

「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。

### (1) - 1. CST の損傷モデルにおいて、

平成19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(Nishimura et al. Science, 2007)。

このモデルを用い、生理研・伊佐グループは

- (1) 損傷後、1ヶ月間訓練しない期間をおいた後の回復過程がどのようになるかについての行動解析を行っている。
- (2) 損傷後長期間かかって起きると推定される軸索走行の大規模再編の可能性を検討するため、対照群としての健常サル CST の頸髄各髄節での軸索投射様式を詳細に定量的に解析した。
- (3) 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、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。
- (4) 機能回復過程での PET による脳機能イメージングにおいて側坐核の活動が亢進し、一次運

動野の活動との相関が高まることを見出した (Nishimura et al. 投稿中)。

産業技術総合研究所・肥後グループは

(1) in situ hybridization (ISH)法によって GAP-43 mRNA の大脳皮質運動関連領域での発現変化を明らかにした(Higo et al.投稿中)。

(2) 理研・小島グループと共同してマイクロアレイによる網羅的解析の結果発現変動の大きな遺伝子について ISH 用プローブを作成して回復過程での発現変化の ISH 解析を開始した。

京大霊長研・大石グループは

脊髄などにおける可塑性関連タンパク質の発現変化を免疫組織化学的に解析している。

理研・小島グループはマイクロアレイ法によって機能回復過程での大脳皮質運動関連領域における遺伝子発現の変化を網羅的に解析している。

理研・尾上グループは PET によって機能回復過程での大脳皮質運動関連領域の活動変化を解析し(Nishimura et al. Science 2007)、またマイクログリアの発現変化を PET や免疫組織化学的手法によって解析している。

(1) - 2. M1 損傷モデルでは、

肥後グループが中心となり、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(Murata et al. J Neurophysiol. 2008)。そして平成20年度は尾上グループとの共同で PET による回復過程での脳活動の変化を解析する実験およびムシモルによる可逆的機能ブロックにより回復に貢献する皮質領域の機能解析を行っている。また、損傷後回復初期、安定期における大脳皮質での遺伝子発現の変化をマイクロアレイによって解析するためのサンプルを損傷前4頭、損傷後初期4頭、安定期4頭分について採取し終えた。現在小島グループで解析中である。

(2). V1 損傷モデルにおいては、

伊佐グループにおいて平成19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。そして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(Yoshida et al. J Neurosci 2008)。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(Ikeda et al.投稿中)。

平成20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行っている。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尾上グループと共同で PET によるイメージング研究を行っている。

## 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

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一筋活動間コヒーレンス(CMC)と筋活動相互のコヒーレンス(MMC)を解析したところ、健常サルで観察されるβ帯域の CMC は回復しなかったが、γ帯域の 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機能回復とともに出現した。この結果は損傷を免れた脳幹・脊髄神経回

路のリズミック活動が機能回復に貢献する可能性を示唆した(Nishimura et al. Brain in press)。

上記脊髄損傷からの機能回復過程での PET による脳機能イメージングにおいて側坐核の活動が亢進し、一次運動野や他の辺縁系の活動との相関が高まることを見出した。このことはモチベーションが機能回復を促進するメカニズムの一端を解明したといえる(Nishimura et al. 投稿中)。

脊髄損傷後長期間を経るとたとえば皮質脊髄路の走行に変化が生じる可能性があるが、その点を検証するため、BDA を5頭のサルの M1 指領域に注入し、順行性標識法により CST の走行を定量的に解析した。すると C7-Th1 に存在する手の運動神経核に投射するとともに多くの軸索側枝が C2-C8 特に運動核より1-3 髄節吻側において VI-VII 層の介在ニューロン群に投射することが明らかになった。これらの投射パターンが障害からの回復過程でどのように変化するかを比較・解析する予定である。

## 2. 一次視覚野(V1)損傷モデルについて

片側 V1 損傷サルはいずれも損傷直後は障害側へのサッケードを正しく行うことができなかったが、約2か月でほぼ100%回復した。しかし、指標の明るさの検出閾値は障害側で上昇し、また障害側へのサッケードは不正確だった。この不正確さの原因が視覚の障害に限定するのかどうかを調べるために健常側での閾値付近の明るさの指標に対するサッケードを調べたところ、やはり障害側に比べてはるかに正確であったことから、障害側でのサッケードの不正確さは単に視覚の障害によるのではないことが示唆された。そこで障害側へのサッケードを詳細に解析すると、その軌道は直線的で、いわゆる online correction が作動していないことが示唆された。また反応時間の分布を diffusion model によって解析すると意思決定の閾値が低下していることが明らかになった。以上の結果、一次視覚野を介する視覚入力にはサッケード遂行自体に必要であるとともに、サッケード遂行に至る意思決定および正確な運動制御に必要であることが明らかになった(Yoshida et al. J Neurosci 2008)。

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(Ikeda et al.投稿中)。

これまで、作業記憶と意識は密接な関係があるとされてきた(Koch)。そこで V1 損傷サルで作業記憶を解析するため記憶誘導サッケード課題を試したところ、障害側においても可能であることが明らかになった。そして記憶誘導性サッケード課題遂行中のサルの上丘より単一ニューロン活動の記録を行ったところ、1頭のサルにおいて作業記憶に対応する持続的発火活動が観察された。以上の結果はV1損傷サルにおいても作業記憶を可能にする何らかの視覚的意識があること、そしてそれに対応する活動が上丘に生じ得ることを示している(投稿準備中)。

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行っている。1頭のサルにおいてサッケードの遂行回数と関連して活動が変化する部位を解析したところ、障害側の頭頂連合野 LIP での活動亢進が検出された。現在2頭目の実験を開始している。そして上記の活動亢進部位と活動が相関する部位を解析することで盲視側での視覚運動変換経路が明らかにできるのではないかと考えて解析を行っている。

「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、さらに、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や、眼窩前頭皮質、吻側帯状回皮質と側座核/無名質との間の機能的神経結合が強化され、これ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可能性を示した。今年度は、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実験を2頭のサルについて終了し、画像解析を行った(肥後グループから報告)。さらに、同モデルについて、イボテン酸による M1 の神経細胞破壊後の炎症の発現を、活性化マクログリアに発現する末梢性ベンゾジアゼピン受容体に対して特異的なリガンドである [ $^{11}\text{C}$ ]PK11195 で測定し、 [ $^{15}\text{O}$ ]H $_2$ O、 [ $^{18}\text{F}$ ]FDG の画像との比較を行った(図1)。その結果、2頭両方の個体において、 [ $^{15}\text{O}$ ]H $_2$ O の集積が認められ、破壊部位における局所血流の増加が示唆された。糖代謝率の増加を示す [ $^{18}\text{F}$ ]FDG の集積の増加も認められたが、 [ $^{11}\text{C}$ ]PK11195 の集積も認められ、破壊部位では、マクログリアの活性化を伴う炎症が起こっていること、ならびに、長期にわたって続いていることが明らかになった。M1 損傷を施した他個体の生体試料を免疫組織化学的手法によって解析した結果、損傷後には、長期にわたってマクログリアやアストログリアが活性化状態にあることが明らかになった。最近、脳損傷後の早期リハビリテーションが提唱されている。しかし、損傷後の組織の状態いかんによっては、リハビリが神経のダメージを増大する可能性もある。今後、例数を増加することによって、イメージングによる適正なりハビリテーションのモニタリングの可能性について検討する。

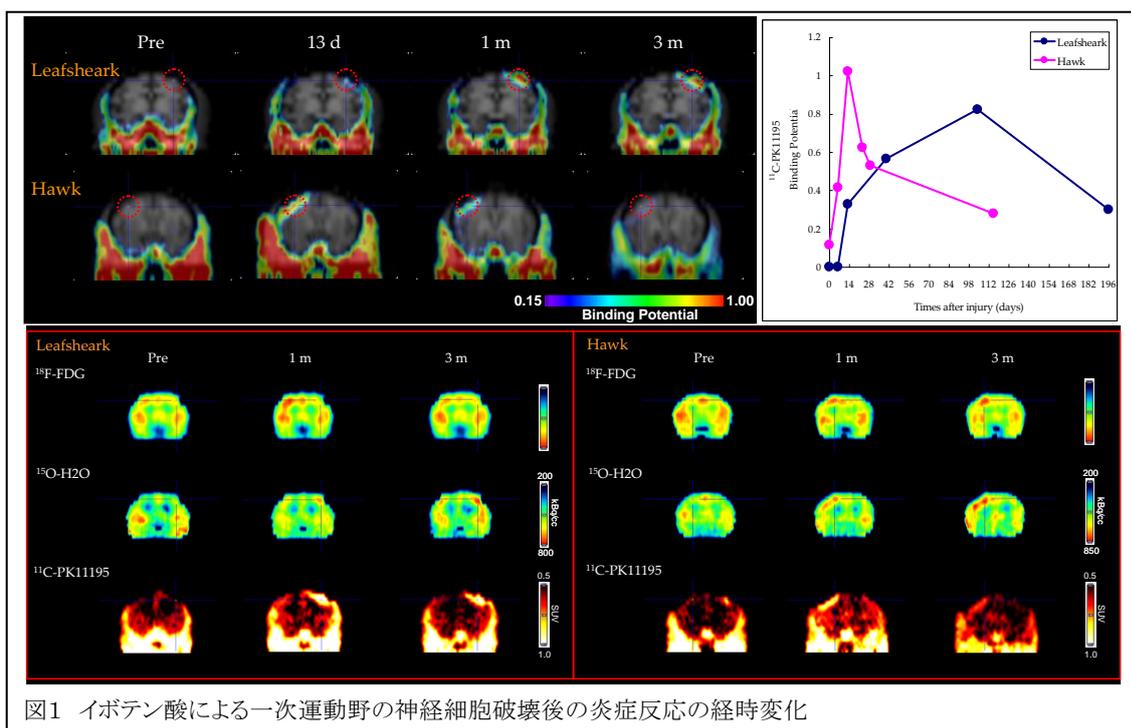


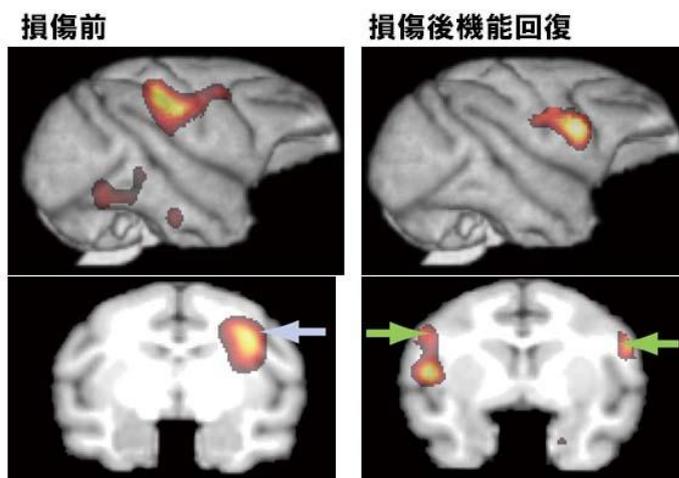
図1 イボテン酸による一次運動野の神経細胞破壊後の炎症反応の経時変化

### 「大石」グループ

免疫組織化学的手法で、皮質脊髓路損傷ザル及び非損傷ザルの脊髓側索における GAP-43、アセチルコリントランスポーター(vAChT)およびカルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CAMK-II)免疫陽性線維、終末を比較検討した。非損傷対照ザルでは縦走する軸索での vAChT 発現が弱かった。それに対し、皮質脊髓路切断ザルの健常側の外側皮質脊髓路(ICST)の GAP-43 陽性構造の一部が vAChT を強く発現していた。切断側 ICST 領域や灰白質にはほとんど vAChT 陽性構造はなかった。また、皮質脊髓路切断ザルの健常側の外側皮質脊髓路や脊髓小脳路で vAChT は CAMK-II と共存していた。この結果から、損傷後の機能代償には、皮質脊髓路ニューロンにアセチルコリンが共発現することが関与している可能性が示唆された。

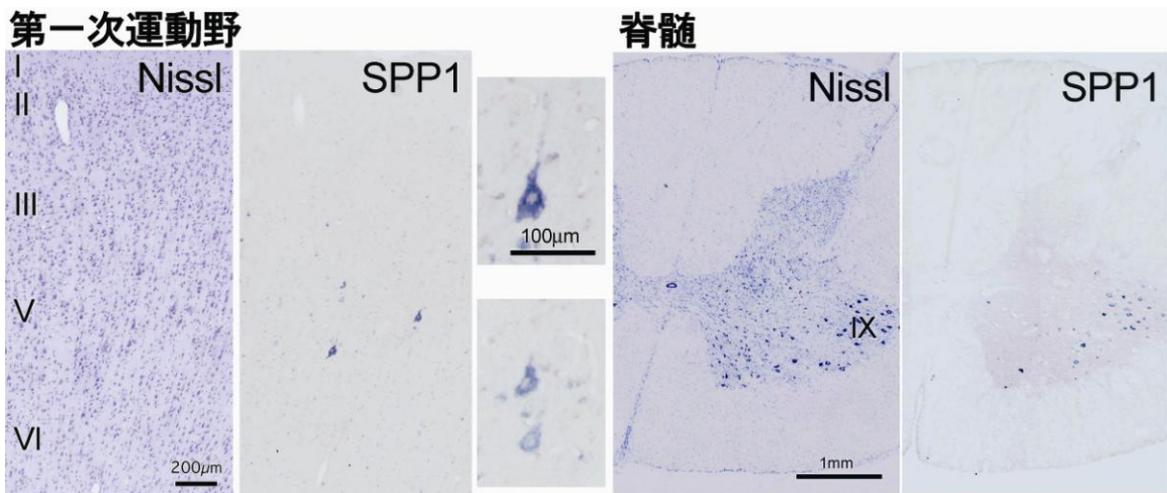
### 「肥後」グループ

第一次運動野損傷後の機能代償に関わる脳領域を明らかにするために、 $^{15}\text{O}-\text{H}_2\text{O}$  を用いた陽電子放出断層撮影(PET)により、損傷前後の脳活動の比較を行った。損傷前の健常個体では使用した左手と対側の右半球の第一次運動野(図 2、青矢印)における活動が見られた。第一次運動野損傷後把握機能の回復が見られた個体では、損傷前と比べ両半球の運動前野腹側部(図 2、緑矢印)において活動の上昇がみられた。このことから、第一次運動野損傷後の把握機能回復の背景として、運動前野腹側部における機能代償があると考えられる。



(図 2)

細胞接着にかかわるタンパクである SPP1 (Secreted phosphoprotein 1)の mRNA が、マカクザル運動皮質 5 層に存在する大型の錐体細胞において特異的に発現していることを明らかにした(図 2)。解剖学的トレーサーとの二重染色により、皮質脊髓路の起始細胞において SPP1 mRNA の発現がみられることを確認した。さらに皮質脊髓路の投射先である脊髓前角においても SPP1 mRNA の発現が見られた(図 3)。一方、ラットの運動皮質では SPP1 の発現は見られなかった。このことから、SPP1 が霊長類において特に発達している皮質脊髓路の形成または維持に関与している可能性が考えられる。



(図 3)

#### 「小島」グループ

研究目的: 脊髄に損傷が起きた際、損傷を逃れた他の神経回路がどのように代償を行い、上肢運動の機能が回復するのか、その分子的基盤の解明を行う。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野での遺伝子発現解析を行った。

方法: 皮質脊髄路損傷(損傷後 2 週間と 3 カ月)および健常アカゲサルのそれぞれ左右の第一次運動野、背側運動前野、腹側運動前野の 6 領野について、マイクロアレイ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: まず、それぞれの領野について、回復過程において有意に発現が変動する遺伝子を調べたところ、運動前野の方が第一次運動野より変動する遺伝子の数が多かった。次に、各回復過程における 6 領野間で有意に発現が変動している遺伝子数を調べたところ、健常や 3 カ月に比べ、回復初期である 2 週間で遺伝子の数が最も少なかった。また、健常や 3 カ月どうしについても、その領野間で発現差のある遺伝子セットが異なっていた。これらの結果は、脊髄損傷後、各運動関連領野間の遺伝子発現レベルの差を一度リセットし、損傷を逃れた周りの運動関連領野の神経細胞などがその遺伝子発現様式を巧みに変え、新たに環境に適した遺伝子ネットワークを再構築し、その機能代償に貢献していることが示唆された。今後組織学的な解析やパスウェイ解析、ネットワーク解析等も含め、その分子メカニズムに関して、多角的に検討を進めていく予定である。また、第一次運動野損傷モデルサルでの結果も出る予定なので、それらとも比較を行い、その機能代償の機構に違いはあるのかなど検討する予定である。

### 3. 研究実施体制

#### (1)「伊佐」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 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」

(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)「大石」グループ

①研究分担グループ長:大石 高生(京都大学 准教授)

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。

・脊髄損傷ザルの大脳皮質運動関連領野の遺伝子発現パターンの解析。

(4)「肥後」グループ

①研究分担グループ長:肥後 範行((独)産業技術総合研究所 研究員)

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研究分担グループ長:小島 俊男((独)理化学研究所 副チームリーダー)

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. Yoshida M, Takaura K, Kato R, Ikeda T, Isa T. 「Striate cortical lesions affect deliberate decision and control of saccade: implication for blindsight.」 *Journal of Neuroscience* (2008), 28: 10541-10548.
2. Takahashi K, Liu FC, Oishi T, Mori T, Higo N, Hayashi M, Hirokawa K, Takahashi H, Expression of FOXP2 in the developing monkey forebrain: comparison with the expression of the genes FOXP1, PBX3, and MEIS2., *J Comp Neurol*, 509, 2, 180-189.
3. Tohno Y, Tohno S, Laleva L, Ongkana N, Minami T, Satoh H, Oishi T, Hayashi M, Sinthubua A, Suwannahoy P, Mahakkanukrauh P, Age-related changes of elements in the

coronary arteries of monkeys in comparison with those of humans., Biol Trace Elem Res, 125, 141-153.

4. Nishimura Y, Morichika Y, Isa T. A common subcortical oscillatory network contributes to recovery after spinal cord injury. (2009), Brain, Jan 26, Epub ahead of print.
5. Okada KI, Inoue Y, Toyama K, Isa T, Ohzawa I, Kobayasi Y. Different pedunculopontine tegmental neurons signal predicted and actual task rewards. J. Neurosci, in press.
6. Nishimura Y, Isa T. Compensatory changes at the cerebral cortical level after spinal cord injury. (review), Neuroscientist, in press.

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数：0 件（CREST 研究期間累積件数：2 件）