

「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

本プロジェクトでは、中枢神経系の特定の部位に加わった損傷による機能障害が、残存するシステムによって代償されるメカニズムについて、電気生理学、行動解析、神経解剖学、PET による脳機能イメージング、*in-situ hybridization* や *microarray* を用いた遺伝子発現解析などを組み合わせることで、分子レベルからシステムレベルまで繋げた統合的理解を目指す。研究代表者らはこれまでに、皮質脊髄路(CST)を頸髄レベルで損傷した後や一次運動野を損傷した後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、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及び一次運動野の損傷モデル、(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明らかにすることを目的としている。

平成17年度までの研究では、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よって、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することを明らかにした。平成18年度は機能回復過程の様々な段階における脳内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に着手した。さらに関連する大脳皮質領域における神経活動の電気生理学的記録を行い、制御対象である手指の筋活動との相関を解析することで機能代償機構の機能面からの分析を試みた。また、大脳皮質一次運動野損傷モデルでは、損傷後一定期間訓練を行わなかった動物の回復過程を解析することで訓練の持つ意味の評価を試みた。一方、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健常側との違いを明らかにした。平成18年度はこれらの動物の中枢神経系における単一神経細胞活動の記録を開始した。またサッケードの遂行に際して活動する部位を明らかにするためにPETによるイメージング研究を開始した。

## 2. 研究実施内容

### 1. 皮質脊髄路損傷モデルについて

手指の精密把持課題を訓練したサルの大脳皮質一次運動野と運動前野に複数のタンダステン針電極を慢性的に留置し、局所フィールド電位を記録するとともに手指筋の筋電図を記録した。そして頸髄C4/5レベルにおいて皮質脊髄路を損傷し、その後の訓練による回復過程での大脳皮質-筋活動間コヒーレンス(*cortico-muscular coherence; CMC*)と筋活動相互のコヒーレンス(*musculo-muscular coherence; MMC*)を解析し、機能回復過程で神経回路にどのような再組織化が生じたかを解析した。その結果、2頭のサルのうち1頭は皮質

脊髄路の損傷前に 17Hz の CMC が観察されたが、もう 1 頭は観察されなかった。皮質脊髄路の切断後、1 ヶ月以内にいずれのサルでも 30-40Hz の MMC が近位筋から遠位筋、屈筋と伸筋にわたる広汎な範囲で観察されはじめ、回復に従って増強した。一方で CMC は消失し、回復はみられなかった。以上の結果から MMC が機能回復の過程で増強すること、CMC の生成には皮質脊髄路から運動ニューロンへの直接結合が必要であることが示唆された。そしてこの結果は、近位筋から遠位筋、屈筋と伸筋にわたる広汎な筋群に共通のオシレーターが組織されることが機能回復に関わること、そしてこのオシレーターには皮質出力細胞は含まれず、より下位のレベルに存在することが示唆された。

一方で、機能回復過程で活性化することが明らかになっている一次運動野や運動前野における遺伝子発現を解析した。

神経突起の伸張などに関与するタンパクである GAP-43 の遺伝子を in-situ hybridization 法で解析したところ、機能回復した動物では健常な動物に比べていずれの領域でもその発現が上昇していることが明らかになった。

さらにこのような遺伝子発現の変化を網羅的に解析するために microarray を用いて解析を行っている。平成 18 年度末までに既に健常サル 3 頭、障害後 1 ヶ月以内の回復初期のサル 3 頭、障害後 3 ヶ月以上の回復安定期のサル 2 頭の標本を採取し終えた。あと 3 ヶ月以上のサルを 1 頭追加して、機能回復過程における遺伝子発現の変化を解析する予定である。

現時点で健常サルの一次運動野及び運動前野背側部、腹側部の遺伝子発現を解析したところ、運動前野の背側、腹側部は一次運動野に比べて遺伝子発現パターンがより類似しているという preliminary な結果を得ている。

## 2. 一次運動野損傷モデルについて

一次運動野損傷モデルでは、一次運動や損傷後、1ヶ月間訓練を行わず、腕を拘束した動物の precision grip の成功率を比較したところ、訓練しなかった動物では成績が明らかに悪かったことから機能回復には訓練が必要であることを示している。またこれらの動物でも健常動物3頭、回復初期3頭、回復安定期のサル1頭の標本を採取した。今後回復安定期のサル2頭の標本を追加して系統的な解析を行う予定である。

## 3. 一次視覚野損傷モデルについて

大脳皮質一次視覚野を一側性に損傷したサルにおいて損傷側視野に向けてのサッケードが可能となるメカニズムを明らかにするため、視覚誘導性サッケード課題遂行中のサル1頭の中脳上丘の神経活動を記録・解析した。一次視覚野一側性損傷後、障害側へのサッケードの際に反対側の上丘中間層のニューロンはサッケード運動に先行して高頻度の発火をすることが確認された。しかし、視覚応答と運動応答の両方を有する visuo-motor neuron の発火を健常側のニューロンと比較すると、健常側では visual burst と motor burst が乖離するのに対して、障害側では常に fuse していることから、視覚運動変換過程に大きな変化が生じていることが示された。

また、一次視覚野損傷側でサッケードが不正確になる原因が視覚情報が十分でないせいなのか、運動制御に支障が生じているせいなのかを明らかにするために、健常側のターゲットの明るさを暗くして検出閾値付近にして、成功率が同じ程度の損傷側へのサッケードとの比較を行った。その結果、障害側は健常側の閾値付近の刺激に対するサッケードよりやはり不正確でかつ軌道が直線的であることが明らかになった。軌道が直線的であるということは初期のエラーを on-line で修正できないことを意味しており、サッケード運動の制御において視覚刺激に対して作られる運動の順モデルを用いた on-line correction ができない、ということを示している。つまり、一次視覚野損傷後にサッケードが不正確になる原因は視覚情報が不正確になるだけでなく、運動制御システムにも支障をきたしていることによる。一次視覚野の損傷がこのような順モデルによる運動制御が障害されるという事実は大変興味深い意義があると考えている。

また、注意の一つの現象として、視野周辺に点灯した手がかり刺激はその提示後100ミリ秒前後はその場所へのサッケードを促進する(attention capture)が、その後200ミリ秒以上経過すると逆に

その場所へのサッケードを抑制する(inhibition of return = IOR)ことが知られている。今回我々は一次視覚野損傷後、attention capture は保たれるが IOR は消失することを見出した。この結果は attention capture は膝状体外視覚系によって誘発され得るが IOR には一次視覚野が必要であることを示していて興味深い。

さらに我々は一次視覚野損傷側へのサッケードを可能にしている神経回路の全容を明らかにするために PET による脳機能イメージングを計画している。現在1頭のサルにおいてサッケード遂行時の脳血流増加部位を測定するためのタスクを訓練し、健常状態でのスキャンを終了したところである。今後データ解析を行い、十分なデータが記録されていることが確認出来次第、一次視覚野の損傷を行う予定である。

### 3. 研究実施体制

#### (1)「伊佐」グループ

##### ①研究者名

伊佐 正(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

#### (2)「尾上」グループ

##### ①研究者名

尾上 浩隆(独立行政法人理化学研究所フロンティア研究システム分子イメージング研究プログラム分子プローブ機能評価研究チーム 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」

- ・ 陽電子断層撮影(PET)法(血流およびグルコース代謝を指標とした解析)を用いた、大脳皮質第一次運動野損傷後の上肢運動機能回復にともなう脳神経活動の解析。
- ・ 第一次運動野損傷にともなう脳内ミクログリア活性化のPETによる検証。
- ・ 陽電子断層撮影(PET)法(血流)を用いた、大脳皮質第一次視覚野損傷後の視覚認知機能回復にともなう脳神経活動の解析。
- ・ 第一次視覚野損傷にともなう脳内ミクログリア活性化のPETによる検証。

#### (3)「大石」グループ

##### ①研究者名

大石 高生(京都大学 助教授)

##### ②研究項目

- ・ 脊髄および大脳皮質損傷後における運動機能回復の基盤となる神経機構の組織化学的検証(特に神経成長関連タンパク GAP-43 のタンパク発現、神経伝達物質関連分子を指標とした解析)。
- ・ 正常対照ザルの皮質脊髄路軸索走行の解析。

- ・正常対照ザルの把握に関わる脳活動の PET による解析。

(4)「肥後」グループ

①研究者名

肥後 範行 ((独)産業技術総合研究所 研究員)

②研究項目

- ・脊髄および大脳皮質損傷後における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。

(5)「小島」グループ

①研究者名

小島 俊男 ((独)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. 研究成果の発表等

##### (1) 論文発表(原著論文)

(1)「伊佐」グループ

- Sooksawate, T., Isa, T. Properties of cholinergic responses in neurons in the intermediate gray layer of rat superior colliculus. *Eur. J. Neurosci.* 24, 3096-3108 (2006)
- 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.* 95, 3674-3685 (2006)
- Tanaka, H., Ikenaka, K., Isa, T. Electrophysiological abnormality precedes apparent histological demyelination in the CNS of mice over-expressing proteolipid protein. *J. Neurosci. Res.* 84, 1206-1216 (2006).
- Seki, K., Kizuka, T. & Yamada H. Reduction in maximal firing rate of motoneurons after 1-week immobilization of finger muscle in human subjects. *J. Electromyogr. Kinesiol.* 17,113-120 (2007).
- Lee, P.H.\* , Sooksawate, T.\* , Yanagawa, Y., Isa, K., Isa, T.\*\* , Hall, W.C.\*\* , Identity of a pathway for saccadic suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press. \* = equal contribution, \*\*= co-corresponding authors

「大石」グループ

○Higo N, Oishi T, Yamashita A, Murata Y, Matsuda K, Hayashi M

Expression of protein kinase C-substrate mRNAs in the basal ganglia of adult and infant macaque monkeys.

*J Comp Neurol* 499: 662-676(2006)

「肥後」グループ

○Higo N, Oishi T, Yamashita A, Murata Y, Matsuda K, Hayashi M

Expression of protein kinase C-substrate mRNAs in the basal ganglia of adult and infant macaque monkeys.

*J Comp Neurol* 499: 662-676(2006)

**(2) 特許出願**

平成 18 年度特許出願 : 0 件 (CREST 研究期間累積件数 : 2 件)