

## 「脳の機能発達と学習メカニズムの解明」

平成 16 年度採択研究代表者

伊佐 正

(自然科学研究機構生理学研究所 教授)

### 「神経回路網における損傷後の機能代償機構」

#### 1. 研究実施の概要

研究代表者らはこれまでに、皮質脊髄路(錐体路, CST)を頸髄レベルで損傷した後においても訓練を重ねることで1-3ヶ月の経過で手指の精密把持運動(precision grip)が回復モデルすることを明らかにしてきた。また大脳皮質一次視覚野を一側性に損傷したサルにおいて、障害側視野に提示された対象に対する急速眼球運動(サッケード)が訓練によって、2ヶ月程度でほぼ回復してくることをも見出してきた。本研究ではこのような(1)主要な運動出力系である皮質脊髄路の損傷モデル、(2)主要な感覚入力系である一次視覚野の損傷モデルにおいて、それらの機能回復のメカニズムをシステム脳科学の問題として明らかにすることを目的としている。

平成17年度の研究では、CSTの損傷モデルにおいて、PETを用いた脳活動イメージングにおいて、回復初期(1ヶ月)と回復安定期(3ヶ月以降)において活動を増加させる大脳皮質の運動関連領域を明らかにし、さらに薬物注入による脳活動の局所的機能ブロック法によってそれらの領域が機能回復過程に実際に貢献しているかを明らかにした。また、現在機能回復過程の様々な段階における脳内の各部位における遺伝子発現の網羅的検索とin situ hybridization法や免疫組織化学的手法を用いた解剖学的解析を行なうとともに、関連する領域における神経活動の電気生理学的記録を行い、再組織化の実体を機能的に明らかにしたい。また、大脳皮質一次視覚野損傷モデルにおいては、平成17年度までの研究で、障害側に向かうサッケード運動の刺激の輝度の検出閾値、反応時間、軌道生成機構、速度、正確さなどを詳細に解析し、健常側との違いを明らかにした。さらに障害側に提示された刺激が作業記憶を誘起し得ること、また動物はトップダウン型の注意を行使するによって障害側の刺激の検出閾値を下げるができる、といった、障害側に向かうサッケードに関する視覚-運動変換過程に関与する認知的機構を一部明らかにした。今後はこれらの動物の中樞神経系における単一神経細胞活動の記録や薬物注入による脳活動の局所的機能ブロック法によって関与する神経回路機構を明らかにしたい。

## 2. 研究実施内容

### (1) 皮質脊髄路損傷(CST)モデル

脊髄損傷や脳卒中により、一時的に失われた運動機能がリハビリテーションを施すことによってその機能が回復することはよく知られている。機能回復には残された神経回路が失われた機能を補償されるということが、患者を用いた脳機能イメージングなど間接的な方法により得られた結果より言われている。しかしながら、上記の方法では下記の問題が挙げられる。

- 1) 患者間で損傷領域が均一ではない。
- 2) 脳機能イメージングでは、ある事象に直接かかわる脳領域とその領域と神経結合している領域が活動の増大を示す。

しかし、前者も後者も活動は増大を示しており、ある事象に直接関与している領域を断定することができない。そこで、まず我々は損傷領域を個体間で均一化するために、経路が既知な皮質脊髄路を損傷させたマカクサルモデルを作成した。マカクサルの CST は、ヒトのそれと同様に大脳皮質と脊髄運動ニューロンとに直接結合が見られ、臨床応用を考えると有用な点である。また、サルを用いたモデル動物を用いることにより、脳機能イメージングで得られた活動領域が機能代償に直接関係しているか、についての実験を、GABA 受容体のアゴニストである muscimol などの薬物を注入することによって、可逆的な不活性化実験で検討することができる。

これまで、我々は10頭のサルに CST 損傷の手術を行い、その損傷領域を検討した。その結果、約 8 割の確立で目的である CST の完全損傷のモデルの作成に成功することができた。また、損傷後の機能回復過程では、損傷の不完全な個体は損傷後、手の器用さには影響しなかった。これに対して、損傷の完全なモデルでは損傷後一時的な手の麻痺が観られ、約一ヶ月前後で完全に回復することが明らかになった。このように、損傷領域とその後の機能回復が均一な CST 損傷動物モデルを作成することに成功した。(西村、Alstermark, Pettersson, 関、伊佐)

また最近この間接経路の中継ニューロンより吻側の C1/C2 髄節で CST を切断したところ、独立した指の運動は回復しないことから、この C3-C4PNs を介する経路を活用することによって手指の巧緻運動の機能が代償し得ることが明らかになった。(西村、坪井、高橋、Pettersson, Alstermark, 伊佐)

次に、機能回復に関係している脳領域を特定するために、この CST 損傷モデルを用いて PET の  $H_2^{15}O$  を用いた脳血流測定法による脳機能イメージングを3頭のサルで行った。手の運動の回復がまだ完全ではない術後一ヶ月における測定では、両側の一次運動野の活動の増大が認められたが、完全に回復した術後三ヶ月では、切断の反体側における一次運動野と両側の腹側運動損野の活動の増大が認められた。したがって、これらの領域が CST 損傷後の機能回復に貢献していることが示唆された。(尾上、西村、伊佐)

さらに、脳機能イメージングで明らかになった領域が、どの程度、手の運動の機能回復に関与しているかを検討するために、GABA 受容体のアゴニストである muscimol を微量局所投与することによる、可逆的な局所不活性化実験を2頭のサルにおいて行った。その結果、障害の反対側の一次運動野のブロックでは、回復初期で極めて顕著な障害が観察されるが、回復安定期では

むしろ症状が軽微だった。一方、同側の一次運動野は切断前に muscimol を注入しても何ら効果は見られないが、回復初期の注入では回復してきた行動が障害を受けた。しかし、回復安定期の注入では効果が見られなかった。また、反対側運動前野腹側部への注入では、1頭のサルで回復初期に行動の障害が見られたが、効果には個体差が見られた。同側の運動前野への注入では回復安定期に運動が緩徐になるという障害が見られた。(西村、Perfiliev, 伊佐)

以上の PET 結果から、回復初期には両側の一次運動野が、回復安定期には一次運動野の広汎な領域と同側の運動野が貢献すること、反対側の運動前野の関与には個体差があることが明らかになった。

さらにこのような可塑的变化が起きている状況で、活動が変化する大脳皮質で起きている物質的な変化を明らかにするため、遺伝子発現の変化を解析する研究を進めている。まず、軸索伸長などに関わることが知られている GAP-43 の mRNA の発現を in-situ hybridization 法で調べたところ、手術を行わなかった健常サルに比べて、回復が起きて間もないサル(1頭)では、反対側の一次運動野上肢領域と運動前野(背側部、腹側部)及び両側の一次運動野下肢領域で mRNA の発現レベルが顕著に増加していること、それに対して補足運動野では変化がないことが確認された。それに対して回復安定期に入ってから2ヶ月の時間が経過したサルでは変化が見られないことから、GAP-43 の発現は回復過程と関係して増加することが示唆された(肥後、村田、大石、西村、伊佐)。一方、発現が変化する遺伝子を網羅的に調べるために Gene chip を用いて皮質脊髄路損傷からの回復過程にあるサルの大脳皮質の各領域での遺伝子発現の変化を解析する研究を開始している。昨年秋に販売が始まったアカゲザルの Gene chip を脳組織で使用できるようにするための条件検討を行い、適切な条件を見出した。そして、現在健常サル、切断後2週間、1ヶ月、3ヶ月の各ステージにおいて遺伝子発現の網羅的検索を行なっている。(佐藤、小島、西村、伊佐)

今回の CST 損傷サルでは、皮質運動関連領域に細胞体を持つ錐体細胞の軸索を頸髄レベルで切断している。このモデルにおいて、損傷後、錐体細胞の細胞体は機能しているのか、あるいは細胞死を起こし、消失し、グリア細胞に置き換わっているのかについては未だに分かっていない。活性化したマイクログリアに発現する末梢型ベンゾジアゼピン結合蛋白に特異的に結合することが知られている PET 分子プローブである $[^{11}\text{C}]$ PK11195 を用いて、損傷の支配領域の基質的变化を検討したところ、支配領域である運動関連領域には $[^{11}\text{C}]$ PK11195 の集積はほとんど見られず、頸髄レベルでの CST 損傷後には運動関連領域の錐体細胞は細胞死することなく、機能している可能性が示唆された。(尾上、西村)

## (2) 一次視覚野損傷モデル

皮質一次視覚野に損傷を受けた患者の中には、障害を受け、「盲」となった視野部位に提示された対象物は認知できないが、それに対して眼を向ける、手を伸ばすといった運動(goal-directed movement)を強制されると、正しく遂行することができるという興味深い所見を示す事例がある。このような認知と行動の乖離は「盲視(blindsight)」と呼ばれ、多くの研究者の関心を引いてきた。ただ、このような一次視覚野損傷後になぜ視覚認知機能が失わ

れるのか、そしてその様な場合においてもなぜ goal-directed movement が可能なのか、それはどのような神経回路によって達成されているのかは明らかでない、そこで申請者らのグループでは、一次視覚野を一側性に吸引除去した2頭のサルにおいて様々な視覚誘導性サッケード課題を用いて研究を行っている。そしてこれまでに以下のような結果を得ている。

- (I) 損傷後、最初はサッケードは不正確であるが、訓練によって2ヶ月程度で成功率はほぼ正常に回復するが、指標の明るさの検出閾値は高く、また運動は不正確である。
- (II) サッケードの反応時間が1頭のサルではより健常側より短く、もう1頭では少し長くなるが、健常側に比して顕著な遅れを示すわけではない。
- (III) 注視点を固視している間に瞬間的に点灯した手がかり刺激の位置を記憶しておき、約2秒後、注視点の消灯とともに手がかり刺激が呈示されていた場所にサッケードする、という記憶誘導性サッケード課題は盲視野に対しても遂行可能である。従って盲視野に提示された刺激によって作業記憶(working memory)は駆動され得る。
- (IV) 注視点の位置に矢印や異なる色の刺激を提示することで次に指標が現れる位置を予告する。それによって予告どおりの位置に引き続いて現れる指標に対するサッケードは、反応時間は短縮し、成功率は上昇するなど、促進される。このようなトップダウン型の注意が盲視野へのサッケードに対しても効果を持つ。従って、一次視覚野を介さない視覚-運動変換過程は注意の影響を受ける。言い換えれば盲視野に対しても注意を作用させることが可能である。

以上のような行動観察の結果から一次視覚野を迂回する視覚-運動変換過程の機能の概要が明らかになってきた。現在このような動物において視覚誘導性サッケードを制御する中枢部位からの単一ニューロン活動記録を開始しつつある。また3頭目のサルを間においても健全な状態での行動記録をほぼ終え、間もなく一次視覚野除去手術を行なう予定である。

### 3. 研究実施体制

「伊佐 正」グループ

- ①研究分担グループ長：伊佐 正（自然科学研究機構生理学研究所、教授）
- ②研究項目：霊長類を用いた脊髄レベルでの皮質脊髄路損傷、また、一次視覚野損傷後の機能代償過程の生理学的、行動学的解析

「尾上」グループ

- ①研究分担グループ長：尾上 浩隆（(独) 理化学研究所、チームリーダー）
- ②研究項目：霊長類を用いた行動実験、PET 脳機能マッピング実験

「大石」グループ

- ①研究分担グループ長：大石 高生（京都大学、助教授）
- ②研究項目：

- ・ 脊髄損傷、機能回復ザルの脊髄における GAP-43 陽性構造の解析
- ・ 脊髄損傷ニホンザルにおける大脳皮質運動野の神経投射
- ・ 一次運動野損傷、機能回復ザルモデル作成と脊髄における組織学的変化の検討
- ・ ニホンザル大脳皮質の発達過程における生長と変位

#### 「肥後」グループ

①研究分担グループ長：肥後 範行（産業技術総合研究所、研究員）

②研究項目：

- ・ 上肢運動機能回復の基盤となる神経機構の組織化学的検証（とくに神経成長関連タンパク GAP-43 の遺伝子発現を指標とした解析）。
- ・ 第一次運動野損傷後の機能回復課程に関する行動学的解析。

#### 「小島」グループ

①研究分担グループ長：小島 俊男（理化学研究所、チームリーダー）

②研究項目：DNA microarray 法、定量的 RT-PCR 法を用いた遺伝子発現比較解析

## 4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文（原著論文）発表

- Isa T, Ohki Y, Seki K, Alstermark B. Properties of propriospinal neurones in the C3-C4 segments mediating disynaptic pyramidal excitation to forelimb motoneurons in the macaque monkey. *J Neurophysiol*, in press.
- Endo T, Yanagawa Y, Obata K, Isa T (2005) Nicotinic acetylcholine receptor subtypes involved in facilitation of GABAergic inhibition in mouse superficial superior colliculus. *J Neurophysiol*, 94:3893-3902.
- Sooksawate T, Saito Y, Isa T (2005) Electrophysiological and morphological properties of identified crossed tecto-reticular neurons in the rat superior colliculus. *Neurosci Res*, 52:174-184.
- Saito Y, Isa T (2005) Organization of interlaminar interactions in the rat superior colliculus. *J Neurophysiol*, 93:2898-2907.
- Watanabe M, Kobayashi Y, Inoue Y, Isa T (2005) Effects of local nicotinic activation of the superior colliculus on saccades in monkeys. *J Neurophysiol*, 93: 519-534.
- Higo N, Oishi T, Yamashita A, Murata Y, Matsuda K, Hayashi M. Northern blot and in situ hybridization analyses for the neurogranin mRNA in the developing monkey cerebral cortex. *Brain Res*. in press.
- Mori T, Takumi K, Shimizu K, Oishi T, Hayashi M. Heterogeneity of the developmental patterns of neurotrophin protein levels among neocortical areas of macaque monkeys. *Exp*

- Brain Res. in press.
- Murata Y, Higo N, Oishi T, Yamashita A, Matsuda K, Hayashi M (2005) Developmental changes in the expression of growth-associated protein-43 mRNA in the monkey thalamus: northern blot and in situ hybridization studies. *Neurosci.* 136:497-507.
  - Menetti F, Tohno S, Tohno Y, Azuma C, Moriwake Y, Satoh H, Minami T, Mahakkanukrauh P, Oishi T, Hayashi M (2005) Age-dependent decreases of calcium, phosphorus, sulfur, and zinc in the cardiac valves of monkeys. *Biol Trace Elem Res.* 106(3):231-45.
  - Higo N., Oishi T., Yamashita A., Murata Y., Matsuda K., Hayashi M. Northern blot and in situ hybridization analyses for the neurogranin mRNA in the developing monkey cerebral cortex. in press.
  - Kazuhiko Seki, Tomohiro Kizuka and Hiroshi Yamada, Reduction in maximal firing rate of motoneurons after 1-week immobilization of finger muscle in human subjects. *Journal of Electromyography and Kinesiology* (2006) in press.
  - 関和彦、随意運動における感覚の制御、*体育の科学* 55(12):pp932-936 (2005)
  - 大石高生 脳の形態と遺伝子. *分子精神医学*. 2005; 5(4): 386-390.
  - 大石高生 脳の可塑性(基礎の立場から)サルを使った大脳運動野の破壊後の回復に関する研究 *認知神経科学*. 2005; 7(3): 206-210.

(2) 特許出願

H17 年度出願件数 : 2 件 (CREST 研究期間累積件数 : 2 件)