

研 究 報 告 書

「大脳皮質への神経活動入力による機能回復促進」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成21年10月～平成25年3月

研究者: 肥後 範行

1. 研究のねらい

脳卒中などによって脳に損傷を受けると、失われた脳領域の機能に障害が生じる。成熟した脳が損傷を受けた場合に、失われた神経細胞は基本的に再生することはないと考えられている。ただし、その後リハビリ訓練を行うなど適切な環境に置かれれば、外科的な処置を施さなくても機能の回復を示すことがある。これは人工的な情報処理装置であるコンピュータが壊れた場合、蓋をあけて部品を交換したり、切れた配線を繋いだりしなければならないのと対照的である。自律的な機能回復は、生命システムに特有の現象であり、そのメカニズムを理解することは生命現象の基本原則を解明することにもつながる。

さらに、脳損傷後の機能回復メカニズムを解明することで、より有効な脳機能回復法の開発につながることを期待できる。例えば、近年注目されている新たな脳機能回復技術に tDCS (Transcranial Direct Current Stimulation; 経頭蓋直流電気刺激) や TMS (Transcranial Magnetic Stimulation; 経頭蓋磁気刺激) 脳電気刺激法) などの脳電気刺激法があるが、現在用いられている刺激の強さ、周波数、タイミングは経験に依存したもので、その機能回復に及ぼす効果は必ずしも高くない。脳損傷後の機能回復メカニズムを知ることで、回復メカニズムに基づいたより有効な脳電気刺激技術の開発が可能となる。

本研究では、ヒトに近い脳構造と筋骨格構造を持つマカクサルを用いて、脳損傷後のリハビリ運動訓練による手の把握動作回復の背景にある脳神経システムの変化を明らかにする。脳損傷後の機能回復には、脳の領野レベルから細胞レベル、分子レベルまでの多くの変化がともなっているが、それらをレベル縦断的に調べた研究は少ない。そのため、これまでの我々の研究で確立した、マカクサル大脳皮質第一次運動野損傷モデルを用いて、手の把握運動機能回復の背景にある脳内の変化を、皮質領野活動、単一神経ニューロン活動、神経投射、遺伝子発現のレベルで多角的に明らかにする。

2. 研究成果

(1) 概要

マカクサルの大脳皮質第一次運動野を神経毒(イボテン酸)により損傷したのち、1-2 か月間の把握運動訓練を行い、上肢運動機能の回復が見られた時期における脳の機能及び構造的変化を明らかにした。

まず、第一次運動野損傷後の機能回復期における脳活動の変化を、PET(陽電子放射断層撮影)を用いて計測した。その結果、損傷周囲の第一次運動野と、運動前野腹側部の両者において、機能回復に伴う活動の変化が見られた。回復後にこれらの領域の活動を抑制したところ、手の運動機能障害が再発したことから、この領域の活動変化が機能回復に必須であると考えられる。次に、領域レベルの活動変化の背景にある、単一ニューロン活動の変化を知るために、把握を伴う一連の動作中に、運動野に記録電極を刺入し活動を計測した。損傷の周辺領域では、電気刺激による体部位の動きが誘発されにくくなったが、この領域では、運動機能の回復期に物体の把握時に活動するニューロンが増加した。すなわち運動機能の回復にともなって、損傷周囲の神経細胞の役割が変化した可能性が示唆された。

機能回復に伴う運動野の物質レベルの変化を調べるために、回復過程におけるタンパクおよび遺伝子発現変化の解析を行った。回復期では運動野直下の白質領域において、ミエリン鞘の形成に関わるタンパクの発現の上昇が見られた。このことから、ミエリン鞘の増加による運動出力線維の強化が、運動機能回復に関わっている可能性が考えられる。DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析をおこなったところ、回復期である損傷後 3 ヶ月におい

て、損傷側半球の運動前野腹側部において、神経突起の伸長や細胞接着など神経の構造変化に関わる遺伝子を含む数百種の遺伝子発現の変動が見られた。具体的には、FGF17 (fibroblast growth factor 17) 遺伝子や、これまでは神経細胞での働きがよく分かっていなかった SPP1 (secreted phosphoprotein 1) と呼ばれる遺伝子が、把握機能に重要な役割を果たす皮質脊髄路の起始細胞で特異的に発現し、機能回復に伴って発現を変動させることが明らかになった。

本研究成果は、脳機能回復を促進する薬剤や、脳の機能回復メカニズムに基づいた電気刺激技術など新たなニューロリハビリテーション技術の開発につながる。

(2) 詳細

成体マカクサルの大脳皮質第一次運動野に局所的な損傷を作成した。第一次運動野は大脳皮質からの運動出力を担う主要な領域であり、この領域に局所的な損傷を作成することにより、運動機能障害を生じる脳損傷モデルを作成を試みた。まず、皮質内微小刺激法-intracortical microstimulation (ICMS)を用いて、マカクサル第一次運動野の体部位マップを同定した。これは大脳皮質内に微量の電流を流し神経を活動させた時に、体のどの筋肉が動いたかを調べることでその領域が支配する体の部位を調べる手法である。体部位マップを同定した後に、神経毒であるイボテン酸を、体部位マップ上の手指の領域に注入した。イボテン酸の注入を受けた領域では、神経細胞(ニューロン)の永続的な欠落が生じ、代わりに小型の神経膠細胞(グリア細胞)の増殖が生じた。このようにして、第一次運動野の手指運動の支配領域に限局した損傷を作成したところ、重篤な運動麻痺が反対側の上肢に生じた。損傷後に週 5 日間、小物体を把握する動作をもちいたリハビリ運動訓練を行った。これまでの私たちの先行研究と同様に、損傷後 1-2 か月のリハビリ運動訓練を行うことで、損傷前に近い精密把握(つまみ把握)の回復がみられた(Murata et. al., 2008, J. Neurophysiol.)。

研究テーマ 1「脳機能イメージングによる活動計測と薬剤投与による不活性化」

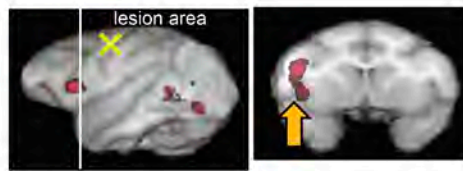
まず、回復に伴う脳活動の変化に着目した。PET (陽電子断層画像法)を用いて、サルがスリットから物体を精密把握によって取り出す課題を行っている時の脳の活動を計測し、損傷前と、第一次運動野損傷後の機能回復期における脳活動の比較を行った。損傷前は、第一次運動野を中心とした脳活動が見られたのに対し、損傷後精密把握の回復が見られた時期には、運動前野腹側部と呼ばれる大脳皮質領域の活動上昇が見られた(図 A)。これらの領域の活動を、抑制性神経伝達物質である GABA のアゴニストであるムシモールによって抑制したところ、回復した精密把握が出来なくなったことから(図 B)、この領域の活動上昇が精密把握の回復に必須であることが明らかになった。

研究テーマ 2「単一ニューロン記録」

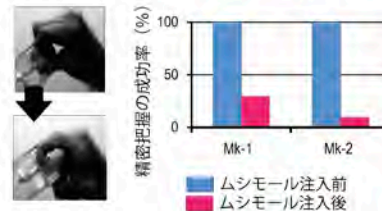
脳機能回復に伴う領域レベルの活動変化の背景にある、単一ニューロン活動の変化を知るために、サルがスリットから物体を把握し、取り出して食べるという一連の運動を行っているときに、脳内に記録電極を刺入し単一ニューロン活動を計測した(特許 1、その他の成果 1)。この分野の先行研究として、神経活動ではなく皮質内微小刺激法(ICMS)によって同定される体部位マップの変化を調べた研究がある(Nudo et al., 1996)。この先行研究では、運動野の手指領域を損傷した後にリハビリ訓練を行うと、もともとは肘や肩の動きにかかわる領域に手指領域が拡がることから、この体部位マップの変化がリハビリによる機能回復の脳内基盤だと考えられてきた。今回の私の実験では、損傷した領域の周囲に指領域の拡大が少し見られた一方、電気刺激で何も応答が見られない領域、すなわち体部位マップが明確でない領域が多くなり、第一次運動野の指と肘肩以外の領域がほとんど見つからなくなかった(図 C)。この、先行研究との違いの原因は不明であるが、先行研究はリスザルを用いているのに対して本研究では手の巧緻性の高いニホンザルを用いていることと関係がある可能性がある。この体部位マップの変化に対応して、損傷前と運動機能の回復後で活動パターンの変化を示す領域がいくつか見られた。例えば電気刺激で何も応答が見られない領域では、損傷前と比べ

て、手の動きに関連したニューロン活動が有意に上昇した(図 C)。このことから、損傷後の回復期には、手の動きを担うニューロンが損傷の周辺領域にモザイク状に広がっていると考えられる。

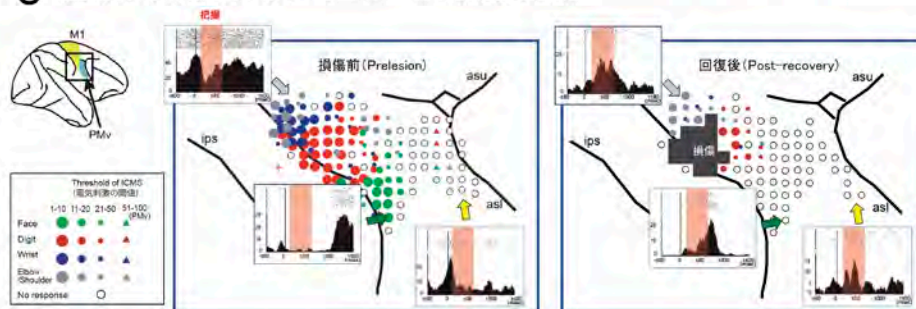
A 回復過程で損傷周囲運動野の活動上昇



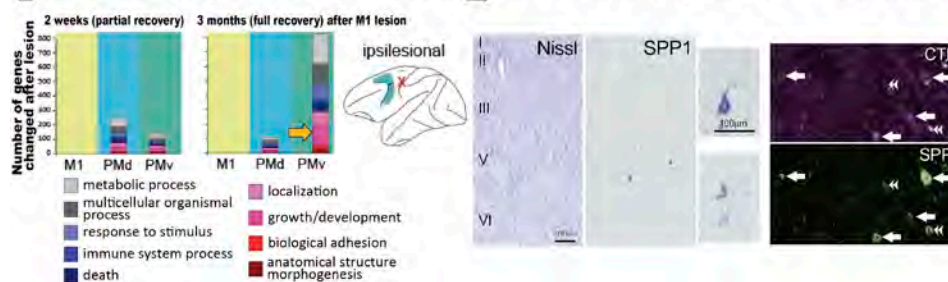
B 活動不活性化による障害の再発



C 運動野で体部位マップとニューロン活動の変化



D 損傷周囲の運動野で遺伝子発現変動 E 皮質脊髓路細胞におけるSPP1遺伝子発現



研究テーマ 3「タンパクおよび遺伝子発現解析」

脳損傷後の機能的な変化には、神経回路の構造変化を含む物質的な変化がともなっていると考えられる。機能回復過程での運動野の物質レベルの変化を調べるために、回復期の運動野におけるタンパクおよび遺伝子発現変化の解析を行った。免疫組織化学を用いた解析により、回復期の運動野下の白質領域ではミエリン鞘の形成に関わるタンパクの発現の上昇が見られた。このことから、ミエリン鞘の強化による、運動出力に関わる神経伝達速度の上昇が、運動機能回復に関わっている可能性が考えられる。さらに灰白質領域において DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析をおこなったところ、回復期である損傷後 3 ヶ月において損傷側半球の運動前野腹側部において、神経突起の伸長や細胞接着など神経の構造変化に関わる遺伝子を含む数百種の遺伝子発現の変動が見られた(図 D 矢印)。一例をあげると、FGF17(fibroblast growth factor 17)は、発達期のマウスにおいて前頭葉の形成に関わることが報告されているが、回復期の運動前野腹側部では正常個体の 3 倍程度の発現上昇を示すことが DNA マイクロアレイを用いた解析で分かった。In situ ハイブリダイゼーションを行ってこの遺伝子の発現細胞及びその分布を調べたところ、回復期である損傷後 3 ヶ月の運動前野腹側部において、V 層に存在する、比較的大型のニューロンで発現が見られた。このことは、運動前野腹側部からの下降性経路に FGF17 の関わる変化が生じていることを示唆している。また、これまでは神経細胞での働きがよく分かっていなかった SPP1 (secreted phosphoprotein 1) と呼ばれる遺伝子が、把握機能に重要な役割を果たす皮質脊髓路の起始

細胞で特異的に発現し、また脳損傷後の把握機能の回復に伴って、損傷周囲の運動野において発現を変動させることが明らかになった(図 E、論文 3)。

3. 今後の展開

これまでに得られた知見をさらに確実なものとするとともに、知見を社会に還元するために、以下の 3 つの側面での展開を考えている。

- (1) これまでの研究により、第一次運動野損傷後の把握動作回復に伴う神経投射と遺伝子発現変化を同定することが出来たが、これらの変化と把握動作の機能回復の因果関係は未だ検証されていない。機能回復後に、ウィルスベクターを用いて特定の神経投射の不活性化や遺伝子発現の抑制を行った場合に障害が再発するのかを検証することで、機能回復との因果関係を明らかにしていきたい。
- (2) 上記の研究成果は全て大脳皮質第一次運動野を神経毒によって損傷した、大脳皮質局所損傷モデルザルにおいて得られたものであるが、臨床における実際の脳卒中患者では、脳深部の内包と呼ばれる線維束において、血栓による梗塞が生じることが多い。今後、より臨床に近い内包梗塞モデルザルで同様の解析を行うことで、臨床に直結する知見を得ることが期待できる。
- (3) 脳機能回復に関わるニューロン活動の変化を同定することが出来たので、この知見を、機能回復を促進する技術の開発につなげたい。具体的には、損傷周囲の運動野に、サルが手を動かそうとするタイミングに合わせて神経活動を模した周波数の電気刺激を与えることで、電気刺激を与えずに訓練を行った場合よりも回復が促進されるかを検証する。

4. 自己評価

機能回復の背景にある脳内の変化を、皮質領野活動、単一神経ニューロン活動、神経投射、遺伝子発現のレベルで多角的に明らかにすることが出来た一方、実際に回復を促進する技術の開発にまで至らなかったことは物足りなさを感じている。

個人的にはかなり背伸びをした提案課題であったにもかかわらず、粘り強く実験を行ったことは評価したい。東日本大震災による被災や実験の中断もあったが、周囲の方の励ましもあり、なんとか続けることが出来た。

特に単一神経ニューロン活動の計測に関しては、これまでに経験が無かったことから、実験室のセットアップから行い試行錯誤の連続であった。経験が無いながらも、さきがけのアドバイザーや他のさきがけ研究者からのアドバイスをいただきながら一定の成果を挙げることが出来たことは満足している。何よりも領域会議などを通じて、この分野の第一線で活躍されている多くの方々との交流を深めることが出来たのが、一生残る大きな財産であると感じている。

5. 研究総括の見解

課題目標は達成された。本研究の成果を考慮することにより、リハビリテーション医療などへの BMI 技術の応用がさらに展開されることが期待される。

脳卒中などの脳損傷後、適切なリハビリ訓練を行うなど BMI 技術による支援により機能が回復することは良く知られているが、機能回復メカニズム解明により、さらに有効な脳機能回復法の開発が期待される。例えば、近年、tDCS や TMS などの新たな脳電気刺激法が注目されるが、その機能回復に及ぼす効果は必ずしも高くない。脳損傷後の機能回復メカニズムを知ることで、それに基づいた、より有効な脳電気刺激技術の開発が可能と考えられる。

本研究では、マカクサルを用い、脳損傷後のリハビリ運動訓練による手の把握動作回復の背景にある脳神経システムの変化を、神経生理学的、形態学的、遺伝子発現などの方法を用い、多角的に脳レベル縦断的に調べた。脳損傷後の機能回復期の PET 計測では、損傷部周囲の第一次運動野・運動前野腹側部の両者において、機能回復に伴う活動変化が見られた。これら領域の活動を抑制すると、手の運動機能障害が再発し、この領域の活動変化が機能回復に必須で

あると考えられた。また、この領域では、運動機能の回復期に物体把握時に活動するニューロンが増加した。微小電気刺激による反応閾値上昇が起きていることを考慮すると、運動機能の回復に伴い、損傷周囲の神経細胞で本来の役割分担を越えた汎化が起こったことが示唆された。回復過程におけるタンパクおよび遺伝子発現変化としては、運動野直下の白質領域において、ミエリン鞘の形成に関わるタンパクの発現上昇が見られた。これから、ミエリン鞘の増加による運動出力線維の強化が、運動機能回復に関わると考えられる。DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析では、回復期(損傷後 3 ヶ月)において、損傷側半球の運動前野腹側部において、神経突起伸長や細胞接着など神経の構造変化に関わる遺伝子を含む数百種の遺伝子発現の変動が見られた。特に FGF17 や、SPP1 が、皮質脊髄路の起始細胞(把握機能に重要な役割を果たす)で特異的に発現し、機能回復に伴う発現変動がみられた。

本研究成果は、脳機能回復を促進するニューロリハビリテーション技術の開発等につながることで期待される。

6. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Kojima T, Higo N, et al. Functional annotation of genes differentially expressed between primary motor and prefrontal association cortices of macaque brain. *Neurochemical Research*. 2013, 38, 133-140
2. Yamamoto T, Higo N, et al. SPP1 is expression in spinal motoneurons of the macaque monkey. *Neuroscience Research* 2011, 69, 81-86
3. Higo N, et al. SPP1 is expressed in corticospinal neurons of the macaque sensorimotor cortex. *The Journal of Comparative Neurology* 2010, 518, 2633-2644
4. Higo N, Training-induced recovery of manual dexterity after a lesion in the motor cortex. *The Keio Journal of Medicine* 2010, 59, 4-9
5. Higo N, et al. Increased expression of the growth-associated protein-43 gene in the sensorimotor cortex of the macaque monkey after lesioning the lateral corticospinal tract. *The Journal of Comparative Neurology* 2009, 516, 493-506

(2)特許出願

研究期間累積件数:1 件

1.

発 明 者: 肥後 範行、野崎展史

発明の名称: 簡易式上肢運動モニター装置

出 願 人: 独立行政法人産業技術総合研究所

出 願 日: 2011/4/28

出 願 番 号: 特開2012-231817

(2)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 主要な学会発表

Noriyuki Higo, Nobuo Kunori, and Ichiro Takashima, Correlation between neural activity and motor representation derived from intracortical microstimulation (ICMS) in the primary motor and ventral premotor cortex of the macaque monkey, Society for Neuroscience 2012, New Orleans, USA.

2. 受賞

肥後 範行、マカクサル運動野損傷後の機能回復メカニズム、予防衛生協会研究奨励賞, 2009



3. 著作物

肥後範行、脳損傷後の機能回復に伴う神経システムの可塑的な変化—運動機能回復を促進するニューロモジュレーションの可能性—、脳21、16(1):37-41, 2013

4. 著作物

肥後範行、運動野での可塑性、Clinical Neuroscience, 29(7):787-790, 2011

5. 著作物

肥後範行、大脳皮質損傷後の上肢訓練による運動機能回復、脳21、12(3):20-23, 2009