

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：32639

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19H03975

研究課題名（和文）脊髄損傷後の機能回復における内部フィードバック回路の役割

研究課題名（英文）Role of internal feedback neural pathway in functional recovery from spinal cord injuries

研究代表者

武井 智彦（TAKEI, Tomohiko）

玉川大学・脳科学研究所・准教授

研究者番号：50527950

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,200,000円

研究成果の概要（和文）：霊長類における「遠心性コピー」の経路を記録及び操作する技術を確立し、健常状態および運動障害時の運動制御への貢献を明らかにすることを目的とした。まず、皮質脊髄路から「遠心性コピー」を外側網様核へと伝える神経経路（PN-LRN経路）を抑制性人工受容体によって抑制することを試みたところ、行動学的及び電気生理学的な変化を示す有意な効果は認められなかった。この原因として人工受容体の発現量の不足、行動評価法の精度の低さなどが考えられた。そこでさらに運動指令のもととなる運動関連領域の神経活動を記録してトルク外乱を用いた詳細な行動解析を行ったところ、運動応答に対する準備に係る神経活動を認めることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の脊髄損傷に関する研究では、いかに元々の神経連絡や運動機能を「復元」するかということに主眼が置かれてきた。しかし、現段階の技術では完全な神経再生は難しく、また他の神経経路による機能代償も限定的である。そのため、このような不完全な神経回路のもとでは患者自身が「思い通りに動かない身体」を受容してそれに対して自分の行動を適応させること、すなわち運動機能の「復元」ではなく「再獲得」を目指していくことが重要である。本研究は、自分の身体状態の把握と考えられる「遠心性コピー」の神経メカニズムの理解を前進させた。この知見を元にさらなる研究により運動障害の神経機構が明らかになると期待される。

研究成果の概要（英文）：To determine the contribution of the 'efference copy' of motor commands to motor control in normal conditions and during motor disorders, we aimed to establish techniques for recording and manipulating the 'efference copy' pathways in non-human primates. First, we attempted to inhibit the neural pathway transmitting 'efference copy' from the corticospinal tract to the lateral reticular nucleus with the chemogenetic tools but failed to show significant behavioural and electrophysiological changes. Therefore, we further recorded the neural activity in the motor-related areas that are the source of motor commands and conducted a detailed behavioural analysis using torque perturbation, which showed neural activity related to preparation for motor responses. These findings have promoted further research to clarify the cortico-cerebellar interaction and their function with regard to 'efference copy' for the preparation of motor responses.

研究分野：神経生理学

キーワード：運動制御 遠心性コピー 化学遺伝学 皮質電位記録

### 1. 研究開始当初の背景

従来の脊髄損傷に関する研究では、いかに元々の神経連絡や運動機能を「復元」するかということに主眼が置かれてきた。しかし、現段階の技術では完全な神経再生は難しく、また他の神経経路による機能代償も限定的である。そのため、このような不完全な神経回路のもとでは患者自身が「思い通りに動かない身体」を受容してそれに対して自分の行動を適応させること、すなわち運動機能の「復元」ではなく「再獲得」を目指していくことが重要である。この「思い通りに身体が動かない状態」とは、運動制御理論の枠組みでは脳内にある身体の「内部モデル」が実際の身体と乖離した状態と表現できる(図1)。「内部モデル」とは、中枢神経系から発せられた運動指令が、実際にどのような身体運動を引き起こすのかを脳内でシミュレート(予測)するための機構であり(図1a)、その際に受け取る運動指令のコピーは「遠心性コピー」と呼ばれる。脊髄損傷などで運動障害が生じた場合、この「内部モデル」によって「予測された運動」と「実際の運動」の間に誤差が生じてしまうため、正しい運動指令が生成できなくなると考えられる(図1b)。そのため、脊髄損傷からの運動機能回復をする場合、新しい身体状態(損傷した神経回路)に合った「内部モデル」を素早く再学習して、この「誤差」を修正することが不可欠である。

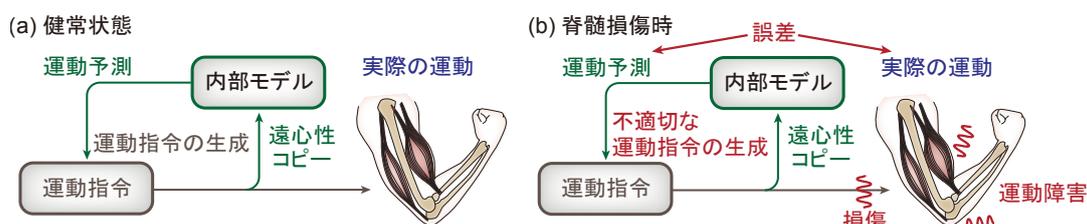


図1. 「内部モデル」を用いた運動制御理論

(a) 健全な状態では、「内部モデル」が運動指令のコピー(「遠心性コピー」)を受け取って実際に起こる運動を正確に予測し、適切な運動指令を生成する。(b) 一方、脊髄損傷などで運動障害が生じた場合、「予測した運動」と「実際の運動(障害された運動)」の間に「誤差」が発生し、適切な運動指令を生成することができなくなってしまう。

問題はこれらの「内部モデル」や「遠心性コピー」が中枢神経系のどこで計算処理されているのかである。従来の研究によって、①頸髄第3節から第4節に存在する脊髄固有ニューロン(propriospinal neuron, PN)から延髄にある脳幹外側網様核(lateral reticular nucleus, LRN)を介して小脳に投射する間接脊髄小脳経路(PN-LRN経路)、および②大脳皮質運動野から橋核を介して小脳に投射する皮質-橋-小脳経路の2つが運動指令の「遠心性コピー」を小脳へと伝える有力な候補である[1](図2)。しかし、現在までのところ、これらの神経経路によって「遠心性コピー」がどのように伝えられ、どのように健全状態での運動制御および脊髄損傷からの機能回復へ貢献しているかは明らかではない。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究では霊長類(マカクザル)を対象として①ウイルスベクターを用いてPN-LRN経路を選択的に遮断する技術を確立し、②機械学習を用いた詳細な行動評価を行い、さらに③運動制御理論に基づくコンピュータシミュレーションを組み合わせることで、PN-LRN経路が健全状態での運動制御および脊髄損傷からの機能回復過程にどのように貢献しているのかを明らかにすることを目的とした。

(2) また「遠心性コピー」の機能と神経基盤をさらに調べるために、①トルク外乱を用いた詳細な運動応答評価、②皮質電位(electrocorticogram, ECoG)による広範な神経活動記録、さらに③微小電気刺激による神経活動修飾法により、「遠心性コピー」の出力元である運動関連領野(一次運動野、運動前野)の機能を検証する実験系を確立することを2つ目の目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 人工受容体によるPN-LRN経路の抑制効果の行動学的評価

被験体のニホンザルは文科省バイオリソースプロジェクトから入手し、動物の飼養と実験は所属機関動物委員会の承認を得た上で行った。サルに

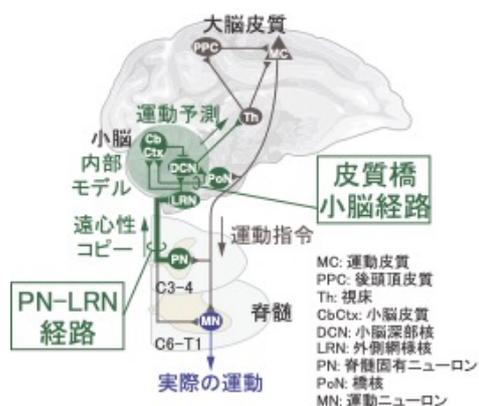


図2. 「内部モデル」の神経基盤仮説

は十分に行動課題を訓練した後、全身麻酔下・無菌的操作によって頭部固定具およびチャンバーを取り付け、MRI および CT 画像を用いて外側網様核 (LRN) の三次元位置を脳定位的に同定し、ガドジアミド水和物の微量の注入によって注入部位を確認した。行動課題としてはケージから約 20cm 離れた距離にあるイモ片 (幅約 0.5 および 6.0cm) を取る課題 (到達把握課題) を訓練した。十分に行動課題を訓練した後、全身麻酔下・無菌的操作により脊髄 (頸髄第 2 節から胸髄第 1 節) の右側中間層へと約 1mm 間隔で、hSyn プロモーターの下に抑制性人工受容体である hM4Di と赤色蛍光色素(mCherry)を発現する AAV ベクター (AAVDJ もしくは AAV2.1) の注入を行った。手術後、発現のために 4 週間待機してから行動学的実験を開始した。

行動学実験では、まず導入麻酔を行い LRN にリガンド注入用のカニューレ (28G、Hamilton 社) を刺入した。その後、hM4Di の高感度リガンドである Deschloroclozapine (DCZ)[2]を注入し、カニューレを取り外した後、サルをケージに戻して麻酔拮抗薬を投与した。覚醒後、約 120 分後に到達把握課題を行い、その動作をビデオカメラ (ソニー、FDR-X3000) を用いて 120fps のフレームレートで撮影した。ビデオ映像から手先の位置情報を解析するため深層学習を用いた姿勢推定システムである DeepLabCut [3]を用いて動作の解析を行った。

実験終了後、導入遺伝子の発現を確認するため組織学的な検討を行った。4%パラフォルムアルデヒド溶液にて灌流固定後、脳幹を取り出して 30%スクロース溶液でスクロース置換したのち、スライディングマイクロトームにて 40 $\mu$ m に薄切した。その後、蛍光色素に対する免疫組織染色を行い、さらに対比染色としてニッスル染色による細胞体の染色を行った。

## (2) ECoG による運動関連皮質電位の記録

被験体のニホンザルは文科省バイオリソースプロジェクトから入手し、動物の飼養と実験は所属機関動物委員会の承認を得た上で行った。サルには十分に行動課題を訓練した後、全身麻酔下・無菌的操作によって大脳前頭・頭頂皮質 (大脳皮質運動前野 (PMd)、一次運動野 (M1)、一次体性感覚野(S1)、頭頂葉 5 野(A5)) をカバーするような多チャンネル (32ch) 皮質電位記録電極 (electro-corticogram, ECoG 電極) を硬膜下に慢性的に埋め込む手術を行った。さらに、サルの上肢運動を詳細に計測するため、サルが外骨格型ロボット (KINARM) を装着して運動課題を行うためのトレーニングを行い、肩と肘の運動に関わる筋群 (16 筋) に対して慢性的にワイヤー電極を埋め込む手術を行い、網羅的に筋活動を計測するシステムを構築した。行動課題としてはトルク外乱に対して素早い運動応答を行う運動課題を訓練した。

## 4. 研究成果

### (1) DREDD による PN-LRN 経路の抑制効果の検討

まずリガンド注入部位付近での組織切片を観察した結果、右の脊髄からの延髄への投射軸索は同側 (右側) に選択的であり、特に腹外側部にある外側網様核(LRN)の細胞体の周囲に高密度な投射を持っていることが分かった。これはこれまでネコで得られた急性実験及び解剖学的な知見と一致するものであった[4]。

続いて行動学的な解析を検討した。リガンドである DCZ 溶液の濃度を 1 から 1mM まで変えて、また対象条件としてリガンドの基剤のみを注入する条件 (Vehicle 条件) と比較した。ビデオ画像から DeepLabCut を用いて手先の位置を測定し、それを三階微分することで動きの滑らかさを示すジャークを算出した。我々のシミュレーションによるパイロット実験から、もし「遠心性コピー」が減少すると小さいターゲットへの到達運動に選択的にジャークが増大する、すなわち運動の滑らかさが損なわれることが確認されている。LRN に高濃度の DCZ 溶液 (100 $\mu$ M) を注入した場合、ジャークが増加する傾向が見られたが、その他の有効濃度とされる 1~10 $\mu$ M ではジャークおよび他のパラメータに有意な差は認められなかった (t-test,  $p>0.2$ )。また同様に、ターゲット大条件においても有意な行動の変化は認められなかった。

このように、免疫組織学的な検討によりターゲットである脊髄から脳幹網様核 (LRN) への神経細胞に遺伝子を導入し目的タンパクを発現させることに成功した。一方、リガンドの投与によって行動学的な結果が認められなかった。この可能性として 2 つの原因が考えられる。まず一つ目は発現量が十分でない可能性がある。これに関して、異なるセロタイプによる感染効率の比較や Tet-OFF システムなど[5]による発現量の増幅などを検討する必要がある。二つ目の可能性は、生じている運動障害を現在の運動課題および評価システムで正しく評価出来ていない可能性である。我々のシミュレーションの結果では、遠心性コピーの影響は本研究で使用した外力のない到達運動よりも、外力を加えた運動においてより顕著な障害が認められた。そのため外力に対する運動応答を検討するため、マニピュランダムを用いた運動課題による運動評価が有効であると考えられる。今回の組織学的及び行動学的な実験の結果は、人工受容体による経路選択的な操作法を確立する上で検討すべき要因を特定するための有用な知見を与えた。

### (2) トルク外乱に対する応答課題における運動関連皮質電位

サルが肩および肘に与えられるトルク外乱に対して運動を行い上肢の姿勢を制御する課題を行わせ、その際の運動関連領野の皮質電位を記録した結果、トルク外乱が与えられる準備期間

において、背側運動前野の $\beta$ 帯域の信号の変化が認められた。これは、準備期間中に背側運動前野を含む神経ネットワークがトルク外乱に対する応答ゲインを適切に調節している可能性を示唆していた。状況に応じたトルク外乱に対する神経応答の差異が最終的に一次運動野の活動の違いとして反映されて、それが筋肉の長潜時応答の違いを生み出していると考えられる。興味深いことに、このような状況に応じたトルク外乱に対する神経応答の違いは、一次運動野よりも小脳、特に大脳小脳の出力核である小脳歯状核において認められるという報告がある[6]。そのため、今回トルク外乱前に運動前野における皮質電位の変化が認められたことから、運動前野と小脳の大脳-小脳連関においてトルク外乱に対する運動応答の予測的な調節が実現している可能性が考えられる。今後、大脳および小脳の同時記録を進めることで、この大脳小脳ループ及びそこで伝達される「遠心性コピー」の機能が明らかにされることが期待される。

- [1] Alstermark B, Lindström S, Lundberg A, Sybirska E. Integration in descending motor pathways controlling the forelimb in the cat. 8. Ascending projection to the lateral reticular nucleus from C3-C4 propriospinal also projecting to forelimb motoneurons. *Exp Brain Res.* 1981;42(3-4):282-98.
- [2] Nagai Y, Miyakawa N, Takuwa H, Hori Y, Oyama K, Ji B, Takahashi M, Huang X-P, Slocum ST, DiBerto JF, Xiong Y, Urushihata T, Hirabayashi T, Fujimoto A, Mimura K, English JG, Liu J, Inoue K, Kumata K, Seki C, Ono M, Shimojo M, Zhang M-R, Tomita Y, Nakahara J, Suhara T, Takada M, Higuchi M, Jin J, Roth BL, Minamimoto T. Deschloroclozapine, a potent and selective chemogenetic actuator enables rapid neuronal and behavioral modulations in mice and monkeys. *Nat Neurosci.* 2020 Jun 18;23(9):1157-67.
- [3] Mathis A, Mamidanna P, Cury KM, Abe T, Murthy VN, Mathis MW, Bethge M. DeepLabCut: markerless pose estimation of user-defined body parts with deep learning. *Nature neuroscience.* 2018 Aug 18;1-12.
- [4] Alstermark B, Ekerot C-F. The lateral reticular nucleus; integration of descending and ascending systems regulating voluntary forelimb movements. *Frontiers in computational neuroscience.* 2015 Aug 5;9:5453-12.
- [5] Watakabe A, Kato S, Kobayashi K, Takaji M, Nakagami Y, Sadakane O, Ohtsuka M, Hioki H, Kaneko T, Okuno H, Kawashima T, Bito H, Kitamura Y, Yamamori T. Visualization of Cortical Projection Neurons with Retrograde TET-Off Lentiviral Vector. *Plos One.* 2012;7(10):e46157.
- [6] Strick P (1983) The influence of motor preparation on the response of cerebellar neurons to limb displacements. *J Neurosci* 3:2007-2020.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Eberle Harry, Hayashi Yoshikatsu, Kurazume Ryo, Takei Tomohiko, An Qi	4. 巻 35
2. 論文標題 Modeling of hyper-adaptability: from motor coordination to rehabilitation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Advanced Robotics	6. 最初と最後の頁 802 ~ 817
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/01691864.2021.1943710	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 該当する
1. 著者名 Song Yunqing, Hirashima Masaya, Takei Tomohiko	4. 巻 16
2. 論文標題 Neural Network Models for Spinal Implementation of Muscle Synergies	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Systems Neuroscience	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) 10.3389/fnsys.2022.800628	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 Oya Tomomichi, Takei Tomohiko, Seki Kazuhiko	4. 巻 3
2. 論文標題 Distinct sensorimotor feedback loops for dynamic and static control of primate precision grip	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	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) 10.1038/s42003-020-0861-0	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 Yaron Amit, Kowalski David, Yaguchi Hiroaki, Takei Tomohiko, Seki Kazuhiko	4. 巻 117
2. 論文標題 Forelimb force direction and magnitude independently controlled by spinal modules in the macaque	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 27655 ~ 27666
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1919253117	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5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tomohiko Takei
2. 発表標題 Neural dynamics of motor cortex for flexible feedback motor control
3. 学会等名 The 8th CiNet Conference: - Beyond Motor Control: Bridging the gap between action and perception (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tomohiko takei
2. 発表標題 Neural dynamics of motor cortex for flexible feedback motor control
3. 学会等名 NEURO2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tomohiko Takei
2. 発表標題 Neural dynamics for adaptive feedback motor control
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 黒木鷹介、増井亮太、伊佐正、武井智彦
2. 発表標題 柔軟な行動選択を支える運動野神経表現
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 黒木鷹介、増井亮太、武井智彦
2. 発表標題 柔軟なフィードバック運動制御を支える運動野神経ダイナミクス
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	伊佐 正  (ISA Tadashi)  (20212805)	京都大学・医学研究科・教授    (14301)	

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
---------	---------