

令和元年6月24日現在

機関番号：14301

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2014～2018

課題番号：26112008

研究課題名(和文)脳・脊髄損傷後の機能回復過程における神経回路の動的変容

研究課題名(英文)Dynamic circuit shift during functional recovery from brain and/or spinal cord injury

研究代表者

伊佐 正 (ISA, Tadashi)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：20212805

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 71,100,000円

研究成果の概要(和文)：脳・脊髄損傷後の機能回復過程における適応回路シフト機構を解明するためにマカクザルの脊髄損傷モデルと一次視覚野損傷モデルを用いて研究を行った。前者では、頸髄C4/C5レベルで皮質脊髄路を選択的切断しても、手指の巧緻運動が数週間で回復するが、ウィルスベクター2重感染法を用い、回復初期には脊髄固有ニューロンが回復に重要な役割を果たすが、回復安定期には他の様々な下行路も回復に貢献し、PNの関与は部分的になることを明らかにした。また、後者のモデルでは、視覚野の損傷後、上丘から視床枕に至る経路が視覚誘導性眼球サッケード運動の生成に関わることをウィルスベクター2重感染による選択的経路遮断法によって証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、我々は、脊髄損傷後の手指の巧緻運動の機能回復における脊髄内の側副路と言える脊髄固有ニューロンの貢献、また一次視覚野損傷後における皮質下の視覚伝導路である上丘から視床枕に至る経路の機能を最先端のウィルスベクターによる経路選択的遮断技術を用いてマカクザルモデルで明らかにした。このような大規模な回路改変による機能代償機構 適応回路シフトの知見は脳・脊髄損傷後の機能回復戦略に重要な指針を与えたと考える。

研究成果の概要(英文)：To clarify the circuit shift mechanism during the recovery from brain and spinal cord injury, we investigated the spinal cord injury and primary visual cortex injury models in macaque monkeys. In the former case, dexterous hand movements recover after the corticospinal tract lesion at C4/C5 segment, and we have demonstrated by using pathway-selective blocking with double viral vector infection technique that the propriospinal neurons in the mid-cervical segments are critically involved in the recovery during the early recovery phase, however during the late recovery phase, other descending pathways also participate in the recovery process and the contribution of propriospinal neurons becomes partial. In the latter case, we have demonstrated by using the same double viral vector infection technique that after the primary visual cortex lesion, the superior colliculus to pulvinar pathway is involved in the recovery of visually guided saccadic eye movements.

研究分野：神経生理学

キーワード：脳損傷 脊髄損傷 機能回復 巧緻運動 サッケード運動 盲視 ウィルスベクター 霊長類

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

皮質脊髄路が脊髄レベル(C4/C5)で損傷されても、手指の巧緻運動が訓練により相当程度に回復することが示されていた (Sasaki et al. J Neurophysiol., 2004; Nishimura et al. Science, 2007 など)。また一次視覚野損傷後でも、訓練により視覚誘導性サッカー運動が顕著に回復することが知られていた (Yoshida et al. J Neurosci 2008 など) が、どのような回路が機能回復に関与するかは明らかでなかった。一方、代表研究者らはマカクザルモデルにおいて、逆行性ウイルスベクターを投射先に、順行性ウイルスベクターを細胞体の位置に注入し、2重感染した細胞において選択的に Tet 系によりドキシサイクリン投与時に破傷風毒素を発現させ、信号伝達を遮断し、行動に影響に与えることに成功していた (Kinoshita et al. Nature 2012)。そこで、この手法を用いることで、上記のような機能回復モデルにおいてどのような回路が機能代償に関与するかを明らかにすることができると考えた。

### 2. 研究の目的

マカクザルの頸髄における皮質脊髄路損傷後の手指の巧緻運動の機能回復過程における代償回路の適応的回路シフト機構を明らかにする。

マカクザルの片側一次視覚野損傷後、障害視野に提示された標的に対する視覚誘導性サッカー運動が回復する過程における回路シフト機構を明らかにする。

### 3. 研究の方法

**脊髄損傷モデルでの実験** 脊髄固有ニューロンの役割：ニホンザルを、上肢を伸ばして小さなイモ片を指先の精密把持でつまんで取るように訓練する。そして下部頸髄 C6-T1 髄節の前角に逆行性ウイルスベクターFuGE-TRE-eGFP.eTeNT を注入、一方で中部頸髄 C2-C5 髄節に順行性ベクターAAVDJ-CMV-rtTAV16 を注入し、中部頸髄から下部頸髄の運動ニューロンに投射する脊髄固有ニューロン (PN) に2重感染を起こさせた。そして1群のサル(n=2)には、ドキシサイクリン投与中に頸髄 C4/C5 髄節での側索背側部 (外側皮質脊髄路) の損傷を行い、その後3-4ヶ月に亘り回復過程を追跡した。また、別の一群のサル(n=4)では、C4/C5 髄節での皮質脊髄路損傷の前で複数回1週間ずつドキシサイクリンの投与を行い、精密把持運動に対する効果を損傷後約3か月まで調べた。そしていずれの群のサルにおいても最後に麻酔・非動化・人工呼吸下にて急性電気生理実験を行い、健常側、損傷側の延髄錐体に刺激電極を置き、それを通じた電気刺激によって誘発されるフィールド電位を下部頸髄の上肢筋運動神経核で記録し、皮質脊髄路損傷及びウイルスベクターによる伝達遮断の効果を評価した。

**脊髄損傷モデルでの実験** 大脳皮質感覚運動野の役割：上肢の到達精密把持運動を訓練した2頭のニホンザルにおいて両側の運動前野から一次運動野、一次体性感覚野にかけてそれぞれ15チャンネルの皮質脳波 (ECoG) 電極を留置し、運動前後の脳活動を記録した。そして頸髄 C4/C5 髄節で側索背側部で外側皮質脊髄路を切断し、その後の機能回復過程を5-6カ月にわたり観察した。そしてその ECoG データ、特に各電極ペア間の Granger 因果を時間・周波数ごとに解析し、その巨大データに対し FARAFAAC (parallel factor analysis) 法という次元圧縮法を適用し、主要な回路構造を抽出した。

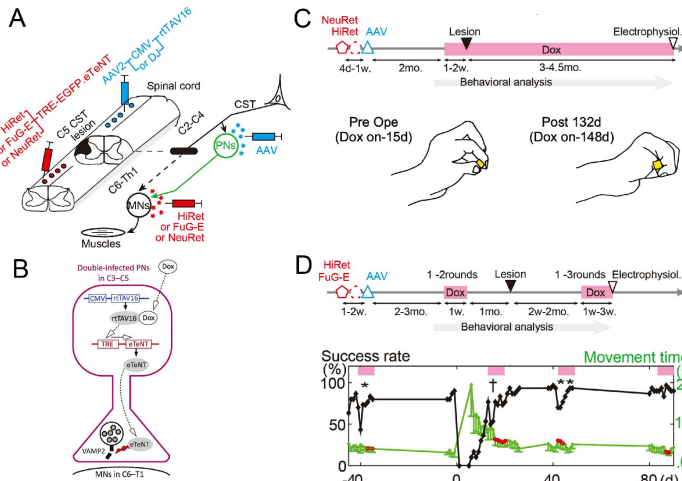
**脊髄損傷モデルでの実験** 側坐核の役割：上記の実験に用いていたサルにおいて、脊髄損傷前と損傷後の回復過程の各段階で側坐核に電極を刺入してフィールド電位を記録。一次運動野との間の Granger 因果を解析した。またムシモルを微量注入して可逆的機能障害を行い、効果を調べた。

**一次視覚野損傷モデルでの実験** 上丘から視床枕に至る経路の役割：視野の様々な位置に提示された標的に対し、眼球の視覚誘導性サッカー運動を訓練したサルにおいて、片側の一次視覚野を吸引除去した。そしてその後約1週間で訓練を再開した。通常1-2カ月で成功率は90%以上に回復した。そこで障害側の視床枕において上丘電気刺激で順行性に応答するニューロンが数多く分布する位置 (腹外側視床枕) を見出し、そこにマイクロシリッジを用いて GABA アゴニストであるムシモルを微量注入し、サッカー運動などの行動に対する影響を解析した。さらに上丘から視床枕に至る経路がサッカーの生成にどの程度寄与しているのかを明らかにするため、逆行性ウイルスベクターFuGE-TRE-eGFP.eTeNT を投射先である腹外側視床枕に注入、一方で上丘に順行性ベクターAAVDJ-CMV-rtTAV16 を注入し、標的とする上丘視床枕投射ニューロンを、ドキシサイクリン投与下で遮断できるようにし、8週間以上経過した後に経路遮断実験を行った。

**一次視覚野損傷モデルでの実験** 上丘から黒質緻密部への入力経路の役割：片側一次視覚野を損傷し、その後視覚誘導性サッカーが回復した段階のサルで、視野中心の注視点を注視している際に指標が健常側ないしは障害側視野の上方に提示された場合には0.7-1.3s後に多量(0.17ml)のジュースが与えられるのに対し、下方に提示された場合にはさらに2s近く待って、注視点消灯から1.5s後に少量(0.06ml)のジュースしか与えられないという条件を与える、吸い口のリッキング行動を計測し、古典的条件付けの成立を検討した。さらに健常側及び障害側の黒質緻密部のドーパミン細胞から単一ニューロン活動を記録、さら一部の実験では記録中に記録側の上丘にムシモルを微量注入し、課題遂行中のドーパミン細胞の発火活動及び古典的条件付け行動に対する影響を解析した。

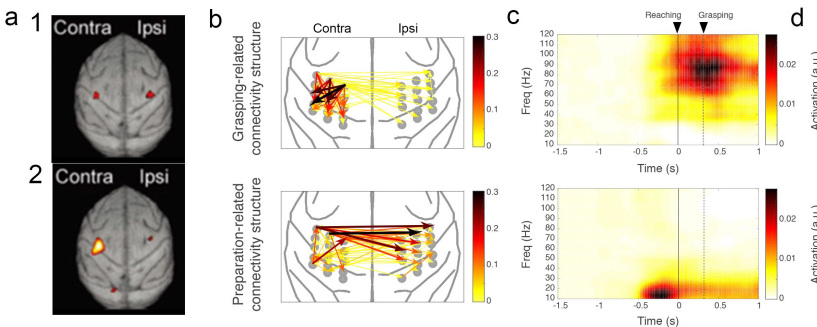
#### 4. 研究成果

**脊髄損傷モデルでの実験 脊髄固有ニューロンの役割：**2頭のサルでウィルスベクター2重感染法とドキシサイクリンの投与により PN の信号伝達遮断を持続的に行いつつ頸髄損傷を行った。すると、手指の巧緻運動は回復せず、第一指の甲と第二指の根元の間でつまむような不完全な把持運動で回復が停止した。一方で脊髄損傷からの回復過程でドキシサイクリンを1週間投与すると、回復初期には回復途上にある精密把持運動が障害を受けたが、回復が進むにつれて、ドキシサイクリンの効果は弱くなり、3カ月後には消失している場合も認められた。しかし、その場合でも急性電気生理実験で、PNを介する伝達は遮断されたままであることがわかったので、効果が弱くなったのは、経路遮断の効果が減弱したからではなく、PN以外の経路が機能回復に加わるようになったからと解釈された。以上の結果から、PNは機能回復の初期に重要な役割を果たすことが分かったが、一方で機能回復が完成してくると、他の回路も回復に参画することで、PNの役割はより限定的になったと考えられた。以上の成果は Tohyama et al. PNAS (2017) として発表された。



(図1) A. ウィルスベクター2重感染法による脊髄固有ニューロン(PN)の選択的遮断。B. その作用機序。C. ドキシサイクリン持続投与によるPNの遮断中に皮質脊髄路損傷を行った場合。D. 脊髄損傷の前後に1週間ずつ脊髄損傷を行った場合の成功率。

運動開始前に  $\beta$  帯域と高  $\beta$  帯域の活動が亢進することがわかった。そして脊髄損傷を行うと、直後は一次運動野の運動中の高  $\beta$  帯域の活動が亢進し、それがその後次第に低減してくることがわかった。また、損傷同側の一次運動野においても回復初期において運動遂行中の高  $\beta$  帯域の活動が亢進することが明らかになった。次に各電極で記録される脳活動の間の Granger 因果を全て解析し、その上で PARAFAC(Parallel factor analysis)法によって次元圧縮を行うと、大きく2つの成分が2頭のサルいずれにおいても分散の70-80%を説明することが明らかになった。ひとつは損傷反対の運動前野から一次運動野に向けて運動中に観察される高  $\beta$  帯域の



(図2) a. 頸髄損傷からの機能回復過程におけるPETによる脳賦活。1. 回復初期(1カ月)。2. 回復安定期(3-4カ月)。b-d. PARAFACによって見つかった2つの成分。上段: 損傷反対側の運動前野から一次運動野に向かう運動中の高  $\beta$  帯域の流れ。下段: 損傷反対側運動前野から損傷同側の運動前野・一次運動野に向かう運動開始前から運動中にかけて増加する  $\alpha$  から  $\beta$  帯域の信号の流れ。

信号の流れで、これは損傷直後一過性に高まり、そのまま数週間で低い値で安定する。もう一つは損傷側の運動前野から健常側の運動前野および一次運動野に向けて送られる運動開始前から運動中にかけての  $\alpha$  帯域の信号の流れで、これは損傷直後2-3週間かけて増大し回復過程に並行する。後者が損傷同側の活動を作り出し、さらに回復過程の基盤となっていることが示唆された。以上の結果から、このような大脳皮質領域間の結合性の動的な切り替えが機能回復過程における適応回路シフトの基盤として明らかになった。今後、この交連性の信号の流れを遮断すると回復過程にどのような影響が出るかを検証する予定である。以上の結果は Chao et al. Cereb Cortex (2018) として発表された。

**脊髄損傷モデルでの実験 側坐核の役割：**以前の回復過程の脳賦活を PET で解析した研究(Nishimura et al. Science, 2007)において損傷反対側の側坐核の血流が回復過程に増大していることが明らかになったことから、機能回復過程における側坐核の役割を検証することにした。まず、側坐核に電極を刺入してフィールド電位を記録し、一次運動野との間の Granger 因

脊髄損傷モデルでの実験 大脳皮質感覚運動野の役割: 通常の上肢の到達把持運動の際には、運動開始前は一次運動野においては20-30Hzの波が主体的であったのが、運動中には60Hzを超える高帯域の活動が主体となる。一方運動前野においては、

帯域と高帯域の活動が亢進することがわかった。そして脊髄損傷を行うと、直後は一次運動野の運動中の高帯域の活動が亢進し、それがその後次第に低減してくることがわかった。また、損傷同側の一次運動野においても回復初期において運動遂行中の高帯域の活動が亢進することが明らかになった。次に各電極で記録される脳活動の間の Granger 因果を全て解析し、その上で PARAFAC(Parallel factor analysis)法によって次元圧縮を行うと、大きく2つの成分が2頭のサルいずれにおいても分散の70-80%を説明することが明らかになった。ひとつは損傷反対の運動前野から一次運動野に向けて運動中に観察される高帯域の信号の流れで、これは損傷直後一過性に高まり、そのまま数週間で低い値で安定する。もう一つは損傷側の運動前野から健常側の運動前野および一次運動野に向けて送られる運動開始前から運動中にかけての  $\alpha$  帯域の信号の流れで、これは損傷直後2-3週間かけて増大し回復過程に並行する。後者が損傷同側の活動を

果を解析したところ、回復初期において運動中に 120Hz を超える高帯域で側坐核から一次運動野に向かう信号の流れが高まることが明らかになった。一方で、側坐核にムシモルを微量注入して可逆的機能障害を行うと、回復初期において手指の巧緻運動が障害された。そしてその際に一次運動野においては 120Hz 以上の高周波数帯域の活動が顕著に減弱した。以上の結果から、回復過程において、側坐核から一次運動野に向かう 120Hz 以上の周波数帯域の信号の流れが高まり、一次運動野の活動を亢進させ、機能回復時の手指の運動制御が行われるという適応回路シフト機構が明らかになった。以上の結果は Sawada et al. *Science* (2015) として発表された。

一次視覚野損傷モデルでの実験 上丘から視床枕に至る経路の役割：今回我々は一次視覚野損傷後の視覚誘導性サッカーボール運動の制御における視床枕の関与を調べた。まず視床枕を記録電極でマッピングし、上丘の電気刺激に反応するニューロンの分布域を探索したところ、短潜時に反応するニューロンは主に腹外側視床枕に分布することが明らかになり、この部位にムシモルを注入した。尚、ムシモルは事前に Gd を混ぜたものを注入し、注入後 MRI 画像を撮像し、実験に用いた注入量では外側膝状体には拡散していないことを確認している。すると視床枕の機能障害はサッカーボールの成功率を顕著に低下させ、さらに成功したサッカーボールにおいても反応時間が遅延した。以上の結果から腹外側視床枕が一次視覚野損傷後のサッカーボール運動の機能代償に関与することが示唆された。しかし、視床枕には大脳皮質連合野も含めた中枢神経系の様々な部位からの入力があるので上記の結果からは必ずしも上丘から視床枕に至る経路が関与しているとは言えない。そこで、以下のように我々が開発したウィルスベクター 2 重感染法を用いて上丘 視床枕経路を選択的に障害する実験を行った。ウィルスベクター注入の 6-8 週間後にドキシサイクリンを投与することで上丘 視床枕経路を遮断したところ、サッカーボール運動が障害された。以上の結果は、上丘 視床枕経路が少なくとも一部は一次視覚野損傷後のサッカーボール運動の機能代償に関与していることを示している。一方、これら一次視覚野損傷サルの外側膝状体を CAMKII に対する抗体で免疫染色し、Schmid らが盲視に関与すると主張している konio 細胞を調べたところ、損傷後 3-8 年経過したサルにおいて健常側に比して 18-34% にまで、おそらく一次視覚野損傷による逆行性変性により減少していたものの、少なからず残存していることがわかり、これらが機能代償に関与する可能性が残された。以上の結果は Kinoshita et al. *Nat Comm* (2019) に発表した。

一次視覚野損傷モデルでの実験 上丘から黒質緻密部への入力経路の役割：視野中心の注視点を注視している際に指標が視野上方に提示された直後に多量のジュースが与えられるのに対し、下方に提示された場合にはさらに 2s 近く待って、注視点消灯から 1.5s 後に少量のジュースしか与えられないという条件を与えると、サルは前者の場合はすぐに吸い口のリッキング行動を行うのに対し、後者の場合は指標の提示が終わり、少量のジュースが与えられる直前に若干のリッキングを行うだけ、という形で古典的条件付け学習が成立した。これは手がかり刺激が盲視野に提示されても同様で、さらに指標の位置と報酬との連合を逆転させた場合にも逆転学習が可能であった。その際に黒質緻密部のドーパミン細胞から神経活動の記録を行うと、大きな報酬を予測させる手がかり刺激に 100ms 程度の短い潜時に反応すること、そしてこの報酬期待信号が中脳上丘を記録中にムシモルによって機能障害すると消失すること、そして同時に学習された古典的条件付け課題が遂行できなくなることが明らかになった。以上の結果は障害視野に提示された報酬を予測させる視覚信号が上丘を介して黒質ドーパミン細胞に伝達され、盲視野における手がかり刺激による古典的条件付けを成立させることが明らかになった。一方、健常視野に提示された手がかり刺激によってドーパミン細胞に誘発される短潜時の報酬予測信号は上丘の機能障害によっては消失せず、また連合学習行動にも影響を与えなかったことから、健常視野での古典的条件付けは視覚皮質を介してドーパミン細胞に伝えられる報酬予測信号によって成立していることが明らかになった。これらの結果から、一次視覚野損傷後、上丘を巡る経路に適応的な回路シフトが起きて盲視野における視覚刺激に対する古典的条件付け行動を成立させていることを示唆された。以上の結果は Takakuwa et al. *eLife* (2017) 及び Takakuwa et al. *Sci Rep* (2018) に発表した。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 31 件)

以下、代表的な論文 6 報

1. Kinoshita M, Kato R, Isa K, Kobayashi K, Kobayashi K, Onoe H, Isa T (2019) Dissecting the circuit for blindsight to reveal the critical role of the pulvinar and superior colliculus. *Nature Communications*, 10(1):135. doi: 10.1038/s41467-018-08058-0.
2. Chao ZC, Sawada M, Isa T, Nishimura Y. (2018) Dynamic reorganization of motor networks during recovery from partial spinal cord injury in monkeys. *Cerebral Cortex*, doi.org/10.1093/cercor/bhy172.
3. Tohyama T, Kinoshita M, Kobayashi K, Isa K, Watanabe D, Kobayashi K, Liu M, Isa T (2017) Contribution of propriospinal neurons to recovery of hand dexterity after corticospinal tract lesions in monkeys. *Proceedings of National Academy of Science USA*: 114:604-609.
4. Takakuwa N, Kato R, Redgrave P, Isa T (2017) Emergence of visually-evoked reward expectation

signals in dopamine neurons via the superior colliculus in V1 lesioned monkeys. *eLife* 6. pii: e24459. doi: 10.7554/eLife.24459.

5. Ishida A, Isa K, Umeda T, Kobayashi K, Kobayashi K, Hida H, Isa T (2016) Causal link between the cortico-rubral pathway and functional recovery through forced impaired limb use in rats with stroke. *Journal of Neuroscience*, 36:455-467.

6. Sawada M, Kato K, Kunieda T, Mikuni N, Miyamoto S, Onoe H, Isa T, Nishimura Y (2015) Function of nucleus accumbens in motor control during recovery after spinal cord injury. *Science*, 350: 98-101.

〔学会発表〕(計 30 件；招待講演のみ---ポスター発表などは省略、以下代表例)

1. Tadashi Isa, Key elements for the recovery from partial spinal cord injury; propriospinal neurons and beyond. The 27<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Neural Control of Movement, May 5, 2017, Dublin, Ireland.
2. Tadashi Isa, Large-scaled network reorganization for recovery after partial spinal cord injury in primates. Special Lecture, The Special Lecture, The 40<sup>th</sup> Annual Meeting of Japan Neuroscience Society, Makuhari, Chiba, Japan.
3. Tadashi Isa, The brain is needed to cure spinal cord injury. Special Lecture, Society for Neuroscience, Nov 17, 2014, Washington DC, USA.

その他の主要な招待講演 31 件 (以下代表的例)

1. Tadashi Isa, Double vector infection technology (DIT) for the pathway-selective manipulation in non-human primates. NIH Symposium on “Genetic technologies for systems neuroscience in non-human primates”, Dec 13, 2018, Bethesda, USA.
2. Tadashi Isa, Dissecting the recovery mechanism after spinal cord injury by multidisciplinary approaches. Cold Spring Harbor Asia, “Primate Neuroscience” Symposium, June 26, 2017, Suzhou, China.

〔図書〕(計 1 件)

1. Tadashi Isa (2015) Large-scaled network reorganization during recovery from partial spinal cord injury. In “Clinical Systems Neuroscience” (eds. Kansaku K, Cohen LG, Birbaumer N), Springer, pp121-138. (分担執筆)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ : <https://nscinbiol.med.kyoto-u.ac.jp/>

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：西村幸男

ローマ字氏名：NISHIMURA Yukio

研究協力者氏名：小林憲太

ローマ字氏名：KOBAYASHI Kenta

研究協力者氏名：吉田正俊

ローマ字氏名：YOSHIA Masatoshi

研究協力者氏名：藤井直敬

ローマ字氏名：FUJII Naotaka

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、研究者個人に帰属されます。