

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 13 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25351004

研究課題名(和文)脳損傷後の運動機能回復の基盤となる分子・解剖レベル変化

研究課題名(英文)Changes of brain structure and gene expression underlying motor recovery after brain damage

研究代表者

肥後 範行(Higo, Noriyuki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・人間情報研究部門・主任研究員

研究者番号：80357839

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：マカクサル第一次運動野に局所的な脳損傷を作成し回復の過程で生じる脳活動の変化を調べたところ、損傷後に把握機能が回復した時期には、運動前野腹側部と呼ばれる脳領域に活動の上昇がみられた。さらに脳活動の変化の背景にある脳の構造変化を知るために、神経の可塑的变化に関わる遺伝子の発現に着目した。神経突起の伸長に関わるGAP-43と呼ばれる遺伝子や、その他の神経の構造変化に関わる遺伝子の発現が、回復期の運動前野腹側部で上昇することが明らかになった。これらの遺伝子発現が運動前野腹側部の神経回路の変化を誘導し、機能回復をもたらした可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Brain activation study using positron emission tomography revealed that the activity of the ventral premotor cortex (PMv) during dexterous hand movements increases when hand movements were restored by motor training after lesion of the primary motor cortex (M1). We also investigated structural changes of neurons that occur during the training-induced motor recovery. Gene expression of growth-associated protein-43 (GAP-43) was increased in PMv during recovery period, suggesting that structural changes occurred in axonal projections from PMv. In addition, an anatomical tracer experiment showed that the projections from PMv to subcortical structures, such as the red nucleus, were more abundant in the M1-lesioned monkeys than those in the intact monkeys. These findings suggest that both functional and structural plastic changes in PMv neurons are induced by motor training after brain damage, and the changes result in the establishment of compensatory motor pathways from PMv.

研究分野：神経科学

キーワード：リハビリテーション 霊長類 神経可塑性

1. 研究開始当初の背景

脳損傷後の運動機能回復は社会からの要請が高いことは言うまでもなく、そのメカニズムを理解することは脳が持つ柔軟性を理解することに繋がり、基礎研究としても重要である。私はこれまで、サル大脳皮質第一次運動野を損傷した後のリハビリ運動訓練が、手の運動機能回復を促進することを明らかにした。さらに手の運動機能回復にとともに、“運動前野腹側部”と呼ばれる脳領域において、活動の変化が生じていることが明らかになった。すなわち回復の背景として、損傷を受けなかった運動前野腹側部が変化することによる“機能代償”があると考えられる。しかし、通常は第一次運動野を介して運動出力を送る運動前野腹側部が、回復後にどのような運動出力経路を用いているのか？という新たな疑問が浮上した。再建された運動出力経路の解剖学的基盤と、その背景にある遺伝子発現を知ることが、リハビリ訓練による運動機能回復メカニズムを理解する鍵になると考えられる。

2. 研究の目的

本研究課題では、第一次運動野損傷後の運動機能回復過程で、機能代償領域である運動前野腹側部から始まる新たな運動出力経路の同定と、その背景にある遺伝子の発現変化を解明することを目的とする。

DNA マイクロアレイをもちいた解析により、機能回復過程での運動前野腹側部における、神経可塑性に関わる遺伝子の発現変化が示唆されている。本研究課題では、おもに組織化学的手法を用いて、どのような遺伝子の発現が、どの細胞で変化するのかを明らかにする。特に神経可塑性に関わる遺伝子に着目して、発現の解析を行う。

つぎに、運動機能回復の基盤となる、運動前野腹側部からの出力経路の変化を明らかにする。解剖学的トレーサーを用いた神経投射の解析に加え、機能的神経回路同定法を用いて、機能回復にともなって強化される出力経路を多角的に検討する。

3. 研究の方法

成体マカクザル(ニホンザルまたはアカゲザル)を対象とし、把握課題を用いた上肢運動訓練を行う。核磁気共鳴画像法(magnetic resonance imaging, MRI)を用いて頭部の解剖画像を撮像し、Horsley-Clarke座標系における大脳皮質第一次運動野の位置を同定する。同定した第一次運動野上の頭骨を除去した後、ケタミンによる鎮静化で皮質内微小刺激を行い、第一次運動野の機能地図を調べる。その後、手運動の支配領域にイボテン酸を注入し不可逆的に破壊する。その後把握課題を用いたリハビリ訓練を行う。申請者らのこれまでの研究結果(Murata et al., 2008)から、損傷後約1ヶ月のリハビリ訓練で手指の巧緻運動の回復が生じることが明らかに

なっている。一方、リハビリ訓練を行わなかった場合には巧緻運動の回復が見られないことを報告している。第一次運動野損傷後の回復過程において、機能代償領域である運動前野腹側部で上昇する遺伝子の発現を、細胞レベルで検証する。最近のDNAマイクロアレイ法を用いた解析により発現上昇が示された遺伝子のうち、主に神経可塑性に関わる遺伝子に着目する。in situ ハイブリダイゼーションなどの組織化学的手法を用いて発現が顕著に見られる領域と層を同定するとともに、細胞特性マーカー分子(興奮性/抑制性神経細胞のマーカー分子など)との二重染色を行うことにより、発現細胞種を同定する。組織切片画像解析用プログラム(キーエンス)を用いて発現の変化を定量的に解析する。

運動前野腹側部からの投射変化を細胞レベルで詳細に明らかにするために、神経情報伝達に関わるミエリン関連タンパクの発現やビオチン化デキストランアミン(Biotin Dextran Amine:BDA)をはじめとした解剖学的トレーサーによる組織学的解析を行う。

4. 研究成果

マカクサル第一次運動野に局所的な脳損傷を作成し回復の過程で生じる脳活動の変化を調べたところ、損傷後に把握機能が回復した時期には、運動前野腹側部と呼ばれる脳領域に活動の上昇がみられた。脳機能イメージングによって認められた脳活動の変化が機能回復に貢献しているかを検証するために、回復直後と回復安定期のそれぞれの時期に、ムシモール(muscimol)と呼ばれる脳活動を抑制する薬剤を用いて運動前野腹側部の活動をブロックしたその結果、損傷と同側の運動前野腹側部では、機能回復後に活動をブロックすると回復した手の巧緻動作に障害が見られた。このことから、損傷同側半球の運動前野腹側部の活動の上昇と機能回復との因果関係が示された。すなわち、この領域の活動上昇が機能回復に寄与していると考えられる。一方、損傷と反対側の運動前野腹側部の活動をブロックしても、手の動作に変化が見られなかったことから、この領域の活動は巧緻動作の回復に直接寄与していないと考えられる。さらにムシモールを用いた一時的不活性化実験により、損傷周辺領域が機能代償に関わることを確認した。すなわち健常の第一次運動野に少量のムシモールを注入した場合には精密把握のみが、多量のムシモールを複数個所に注入した場合には、掌全体を用いた握力把握も含めて障害が生じた。損傷半球では、手指領域の中心は損傷されたため機能しておらず、少量のムシモールでは影響を受けなかった。健常では握力把握に影響を与える程度のムシモールを注入すると、精密把握にのみ影響を受けた。このことから、損傷した第一次運動野では、損傷の周辺領域に精密把握に関わる領域が存在していると考えられる。

精密把握の回復に伴う機能代償の背景に神経回路の変化があると考えられる。神経回路は、神経細胞同士が軸索や樹状突起と呼ばれる部位で結合することで形成されているので、これらの変化を同定できれば神経回路の変化を知ることができる。近年、軸索や樹状突起の構造変化にかかわる遺伝子が数多く見つかっており、そのような遺伝子の発現を指標とすれば軸索や樹状突起の変化を同定することが可能である。第一段階として、軸索伸長に関わる分子として知られるGAP-43 (growth-associated protein-43) の遺伝子発現が、回復過程で脳のどの領域で見られるのかを調べた。その結果、第一次運動野損傷後運動訓練を行った個体では、損傷された第一次運動野と同側半球の運動前野腹側部において、回復期にGAP-43の遺伝子発現が亢進することが明らかになった。神経活動の上昇によってGAP-43の遺伝子発現が上昇することが知られていることから、この遺伝子が、運動訓練と神経回路の構造変化を結びつける鍵となっている可能性がある。

精密把握の回復の背景にある神経回路・投射の変化の詳細を同定するため、解剖学的トレーサーを用いた解剖学的解析を行った。ビオチン化デキストランアミン (Biotin Dextran Amine:BDA)を運動前野腹側部に注入し、1か月後に解剖して染色したところ、運動前野腹側部から発し、皮質下、あるいは反対半球に向かっての線維が同定された。ミエリン鞘の形成に関わるオリゴデンドロサイト前駆細胞マーカーの発現を調べた結果、運動前野腹側部から皮質下への投射経路の周囲には、オリゴデンドロサイト前駆細胞マーカーの発現細胞が多く発現していた。すなわちミエリン鞘の形成により経路を強化することが、損傷後の機能回復に関与している可能性が考えられる。

既存の経路の強化とともに、新たな経路が形成されている可能性がある。運動野損傷後精密把握の回復を示した個体の出力線維終末の分布を健常個体と比較した。ほとんどの領域で、出力線維終末の分布は健常個体と損傷個体で一致していたが、小脳核、特に室頂核では損傷個体のみで運動前野腹側部からの出力線維終末が見られた。3頭の損傷個体すべてで、損傷側の小脳核に運動前野腹側部からの終末が確認された一方で、健常個体では私たちのサンプルでも、先行研究でも、運動前野腹側部から小脳核への投射は確認できなかった。このことから、回復過程で運動前野腹側部から小脳核への投射が形成された可能性が考えられる。量的な変化は赤核など他の投射でも生じていた。第一次運動野の損傷により、皮質脊髄路を介した伝達に障害を受けるが、運動前野腹側部から小脳核や赤核などの運動神経核への投射が形成されることにより、第一次運動野を介さない運動出力の伝達が可能になった可能性がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

Murata Y, Higo N, Hayashi T, Nishimura Y, Sugiyama Y, Oishi T, Tsukada H, Isa T, Onoe H, Temporal plasticity involved in recovery from manual dexterity deficit after motor cortex lesion in macaque monkeys, *The Journal of Neuroscience* (査読有り), vol.35 (1), p.84-95, 2015

Murata Y, Higo N, Oishi T, Isa T, Increased expression of the growth-associated protein-43 gene after primary motor cortex lesion in macaque monkeys, *Neuroscience Research* (査読有り), vol.98, p.64-69, 2015

Higo N, Effects of rehabilitative training on recovery of hand motor function: A review of animal studies. *Neuroscience Research* (査読有り), 78: 9-15, 2014

Higo N, Isa T, Strategies to understand and overcome brain/spinal cord injury. *Neuroscience Research* (査読無し), 78: 1-2, 2014

Yamamoto T, Oishi T, Higo N, Murayama S, Sato A, Takashima I, Sugiyama Y, Nishimura Y, Murata Y, Yoshino-Saito K, Isa T, Kojima T, Differential expression of secreted phosphoprotein 1 in the motor cortex among primate species and during postnatal development and functional recovery. *PLoS One* (査読有り) 8:e65701, 2013

Sugiyama Y, Higo N, Yoshino-Saito K, Murata Y, Nishimura Y, Oishi T, Isa T, Effects of early versus late rehabilitative training on manual dexterity after corticospinal tract lesion in macaque monkeys. *Journal of Neurophysiology* (査読有り)109:2853-2865, 2013

[学会発表](計13件)

Compensatory changes in neuronal firing in the perilesional motor cortex: a single unit recording study in the macaque monkey, 肥後 範行、九里 信夫、高島 一郎, *Neuroscience Meeting 2013*, 米国サンディエゴ、2013/11/12、2013/11

サル内包梗塞モデルの開発と運動機能回復の評価 Development and characterization of a monkey model of internal capsular stroke. , 村田 弓、肥後 範行, 第91回日本生理学会大会, 鹿児島県、2014/03/16

The role of the ventral premotor cortex for functional recovery of grasping after primary motor cortex lesion in macaque monkeys, 村田 弓、肥後 範行, 第 16 回世界作業療法士連盟大会, 横浜、2014/06/19

機能回復にともなう運動関連領野の変化
第一次運動野損傷動物モデルを用いて, 村田 弓、肥後 範行, 脳機能とリハビリテーション研究会学術集会, 東京都江戸川区船堀、2013/04/21

第一次運動野損傷後のつまみ動作の回復と運動関連領野の機能の変化～動物モデルを対象として～, 村田 弓、肥後 範行, 第 25 回活動分析研究大会, 山梨県甲府市、2013/05/18

マカクサル皮質脊髄路損傷後の機能回復に伴う運動関連領野の変化：腹側運動前野の皮質下投射ニューロンにおける SPP1 遺伝子発現上昇, 山本 竜也、肥後 範行、佐藤 明、西村 幸男、大石 高生、村田 弓、吉野-齋藤 紀美香、伊佐 正、小島 俊男, 第 48 回日本理学療法学術大会, 愛知県名古屋市熱田区、2013/05/26

サル第一次運動野損傷後の把握運動に対する運動前腹側部の関わり The role of the ventral premotor area after primary motor cortex lesion in macaque monkeys: involvement in functional compensation of grasping, 村田 弓、肥後 範行、林 拓也、西村 幸男、杉山 容子、大石 高生、塚田 秀夫、伊佐 正、尾上 浩隆, 第 7 回モーターコントロール研究会, 東京大学、2013/09/07

脳損傷後の把握機能回復に対する運動関連領野の役割 - 第一次運動野損傷サルモデルを用いて -, 村田 弓、肥後 範行, 第 26 回バイオエンジニアリング講演会, 宮城県 仙台、2014/01/12

Rewiring of subcortical projections from ventral premotor cortex after primary motor cortex lesion in macaque monkeys, 山本 竜也、林拓也、村田 弓、尾上浩隆、肥後 範行, 第 91 回日本生理学会大会, 鹿児島県鹿児島市、2014/03/17

マカクサル第一次運動野損傷後の機能回復に伴い新たに形成される皮質小脳核路, 山本 竜也、林拓也、村田 弓、尾上浩隆、肥後 範行, 第 21 回脳機能とリハビリテーション研究会学術集会, 千葉市美浜区千葉県立保健医療大学、2014/04/20

内包損傷動物モデルによる把握機能回復過程の解析, 村田 弓、肥後 範行, 第 21 回脳

科学とリハビリテーション研究
会学術集会, 千葉、2014/04/20

マカクサル第一次運動野損傷後の運動機能回復に伴う神経回路の変化 腹側運動前野から小脳核へと投射する新たな出力経路の構築, 山本 竜也、村田 弓、林 隆司、肥後 範行, 第 49 回日本理学療法学術大会, 横浜市西区パシフィコ横浜、2014/05/30

マカクサル第一次運動野損傷後に形成される損傷同側腹側運動前野 小脳核路, 山本 竜也、林 拓也、村田 弓、尾上浩隆、肥後 範行, 第 8 回モーターコントロール研究会, 茨城県つくば市、2014/08/08

〔図書〕(計 3 件)
肥後 範行、リハビリテーションのためのニューロサイエンス 第 2 章リハビリテーションによる脳の変化 p.121-136、メジカルビュー社、2015 年 9 月 30 日出版

肥後 範行、霊長類脳損傷モデルを用いた機能回復メカニズムの解明, 理学療法学, 40(8): 599-603, 2014

肥後 範行、脳の可塑性と運動(17 章)、筋機能改善の理学療法とそのメカニズム 理学療法の科学的基礎を求めて 【第 3 版】、ナッブ、2014 年 5 月 18 日出版

〔産業財産権〕
出願状況(計 1 件)

名称: 非ヒト霊長類を用いた内包脳卒中モデル動物、およびその作成方法
発明者: 村田弓、肥後 範行
権利者: 独立行政法人産業技術総合研究所
種類:
番号: 特願 2014-118781
出願年月日: 2014 年 6 月 9 日
国内外の別: 国内

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
肥後 範行 (Noriyuki Higo)
国立研究開発法人産業技術総合研究所・人間情報研究部門・主任研究員
研究者番号: 80357839