

令和 4 年 9 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2018～2021

課題番号：17KK0140

研究課題名（和文）サル覚醒行動下の光刺激による手指運動変化とベータ波位相の関係解明

研究課題名（英文）Clarifying of relationship between hand movement and phase of beta oscillation by optogenetic stimulation in awake monkey

研究代表者

渡辺 秀典（Watanabe, Hidenori）

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：00407686

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,500,000円

渡航期間： 21ヶ月

研究成果の概要（和文）：サル大脳皮質運動野でベータ波の特定位相が運動準備中の視覚刺激呈示時に出現する現象（位相ロック）を申請者は発見した。この現象の発生機序を調べるため光遺伝学的手法による光刺激で一次運動野の位相ロックを修飾した。研究は運動制御についてベータ波に着目しているシカゴ大学Dr. Hatsopoulosと共同実施した。光刺激は上肢到達課題中のサル大脳皮質一次運動野の広範囲に応答を与えた。運動閾値下光刺激に対して位相ロックは記録電極間で有意に促進された。本研究は覚醒下の一次運動野ベータ波周期の神経活動の光刺激による操作可能性を示し、感覚刺激に対する位相ロックに一次運動野の内因的の神経回路活動の関与を示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳波に代表される神経活動の振動現象の機能解明は睡眠・記憶を介した免疫系強化や注意欠陥障害児の治療など社会的な期待を受けてる。また神経刺激による行動制御は社会性、パーキンソン病、意識覚醒等に深く関与する事実から神経科学における重要な基盤研究の1つである。行動に直接関係する大脳皮質運動野において周期的神経活動の操作可能性を示した本研究の社会・神経科学的意義は大である。

研究成果の概要（英文）：It has been reported that phase of the oscillations in the motor cortex are locked by visual stimuli instructed task condition in resting periods during the behavioral tasks. To clarify the relationship between motor control and the phase-locking (PL) of beta oscillation, neural activities in the motor cortex were modulated at the timing of visual stimuli by optogenetic stimuli in awake monkey. That work collaborated with Dr. Hatsopoulos at the University of Chicago, who focused on beta oscillations in motor control. Optical stimulation induced evoked potentials in a wide area of the primary motor cortex during a reaching task. Across most recording sites, the PLs with the stimulation under motor threshold enhanced significantly in according to ones in the task trials without the stimulation. These results suggest the involvement of intrinsic neuronal activity in the primary motor cortex in the generation of PL in response to sensory stimulation.

研究分野：神経科学

キーワード：運動制御 オプトジェネティクス(光遺伝学) 脳波 ベータ波 一次運動野 位相ロック 感覚応答
サル

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

ベータ波は運動に関与する 12-30Hz の脳波として運動野を中心に大脳皮質の広範な部位で記録されるがその発生機序や何を表現しているのか不明な点が多い。申請者はサルの上肢到達課題における運動開始前に大脳皮質一次運動野で記録されたベータ波の特定の位相が試行間を通じて外部事象と同期して出現する現象(位相ロック)を発見した。位相ロック出現は力の強弱の出力、運動開始指示信号有無の運動課題の条件に依存したが、一次運動野から入力を受ける筋肉の活動と強い関係はなかった。そこで位相ロック発生時に神経回路の活動を操作した場合の行動変化を記録し、ベータ波位相ロックと運動に因果関係があるかを解明する。

神経回路の活動を操作した場合のベータ波の電気生理学的記録は必須である。また神経活動の修飾については電気生理学的記録を不感にしない光遺伝学的手法による光刺激が適する。基課題では麻酔下実験において一次運動野への光刺激で上肢運動の即時惹起が可能なほどに高効率な光感受性タンパクの発現に成功し、光刺激でサル運動野の神経活動の操作が可能であることを明らかにした(図 1)。

そこで本課題では覚醒下の運動課題中において視覚刺激と同期した光刺激によってベータ波の変化と行動の関係を明らかにする。覚醒行動下のサルの上肢運動の定量分析に豊富な経験を有し、かつベータ波について世界的第一人者であるシカゴ大学の Dr. Hatsopoulos と共同研究をする。

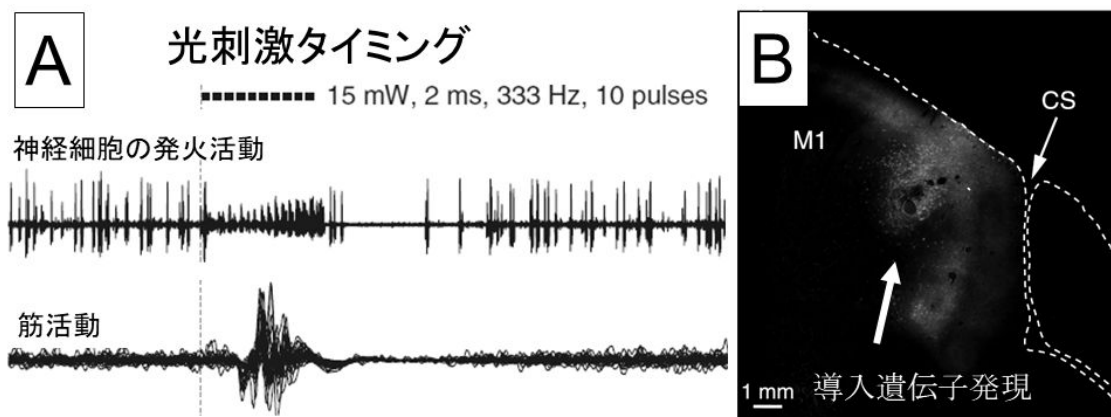


図 1. サル一次運動野における光感受性タンパクの効果的な発現。(A) 光刺激応答。アデノ随伴ウィルスベクター (AAV-DJ-CAG-hChR2(H134R)/EYFP) をサル一次運動野の上肢神経支配領域に注入し、光感受性タンパク(チャンネルロドプシン)を発現させた。一次運動野への照射は上肢の筋活動並びに運動を惹起した。神経支配領域は微小電流刺激によって同定され、光刺激で惹起される身体部位と一致していた。一方で電流刺激で観測されるような刺激強度の増大に応じた単収縮から強縮の変化は光刺激では観察できなかった。また周波数構造を持つ光刺激列(刺激間隔; 10ms, 50ms, 100ms, 125ms)を用いた刺激応答について運動閾値について差はなかった。本結果は、光刺激によって動員される運動単位の上限は電流刺激よりも小であることを、一次運動野において神経活動を誘導させる刺激の周波数選択性はないことを示唆する。(B) 光刺激実験後に組織標本の EGFP を観察し、その蛍光シグナルはベクターの注入部位周辺で最も顕著であった。また被殻及び外側皮質脊髄路において軸索にて EGFP 蛍光シグナルが観測されたのに対して視床では標識される細胞はなかった。更に NeuN の発現している細胞は多数である(91.2%)のに対し、パルバルブミン(PV)、グリア線維性酸性タンパク質(GFAP)の発現細胞はわずかであった(PV; 15.9%, GFAP; 1.9%)。これらの蛍光標本の結果は本実験で光刺激によって運動惹起させた一次運動野の細胞は大脳基底核及び脊髄に投射する興奮性神経細胞が主であることを示唆する。

2. 研究の目的

運動野で発生する位相ロックが実際にどのような運動情報を表現するかを明らかにするために、運動を表現する神経細胞をベータ波位相ロック発生時に光刺激することでベータ波の位相ロックの修飾を試みる。ここでの修飾とは光刺激による位相ロックの不発・促進や発生領域変化である。光刺激後の位相ロックと行動を分析することで、光刺激によるベータ波位相ロックの修飾の有効性を確認する。

3. 研究の方法

実験はシカゴ大学の動物実験プロトコル(71565-13)に準拠し、申請者がシカゴ大学内で実験可能な期間内に実施した。サルに上肢到達課題を KINARM(BKIN Technologies, CA)で習熟させた。課題中はサルの右上肢をフレームに安全に固定し、手位置、肩、肘関節角度を検出した。サル前面に位置するモニターに表示されるカーソルは肢位水平面上の手位置が反映され、カーソルの移動は肩肘運動で操作された。サルは覚醒下の休止状態として3.4秒間カーソルを静止目標に維持した後にランダムに3つの位置のいずれかを示すターゲットキューにカーソルを移動させる。静止目標は円形で表示され、カーソルが円内に位置してから1.7秒後に視覚刺激として目標の色を変化させた(図2)。十分な課題訓練後に大脳皮質左一次運動野の肩領域に CAG-hChR2(H134R)/EYFP を有する AAV ベクターを注入し、続いて産学連携によって開発された光ファイバーが結合された慢性埋込型多点電極アレイ(Matrix Array™, NeuroNexus, US)を同部位に外科的手術にて慢性留置した(図3)。電極アレイは ECoG グリッド(32チャンネル)と6本の3次元皮質内 LFP プローブ(6x16=96チャンネル)で構成され、アレイ中央にプラットフォームから0.8mm突出させた刺激用光ファイバーを配置した。術後、光感受性タンパク質の十分な発現を待って光刺激実験を実施した。光刺激試行ブロックはコントロールとされる無刺激試行ブロックに続いて実施され、光刺激(2ms duration, 10ms interval, 11 train)は課題遂行中の視覚刺激時に与えた(図2)。

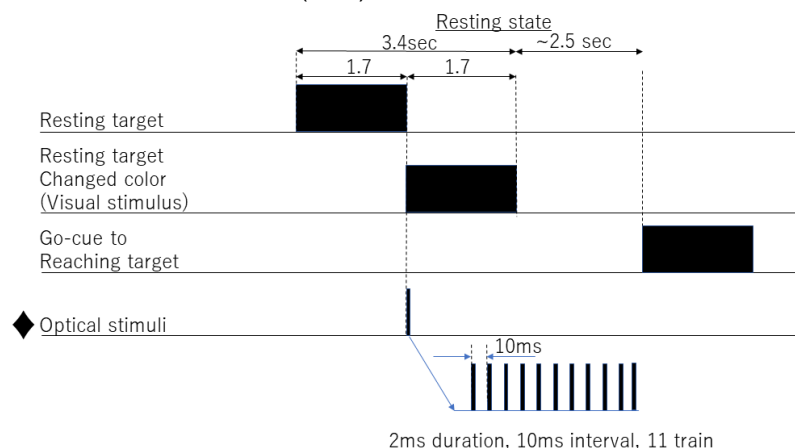


図2. 上肢到達課題デザイン。覚醒休止状態開始1.7秒後に静止目標の色変化を視覚刺激としてサルに呈示される。光刺激無しの試行での神経応答に対して光刺激(◆)有りのそれを評価した。比較において刺激有無の試行は共に50試行以上とした。

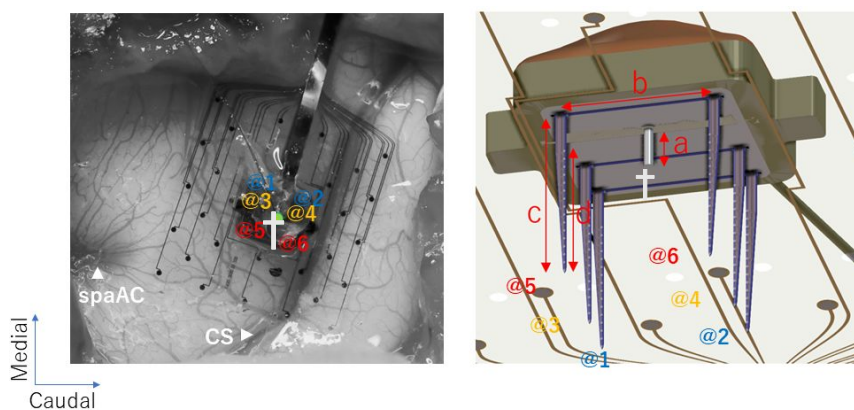


図3. サル慢性埋込型光ファイバー内蔵多点電極アレイの開発と実装。(左パネル)サル左脳一次運動野・肩神経支配部位に慢性留置された電極アレイ。LFPプローブはECoGアレイシート中央に位置する。(右パネル) LFPプローブ配置。アレイ中央部に光ファイバー(+)が配置する。(a,b,c,d)=(0.8,1.65,2,1.5mm)

4. 研究成果

(1)電極アレイと光刺激の有効性の評価。

課題関連の神経活動を休止状態中のベータ波(10-30Hz)とターゲットキューにカーソルを移動させる上肢の運動中の高ガンマ波(80-200Hz)の振幅増加で評価した(図2)。実験期間の最終日であるベクター注入後57日目においては運動中より休止中のベータ波の振幅が有意に大($p < 0.05$, U-test)である信号は65%(84/128)、休止中より運動中の振幅が有意に大($p < 0.05$, U-test)である高ガンマ波は47%(61/128)の電極から記録された。ベータ波と高ガンマ波の振幅変化について交差される41%(53/128)の電極について課題関連神経活動が記録されたと判定した。

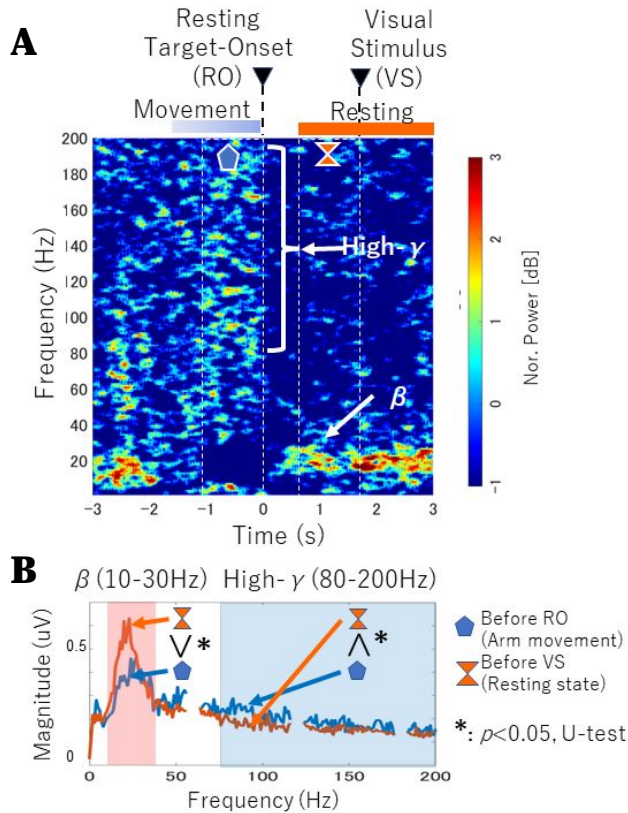
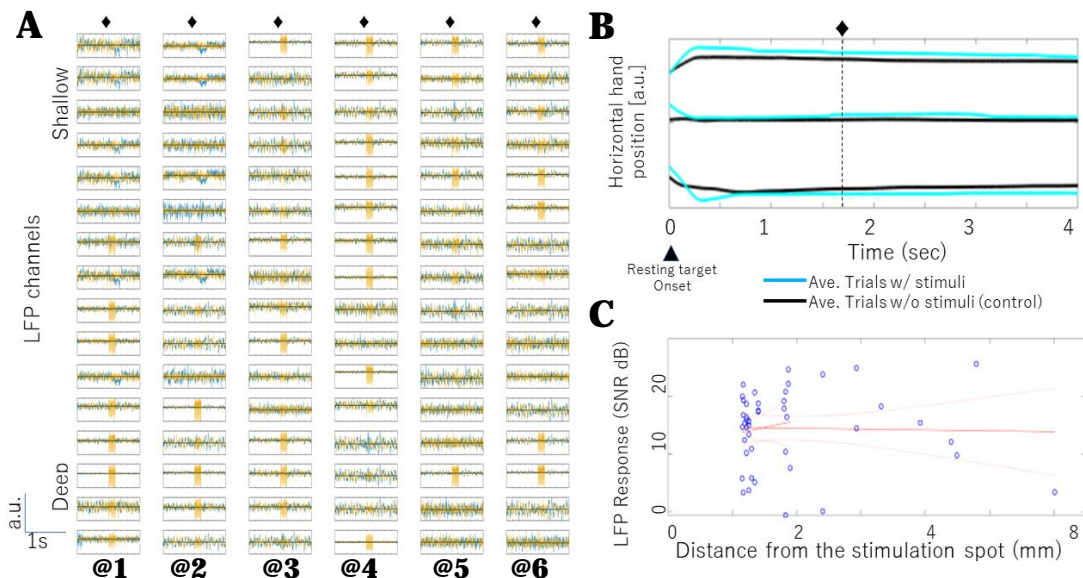


図 4. 周波数解析による課題関連チャンネルの判定。(A) 課題中の神経活動において高ガンマ周波数とベータ周波数帯域の賦活タイミング. 各周波数においてパワーは試行間で規格化された. 課題では到達後 (RO) に休止状態に至る. 休止開始 1.7 秒後に視覚刺激 (VS) が呈示される. 到達前 0.5 秒間 (◆; 運動状態) と視覚刺激開始前 0.5 秒間 (▲; 休止状態) を解析区間とした. (B) 周波数解析による運動状態と休止状態の振幅比較. ベータ周波数帯域 (10-30Hz) においては休止中が運動中よりも, 高ガンマ周波数帯域 (80-200Hz) においては運動中が休止中よりも信号振幅が有意に大 ($p < 0.05$, U-test) であったチャンネルを課題関連信号とした. 課題関連チャンネルの判定は全 128 チャンネルで実施された. ここでは皮質深度 1.8 mm に位置する局所電位についての解析結果を表示した.

光刺激は上肢運動軌道を変化させない閾値下の刺激強度で実施した (図 4). 光刺激に対して 34% の電極から誘発電位応答が観測された (LFP: 33 channels ; 図 5, ECoG: 10 channels). これら刺激応答チャンネルにおける刺激応答振幅について刺激部位からの距離依存性はなかった. 課題関連と刺激応答性について交差される電極は 22% (29/128) であった. 以上の結果は本実験で使用された多点電極アレイの神経活動の刺激・記録の有効性を示す. また本実験で使用した刺激パラメータによる閾値下刺激は皮質下投射経路を直接賦活せず, 電極アレイ内の皮質内ネットワークに一樣な応答効果を与えたことを示唆する.



【キャプションは次ページに譲る.】

(2) 光刺激によるベータ波の修飾を試行間位相コヒーレンス (Phase-locking score) での評価.

光刺激後 300ms 間において 53 の課題関連チャンネルについて光刺激はコヒーレンスの有意な増加を与えた ($p < 0.01$; 刺激応答性チャンネル (29) について増加 23; 減少 6, 刺激非応答性チャンネル (24) について増加 22; 減少 2; 図 6). コヒーレンスの増加について刺激箇所と記録電極間の

図5. 課題中の光刺激応答. (A)光刺激による皮質内誘発電位. 光刺激は視覚刺激と同時に与えた. 各パネルは皮質内電極の位置を示し, 無刺激試行(Blue line)と刺激試行(Yellow line)における皮質内局所電位(local field potential; LFP)の試行平均波形をオーバープロットした. パネルのコラムは皮質深度方向に電極が線形配置された同プローブからの神経活動を示し, 全パネルにおける刺激タイミング(◆)は最上部パネルのそれに準じる. 皮質内の誘発電位については無光刺激試行の視覚刺激時と比較して 33%(33/96)のチャンネルにおいて光刺激に感受性を有した($p < 0.05$, U-test). (B)手位置運動の試行平均軌跡. 手休止位置は体躯水平方向に3か所とした. Black line:無光刺激試行, Blue line:光刺激試行. 本実験では手位置について軌跡変化はないことから光刺激強度は運動閾値下であるとした. (C)刺激応答誘発電位の距離非依存性. 光刺激試行における試行平均波形と無光刺激試行のそれとの信号比(SNR)で刺激応答を評価した. 刺激部位(stimulation spot)は電流源密度解析により推定された. 刺激部位から2mm以上に位置する電極はECoGである. 線形回帰分析(Red line)において皮質内及び全電極において刺激応答に距離依存性はない($p > 0.05$).

距離依存性はなく, 多点電極アレイで記録される脳領域において一様にベータ波位相は修飾された. 本結果は多点電極アレイを用いて記録されるサル覚醒行動課題中におけるベータ波について光刺激による位相修飾の有効性を示す. また本結果は運動野で観測される感覚応答と同期する位相ロックは, 感覚情報処理を主とする脳領域からの受動的応答以外にも運動野内のネットワークダイナミクスによっても影響を受けることを示唆する.

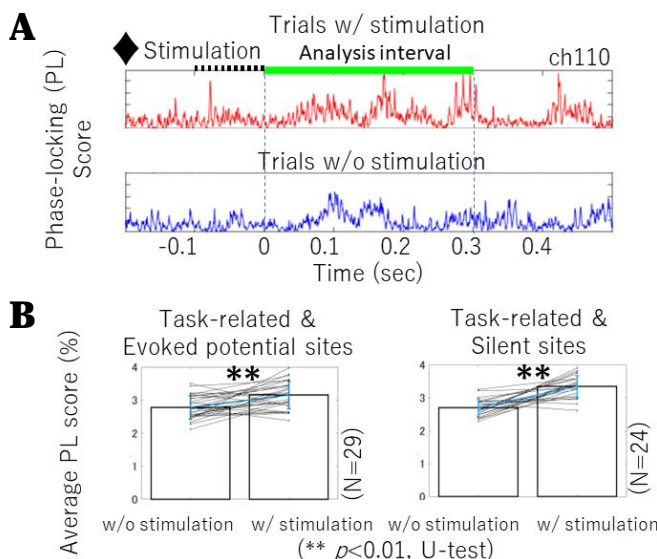


図6. 光刺激によるベータ波の位相ロックの修飾. (A)位相ロックスコアの時系列プロフィール. 視覚刺激呈示は-0.1secである. 高スコアは試行間でベータ波の特定の位相の発生頻度が大である現象を意味する. 解析では刺激後0.3sec間のスコア加算を算出した. (B)刺激の有無による位相ロック発生頻度の変化. 課題関連チャンネルにおいて光刺激に対する感受性の有無に係わらず光刺激により位相ロックの発生頻度は増加する傾向を示した.

慢性埋込デバイスを介した計測・刺激はそれらの留置部位の長期的変位が小さく, 経日的な神経活動変動の計測に適する. 特に筋骨格系や薬理効果がヒトに近い霊長類モデルを使用した医療研究においては有用であり, ヒトに至っては慢性埋込多点電極アレイによるブレインマシンインターフェースが実現している. また光遺伝学的手法による光刺激は特定の細胞種を任意の時間で刺激できるため神経回路の機能的結合の特定が期待される手法として普及している. しかし光刺激応答の継続的な記録のための慢性埋込型光ファイバー内蔵多点電極アレイによるサル中枢神経の神経活動計測は, 生体実装に現実的デザインと外科的手術方法開発の点でこれまで実現が困難であった. 本申請はその計測の成功例となり, サルにおける光刺激の経日的効果についての定点神経活動計測のパイロットデータも得られた. 開発された電極アレイの発展によって, 例えば神経回路への刺激誘導可塑性の長期的効果の研究や, 創薬分野において薬理作用の持続性についての霊長類モデルを利用した研究に新展開を与えると期待する.

本研究は課題実行中における視覚刺激呈示時に発生する大脳皮質一次運動野のベータ波位相が光刺激によって修飾できることで覚醒中に発生する振動的神経活動の操作が可能であることを示した. 神経刺激による行動制御は社会性, パーキンソン病, 意識覚醒等に深く関与する事実から昨今の神経科学における重要な基盤研究の1つである. また脳波に代表される神経活動の振動現象の機能解明は睡眠・記憶を介した免疫系強化や注意欠陥障害児の治療など社会的な期待を受けている. このような背景を受けて刺激による脳波の機能的意義の探索は世界的な注目課題となっている. 霊長類モデルとしてのサルに光遺伝学手法を使用した脳波の修飾は世界的に希少であり, 行動制御に直接関係する大脳皮質において振動的神経活動の操作可能性を示した本研究の社会・神経生理学的意義は大である.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

| | |
|--|--------------------|
| 1. 著者名 Watanabe Hidenori, Sano Hiromi, Chiken Satomi, Kobayashi Kenta, Fukata Yuko, Fukata Masaki, Mushiake Hajime, Nambu Atsushi | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Forelimb movements evoked by optogenetic stimulation of the macaque motor cortex | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Nature Communications | 6. 最初と最後の頁 3253 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-16883-5 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Hidenori Watanabe, Hiromi Sano, Satomi Chiken, Kenta Kobayashi, Yuko Fukata, Masaki Fukata, Hajime Mushiake, Atsushi Nambu | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Forelimb movements evoked by optogenetic stimulation of the macaque motor cortex | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 bioRxiv | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2019.12.13.876219 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Hosaka Ryosuke, Watanabe Hidenori, Nakajima Toshi, Mushiake Hajime | 4. 巻 2 |
| 2. 論文標題 Theta Dynamics Contribute to Retrieving Motor Plans after Interruptions in the Primate Premotor Area | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Cerebral Cortex Communications | 6. 最初と最後の頁 tgab059 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/texcom/tgab059 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件/うち国際学会 8件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Hidenori Watanabe |
| 2. 発表標題 Spatiotemporal dynamics of beta oscillation phase in the monkey motor cortex. |
| 3. 学会等名 Neural Oscillation Conference 2019（招待講演）（国際学会） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kazutaka Takahashi, Hidenori Watanabe, Masaki Makitani, Hajime Mushiake. |
| 2. 発表標題 Sensorimotor integration for cued reaching movements through multiple bands of cortical oscillations from the motor and somatosensory cortices |
| 3. 学会等名 Society for Neuroscience Annual Meeting (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Hidenori Watanabe |
| 2. 発表標題 3D recordings using the Matrix Array |
| 3. 学会等名 Society for Neuroscience Annual Meeting (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Hidenori Watanabe, Kazutaka Takahashi, Hajime Mushiake |
| 2. 発表標題 Three dimensional dynamics of oscillation phase in the monkey motor cortex during a reaching task |
| 3. 学会等名 Society for Neuroscience Annual Meeting (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Hidenori Watanabe, Hajime Mushiake, Kazutaka Takahashi |
| 2. 発表標題 Phase Locking of Oscillation in the Monkey Motor Cortical Areas |
| 3. 学会等名 The 41st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Ryosuke Hosaka, Hidenori Watanabe, Toshi Nakajima, Hajime Mushiake |
| 2. 発表標題 Increasing LFP theta power reflects protecting motor plans from an interruption in primate motor areas |
| 3. 学会等名 The 41st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Ryosuke Hosaka, Hidenori Watanabe, Toshi Nakajima, Hajime Mushiake |
| 2. 発表標題 Increasing LFP theta power reflects protecting motor plans from an interruption in primate motor areas |
| 3. 学会等名 11th Federation of European Neuroscience Societies forum (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Hidenori Watanabe, Kazutaka Takahashi, Kenta Kobayashi, Nicholas G. Hatsopoulos, Hajime Mushiake |
| 2. 発表標題 3D microelectrode array with optical stimulation for modulating neural network dynamics in the monkey motor cortex during a reaching task |
| 3. 学会等名 The 99th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|---|
| <p>所属研究室の研究実績紹介Webページ http://www.neurophysiology.med.tohoku.ac.jp/work/work03/work03_2021.html</p> <p>神経細胞を光によって操作し、サルの手を動かすことに成功 https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2020/06/press20200626-01-hand.html 上記記事はマルチメディアで世界的に紹介される。</p> |
|---|

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------------------|---|---|------------------|
| 主たる渡航先の主たる海外共同研究者 | ハトソポラス ニコラス (Hatsopoulos Nicholas) | The University of Chicago・Organismal Biology and Anatomy・Professor | 海外受入機関における主共同研究者 |
| 主たる渡航先の主たる海外共同研究者 | 高橋 和貴 (Kazutaka Takahashi) | The University of Chicago・Organismal Biology and Anatomy・Researcher | 海外受入機関における共同研究者 |

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-----------|--------------------------------|------------------------|----------------|
| その他の研究協力者 | 小林 憲太 (Kobayashi Kenta) | 生理学研究所・ウィルスベクター開発室・准教授 | ウィルスベクター提供 |
| その他の研究協力者 | 虫明 元 (Mushiake Hajime) | 東北大学・医学系研究科・教授 | 研究助言 |
| その他の研究協力者 | 知見 聡美 (Satomi Chiken) | 生理学研究所・システム脳科学研究領域・助教 | 海外受入機関における実験助言 |

6. 研究組織（つづき）

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-----------|-----------------------------|-----------------------|----------------|
| その他の研究協力者 | 佐野 裕美 (Sano Hiromi) | 生理学研究所・システム脳科学研究領域・助教 | 海外受入機関における実験助言 |
| その他の研究協力者 | 南部 篤 (Nambu Atsushi) | 生理学研究所・システム脳科学研究領域・教授 | 海外受入機関における実験助言 |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 | | |
|--------------------------|---------------------------|--------------------------------|--|
| United States of America | The University of Chicago | Organismal Biology and Anatomy | |