

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：13201

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(A））

研究期間：2020～2022

課題番号：19KK0414

研究課題名（和文）高次運動野の領域特異的な歩行制御機構の解明

研究課題名（英文）Area-specific contribution to locomotor control in premotor cortex

研究代表者

中島 敏（Nakajima, Toshi）

富山大学・学術研究部医学系・准教授

研究者番号：00455792

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,700,000円

渡航期間： 8ヶ月

研究成果の概要（和文）：転倒リスクの高い凹凸面上を歩く時、大脳に複数存在する高次運動野(PMC)が視覚に基づいた歩行制御のどのような側面を担うのかを明らかにすべく、障害物付きのトレッドミル上を歩行するよう訓練したネコをモデル動物として(1)電気生理学的アプローチ、及び(2)薬物による介入的アプローチでPMCを探索しました。

(1)ではPMCのうち4delta野の機能を「複数の肢の協調運動の制御」であろうと特徴づけ、Cerebral Cortex誌上で発表しました。

(2)の解析は現在進行中ですが、4delta野を薬物で一時的に不活性化した結果、運動失調が複数肢に及ぶ傾向を認め、(1)の見方を裏付けると期待されます。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた知見は脳障害に起因する歩行障害の病態生理学的機序についての理解を深め、高次脳機能に着目した障害部位特異的な歩行リハビリテーション法を開発する礎となりました。更に、物に対して手を伸ばすといった「単発の運動」の制御という枠内で機能を特徴づけられてきた高次運動野(PMC)に、歩行運動の制御という異なった角度からアプローチを行い、PMCによる運動一般の制御機構の包括的な理解を促しました。

研究成果の概要（英文）：To explore the roles of the premotor cortices (PMC) in controlling visually guided locomotion on uneven terrain, which entails a high risk of falling, we trained cats to walk on a treadmill with obstacles, and explored the PMC using both electrophysiological (1) and pharmacological (2) approaches.

In approach (1), we characterized the function of the 4delta subdivision of the PMC as interlimb coordination and published our findings in the following journal: Nakajima, T., Fortier-Lebel, N., & Drew, T. (2023). A secondary motor area contributing to interlimb coordination during visually guided locomotion in the cat. Cerebral Cortex, 33(2), 290-315.

Our analysis for (2) is currently ongoing, but preliminary results show that temporary inactivation of the 4delta using pharmacological intervention leads to motor impairment affecting multiple limbs, supporting the findings from (1).

研究分野：システム神経科学

キーワード：ネコ 歩行 高次運動野 単一細胞記録 不活性化 随意運動 視覚 比較生理学

1. 研究開始当初の背景

(1) 歩行調節は我々の運動機能の中でも基本的な要素であり、これらに障害をきたせば生活の自立度は下がり、転倒の危険が増大する。高齢化に伴う筋骨格系や循環系の機能低下に加えて、高次脳機能の低下による歩行制御の障害が転倒・転落を誘発する重要な危険因子である。そこで脳の障害部位に基づいたリハビリテーション方法を開発することが急務となっているが、そのためには脳の各領域が随意的な歩行調節に果たす役割についての正しい知見が不可欠である。

(2) 随意的歩行調節に関与する大脳皮質の機能については、限られた数のグループがネコを用いて研究を続けていた。本研究開始当初の描像は、一次運動野(MI)が歩行中のステップの精密な軌道制御に関与し、頭頂連合野(PPC)が視覚入力に基づいた障害物の空間的な定位、障害物を跨ぎはじめるタイミングの予測、自己身体からみた障害物の位置についての空間的ワーキングメモリ、さらには前肢と後肢の協調に関与するというものであった。サル及びヒトを対象とした研究の流れからは、高次運動野(PMC)もMI、PPCとともに随意的歩行制御に大きく関与すると考えられていたが、当時動物を用いてこれを検証しようとしていたグループは補助事業者の知る限り共同研究先のカナダ・モントリオール大学の Trevor Drew 教授のグループのみであった。

(3) PMC の機能を詳細に知る手段はサルを用いた慢性実験が殆どであり、世界の多くの有力な研究室から様々な PMC の機能仮説が提唱されてきた。ところがサル以外の動物に至っては、解剖学的に PMC の存在は知られていたものの動物が行動中に PMC の活動を直接記録した研究は非常に乏しかった。この点にサルとサル以外の動物で高次運動野の機能を比較し、理解を深めようとする動機があった。直近では、ネコ PMC 中の 2 つの亜領域の随意的歩行制御への関与を示した成果が電気生理学的手法によって得られていた(文献)。しかしネコ PMC には当時まだ研究対象となっていなかった亜領域が複数あり、その機能は未知であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は以下の 2 点であった。

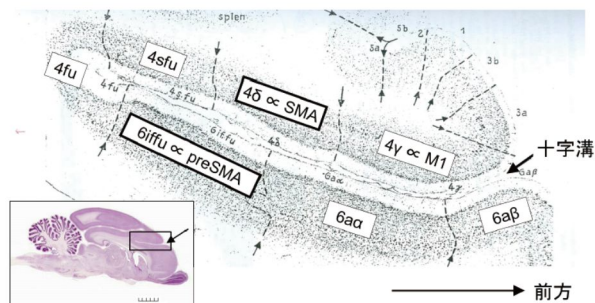
(1) これまでに明らかでなかったネコ PMC の亜領域の 1 つ、4 c, 6a 領域が視覚に基づいた歩行の随意的制御にどのように関与しているのかを単一神経細胞をもとに明らかにすること。

(2) 上記の領域に加え、近年、電気生理学的手法で打ち立てられたネコ PMC 亜領域(6iffu, 4 r)の機能仮説を薬理的な機能脱落实験をもってより確かなものにする。

図 1 にネコ PMC 亜領域の略図を示した。

図 1 ネコ運動関連領域の細胞構築学的分類(Hassler and Muhs-Clement (1964) J Hirnhorsch; 7:377-420を改変)

ネコ大脳の前方領域の傍矢状断中、4 δ, 4sfu, 6iffu, 6a α, 6a βと記された領域は、4 γ (霊長類の一次運動野(MI)と相同)と結合することが知られており、ネコの高次運動野である。6iffu領域はサルの前補足運動野(pre-SMA)と相同な領域であると文献①で示唆した。4 δはサルの補足運動野(SMA)に相同と提唱する(後述)。

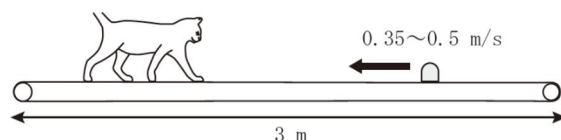


3. 研究の方法

本研究に用いた動物はカナダ連邦政府・ケベック州政府によって認可済みの実験動物飼育機関で研究に供する目的に飼育された動物に限定され、モントリオール大学(Université de Montréal; UdeM)動物実験施設にて飼育されたものである。実験の実施はUdeMのAnimal ethics committeeの承認を受け、Canadian Council for the Protection of Animalsにより立案されたガイドラインに従い行われた。

(1) 動物の訓練:本研究ではネコ2頭をトレッドミル(図2)の上を歩くよう訓練した。トレッドミルにはメインのベルトと障害物を運ぶためのサブベルトが装着されており、ネコは9-12秒に1回程度前方から近づいてくる障害物を跨ぎながら歩くまで訓練された。トレッドミルは全長3mで、ネコは障害物を跨ぐ約10歩手前の位置から、近づいてくる障害物を見ることができた。

図 2 実験系の模式図



(2) 手術：ネコを十分訓練した後，全身麻酔，呼吸管理下で無菌的手術を行い，図1に示した高次運動野と4（一次運動野）の直上の頭蓋骨を除去して神経細胞活動記録用チャンバーを設置した．術後回復期間には上記ガイドラインに基づき鎮痛剤，抗生物質の投与を行った．

(3) 脳マッピング：一頭につき約2か月かけて脳のマッピングを行った．すなわちチャンバーに固定可能な超小型マニピュレーターを用いて大脳皮質に電極を定位的に刺入した．刺入中に観察される神経細胞活動の知覚刺激に対する応答を調べ，皮質内微小電気刺激を行って運動が誘発される体部位および電流閾値を記載し，その分布に基づいて領野の同定を行った．標的となる高次運動野の皮質第V層の錐体細胞のものと思われる大きな活動電位が記録できた深さを1回の穿刺ごとに記録しておき，後に薬剤を注入する深さと定めた．

(4) 第V層に電極の先端を固定した状態で，ネコが障害物を跨ぎながらトレッドミル上を歩行している時の単一神経細胞活動を領域別に多数記録した．

(5) 薬剤(ムシモール：MUSと略)注入による脳局所不活化：MUSはGABAアゴニストであり，注入局所の神経細胞活動を数時間抑制できる．高次運動野の領域別にMUS注入効果を観察するため，1頭につき2か月かけて一連の実験を行った．毎回の実験では，薬剤注入前に5分間トレッドミルの上を歩かせ，control dataとした．その後，予めMUS(5 mg/mL)を充填しておいた微量薬剤注入用カニューラを，あらかじめ定めておいたXY座標より刺入し，事前のマッピングで第V層と同定した深さまでカニューラ先端を進めてMUSを0.5~2 μ L注入した(注入速度：0.1 μ L/min)．MUSの効果は30-90分持続することが経験上知られているので，この間にトレッドミル上を合計10分前後歩かせた．このとき，歩行中の肢の軌道を計測するため歩行の様子をビデオで記録した．現在このビデオの解析が進行中である．MUSで歩行に変化が現われた部位には，後日生理食塩水を2 μ L注入し，歩行に変化がないことを確認した．

(6) 脳標本の作成と注入部位の同定：実験期間終了後2~4か所にカニューラを穿刺して色素を注入し標識とする．ネコは致死量のペントバルビタールで深麻酔され，脳を固定標本とするためブドウ糖入りホルマリン溶液で径心臓的に灌流された．脳切片はNissl法で染色した．現在，顕微鏡下で穿刺部位を一個一個同定した上で，解剖学的構造と標識を手掛かりとし，生理学的に同定した脳領域が解剖学的に定義された脳領域と矛盾しないことを確認中である．

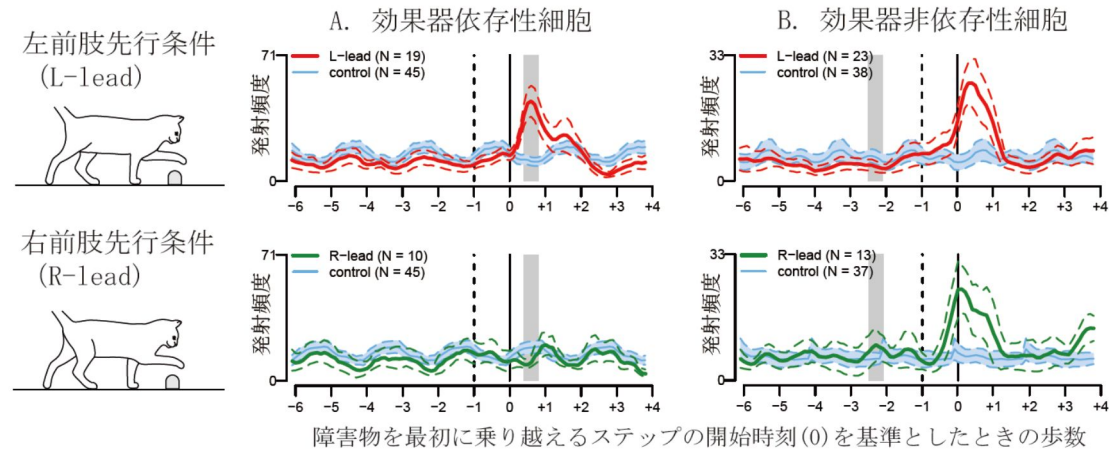
4．研究成果

(1)この研究の結果，4c領域の機能的特性に関して，細胞活動を基に世界で初めて詳細な情報が得られ，これを英語原著論文(文献)及び日本語の総説(文献)で発表した．

4c領域の多くの細胞は，障害物のないトレッドミル上を歩いている時と比べ，障害物を乗り越える際に著しく活動パターンを変化させた．これまでにその活動パターンがよく知られていた一次運動野(4r領域)のように，障害物を乗り越えるべく反対側の前肢あるいは後肢を高く挙上する時に一致して活動が増加する細胞もあったが，4c領域で特徴的であったのは反対側の前肢と後肢が障害物を乗り越える間に特異的に活動が変化する細胞(効果器依存性細胞)群であった．その具体例は図3Aであり，細胞活動記録側と反対側の左前肢から障害物を跨ぎはじめた後に限って活動が増加する．これらの細胞は，随意的にステップを調節して障害物を跨ぎ越えようとするときの前肢と後肢の協調制御に貢献していると考えられた．4c領域全体では，前肢の通過中から後肢の通過までの期間の様々な時相で活動を増加させる細胞がまんべんなく存在していた．一方我々は，4c領域に隣接する4r領域には先行する前肢を障害物の手前に配置するとき一致して活動を増加させる細胞が多く見出されたと報告していた(文献)．これらの知見を併せ，4cと4rは，四肢を順序良く高く挙上しつつ障害物をスムーズに跨ぎ越える過程において，複数の肢が協調した運動をするべく制御を行う単一の領域として考えるべきであると提案した．

4c領域全体では84個の細胞が障害物を乗り越える前後のいずれかの時相で活動の変化を示し，このうち効果器依存性細胞が大多数(71個)を占めた．そのうち記録側と反対側の前肢が先行した時に活動レベルをより増した細胞が25個であり，その具体例が図3Aであった．これに対し，どちらの前肢が先行するかを問わず，先行する前肢が障害物を跨ぎ始めたとほぼ同時に活動を増す細胞(効果器非依存性細胞)は少数(13個；具体例は図3B)であり，効果器依存性細胞の1/5以下の数に留まった．

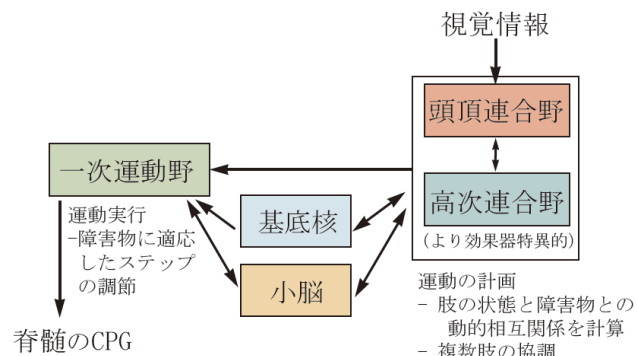
図3 ネコ高次運動野 4 δ c領域の単一神経細胞活動—障害物を跨ぐ場合とそうでない時



トレーサーを用いた組織学的検索により、4 δ 領域は4 δ cや4 δ rとともにPPCの5b野および一次体性感覚野からの入力を受け、かつ一次運動野(4 δ 又はMI)の前肢および後肢支配領域と双方向的に結合することが明らかになった。これらのことから、4 δ 領域はPPCがコードしていると考えられる効果器非依存的な情報(視覚入力に基づいた自己に対する障害物の位置、あるいは障害物を跨ぎ始めるタイミングの予測結果)を効果器依存的な情報、言い換えれば、左右どちらの前肢に関したものを特定した情報に変換して4 δ 領域(一次運動野)に受け渡す。4 δ からは各肢が適切な軌道・タイミングで障害物を跨ぐべく筋活動パターンを特定する信号が出力され、脊髄のセントラル・パターンジェネレーターが制御される、という描像(図4)を描くに足る論拠を得た。サルの高次運動野と活動特性および線維連絡を比較すると、ネコの4 δ 領域はサルの補足運動野(SMA)に相当すると考えるのが妥当であり、本研究の成果はサルのSMAについてこれまでに積み上げられてきた知見のいくつかを「複数肢の協調的制御」という文脈で説明し直せる可能性を秘めている。

(2)詳細な組織学的検索は未だ完了していないが、本研究では、2頭のネコの4 δ の前肢支配領域、4 δ の後肢支配領域、4 δ c、6iffu、6a領域にMUSの微量注入を行うことができたと考えている。定性的には、4 δ 領域を不活性化した時には反対側の前肢あるいは後肢のみに限局した運動障害(障害物を跨ぐ場面で十分な高さに肢先を挙上できない)がはっきりと見られたのに対し、4 δ c領域の不活性化時には4 δ 領域のときと同じ注入量にも拘わらず前肢及び後肢両方に運動障害が起こる場合があった。また、6iffuでも、障害物の手前の適切な位置に軸となる前肢を置くことができないまま反対側の前肢を障害物に向かって進めてしまい、途中で軌道を修正して障害物をやりすごす場合が多かった。これらの観察結果は電気生理学的手法を用いて打ち立てられた各領域の機能仮説と矛盾しない。薬物の作用下でネコが歩行した時のビデオ画像は現在深層学習システム(DeepLabcut)を用いて解析中であり、体の各部位(特に肢先)の軌道の薬物投与前後での変化を、注入領域ごとに定量して特徴付けることを目指している。

図4
高次運動野を含む皮質間ネットワークが皮質下構造と情報のやりとりを行った結果、一次運動野から出力される信号が脊髄のセントラル・パターンジェネレーター(CPG)を制御する描像を示した概念図(文献③より引用)



<引用文献>

Nakajima, T., Fortier-Lebel, N., & Drew, T. (2019). Premotor cortex provides a substrate for the temporal transformation of information during the planning of gait modifications. *Cerebral Cortex*, 29(12), 4982-5008.

Nakajima, T., Fortier-Lebel, N., & Drew, T. (2023). A secondary motor area contributing to interlimb coordination during visually guided locomotion in the cat. *Cerebral Cortex*, 33(2), 290-315.

Nakajima, T. (2022). Cortical Control of Steps During Locomotion to Avoid Obstacles. *Brain and Nerve= Shinkei Kenkyu no Shinpo*, 74(9), 1087-1093. 邦題「大脳皮質による歩行中のステップの制御—障害物を回避するために」

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakajima Toshi, Fortier-Lebel Nicolas, Drew Trevor	4. 巻 33
2. 論文標題 A secondary motor area contributing to interlimb coordination during visually guided locomotion in the cat	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cerebral Cortex	6. 最初と最後の頁 290 ~ 315
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/cercor/bhac068	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 中島 敏	4. 巻 74
2. 論文標題 特集 動的環境への適応系としての歩行 大脳皮質による歩行中のステップの制御-障害物を回避するために	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BRAIN and NERVE	6. 最初と最後の頁 1087 ~ 1093
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11477/mf.1416202187	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中島 敏, 高橋 未来, 福山 秀青, 高草木 薫
2. 発表標題 ネコがターゲット位置を予測したか否かが到達運動前の姿勢調節に現れる
3. 学会等名 第67回中部日本生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋 未来, 中島 敏, 宮岸 沙織, 福山 秀青, 野口 智弘, 千葉 龍介, 高草木 薫
2. 発表標題 ネコ前肢リーチング運動に随伴する姿勢制御の時空間的定量化
3. 学会等名 第100回 北海道医学大会 生理系分科会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

本補助事業者が本研究のためカナダに滞在中、本研究に関連した研究で補助事業者を第二著者として次の論文が出版された。
Fortier-Lebel, N., Nakajima, T., Yahiaoui, N., & Drew, T. (2021). Microstimulation of the premotor cortex of the cat produces phase-dependent changes in locomotor activity. *Cerebral Cortex*, 31(12), 5411-5434.

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	ドゥルー トレバー (Drew Trevor)	モントリオール大学・神経科学部・教授	

	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	フォルティエ・レベル ニコラ (Fortier-Lebel Nicolas)	モントリオール大学・神経科学部・大学院学生	

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

--	--	--	--	--