

「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の多様な研究手法を共通の研究対象に結集することで、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している。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も見出ししてきた。本研究ではこのような(1)主要な運動出力系であるCST及び一次運動野(M1)の損傷モデル、(2)主要な感覚入力系である一次視覚野(V1)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。

### CST の損傷モデルにおいて、

平成17年度までの研究では、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行った。

平成19年度は microarray によって健常動物での M1、運動前野、前頭前野の遺伝子発現パターンを明らかにした。また機能回復過程での大脳皮質一筋間コヒーレンス、筋一筋間コヒーレンス

を解析することで神経回路の再組織化の動的過程を明らかにした。

#### M1 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。平成19年度、PET による回復過程での脳活動の変化を解析する実験に着手した。

#### V1 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。

平成19年度は、サッケード運動の軌道や反応時間の分布を解析することで、V1 損傷動物では、視覚だけでなく運動制御や意思決定の過程に変化が起きていることを明らかにした。またボトムアップ型注意の機構の変化を明らかにできた。

## 2. 研究実施内容

「伊佐」グループ

### 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グ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、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。

### 2. 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ことが明らかになった。

またサッケードの反応時間を diffusion model を改変したモデルで解析したところ、サッケードの開始の意思決定の閾値が下がっていることが明らかになった。このことと上記の on-line correction の喪失はともにサッケード制御の”deliberate control”が障害されていることを示している。

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。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。

#### 「尾上」グループ

昨年度までに我々は、皮質脊髄路損傷後の手の巧緻運動脳機能回復に両側の一次運動野(M1)の活動が重要であることを明らかにしたが、同時に、モチベーションと関連する側座核/無名質において、両側の M1 と同様に活動の増大が観られたことから、今回、皮質脊髄路損傷後の手の巧緻運動脳機能回復に、M1 と側座核/無名質の活動とに関連性(機能的神経結合)があるかについて検討を行った。その結果、皮質脊髄路損傷後の手の巧緻運動中の M1 の活動と側座核/無名質の活動との間、また、側座核より投射のある眼窩前頭皮質、吻側帯状回皮質と側座核/無名質との間にも正の相関が認められ、大脳辺縁系-運動野間の機能的神経結合の強化が、皮質脊髄路損傷後の手の巧緻運動機能の回復や神経ネットワークの再組織化を促していることが強く示唆された。今年度の研究計画に掲げた、大脳皮質第一次運動野損傷、および、大脳皮質第一次視覚野損傷後の機能回復にともなう脳神経活動の解析については、今年度中に、それぞれ一頭目のデータ採取がほぼ完了し、現在、詳細な解析を行っている(一部については、肥後グ

ループから報告)。

#### 「大石」グループ

免疫組織化学的手法で、脊髄前角の GAP-43 免疫陽性構造がどのような神経細胞の線維、終末であるかを検討した。グルタミン酸トランスポーター1、カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II、セロトニンは GAP-43 免疫陽性構造に共存していた。それに対し、グルタミン酸トランスポーター2、GABAトランスポーター、アセチルコリントランスポーターはほとんど共存が認められなかった。

#### 「肥後」グループ

大脳皮質運動野または脊髄の損傷後に生じる上肢運動機能回復の神経基盤を明らかにするため、回復途中または回復直後の脳組織における組織化学的解析を行った。脊髄損傷個体では、大脳皮質第一次運動野、運動前野腹側部、第一次体性感覚野の 2-3 層において神経成長関連タンパク GAP-43 の遺伝子発現の上昇が見られた。さらに、第一次運動野 5 層に存在する大型錐体細胞においても GAP-43 の遺伝子発現上昇が見られた。以上の結果から、脊髄損傷後の回復過程において脳内の運動・体性感覚野間および第一次運動野から脊髄への下降性線維において、可塑的变化が生じた可能性が強く示唆される。

#### 「小島」グループ

研究目的: 脳の神経回路に損傷が起きた際、他の神経回路がどのように機能代償を行なうのか、その分子的基盤の解明を行う。そのためには、損傷回復過程と合わせて、健常状態での基礎的な遺伝子システムを理解しておくことも重要である。そこで今回、その回復過程への関与が想定される大脳皮質運動関連領域の健常サルでの遺伝子発現解析を行った。

方法: 健常アカゲサルの第一次運動野 (M1)、背側運動前野 (PMd)、腹側運動前野 (PMv)、比較対照として前頭前野 (A46) の 4 領域について、DNA マイクロアレイ法によるゲノムワイドな網羅的遺伝子発現比較解析を行った。

結論: 統計解析により、4 領域間で発現が変動している 476 遺伝子を得た。その結果、遺伝子発現パターンとして、PMd と PMv は近く、M1 と A46 の中間的な性質をもつことがわかった。また、全体的に M1 で発現の高い遺伝子が多く、次に相補的に A46 で高い遺伝子が多いこともわかった。今回同定された遺伝子群は、過去の類似研究で見出されていない遺伝子が殆どであり、機能未知のものも多く含まれている。今後組織学的な解析も含め、検討を進めていく予定である。また、今回の基礎研究を元に、損傷サルとの比較を行い、今後の研究に応用していく予定である。

### 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)

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(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)

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
  - (1) 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。
  - (2) 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。
  - (3) 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。
  - (4) 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)

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。

#### (4) 肥後グループ

①研究者名:肥後 範行 (産業技術総合研究所)

②研究項目

- ・ 上肢機能の代償にともなう遺伝子発現の in situ hybridization による解析

#### (5) 小島グループ

①研究者名:小島 俊男 (理化学研究所)

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)

- Nishimura Y, Onoe H, Morichika Y, Perfiliev S, Tsukada H, Isa T.  
「Time-dependent central compensatory mechanisms of finger dexterity after spinal cord injury.」  
Science. 2007; 318(5853):1150-5
- Sato A, Nishimura Y, Oishi T, Higo N, Murata Y, Onoe H, Saito K, Tsuboi F, Takahashi M, Isa T, **Kojima T**.  
「Differentially expressed genes among motor and prefrontal areas of macaque neocortex.」  
Biochem Biophys Res Commun. 2007; 362(3): 665-9
- Nishimura Y, Onoe H, Morichika Y, Tsukada H, Isa T.  
「**Activation** of parieto-frontal stream during reaching and grasping studied by positron emission tomography in monkeys.」  
Neurosci Res. 2007; 59(3):243-250 July 17
- Higo N, Oishi T, Yamashita A, Murata Y, Matsuda K. & Hayashi M.  
「**Expression** of protein kinase-C substrate mRNA in the motor cortex of adult and infant macaque monkeys.」  
Brain Res 1171, 30-41 (2007).
- Murata Y, Higo N, Oishi T, Yamashita A, Matsuda K, Hayashi M. & Yamane S.  
「Effects of motor training on the recovery of manual dexterity after primary motor cortex lesion in **macaque** monkeys.」  
J Neurophysiol 99, 773-86 (2008).
- Nishimura T, Oishi T, Suzuki J, Matsuda K, Takahashi T.  
**Development** of the supralaryngeal vocal tract in Japanese macaques: implications for the evolution of the descent of the larynx.  
Am J Phys Anthropol. 135(2):182-94, 2008.