths S, Bonin M, Knipper M, Schmidt WJ, Wilbertz J, Wolburg H, Laccone F, Riess O (2007) Nuclear localization of ataxin-3 is required for the manifestation of symptoms in SCA3: in vivo evidence. *J Neurosci* 27: 7418–7428.

Birjukova EV, Dufossé M, Frolov AA, Ioffé ME, Massion J (1989) Role of the sensorimotor cortex in postural adjustments accompanying a conditioned paw lift in the standing cat. *Exp Brain Res* 78: 588–596.

Bolton DA, Tse AD, Ballermann M, Misiaszek JE, Fouad K (2006) Task specific adaptations in rat locomotion: runway versus horizontal ladder. *Behav Brain Res* 168: 272–279.

Booth FW, Kelso JR (1973) Production of rat muscle atrophy by cast fixation. *J Appl Physiol* 34: 404–406.

Booth FW (1977) Time course of muscular atrophy during immobilization of hindlimbs in rats. *J Appl Physiol* 43: 656–661.

Bosco G, Poppele RE (1993) Broad directional tuning in spinal projections to the cerebellum. *J Neurophysiol* 70: 863–866.

Bosco G, Poppele RE (1997) Representation of multiple kinematic parameters of the cat hindlimb in spinocerebellar activity. *J Neurophysiol* 78: 1421–1432.

Bosco G, Eian J, Poppele RE (2006) Phase-specific sensory representations in spinocerebellar activity during stepping: evidence for a hybrid kinematic/kinetic framework. *Exp Brain Res* 175: 83–96.

Bouisset S, Zattara M (1981) A sequence of postural movements precedes voluntary movement. *Neurosci Lett* 22: 263–270.

Bouisset S, Zattara M (1987) Biomechanical study of the programming of anticipatory postural adjustments associated with voluntary movement. *J Biomech* 20: 735–742.

Boy J, Schmidt T, Wolburg H, Mack A, Nuber S, Böttcher M, Schmitt I, Holzmann C, Zimmermann F, Servadio A, Riess O (2009) Reversibility of symptoms in a conditional mouse model of spinocerebellar ataxia type 3. *Hum Mol Genet* 18: 4282–4295.

Brooks S, Dunnett S (2009) Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nat Rev Neurosci* 10: 519–529

Bürk K, Abele M, Fetter M, Dichgans J, Skalej M, Laccone F, Didierjean O, Brice A, Klockgether T (1996) Autosomal dominant cerebellar ataxia type I clinical features and MRI in families with SCA1, SCA2 and SCA3. *Brain* 119: 1497–1505.

Canu M, Stevens L, Ricart-Firinga C, Picquet F, Falempin M (2001) Effect of the beta(2)-agonist clenbuterol on the locomotor activity of rat submitted to a 14-day period of hypodynamia-hypokinesia. *Behav Brain Res* 122: 103–112.

Caron AZ, Drouin G, Desrosiers J, Trens F, Grenier G (2009) A novel hindlimb immobilization procedure for studying skeletal muscle atrophy and recovery in mouse. *J Appl Physiol* 106: 2049–2059.

Cemal CK, Carroll CJ, Lawrence L, Lowrie MB, Ruddle P, Al-Mahdawi S, King RH, Pook MA, Huxley C, Chamberlain S (2002) YAC transgenic mice carrying pathological alleles of the MJD1 locus exhibit a mild and slowly progressive cerebellar deficit. *Hum Mol Genet* 11: 1075–1094.

Cernak K, Stevens V, Price R, Shumway-Cook A (2008) Locomotor training using body-weight support on a treadmill in conjunction with ongoing physical therapy in a child with severe cerebellar ataxia. *Phys Ther* 88: 88–97.

Chen X, Tang TS, Tu H, Nelson O, Pook M, Hammer R, Nukina N, Bezprozvanny I (2008) Deranged calcium signaling and neurodegeneration in pinocerebellar ataxia type 3. *J Neurosci* 28: 12713–12724.

Chou AH, Yeh TH, Ouyang P, Chen YL, Chen SY, Wang HL (2008) Polyglutamine-expanded ataxin-3 causes cerebellar dysfunction of SCA3 transgenic mice by inducing transcriptional dysregulation. *Neurobiol Dis* 31: 89–101.

Coffman KA, Dum RP, Strick PL (2011) Cerebellar vermis is a target of projections from the motor areas in the cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 16068–16073.

Colomer Gould VF (2012) Mouse models of spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph

disease). *Neurotherapeutics* 9: 285–296.

Cordo PJ, Nashner LM (1982) Properties of postural adjustments associated with rapid arm movements. *J Neurophysiol* 47: 287–302.

Deliagina TG, Sirota MG, Zelenin PV, Orlovsky GN, Beloozerova IN (2006a) Interlimb postural coordination in the standing cat. *J Physiol* 573: 211–224.

Deliagina TG, Orlovsky GN, Zelenin PV, Beloozerova IN (2006b) Neural bases of postural control. *Physiology (Bethesda)* 21: 216–225.

Deliagina TG, Zelenin PV, Orlovsky GN (2012) Physiological and circuit mechanisms of postural control. *Curr Opin Neurobiol* 22: 646–652.

Dichgans J, Mauritz KH (1983) Patterns and mechanisms of postural instability in patients with cerebellar lesions. *Adv Neurol* 39: 633–643.

Diedrichsen J, Verstynen T, Lehman SL, Ivry RB (2005) Cerebellar involvement in anticipating the consequences of self-produced actions during bimanual movements. *J Neurophysiol* 93: 801–812.

Diener HC, Dichgans J, Bacher M, Gompf B (1984) Quantification of postural sway in normals and patients with cerebellar diseases. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 57: 134–142.

Diener HC, Dichgans J (1992) Pathophysiology of cerebellar ataxia. *Mov Disord* 7: 95–109.

Di Fabio RP (1983) Postural supporting mechanisms during spontaneous single limb movement in the cat. *Neurosci Lett* 40: 133–138.

Döhlinger S, Hauser TK, Borkert J, Luft AR, Schulz JB (2008) Magnetic resonance imaging in

spinocerebellar ataxias. *Cerebellum* 7: 204–214.

Dufossé M, Macpherson J, Massion J (1982) Biomechanical and electromyographical comparison of two postural supporting mechanisms in the cat. *Exp Brain Res* 45: 38–44.

Ethier C, Oby ER, Bauman MJ, Miller LE (2012) Restoration of grasp following paralysis through brain-controlled stimulation of muscles. *Nature* 485: 368–371.

Friedli WG, Hallett M, Simon SR (1984) Postural adjustments associated with rapid voluntary arm movements 1. Electromyographic data. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 47: 611–622.

Friedli WG, Cohen L, Hallett M, Stanhope S, Simon SR (1988) Postural adjustments associated with rapid voluntary arm movements. II. Biomechanical analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 51: 232–234.

Frimel TN, Kapadia F, Gaidosh GS, Li Y, Walter GA, Vandenborne K (2005) A model of muscle atrophy using cast immobilization in mice. *Muscle Nerve* 32: 672–674.

Fryer JD, Yu P, Kang H, Mandel-Brehm C, Carter AN, Crespo-Barreto J, Gao Y, Flora A, Shaw C, Orr HT, Zoghbi HY (2011) Exercise and genetic rescue of SCA1 via the transcriptional repressor Capicua. *Science* 334: 690–693.

Fung J, Macpherson JM (1995) Determinants of postural orientation in quadrupedal stance. *J Neurosci* 15: 1121–1131.

Gahéry Y, Massion J (1981) Co-ordination between posture and movement. *Trends Neurosci* 4: 199–202.

Goti D, Katzen SM, Mez J, Kurtis N, Kiluk J, Ben-Haiem L, Jenkins NA, Copeland NG, Kakizuka A, Sharp AH, Ross CA, Mouton PR, Colomer V (2004) A mutant ataxin-3

putative-cleavage fragment in brains of Machado-Joseph disease patients and transgenic mice is cytotoxic above a critical concentration. *J Neurosci* 24: 10266–10279.

Galgiani JE, Billig I, Strick PL (2011) Regions of the cerebellar vermis are the target of input from multiple cortical areas. *Soc Neurosci Abstr*, 101.08.

Hayashi M, Kobayashi K, Furuta H (2003) Immunohistochemical study of neuronal intranuclear and cytoplasmic inclusions in Machado-Joseph disease. *Psychiatry Clin Neurosci* 57: 205–213

Hayashi R, Tako K, Tokuda T, Yanagisawa N (1997) Three-Hertz postural oscillation in patients with brain stem or cerebellar lesions. *Electromyogr Clin Neurophysiol* 37: 431–434.

Hirai H, Miyazaki T, Kakegawa W, Matsuda S, Mishina M, Watanabe M, Yuzaki M (2005) Rescue of abnormal phenotypes of the delta2 glutamate receptor-null mice by mutant delta2 transgenes. *EMBO Rep* 6: 90–95.

Hochberg LR, Serruya MD, Friebs GM, Mukand JA, Saleh M, Caplan AH, Branner A, Chen D, Penn RD, Donoghue JP (2006) Neuronal ensemble control of prosthetic devices by a human with tetraplegia. *Nature* 442: 164–171.

Hochberg LR, Bacher D, Jarosiewicz B, Masse NY, Simeral JD, Vogel J, Haddadin S, Liu J, Cash SS, van der Smagt P, Donoghue JP (2012) Reach and grasp by people with tetraplegia using a neurally controlled robotic arm. *Nature* 485: 372–375.

Horak FB, Diener HC (1994) Cerebellar control of postural scaling and central set in stance. *J Neurophysiol* 72: 479–493.

Ikeda H, Yamaguchi M, Sugai S, Aze Y, Narumiya S, Kakizuka A (1996) Expanded polyglutamine in the Machado-Joseph disease protein induces cell death in vitro and in vivo. *Nat Genet* 13: 196–202.

Ilg W, Golla H, Thier P, Giese MA (2007) Specific influences of cerebellar dysfunctions on gait. *Brain* 130: 786–798.

Ilg W, Synofzik M, Brötz D, Burkard S, Giese MA, Schöls L (2009) Intensive coordinative training improves motor performance in degenerative cerebellar disease. *Neurology* 73: 1823–1830.

Ilg W, Brötz D, Burkard S, Giese MA, Schöls L, Synofzik M (2010) Long-term effects of coordinative training in degenerative cerebellar disease. *Mov Disord* 25: 2239–2246.

Ishiguro T, Ishikawa K, Takahashi M, Obayashi M, Amino T, Sato N, Sakamoto M, Fujigasaki H, Tsuruta F, Dolmetsch R, Arai T, Sasaki H, Nagashima K, Kato T, Yamada M, Takahashi H, Hashizume Y, Mizusawa H (2010) The carboxy-terminal fragment of alpha(1A) calcium channel preferentially aggregates in the cytoplasm of human spinocerebellar ataxia type 6 Purkinje cells. *Acta Neuropathol* 119: 447–464.

Ishikawa K, Fujigasaki H, Saegusa H, Ohwada K, Fujita T, Iwamoto H, Komatsuzaki Y, Toru S, Toriyama H, Watanabe M, Ohkoshi N, Shoji S, Kanazawa I, Tanabe T, Mizusawa H (1999) Abundant expression and cytoplasmic aggregations of alpha1A voltage-dependent calcium channel protein associated with neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 6. *Hum Mol Genet* 8: 1185–1193.

Ito M (1984) *The cerebellum and neural control*. New York, MA: Raven Press.

Ito M (2005) Bases and implications of learning in the cerebellum—adaptive control and internal model mechanism. *Prog Brain Res* 148: 95–109.

Ito M (2006) Cerebellar circuitry as a neuronal machine. *Prog Neurobiol* 78: 272–303.

Karayannidou A, Deliagina TG, Tamarova ZA, Sirota MG, Zelenin PV, Orlovsky GN, Beloozerova IN (2008) Influences of sensory input from the limbs on feline corticospinal neurons during postural responses. *J Physiol* 586: 247–263.

Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, Aizawa M, Inoue M, Katayama S, Kawakami H, Nakamura S, Nishimura M, Akiguchi I, Kimura J, Narumiya S, Kakizuka A (1994). CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat Genet* 8: 221–228.

Kawato M (1999) Internal models for motor control and trajectory planning. *Curr Opin Neurobiol* 9: 718–727.

Kawato M, Kuroda T, Imamizu H, Nakano E, Miyauchi S, Yoshioka T (2003) Internal forward models in the cerebellum: fMRI study on grip force and load force coupling. *Prog Brain Res* 142: 171–188.

Klockgether T, Skalej M, Wedekind D, Luft AR, Welte D, Schulz JB, Abele M, Bürk K, Laccone F, Brice A, Dichgans J (1998) Autosomal dominant cerebellar ataxia type I. MRI-based volumetry of posterior fossa structures and basal ganglia in spinocerebellar ataxia types 1, 2 and 3. *Brain* 121: 1687–1693.

Knutsson E (1972) An analysis of Parkinsonian gait. *Brain* 95: 475–486.

Kolb FP, Lachauer S, Maschke M, Timmann D (2004) Classically conditioned postural reflex in cerebellar patients. *Exp Brain Res* 158: 163–179.

Lalonde R, Strazielle C (2007) Brain regions and genes affecting postural control. *Prog Neurobiol* 81: 45–60.

Leblond H, L'Esperance M, Orsal D, Rossignol S (2003) Treadmill locomotion in the intact and

spinal mouse. *J Neurosci* 23: 11411–11419.

Lee WA, Buchanan TS, Rogers MW (1987) Effects of arm acceleration and behavioral conditions on the organization of postural adjustments during arm flexion. *Exp Brain Res* 66: 257–270.

Leonard JA, Brown RH, Stapley PJ (2009) Reaching to multiple targets when standing: the spatial organization of feedforward postural adjustments. *J Neurophysiol* 101: 2120–2133.

Macpherson JM (1988) Strategies that simplify the control of quadrupedal stance. I. Forces at the ground. *J Neurophysiol* 60: 204–217.

Manto M, Marmolino D (2009a) Cerebellar ataxias. *Curr Opin Neurol* 22: 419–429.

Manto M, Marmolino D (2009b) Animal models of human cerebellar ataxias: a cornerstone for the therapies of the twenty-first century. *Cerebellum* 8: 137–154.

Maruyama H, Kawakami H, Kohriyama T, Sakai T, Doyu M, Sobue G, Seto M, Tsujihata M, Oh-i T, Nishio T, Sunohara N, Takahashi R, Ohtake T, Hayashi M, Nishimura M, Saida T, Abe K, Itoyama Y, Matsumoto H, Nakamura S (1997) CAG repeat length and disease duration in Machado-Joseph disease: a new clinical classification. *J Neurol Sci* 152: 166–171.

Massion J (1984) Postural changes accompanying voluntary movements. Normal and pathological aspects. *Hum Neurobiol* 2: 261–267.

Massion J (1992) Movement, posture and equilibrium: interaction and coordination. *Prog Neurobiol* 38: 35–56.

Mauritz KH, Dichgans J, Hufschmidt A (1979) Quantitative analysis of stance in late cortical cerebellar atrophy of the anterior lobe and other forms of cerebellar ataxia. *Brain* 102: 461–482.

Miall RC, Weir DJ, Wolpert DM, Stein JF (1993) Is the cerebellum a smith predictor? *J Mot Behav* 25: 203–216.

Mori S, Matsui T, Kuze B, Asanome M, Nakajima K, Matsuyama K (1999) Stimulation of a restricted region in the midline cerebellar white matter evokes coordinated quadrupedal locomotion in the decerebrate cat. *J Neurophysiol* 82: 290–300.

Moritz CT, Perlmutter SI, Fetz EE (2008) Direct control of paralysed muscles by cortical neurons. *Nature* 456: 639–642.

Morton SM, Bastian AJ (2003) Relative contributions of balance and voluntary leg-coordination deficits to cerebellar gait ataxia. *J Neurophysiol* 89: 1844–1856.

Morton SM, Bastian AJ (2004) Cerebellar control of balance and locomotion. *Neuroscientist* 10: 247–259.

Morton SM, Bastian AJ (2009) Can rehabilitation help ataxia? *Neurology* 73: 1818–1819.

Mummel P, Timmann D, Krause UW, Boering D, Thilmann AF, Diener HC, Horak FB (1998) Postural responses to changing task conditions in patients with cerebellar lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 65: 734–742.

Murray MP, Sepic SB, Gardner GM, Downs WJ (1978) Walking patterns of men with parkinsonism. *Am J Phys Med* 57: 278–294.

Musienko PE, Zelenin PV, Lyalka VF, Orlovsky GN, Deliagina TG (2008) Postural performance in decerebrated rabbit. *Behav Brain Res* 190: 124–134.

Nashner LM (1976) Adapting reflexes controlling the human posture. *Exp Brain Res* 26: 59–72.

Orlovsky GN, Deliagina TG, Grillner S (1999) *Neuronal control of locomotion. From mollusc to man*. New York, Oxford University Press.

Palliyath S, Hallett M, Thomas SL, Lebedowska MK (1998) Gait in patients with cerebellar ataxia. *Mov Disord* 13: 958–964.

Pereira JE, Cabrita AM, Filipe VM, Bulas-Cruz J, Couto PA, Melo-Pinto P, Costa LM, Geuna S, Maurício AC, Varejão AS (2006) A comparison analysis of hindlimb kinematics during overground and treadmill locomotion in rats. *Behav Brain Res* 172: 212–218.

Ramnani N (2006) The primate cortico-cerebellar system: anatomy and function. *Nat Rev Neurosci* 7: 511–522.

Riess O, Rüb U, Pastore A, Bauer P, Schöls L (2008) SCA3: neurological features, pathogenesis and animal models. *Cerebellum* 7: 125–137.

Rüb U, Brunt ER, Deller T (2008) New insights into the pathoanatomy of spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease). *Curr Opin Neurol* 21: 111–116.

Schepens B, Drew T (2003) Strategies for the integration of posture and movement during reaching in the cat. *J Neurophysiol* 90: 3066–3086.

Schepens B, Drew T (2004) Independent and convergent signals from the pontomedullary reticular formation contribute to the control of posture and movement during reaching in the cat. *J Neurophysiol* 92: 2217–2238.

Schepens B, Drew T (2006) Descending signals from the pontomedullary reticular formation are bilateral, asymmetric, and gated during reaching movements in the cat. *J Neurophysiol* 96: 2229–2252.

Schepens B, Stapley P, Drew T (2008) Neurons in the pontomedullary reticular formation signal posture and movement both as an integrated behavior and independently. *J Neurophysiol* 100: 2235–2253.

Schmitz-Hübsch T, Coudert M, Bauer P, Giunti P, Globas C, Baliko L, Filla A, Mariotti C, Rakowicz M, Charles P, Ribai P, Szymanski S, Infante J, van de Warrenburg BP, Dürr A, Timmann D, Boesch S, Fancellu R, Rola R, Depondt C, Schöls L, Zdienicka E, Kang JS, Döhlinger S, Kremer B, Stephenson DA, Melegh B, Pandolfo M, di Donato S, du Montcel ST, Klockgether T (2008) Spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 6: disease severity and nonataxia symptoms. *Neurology* 71: 982–989.

Schöls L, Bauer P, Schmidt T, Schulte T, Riess O (2004) Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *Lancet Neurol* 3: 291–304.

Schulz JB, Borkert J, Wolf S, Schmitz-Hübsch T, Rakowicz M, Mariotti C, Schöls L, Timmann D, van de Warrenburg B, Dürr A, Pandolfo M, Kang JS, Mandly AG, Nägele T, Grisoli M, Boguslawska R, Bauer P, Klockgether T, Hauser TK (2010) Visualization, quantification and correlation of brain atrophy with clinical symptoms in spinocerebellar ataxia types 1, 3 and 6. *Neuroimage* 49: 158–168.

Seidel K, Siswanto S, Brunt ER, den Dunnen W, Korf HW, Rüb U (2012) Brain pathology of spinocerebellar ataxias. *Acta Neuropathol* 124: 1–21.

Stapley PJ, Ting LH, Hulliger M, Macpherson JM (2002) Automatic postural responses are delayed by pyridoxine-induced somatosensory loss. *J Neurosci* 22: 5803–5807.

Stapley PJ, Drew T (2009) The pontomedullary reticular formation contributes to the compensatory postural responses observed following removal of the support surface in the standing cat. *J Neurophysiol* 101: 1334–1350.

Stolze H, Klebe S, Petersen G, Raethjen J, Wenzelburger R, Witt K, Deuschl G (2002) Typical features of cerebellar ataxic gait. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 73: 310–312.

Suzuki L, Coulon P, Sabel-Goedknecht EH, Ruigrok TJ (2012) Organization of cerebral projections to identified cerebellar zones in the posterior cerebellum of the rat. *J Neurosci* 32: 10854–10869.

Takeuchi E, Sato Y, Miura E, Yamaura H, Yuzaki M, Yanagihara D (2012) Characteristics of gait ataxia in $\delta 2$ glutamate receptor mutant mice, ho15J. *PLoS ONE* 7: e47553.

Timmann D, Horak FB (1997) Prediction and set-dependent scaling of early postural responses in cerebellar patients. *Brain* 120: 327–337.

Timmann D, Horak FB (1998) Perturbed step initiation in cerebellar subjects. 1. Modifications of postural responses. *Exp Brain Res* 119: 73–84.

Timmann D, Horak FB (2001) Perturbed step initiation in cerebellar subjects: 2. Modification of anticipatory postural adjustments. *Exp Brain Res* 141: 110–120.

Ting LH, McKay JL (2007) Neuromechanics of muscle synergies for posture and movement. *Curr Opin Neurobiol* 17: 622–628.

Torashima T, Yamada N, Itoh M, Yamamoto A, Hirai H (2006) Exposure of lentiviral vectors to subneutral pH shifts the tropism from Purkinje cell to Bergmann glia. *Eur J Neurosci* 24: 371–380

Torashima T, Koyama C, Iizuka A, Mitsumura K, Takayama K, Yanagi S, Oue M, Yamaguchi H, Hirai H (2008) Lentivector-mediated rescue from cerebellar ataxia in a mouse model of spinocerebellar ataxia. *EMBO Rep* 9: 393–399.

van de Warrenburg BP, Bakker M, Kremer BP, Bloem BR, Allum JH (2005) Trunk sway in patients with spinocerebellar ataxia. *Mov Disord* 20: 1006–1013.

Vaz DV, Schettino Rde C, Rolla de Castro TR, Teixeira VR, Cavalcanti Furtado SR, de Mello Figueiredo E (2008) Treadmill training for ataxic patients: a single-subject experimental design. *Clin Rehabil* 22: 234–241.

Velliste M, Perel S, Spalding MC, Whitford AS, Schwartz AB (2008) Cortical control of a prosthetic arm for self-feeding. *Nature* 453: 1098–1101.

Viallet F, Massion J, Massarino R, Khalil R (1992) Coordination between posture and movement in a bimanual load lifting task: putative role of a medial frontal region including the supplementary motor area. *Exp Brain Res* 88: 674–684.

Watanabe M, Abe K, Aoki M, Kameya T, Kaneko J, Shoji M, Ikeda M, Shizuka M, Ikeda Y, Iizuka T, Hirai S, Itoyama Y (1996) Analysis of CAG trinucleotide expansion associated with Machado-Joseph disease. *J Neurol Sci* 136: 101–107.

Wolpert DM, Miall RC (1996) Forward models for physiological motor control. *Neural Netw* 9: 1265–1279.

Wolpert DM, Miall RC, Kawato M (1998) Internal models in the cerebellum. *Trends Cogn Sci* 2: 338–347.

Yakovenko S, Drew T (2009) A motor cortical contribution to the anticipatory postural adjustments that precede reaching in the cat. *J Neurophysiol* 102: 853–874.

Yakovenko S, Krouchev N, Drew T (2011) Sequential activation of motor cortical neurons contributes to intralimb coordination during reaching in the cat by modulating muscle synergies. *J Neurophysiol* 105: 388–409.

Yamada M, Sato T, Tsuji S, Takahashi H (2008) CAG repeat disorder models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol* 115: 71–86.

Yanagihara D, Kondo I (1996) Nitric oxide plays a key role in adaptive control of locomotion in cat. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 13292–13297.

Yoshizawa T, Yamagishi Y, Koseki N, Goto J, Yoshida H, Shibasaki F, Shoji S, Kanazawa I (2000) Cell cycle arrest enhances the in vitro cellular toxicity of the truncated Machado-Joseph disease gene product with an expanded polyglutamine stretch. *Hum Mol Genet* 9: 69–78.

Zattara M, Bouisset S (1988) Posturo-kinetic organisation during the early phase of voluntary upper limb movement. 1. Normal subjects. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 51: 956–965.

Zelenin PV, Beloozerova IN, Sirota MG, Orlovsky GN, Deliagina TG (2010) Activity of red nucleus neurons in the cat during postural corrections. *J Neurosci* 30: 14533–14542.

伊佐 正, 北澤 茂 (1994) 前肢のリーチング. *生体の科学* 45: 404–405.