

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26560454

研究課題名(和文)放射線定位照射による脳疾患モデルを用いた脳機能解析

研究課題名(英文)Functional evaluation in animal models of radiosurgical brain lesions

研究代表者

田中 真樹 (Tanaka, Masaki)

北海道大学・医学研究院・教授

研究者番号：90301887

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：実験動物の特定の脳部位に比較的広範な障害を作成する技術は、脳の機能を調べる基本的なツールになりうる。本研究ではそのひとつとして放射線照射の実用性を検討するとともに、新たな行動および電気生理学的な指標の開発を行い、さらには放射線照射以外の脳深部への破壊集作法の検討を行った。前頭葉皮質に放射線照射を行ったサルの眼球運動を最長8か月間評価し、その障害の経時変化を明らかにした。また、小脳や大脳基底核の病変を検知するための行動指標の開発を行った。新しい障害作成法として、化学遺伝学の手法を用いた可逆的な機能脱落を目指してサル小脳への遺伝子導入を試みた。今後の研究につながる貴重な情報を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Experimental technique to produce focal brain lesions may provide opportunities for future research exploring mechanisms of brain function and recovery from injury. As a candidate method, we evaluated the radiosurgical technique. We also tried to develop behavioral and electrophysiological techniques to examine subcortical brain functions, and explored new methods to generate focal brain lesions. We evaluated the oculomotor behavior in monkeys up to 8 months following irradiation to the frontal eye field. In addition, we have developed several behavioral tasks and a method to record cortical potentials through epi-dural electrodes, both of which are usable to detect subcortical dysfunction. Further, we performed a feasible study of chemogenetic application to monkeys by injecting a viral vector into the cerebellum. Through these studies, we could obtain valuable information for future studies.

研究分野：システム神経生理学、認知神経科学

キーワード：霊長類 事象関連電位 X線照射 脳疾患モデル 眼球運動 行動評価 化学遺伝学 小脳

1. 研究開始当初の背景

脳の損傷例を対象にした神経心理学研究や、脳の一部を可逆的・不可逆的に障害した実験動物の行動解析は、脳の機能を知るための最も基本的かつ重要な研究手法である。しかし、臨床的にみられる数ミリ～数センチメートルにおよぶ比較的広範な障害を脳深部に作成することは技術的に困難であり、効率的で精度のよい実験手法の開発が待たれる。

研究代表者は最近、所属機関内に措置されたがん治療用の放射線定位照射装置を用いて、ヒトと相同の脳をもつマカクザルの脳の特定部位に破壊巣を作成することを試みた。照射した数頭のうち1頭に関しては組織切片を作成していたが、他の個体に関しては本研究開始時にはまだ経過観察中であり、行動評価を引き続き行う必要があった。また、障害効果を評価する方法も十分ではなかったため、それらの改良・開発が必要であった。さらに、研究代表者が目的とする小脳外側部の機能解析にこの技術を適用するためには、放射線照射後の浮腫が問題となるため、脳深部の破壊巣を作成する新しい技術を模索する必要があった。

2. 研究の目的

開頭することなく効率的に実験動物の脳の特定部位に比較的広範な障害を作成する技術は、脳の機能を調べる基本的なツールになるだけでなく、脳深部の梗塞、出血、腫瘍、変性などに引き続いて起こる機能代償のメカニズムを調べる研究を展開することにも利用できる。本研究ではその方法のひとつとして放射線照射の実用性を検討するとともに、行動の評価方法の開発、電気生理学的な指標の開発、さらには脳深部に破壊巣を作成する放射線照射以外の方法の検討などを行う。本研究の具体的な実践目標は以下の通りであった。

- (1) 研究開始当初にすでに放射線照射を行っていたサル2頭の行動評価を継続するとともに、待機的にその脳の病理組織切片を作成し、行動の変化との相関を調べる。
- (2) 研究代表者が目指している大脳基底核や小脳などの機能評価法を開発するため、種々の眼球運動課題を試し、さらには障害時に変化することが期待される行動上パラメータを探る。
- (3) 行動以外の機能指標として、サル大脳からの事象関連電位の記録法を確立する。
- (4) 上記と並行して、脳深部に効率よく破壊巣を作成する方法を模索する。

この中で、前者3項目については申請時点で計画していた通りであるが、に関しては当初は具体的なアイデアが無かった。しかし、最近げっ歯類でよく用いられている化学遺伝学的手法がサルで用いられるようになり、共同研究によって試行できる可能性が生じ、並行してこれを進めた。

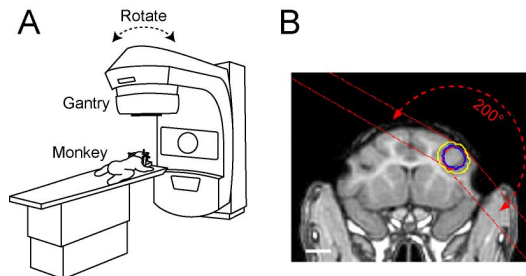


図1. 放射線照射の方法。全身麻酔したサルを脳定位固定装置で固定し、リニアックで照射を行う(A)。事前に撮像したMRIによって照射位置を決める(B)。

3. 研究の方法

サルの飼養に関しては札幌市の許可を得ており、動物実験は北海道大学動物委員会の事前承認を得た上で、文科省ナショナルバイオリソース計画の指針を遵守して行った。サルをあらかじめ訓練し、頭部のMRIを撮像した。イソフルレンによる全身麻酔下で無菌的操作によって眼位測定用のアイコイルと頭部固定用の器具を埋め込んだ。手術後は十分な鎮痛を行い、必要に応じて抗生剤の投与を行った。十分な回復期間の後、眼球運動課題を数ヶ月にわたって訓練した。

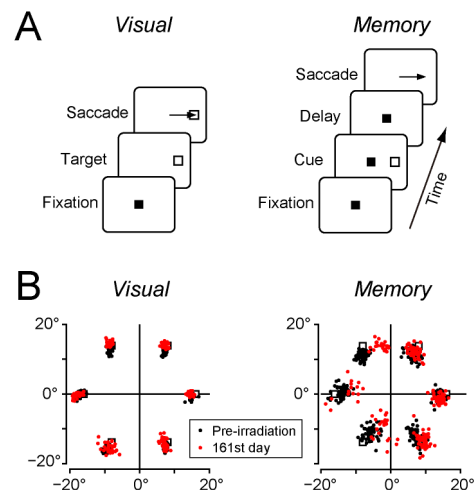


図2. 深部照射後の行動評価(その1)。視覚誘導性サッカードと記憶誘導性サッカード(A)。照射前後での眼球運動の終点の分布(B)。左方向への記憶誘導性課題で終点のばらつきが大きくなっている。

以下、目的の項であげた4点について、それぞれの研究方法を述べる。

(1)前ページ図1のように全身麻酔下で頭部を固定し前頭眼野を中心に130-150Gyの照射を行った。照射前後で経時的に眼球運動の評価を行った。照射後最長8か月間の行動観察の後、深麻酔下で心臓灌流した上で抜脳し、組織切片を作成した。

(2)行動指標の開発に関しては、小脳や大脳基底核が関与すると考えられる時間生成課題やオドボール検出課題、アンチサッカード課題での潜時変化などの解析を行った。また、アンチサッカードや時間生成課題での小脳外側部の機能評価も行った。

(3)一部の個体で硬膜上に金属プレートを埋設し、事象関連電位の記録を試みた。

(4)新たな破壊巣を作成する技術として化学遺伝学の手法の小脳への導入を目指して技術開発を行った。共同研究を通じて、小脳外側にウイルスベクターの接種を行った。

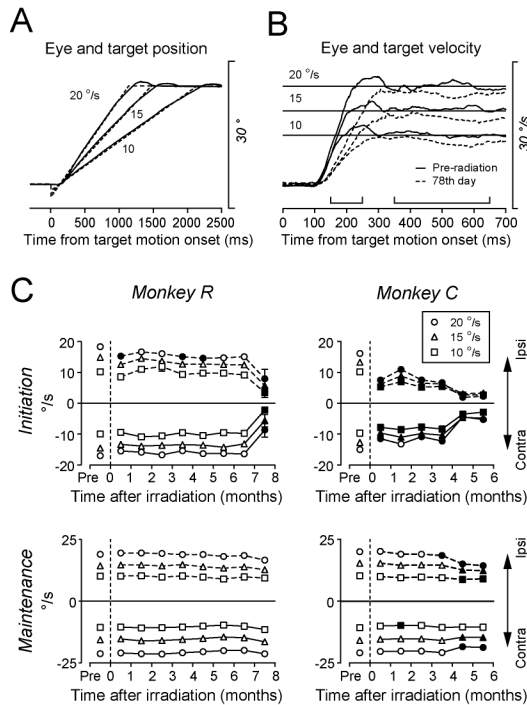


図3. 深部照射後の行動評価(その2). 滑動性追跡眼球運動(smooth pursuit). 照射前後での眼球位置(A)と眼球速度の平均のトレース(B). サッカードは除いてある。(C)運動開始時と維持の際の眼球速度を6-8か月にわたって評価した。

4. 研究成果

(1)放射線深部照射後の機能評価を継続的に行った。記憶誘導性サッカード(図2)と滑動性追跡眼球運動(図3)で明らかな変化が認められ、これを最長8か月間追跡調査した。これらの研究成果を英文原著として発表した(Kunimatsu et al., 2015)。

(2)脳損傷後の機能評価に用いるために、様々な課題でサルの行動解析を行い、多くの

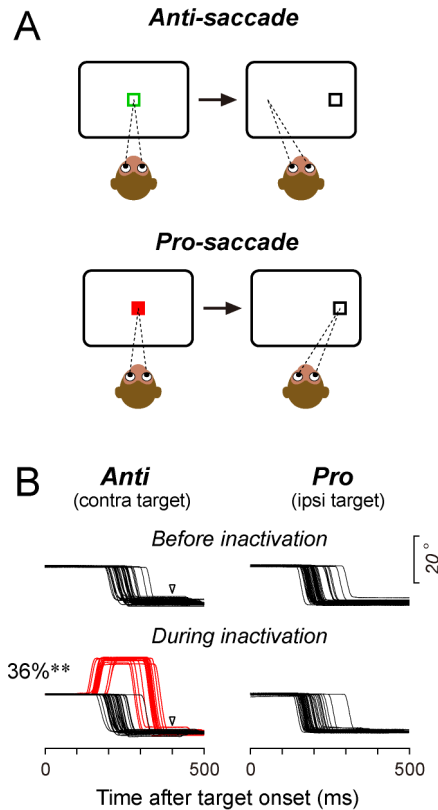


図4. 行動評価法の開発. アンチサッカード課題とプロサッカード課題(A). 固視点の色でターゲットに対する反応を変化させる。小脳歯状核へのムシモール投与により、アンチサッカードの失敗試行が増加するが、プロサッカードには変化がない(B)。

学会発表を行った。また、小脳外側部の機能評価のパラメータを探るために、アンチサッカードへの小脳の薬理的な不活化の影響を調べた(図4)。また、時間生成課題への小脳の関与や、潜時と瞳孔径の相関なども調査した。これらの研究成果の一部を原著論文として発表することができた(Kunimatsu et al., 2016; Suzuki et al., 2016; Ohmae et al., 2017)。これらの行動指標は今後、脳深部の破壊巣や回復過程の評価に利用できると考えられる。

(3)サルの事象関連電位を計測することに挑戦した。最初は頭皮上からの記録を試みたが、日ごとに波形が変化して、信頼できるデータを得ることができなかった。そのため、1頭の硬膜上に複数のプラチナ板を慢性的に埋設し、ここから脳波を導出することを試みた。現在、良好な事象関連電位の記録が得られており、様々な行動課題での測定を試みている。今後は上記の行動指標とともに、硬膜上電極からの脳波記録も脳深部の障害とその回復過程の機能評価に用いることができると期待される。

(4)最後に、これらの研究と並行して、放射線照射に代わる脳深部の破壊巣の作製技術

を模索した。共同研究を通じて小脳プルキンエ細胞特異的なプロモータ下に変異型のヒトムスカリン性受容体 (hM4) を発現するアデノ随伴ウイルスベクターを入手し、小脳外側への接種を試みた。マンガンを加えることで、注入部位を正確にMRIで確認することができた(図5)。接種量が少なく、リガンド投与による行動変化を確認するには至らなかったが、化学遺伝学的手法を用いた研究を進めるにあたっての様々な課題が明らかになり、今後の研究につながる大変貴重な情報を得ることができた。

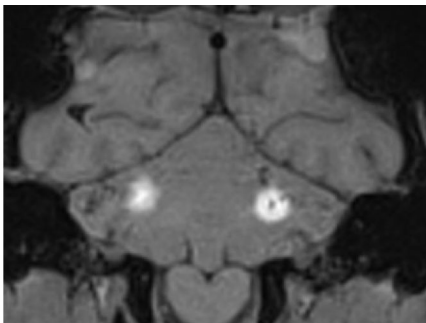


図5. 新たな脳深部破壊法の開発。ウイルスベクターを小脳外側部に接種する際、水和マンガンを混ぜて注入部位をMRIで確認した。

< 引用文献 >

- Kunimatsu, J., Miyamoto, N., Ishikawa, M., Shirato, H. & Tanaka, M. (2015) Application of radiosurgical techniques to produce a primate model of brain lesions. *Front. Syst. Neurosci.* 9: 67. DOI:10.3389/fnsys.2015.00067
- Kunimatsu, J., Suzuki, T.W. & Tanaka, M. (2016) Implications of lateral cerebellum in proactive control of saccades. *J. Neurosci.* 36: 7066-7074. DOI:10.1523/JNEUROSCI.0733-16.2016
- Suzuki, W.T., Kunimatsu, J. & Tanaka, M. (2016) Correlation between pupil size and subjective passage of time in non-human primates. *J. Neurosci.* 36: 11331-11337. DOI:10.1523/JNEUROSCI.2533-16.2016
- Ohmae, S., Kunimatsu, J. & Tanaka, M. (2017) Cerebellar roles in self-timing for sub- and supra-second intervals. *J. Neurosci.* 37: 3511-3522. DOI:10.1523/JNEUROSCI.2221-16.2017

5 . 主な発表論文等

- [雑誌論文] (計10件) 【すべて査読あり】
- Matsushima, A. & Tanaka, M. (2014) Different neuronal computations of spatial working memory for multiple

- locations within versus across visual hemifields. *J. Neurosci.* 34: 5621-5626. DOI:10.1523/JNEUROSCI.0295-14.2014
- Matsushima, A. & Tanaka, M. (2014) Differential neuronal representation of spatial attention dependent on relative target locations during multiple object tracking. *J. Neurosci.* 34: 9963-9969. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4354-13.2014
- Kunimatsu, J., Miyamoto, N., Ishikawa, M., Shirato, H. & Tanaka, M. (2015) Application of radiosurgical techniques to produce a primate model of brain lesions. *Front. Syst. Neurosci.* 9: 67. DOI: 10.3389/fnsys.2015.00067
- Yoshida, A. & Tanaka, M. (2016) Two types of neurons in the primate globus pallidus external segment play distinct roles in antisaccade generation. *Cereb. Cortex* 26: 1187-1199. DOI:10.1093/cercor/bhu308
- Ohmae, S. & Tanaka, M. (2016) Two different mechanisms for the detection of stimulus omission. *Sci. Rep.* 6: 20615. DOI:10.1038/srep20615
- Kunimatsu, J., Suzuki, T.W. & Tanaka, M. (2016) Implications of lateral cerebellum in proactive control of saccades. *J. Neurosci.* 36: 7066-7074. DOI:10.1523/JNEUROSCI.0733-16.2016
- Kunimatsu, J. & Tanaka, M. (2016) Striatal dopamine modulates timing of self-initiated saccades. *Neuroscience* 337: 131-142. DOI:10.1016/j.neuroscience.2016.09.006
- Suzuki, W.T., Kunimatsu, J. & Tanaka, M. (2016) Correlation between pupil size and subjective passage of time in non-human primates. *J. Neurosci.* 36: 11331-11337. DOI:10.1523/JNEUROSCI.2533-16.2016
- Uematsu, A., Ohmae, S. & Tanaka, M. (2017) Facilitation of temporal prediction by electrical stimulation to the primate cerebellar nuclei. *Neuroscience* 346: 190-196. DOI:10.1016/j.neuroscience.2017.01.023
- Ohmae, S., Kunimatsu, J. & Tanaka, M. (2017) Cerebellar roles in self-timing for sub- and supra-second intervals. *J. Neurosci.* 37: 3511-3522. DOI:10.1523/JNEUROSCI.2221-16.2017

[学会発表] (計 16 件)

- 田中真樹 (2014.11.2) 「計時と予測の神経機構」: 日本神経回路学会オータムスクール

(ASCONE)かたくら諏訪湖ホテル、長野県・諏訪市

田中真樹(2014.12.13)

“Neural mechanisms of temporal monitoring and prediction” : 2014年度包括型脳科学研究推進支援ネットワーク冬のシンポジウム、東京医科歯科大、東京都

田中真樹(2015.3.13)「大脳小脳連関と高次機能」:平成26年度 京大霊長研共同利用研究会「霊長類脳科学の新しい展開とゲノム科学との融合」、京大霊長研、愛知県・犬山市

Tanaka, M.(2015.4.24) “Role of the cerebellum in temporal prediction” :LSR Seminar, NEI/NIH, Bethesda, MD, USA

Tanaka, M.(2015.4.27) “Transformation of temporally-specific cerebellar signals through thalamocortical pathways” :Janelia Conference on Thalamus and Corticothalamic Interactions. HHMI Janelia Research Campus, Ashburn, VA, USA

Tanaka, M.(2015.4.30) “Temporal information processing in the primate brain” :McGovern Institute Neuroscience Seminar. McGovern Institute for Brain Research, MIT, Boston, MA, USA

田中真樹(2015.5.29)「小脳の時間情報」:東京都医学研究所セミナー、東京都医学研、上北沢、東京都

Tanaka, M.(2015.7.28) “Neuronal mechanism of temporal prediction in the cerebellum” 第38回日本神経科学大会シンポジウム「時間認知の神経機構」、神戸国際会議場、神戸市

Tanaka, M.(2015.9.12) “Roles of subcortical climbing activity in self-timing” : International Symposium on the Science of Mental Time. Campus Innovation Center Tokyo, 東京都

田中真樹(2015.12.4-5)「眼球運動と高次機能」:生理研研究会「行動制御における脳領域間の機能連関」、生理研、愛知県・岡崎市

田中真樹(2016.3.11)「眼球運動を指標にした時間情報処理の解析」:平成27年度 京都大学霊長類研究所共同利用研究会「霊長類脳科学の新しい展開とゲノム科学との融合」、京大霊長研、愛知県・犬山市

田中真樹(2016.10.28)「眼球運動で探る小脳の高次機能」:第46回日本臨床神経生理学会 シンポジウム11「眼球運動の基礎と臨床」、ホテルハマツ、福島県・郡山市

田中真樹(2016.12.7)「皮質下ループによる時間情報処理」:平成28年度生理研研究会「大脳皮質の機能原理を探る」、生理研、愛

知県・岡崎市

田中真樹(2017.3.18)「大脳皮質下ループによる高次運動調節」:平成28年度 京都大学霊長類研究所共同利用研究会「集団的フロンティスの発現と創発の解明を目指して」、京大霊長研、愛知県・犬山市

Tanaka, M.(2017.3.26-30) “Subcortical mechanism of self-timing” : 12th International Basal Ganglia Society Meeting (IBAGS2017) Session 3: Neurophysiology and behavior in non-human primates, Mérida, Yucatan, Mexico

Tanaka, M.(2017.3.31) “Neural mechanism of temporal prediction in the primate brain” : Neuroscience Seminar, Universidad Nacional Autonoma de Mexico (UNAM), Queretaro, Mexico

[図書](計5件)【すべて査読なし】

植松明子、田中真樹(2015)「高次脳機能と小脳」In: Annual Review神経2015(鈴木則宏、祖父江元、宇川義一 他編)中外医学社、東京(pp. 107-114, ISBN: 987-4-498-22815-3)

田中真樹(2015)南山堂医学大辞典(第20版)(分担執筆)南山堂、東京(ISBN: 978-4-525-01080-5)

田中真樹(2014)「聴覚・前庭系」In: 心理学辞典(下山晴彦、筒井健一郎 他編)誠心書房、東京(pp. 473-475, ISBN: 978-4-41430-507-4)

田中真樹(2015)南山堂医学大辞典(第20版)(運動残像、対応点、中心視、複視、ホロプタ、立体視、立体認知、両眼視、運動視)南山堂、東京(ISBN: 978-4-525-01080-5)

田中真樹(2015)神経系の構造 - 局所からネットワークまで - 運動制御・脳、脳神経外科プラクティス6(三國信啓、深谷親編)文光堂、東京(pp. 59-61, ISBN:978-4-8306-2406-3)

[その他]

研究室ホームページ

<http://niseiri.med.hokudai.ac.jp/>

ScienceNews記事 "Eyes offer window into brain's timekeepers"

<https://www.sciencenews.org/article/eyes-offer-window-brains-timekeepers>

Journal of Neuroscience誌Journal Club Faber, N.J. Neuromodulation of pupil diameter and temporal perception. *J Neurosci* 37: 2806-2808 (2017)

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 真樹(TANAKA MASAKI)

北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：90301887

(3) 連携研究者

國松 淳 (KUNIMATU JUN)
北海道大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：50632395

竹谷 隆司 (TAKEYA RYUJI)
北海道大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：00756322

(4) 研究協力者

石川 正純 (ISHIKAWA MASAYORI)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：80314772

宮本 直樹 (MIYAMOTO NAOKI)
北海道大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：00552879