

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06488

研究課題名(和文)脳損傷後の機能回復過程における可塑的変化の解明

研究課題名(英文)The mechanism of plastic changes during functional recovery after brain injury.

研究代表者

實木 亨 (JITSUKI, Susumu)

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：10546675

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：大脳皮質損傷後の回復過程の損傷周囲の可塑的変化の実態は不明であるため、可塑的変化の時期と可塑的変化により回復を担う細胞について明らかにすることを目標としている。脳損傷後のトレーニング開始から2週目の大脳皮質の損傷周囲5層の興奮性神経細胞において回復率に相関した興奮性入力が増加が観察された。この脳領域にDREADD(hM3DGq)を発現させ、損傷後の運動機能が回復しなかった動物において当該領域を活性化させながらリハビリを続けたところ、運動機能の回復傾向が見られた。これらことから、損傷周囲の神経細胞の活性化とトレーニングの組み合わせが失われた機能を回復する上で重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リハビリテーション医学の発展により疾患や外傷を原因とした脳損傷からある程度の機能回復が可能となってきている。しかしながら、施設間での治療効果のばらつきが大きく、このようなばらつきは機能が回復していく過程として「脳内の何がどう変化すればいいのか」といったような機能回復の実態が不明瞭であるためと考えられる。そのため脳損傷後の回復過程において、脳内のどの回路がどのタイミングで変化するのかという回復過程の実態を明らかにすることにより、より効果の高いリハビリテーション技術を中枢神経の損傷に苦しむ患者に提供することができると期待できる。

研究成果の概要(英文)：The cell biological mechanism of plastic changes in the peri-injured area during recovery after cortical injury is still unknown. The aim of this study is to determine the timing of synaptic delivery of AMPA receptors after cortical injury during recovery and the neurons responsible for recovery. We observed an increase in excitatory input correlated with recovery rate of neurons in the peri-injured cortex during the first two weeks of training after brain injury. Furthermore, we expressed DREADD (hM3DGq) in this area, and introduced combination of rehabilitation with DREADD activation in animals that had no recovery. These manipulations induced tendency of recovery of motor function.

These results suggest that activation of neurons in the peri-injured area together with rehabilitation is useful to induce recovery of chronic paralysis.

研究分野：神経科学

キーワード：AMPA受容体 シナプス可塑性

## 1. 研究開始当初の背景

神経回路網を構成する神経細胞には再生能力が極めて低く、損傷を受けた神経回路網を回復するという事は困難であると考えられてきたが、近年は神経リハビリテーション医学の発展に伴い、ある程度の回復は認められるようになってきた。しかしながらその効果は限定的であり、機能回復の実体は明らかではない。脳損傷後の回復過程において、失われた機能をそれぞれの機能に関連した脳領域が代償することで脳の機能的地図が大規模に再構成されるといわれている。この際に脳損傷後の機能回復には脳の可塑的变化が重要な役割を担っていると考えられている。動物が学習やトレーニングといった新しいことを経験して神経回路が再構成されるときに AMPA 受容体がシナプス後膜に移行することでシナプス伝達が増強することがすでに明らかになっており、AMPA 受容体のシナプス移行が脳の可塑性の分子基盤の一つであると世界的に認められている。このことから脳損傷後の機能回復は損傷を受けていない残存する脳領域における AMPA 受容体のシナプス移行促進により失われた脳領域の機能を補うことが機能回復をする上で重要であるのではないかという仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

上記に示す仮説を検証するため、これまでに大脳皮質運動野の前肢領域を破壊した動物において、前肢機能(前肢を伸ばし餌ペレットを取るトレーニング:リーチング課題の成績)の回復過程について検討し、損傷を受けた動物はリハビリテーションにより 5 割近くの回復が認められるが、AMPA 受容体のドミナントネガティブ体である GluA1-c-tail を損傷周囲領域の第 5 層に発現させることにより回復が阻害されるということを見出している。このことから損傷周囲の残存する皮質領域において AMPA 受容体のシナプス移行が促進されることにより失われた前肢の運動機能が回復したと考えられる。しかしながら、いつ、どのタイミングでどのような回路を用いて機能が回復したのかということについては全く不明なままである。本研究では前肢機能のリハビリテーショントレーニングにより誘導される機能回復の実体を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 大脳皮質損傷後の回復過程における可塑的变化のタイムコース

申請者らはこれまでに、ラットの大脳皮質運動野の前肢領域を破壊した動物においても、障害された前肢機能はトレーニングにより損傷後 2 週において 5 割近くの回復が認められ、損傷周囲に AMPA 受容体の阻害剤を投与することにより、回復した運動機能が阻害されるということを見出している。このことは前肢の運動機能の回復の背景には損傷周囲の残存する皮質領域において AMPA 受容体のシナプスへの集積が必要と考えられる(この皮質領域を「代償領域」とする)。しかしながらどの時点で AMPA 受容体のシナプス移行の促進が惹起されたかは不明である。この疑問を解決するため、AMPA 受容体のシナプス移行が促進されるタイムコースを電気生理学的解析を用いて明らかにすることを最初の目的とした。

はじめに、成体ラットにリーチング課題(前肢を伸ばし餌ペレットを取る課題)を学習させ、その後に冷凍手術装置を用いた脳組織の凍結により損傷させる手法である Cryogenic lesion (Raslanら Exp Transl Stroke Med 2012)により大脳皮質運動野前肢領域に損傷を施す。損傷作成後 3 日目から毎日リーチングトレーニングを開始した。トレーニング開始から 1 週間ごとの運動機能評価により回復率を確認し、2 週まで続ける。AMPA 受容体のシナプス移行のタイムコースについて電気生理学的に解析するために、損傷後 1 週目、2 週目に

において急性脳スライスを作成し、損傷周囲の大脳皮質第5層の錐体細胞からパッチクランプ法により AMPA 受容体を介した微小興奮性シナプス後電流 (mEPSC) と微小抑制性シナプス後電流 (mIPSC) を測定した。また、抑制性神経細胞においても mEPSC を測定した。記録する範囲としては先行研究において樹状突起スパインの運動性の増加が見られた損傷部位の縁から 500 $\mu$ m 以内とした。

## (2) 大脳皮質損傷後の回復過程において用いられる神経ネットワーク

### 神経トレーサーを用いた代償領域への神経接続する脳部位の同定

前年度において見出した AMPA 受容体を介したシナプス応答の増加がどこからのシナプス入力か不明である。機能回復をする上で損傷周囲にどこからのシナプス入力強化されているのかを明らかにする必要がある。障害された前肢機能がリハビリテーションにより回復した時点で使用される神経回路を同定するため、はじめに損傷後 2 週目においてトレーニングにより回復した動物の損傷周囲の皮質第5層に逆行性トレーサーを導入した。この手法により機能代償をする皮質領域のどこから神経接続があるのかについて解析した。

### DREADD を用いた代償領域と神経接続のある脳部位の前肢機能回復における役割

さらにその回路の役割を明らかにするために外因性の人工受容体を使用する薬理遺伝学的手法である DREADD システムを用いた。本研究では、「代償領域」と神経接続のある脳部位にアデノ随伴ウイルスを用いて DREADD である hm3Dq を回復が見られなかった動物に発現させ、その領域の神経細胞を活性化させることで回復を誘導することを試みた。ウイルスにより hm3Dq を発現させた成体ラットに前肢のリーチング課題を学習させ、その後 cryogenic lesion により大脳皮質運動野前肢領域に損傷を施した。これまでと同様のプロトコールによりトレーニングを行い回復率を確認し、リハビリテーションを施しても回復しない動物に CNO を投与し、その後にリーチング課題評価を行った。

## 4. 研究成果

大脳皮質損傷後のどの時点で回復過程の AMPA 受容体のシナプス移行の促進が惹起されたかは不明であるため、AMPA 受容体のシナプス移行が促進される時期、さらにはどのような細胞において担われるかについて電気生理学的解析を用いて明らかにするため、損傷周囲5層の興奮性神経細胞への興奮性入力と抑制性入力について検討した。大脳皮質損傷後のトレーニング開始から1週目における興奮性入力である mEPSC と運動機能の回復率と相関関係は見られなかった。また、同時期において抑制性入力である mIPSC と回復率についても相関関係は見られなかった。次に、大脳皮質損傷後のトレーニング開始から2週目におけるシナプス入力の変化について検討したところ、興奮性入力のみにおいて運動機能との回復率との相関関係が見られた ( $r=0.717$ )。さらに、テストパルスを導入した際の膜容量もしくは細胞の形態をもとに抑制性神経細胞を特定し、その細胞への興奮性入力を記録することを試みたところ、興奮性入力である mEPSC と運動機能の回復率との相関関係は見られなかった。このような結果から、大脳皮質損傷後の機能回復における AMPA 受容体のシナプス移行は早期のトレーニング開始から1週目ではなく、2週目において興奮性の神経細胞においてみられ、そのような興奮性入力の変化が運動機能回復に寄与していることが示唆された。

これまでに脳損傷後のトレーニング開始から2週目の大脳皮質の損傷周囲5層の興奮性神経細胞において回復率に相関した興奮性入力の増加が観察された。このことから損傷周

囲の皮質第5層に逆行性のアデノ随伴ウィルスを導入し、これまでに見られた興奮性入力  
の増加がどの脳領域から投射されてきたものかを検討した。種々の皮質領域や皮質下領域  
からの投射が見られることが予想されたが、反対側の体性感覚皮質からの投射のみが観察  
された。このことから片側の運動皮質の損傷により生じた運動障害からの回復は、反対側  
からの脳梁を介した入力により代償されていることが示唆された。また、この脳領域に  
DREADD (hM3DGq)を発現させ、損傷後の運動機能が回復しなかった動物において当該領域  
を活性化させながらリハビリを続けたところ、運動機能の回復傾向が見られた。

これらのことから、損傷周囲の神経細胞の活性化とトレーニングの組み合わせが失われ  
た機能を回復する上で重要であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Abe Hiroki, Jitsuki Susumu, Nakajima Waki, Murata Yumi, Jitsuki-Takahashi Aoi, Katsuno Yuki, Tada Hirobumi, Sano Akane, Suyama Kumiko, Mochizuki Nobuyuki, Komori Takashi, Masuyama Hitoshi, Okuda Tomohiro, Goshima Yoshio, Higo Noriyuki, Takahashi Takuya	4. 巻 360
2. 論文標題 CRMP2-binding compound, edonepic maleate, accelerates motor function recovery from brain damage	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 50 ~ 57
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.aao2300	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 Jitsuki Takahashi Aoi, Jitsuki Susumu, Yamashita Naoya, Kawamura Meiko, Abe Manabu, Sakimura Kenji, Sano Akane, Nakamura Fumio, Goshima Yoshio, Takahashi Takuya	4. 巻 53
2. 論文標題 Activity induced secretion of semaphorin 3A mediates learning	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 3279 ~ 3293
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ejn.15210	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 Kawashima Takeshi, Jitsuki Takahashi Aoi, Takizawa Kohtarō, Jitsuki Susumu, Takahashi Takuya, Ohshima Toshio, Goshima Yoshio, Nakamura Fumio	4. 巻 157
2. 論文標題 Phosphorylation of Collapsin Response Mediator Protein 1 (CRMP1) at Tyrosine 504 residue regulates Semaphorin 3A induced cortical dendritic growth	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 1207 ~ 1221
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.15304	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 実木 亨、川上 裕、湖上 爽、實木-高橋 葵、高橋 琢哉
2. 発表標題 The role of striatal AMPA receptor in functional recovery after cortical damage
3. 学会等名 Neuro 2019(第42回日本神経科学大会、第62回日本神経化学学会大会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Abe Hiroki、Jitsuki Susumu、Nakajima Waki、Masuyama Hitoshi、Okuda Tomohiro、Takahashi Takuya
2. 発表標題 CRMP2-binding compound accelerates motor function recovery from cortical damage.
3. 学会等名 Neuroscience 2018 (Society for Neuroscience) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 實木 亨、高橋 琢哉
2. 発表標題 CRMP2結合化合物による中枢神経損傷後の運動機能回復促進
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021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

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