慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	リハビリテーションは運動野におけるミクロ機能シフトを効率化するか
Sub Title	Verification of the effects of rehabilitation on neural circuit reorganization in motor cortex
Author	近藤, 崇弘(Kondō, Takahiro) 牛場, 潤一(Ushiba, Jun'ichi)
Publisher	
Publication year	2019
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2018.)
JaLC DOI	
Abstract	ラット両側皮質脊髄路損傷モデルに対し神経細胞活動の可塑性を検証したところ、運動野において208 ± 7.2個の神経細胞活動を記録できた(n=3)。上肢の到達運動を行なう際のラット運動野の神経活動を記録したところ、12.7個(6.1%)の細胞が到達運動に関連して活動することが確認された。これらの神経細胞は、脊髄損傷1-2週後では到達運動に関連する細胞が減少し、その後上昇することが確認された。マーモセ ット運動野においても同様に、皮質脊髄路損傷の損傷前、損傷直後(麻痺)、回復期において動員される神経細胞が変化することが確認された。 The plasticity of neuronal activity was examined in a rat corticospinal tract injury model. 208 ± 7.2 neuronal activities were recorded in the motor cortex. Neural activity in the rat motor cortex during arm reaching movements was recorded, and 12.7 cells (6.1%) were found to be active in association with reaching movements. It was confirmed that the number of these nerve cells related to reaching movement decreased 1 -2 weeks after injury and increased thereafter. Similarly, in the marmoset motor area, it was confirmed that neurons mobilized before, immediately after (paralysis), and during recovery from corticospinal tract injury changed.
Notes	研究種目 : 若手研究(B) 研究期間 : 2017 ~ 2018 課題番号 : 17K13067 研究分野 : 神経科学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_17K13067seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　元 年　 ５ 月 ３０ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2017～2018
課題番号：１７Ｋ１３０６７

研究課題名（和文）リハビリテーションは運動野におけるミクロ機能シフトを効率化するか

研究課題名（英文）Verification of the effects of rehabilitation on neural circuit reorganization in motor cortex.

研究代表者
近藤　崇弘（Kondo, Takahiro）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任助教

研究者番号：７０７５９８８６

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,100,000円

研究成果の概要（和文）：ラット両側皮質脊髄路損傷モデルに対し神経細胞活動の可塑性を検証したところ、運動野において208 ± 7.2個の神経細胞活動を記録できた(n=3)。上肢の到達運動を行なう際のラット運動野の神経活動を記録したところ、12.7個(6.1%)の細胞が到達運動に関連して活動することが確認された。これらの神経細胞は、脊髄損傷1-2週後では到達運動に関連する細胞が減少し、その後上昇することが確認された。 マーモセット運動野においても同様に、皮質脊髄路損傷の損傷前、損傷直後(麻痺)、回復期において動員される神経細胞が変化することが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
この内視鏡レンズを用いた観察手法は、より脳の深部に位置する大脳基底核や海馬などの領域における観察にも応用が可能であり、運動や認知、記憶などの霊長類における複雑な脳機能に関わる神経ネットワークの研究の有力なツールとなる。さらに精神・神経疾患モデルマーモセットに対し適用することで、ヒトにおける精神・神経疾患の新たな治療へ展開されることが期待されます。
リハビリテーションは様々なメカニズムが複合的に合わせることで運動機能回復に寄与するが、本研究ではその中でも脊髄損傷後に局所回路の再編成がどのように起こるかIn vivo カルシウムイメージング手法を用いて解析することができた。

研究成果の概要（英文）：The plasticity of neuronal activity was examined in a rat corticospinal tract injury model. 208 ± 7.2 neuronal activities were recorded in the motor cortex. Neural activity in the rat motor cortex during arm reaching movements was recorded, and 12.7 cells (6.1%) were found to be active in association with reaching movements. It was confirmed that the number of these nerve cells related to reaching movement decreased 1 -2 weeks after injury and increased thereafter. Similarly, in the marmoset motor area, it was confirmed that neurons mobilized before, immediately after (paralysis), and during recovery from corticospinal tract injury changed.

研究分野：神経科学

キーワード：マーモセット　カルシウムイメージング　脊髄損傷　運動制御

様　式　C－１９、F－１９－１、Z－１９、CK－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

脊髄損傷や脳卒中などの中枢神経損傷は、随意運動に関わる運動野と脊髄を結ぶ神経連絡が阻害されることで麻痺を呈する病態である。これらに対する治療法としてリハビリテーションは筋萎縮予防や拘縮予防する効果だけでなく、近年では脳回路再編成を促すことで麻痺症状の回復を導く効果があると考えられるようになった。ラット脳卒中モデル(Ishida et al., *J Neurosci.* 2016)や皮質脊髄路損傷モデル(Mosberger et al., *Cereb Cotrtex* 2017)では、上肢リハビリテーションにより脳地図に可塑性が生じたり脳活動の可塑性が生じたりすることが報告されており、リハビリテーションが脳回路再編成を促す可能性が示唆されている。

ではこの運動野における脳回路再編成はどのようにして起こるだろうか。皮質脳波を用いた検証実験では、電極近傍の神経細胞集団が同期的発火を起こしていることが示唆されており、回復期の運動野では、Hebb 則で提唱されているような、「ニューロン A の発火がニューロン B を繰り返し発火させると両者のシナプス結合が強まる」といった現象が個々のニューロン間で生じることで、神経細胞集団全体としてより洗練された効率的な神経回路を再獲得されている可能性が考えられる。しかし、皮質脳波の解像度ではこれらの現象理解に対して推測の域を超えることができず、神経活動を細胞レベルの解像度で、長期間同時に計測する必要性が考えられた。

２．研究の目的

nVista は、観察レンズを直接脳へ埋め込むことにより 2 光子励起顕微鏡では到達出来ない脳深部の神経活動観察を可能とする小型蛍光顕微鏡である。これと蛍光カルシウムセンサーである GCaMP との併用により、同時に 100～1000 個の脳深部神経活動を長期観察することが出来る。我々は nVista 開発者の Mark Schnitzer 博士と共同でこれをマーモセットに適応し、世界で初めて運動野第 5 層での随意運動中の神経細胞活動を計測することに成功しており、この技術を用いて損傷後回復期における運動野の神経活動を細胞レベルで計測することで脳回路再編成の実態を捉えることが出来るのではないかと考えた。

そこで本研究では、コモンマーモセット脊髄損傷モデルを用いて、カルシウムイメージング法により数 100 個の神経活動を長期間同時記録することで、リハビリテーションが脳神経回路に作用する効果を検証した。

３．研究の方法

マーモセットにおける検証実験の予備段階として、ラット脊髄損傷モデルにおける Ca^{2+}イメージングを行なった。次に、マーモセット脊髄損傷後の局所回路再編成を捉えるために、自然回復群において一次運動野における局所回路再編成を検証した。

(1) ラット皮質脊髄路損傷

一次運動野の再編成において電気生理学的な検証例のある延髄レベルでの両側皮質脊髄路損傷モデルを確立した(Mosberger et al., *Cereb Cotrtex* 2017)。具体的には、腹側からアプローチすることにより延髄の高さで両側錐体を切断するモデルを確立した。腹側から皮切し、気管と食道を外側に牽引して露出した後頭骨にドリルで小口を開け、ばねバサミで錐体を切断した。

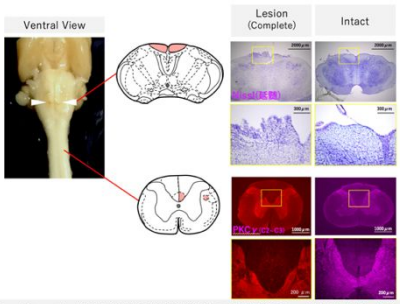

図1. ラット皮質脊髄路切断後の切片(Nissl染色)(上段)。皮質脊髄路が完全に切断されていることを確認(下段)。

(2) ラット Ca^{2+}イメージング

ラット運動野に蛍光カルシウムインジケーターである GCaMP7 を強制発現させる AAV ベクターを注入した後、小型顕微鏡 nVista（Inscopix, Inc.）を 1800 μm の深さに埋植・固定した。このラットにペレットに上肢の到達運動を行なう際の神経活動を記録し、到達運動に関連するする神経細胞の活動様式を計測した。

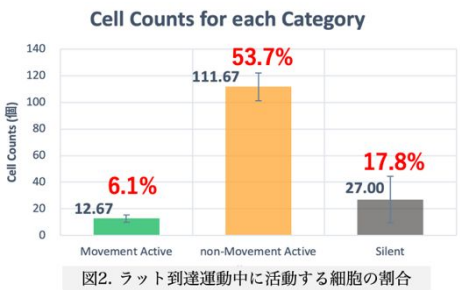

図2. ラット到達運動中に活動する細胞の割合

(3) マーモセット Ca^{2+}イメージング

マーモセット運動野にテトラサイクリン発現誘導システムによるウイルスベクターを注入することにより蛍光カルシウムインジケーターである GCaMP6f を強制発現させ、小型顕微鏡 nVista を 2400 μm の深さに埋植・固定した。

４．研究成果

(1) ラット皮質脊髄路損傷
ラットの皮質脊髄路が切断されていることを確認するために、損傷後の延髄および脊髄にて確認した。皮質脊髄路マーカーである PKC-γは損傷下部の脊髄にて消失することを確認した(図 1)。これらのラットにおける到達運動の成功率を評価したところ、損傷前は 60%程度であった成功率が術後 7/8 日目には 23%に低下し、その後緩やかに回復することがわかった。

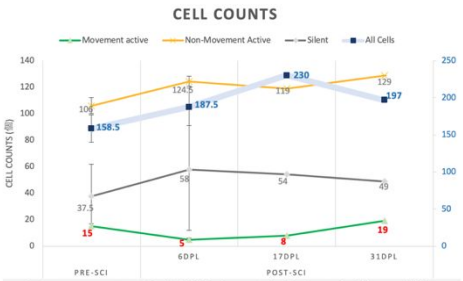

図3. ラット到達運動中に活動する細胞の割合

(2) ラット Ca^{2+}イメージング
ラット運動野の神経細胞活動を小型顕微鏡 nVista により計測したところ 208 ± 7.2 個の細胞活動を同時計測できた(n=3)。このラットに左上肢の到達運動を行なう際の神経活動を記録したところ、12.7 個(6.1%)の細胞が到達運動に関連して活動することが確認された(図 2) 。これらの神経細胞が、脊髄損傷前後でどのように推移するか検証したところ、損傷 1-2 週後では到達運動に関連する細胞が減少し、その後上昇することが確認された。一方、イメージング中にほとんど活動しないサイレント細胞や、到達運動以外の運動中に活動する細胞の数は損傷後に増加していた(図 3)。

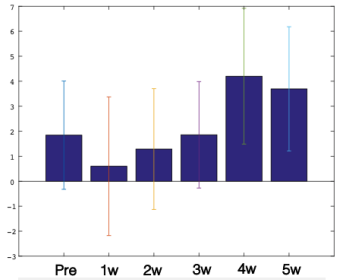

図4. マーモセット運動野で脊髄損傷前後で発火する神経細胞数の推移

(3) マーモセット Ca^{2+}イメージング
マーモセット運動野の神経細胞活動を小型顕微鏡 nVista により計測したところ 80-240 個の神経細胞を同時記録することができた。このマーモセットがレバーを引く課題を行うと運動野の神経細胞活動が確認された。さらに、皮質脊髄路損傷を損傷前、損傷直後(麻痺)、回復期において動員される神経細胞が変化することが確認された(図 4)。

５．主な発表論文等
〔雑誌論文〕（計３件）
(1)
Kondo T, Saito R, Otaka M, Yoshino-Saito K, Yamanaka A, Yamamori T, Watakabe A, Mizukami H, Schnitzer MJ, Tanaka KF, Ushiba J, Okano H., “Calcium Transient Dynamics of Neural Ensembles in the Primary Motor Cortex of Naturally Behaving Monkeys.” Cell reports 査読あり, 24(8) 2191-2195.e4 2018 年
プレスリリース https://www.keio.ac.jp/ja/press-releases/files/2018/8/22/180822-1.pdf

(2)
Shimada H, Kanai R, Kondo T, Yoshino-Saito K, Uchida A, Nakamura M, Ushiba J, Okano H, Ogihara N., “Three-dimensional kinematic and kinetic analysis of quadrupedal walking in the common marmoset (Callithrix jacchus).” Neuroscience research 査読あり, 125 11-20 2017 年

(3)
Ogihara N, Oishi M, Kanai R, Shimada H, Kondo T, Yoshino-Saito K, Ushiba J, Okano H., “Muscle architectural properties in the common marmoset (Callithrix jacchus).” Primates; journal of primatology, 査読あり 58(3) 461-472 2017 年

〔学会発表〕（計２件）
(1)
近藤崇弘，岡野栄之“小型蛍光顕微鏡を用いた自由行動下のマーモセットカルシウムイメージング”第 8 回日本マーモセット研究会大会　2019 年

(2)
近藤崇弘，岡野栄之 “運動制御機構からみたマーモセット” 第 7 回日本マーモセット研究会大会　2018 年

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

６．研究組織

(1)研究分担者
研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：
研究者番号（8 桁）：

(2)研究協力者
研究協力者氏名：牛場　潤一
ローマ字氏名：USHIBA, Junichi

※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。