

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K13079

研究課題名(和文)高齢期の脳内炎症を標的とした脳損傷後の神経回路再建へのアプローチ

研究課題名(英文)An approach to neural circuit reconstruction after brain injury targeting inflammation in the brain in elderly mice

研究代表者

田中 貴士(TANAKA, Takashi)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：30734694

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)：脳損傷後にみられる運動障害などの機能障害の改善には、失われた神経回路の再編が重要である。若齢期の成体マウスにおいては、損傷を免れた神経が代償的に神経回路を再編させることで、ある程度の運動機能の回復が得られることが明らかになってきたが、高齢期のマウスでは同じような神経回路の再編が起こらず、運動機能が回復しないことを見出した。そこで、高齢期の脳損傷モデルマウスに自発的な身体運動を実施させた結果、非損傷側皮質脊髄路の脊髄麻痺側への側枝形成の程度が増加し、麻痺肢の運動機能を回復させることができた。今後は、自発的な身体運動による回復効果をさらに検証し、効果的な介入方法を探索していく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国における脳血管障害者の累積は100万人を超え、外傷性の脳損傷患者は毎年約1万人ずつ増加をしている。これら障害者の大半を高齢者が占めており、脳損傷を主とする運動機能障害は寝たきりや要介護を引き起こす大きな要因である。これまでの研究では、若齢期の成体モデルを用いた研究が主体であったが、臨床により近いデータを提供するには高齢期における研究が必要であった。本研究によって、高齢期のマウスでは脳損傷後の機能回復が生じないが、自発的な運動を実施することで神経回路の再編や運動機能の回復が促されることが明らかになった。今後はさらに研究を重ねることで、より臨床に有用なデータを提供していく。

研究成果の概要(英文)：Brain injury often causes severe motor dysfunction, leading to difficulties with living a self-reliant social life. At the clinical and experimental level, lost motor functions often spontaneously recover owing to the compensatory reorganization of spared motor circuits, including the corticospinal tract (CST), but the adult brain is limited in its ability to restore neuronal connections. We tested whether voluntary training to promote reorganization of motor circuits and functional recovery in aged mouse model of brain injury. We found that reorganization of spared motor circuits and motor recovery were not induced in aged mice. However, we indicated that voluntary exercise significantly increased sprouting of CST axons and enhanced motor recovery in the impaired forelimb of aged mice after brain injury. We will investigate the factors that have caused the reorganization of neural circuits and functional recovery due to voluntary exercise in the future studies.

研究分野：神経科学

キーワード：高齢期 脳損傷 神経回路再編 運動機能回復 炎症 自発的運動

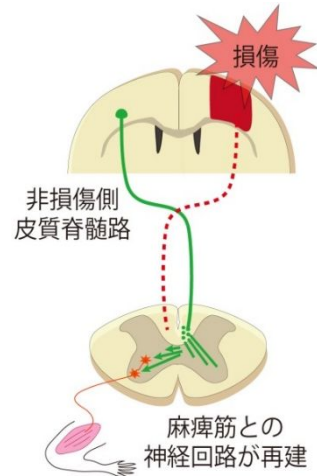
## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脳が損傷を受けると、その支配領域に運動障害が生じるが、障害された運動機能はある程度回復する。これは、損傷を免れた皮質脊髄路の軸索が二次ニューロンと代償性の神経回路を再編するためであると報告される<sup>1</sup>。しかし、このような脳損傷後の神経回路の再編は若齢成体マウスを対象とした研究によって導かれた結論であり、高齢マウスにおける検証は不十分である。近年、高齢なヒトやマウスの脳内環境は慢性的な炎症状態にあり若齢期とは似て非なるものであることが報告されており<sup>2</sup>、若齢期の研究結果を高齢期にそのまま応用することは不適切であることが示唆される。実際、我が国においては、寝たきりや要介護者の大半を高齢の脳障害患者が占めているが、高齢期の動物モデルを用いた再生医療およびリハビリテーションに関連した研究は非常に少ない。そこで、これまでの若齢期での研究を高齢期で発展させ、新たな知見を得ることが非常に重要であると考えた。高齢期に特有の慢性炎症を制御できれば、効果的な治療に繋がらう。本研究では運動量が測定できる自走式の回転運動器を用いることで、どの程度の運動量が抗炎症および脳損傷後の神経回路の再編に効果的であるのかを明らかにすることができる。

### 2. 研究の目的

成体の中枢神経は新たな神経回路を構築する能力に乏しいとされてきたが、成体若齢期の中枢神経損傷後においては限定的ながら神経回路が再編され、機能回復が得られることが明らかになってきた。これまでに研究代表者は、運動を司る皮質脊髄路が片側で全て消失した場合、損傷を免れた反対側の皮質脊髄路が側枝を伸ばし、麻痺筋の支配神経と新たな神経回路を再編することが機能回復に重要であると報告してきた<sup>3</sup>(右図)。しかし、高齢期の脳内は慢性的に顕著な炎症状態にあるといわれ<sup>2</sup>、慢性化した炎症は機能回復を遷延させてしまう。一方で、身体運動は栄養因子の分泌や抗炎症効果を促進させることで機能回復に有用であるとされている<sup>4</sup>。しかし、どの程度の運動量が抗炎症効果をもたらし、脳損傷後の神経回路の再編に効果的であるのかなど明らかでないことが多い。本研究では、高齢期における脳損傷後の神経回路の再編に効果的な運動量を明らかにするとともに、再編を促す因子を特定することで、国民の健康増進に貢献するものである。



### 3. 研究の方法

#### (1) 脳損傷モデルの作製

高齢マウス (C57BL/6J、20~22 ヶ月齢) の片側の運動野に損傷を作製する。

#### (2) 身体運動

運動群と非運動群を設定し、運動群においては自走式の回転運動器 (MK-713、室町機械) を用いて自発的な身体運動を実施させ、運動量を測定する。運動期間は脳損傷の前 4 週間~後 4 週間とする (7 日/週、8 週間)。

#### (3) 運動機能の評価

グリッドウォークテスト...脳損傷後の高齢マウスを網の上で自由に歩行させ、麻痺側前肢の落下頻度を評価する。評価は脳損傷前と脳損傷後 7、14、21、28 日に実施する。

#### (4) 脳損傷後における代償的な神経回路再編の評価

- ・損傷とは反対側の運動野に順行性の標識剤 BDA を注入し、非損傷側の皮質脊髄路を標識することで、頸髄における神経軸索の側枝形成の程度を評価する。
- ・前肢の麻痺筋に経シナプス性の逆行性の標識剤 WGA を注入し、麻痺筋を支配する運動神経および脊髄介在神経を標識することで、BDA 陽性の軸索側枝と麻痺筋の支配神経との神経回路の再編の程度を評価する。

#### (5) 脳損傷後の機能回復に影響を及ぼす因子の抽出および解析

- ・若齢成体期および高齢期の運動群・非運動群の脳 (非損傷側の運動野) から RNA を回収し、免疫因子のターゲットシークエンス解析用にライブラリを調整後、次世代シークエンサー (NextSeq、イルミナ社) にて解析する。
- ・本解析から候補因子を抽出し、Real-Time PCR で評価することで、運動量や運動機能回復の程度と相関の高い因子を同定する。

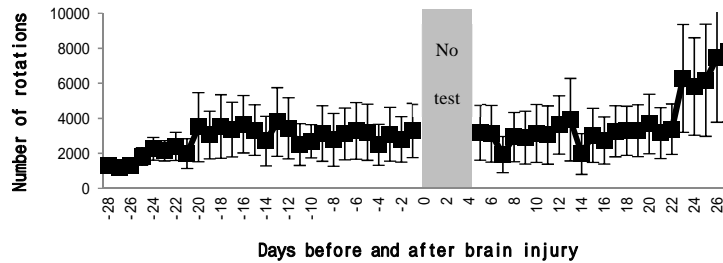
### 4. 研究成果

#### (1) 脳損傷および皮質脊髄路の損傷の程度

高齢マウスの運動群および非運動群において、脳損傷の程度、頸髄における皮質脊髄路の損傷の程度に有意な差はみられず、同程度の脳損傷が作製できていることを確認した。

(2) 脳損傷前後の身体運動量の推移

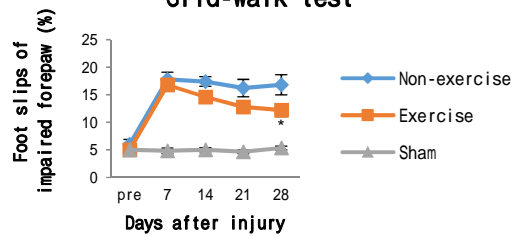
脳損傷前後における高齢マウスの運動群において、自発的な身体運動量の推移を測定した。脳損傷前や損傷後において、個人差は約 0.4 ~ 4.0km と大きいものの 1 日当たり平均して約 1.3km 走行していることが明らかになった。



(3) 脳損傷後の運動機能

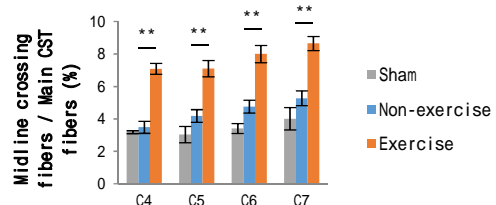
脳損傷後の麻痺側前肢の運動機能回復の程度を評価した結果、非運動群と比較し運動群において顕著な回復傾向が示され、脳損傷後 28 日目では運動群が有意に回復していることが示された (\*P<0.05)。しかし、脳損傷を施さなかった偽手術群に比べると、機能回復の程度は不十分であり、完全回復までは得られていないことが示された。また、運動機能回復と運動量の間に関連関係は無いことが明らかになった。

Grid-walk test



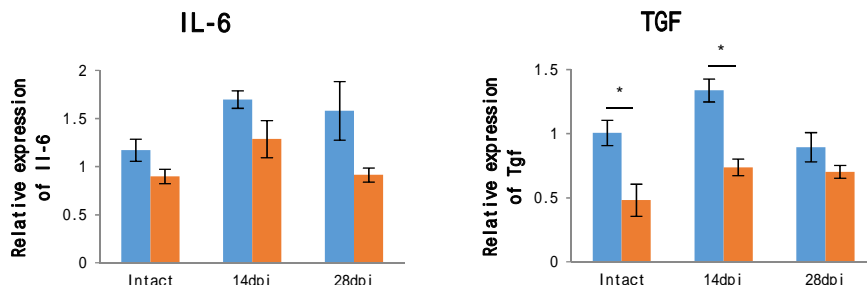
(4) 脳損傷後の代償的な神経回路

脳損傷後の脊髄における皮質脊髄路が麻痺側へ側枝を侵入させる割合を評価した。この側枝形成は、皮質脊髄路の代償的な神経回路の再編の基本となる指標である。脳損傷後の皮質脊髄路の麻痺側への侵入の割合は、高齢マウスでは若齢期にみられるよう増加が認められないことを見出した。一方、運動群では非運動群と比較し、麻痺側への側枝形成数が顕著に増加することが明らかになった (\*\*P<0.01)。



(5) 脳損傷後の機能回復に影響を及ぼす因子の抽出

脳損傷後 14 日の運動群・非運動群の脳から RNA を回収し、次世代シーケンサーにおいて解析を実施中である。そこで、Real-Time PCR を実施することで、どのような炎症因子が自発的な運動によって変化しているのか解析した。解析には脳損傷前と損傷後 14、28 日の非損傷側の運動野を使用した。着目した因子は、炎症性サイトカインである TNF、IL-1、IFN、IL-6。抗炎症性サイトカインである TGF、IL-4、IL-10。その他に栄養因子などの BDNF、TrkB、IGF-1、CX3CL1、CX3CR1、CD200 である。大変興味深いことに、損傷の無い脳においては自発的な運動によって抗炎症性のサイトカインが減少傾向にあるという、予想とは反対の結果が示された。脳損傷後 28 日の変化が大きい因子として、IL-1、IFN、IL-4、IL-10 が抽出され、自発的な運動によって各因子が減少していることが明らかになった。さらに脳損傷前後ともに自発運動によって減少した因子が IL-6 と TGF (\*P<0.05) であることが示された。



< 引用文献 >

1. Bareyre FM, et al. Nat Neurosci. 7: 269-277, 2004.
2. Norden DM and Godbout JP. Neuropathol Appl Neurobiol. 39: 19-34, 2013.
3. Tanaka T, et al. Cell Death Dis. 4: e567, 2013.
4. Cotman CW, et al. Trends Neurosci. 30: 464-72, 2007.

5. 主な発表論文等

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

|  |                  |
|--|------------------|
| 1. 著者名<br>Takashi Tanaka, Tetsufumi Ito, Megumi Sumizono, Munenori Ono, Nobuo Kato, Satoru Honma, Masaki Ueno  | 4. 巻<br>in press |
| 2. 論文標題<br>Combinational approach of genetic SHP-1 suppression and voluntary exercise promotes corticospinal tract sprouting and motor recovery following brain injury | 5. 発行年<br>2020年  |
| 3. 雑誌名<br>Neurorehabilitation and Neural Repair  | 6. 最初と最後の頁<br>-  |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1177/1545968320921827  | 査読の有無<br>有       |
| オープンアクセス<br>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<br>-        |

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>田中 貴士、宮田 信吾                 |
| 2. 発表標題<br>脳損傷後の神経回路再編における分子および運動介入の効果 |
| 3. 学会等名<br>第78回 日本解剖学会中部支部学術集会         |
| 4. 発表年<br>2018年                        |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Takashi Tanaka, Shingo Miyata  |
| 2. 発表標題<br>Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate like 1 in the central amygdala plays a pivotal role in anxiety disorders |
| 3. 学会等名<br>WFSBP 2018 KOBE: Asia Pacific Regional Congress of Biological Psychiatry (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Takashi Tanaka, Shingo Miyata  |
| 2. 発表標題<br>MARCKSL1 in the amygdala controls the HPA axis and anxiety behaviors |
| 3. 学会等名<br>The 48th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (国際学会)       |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>田中 貴士、伊藤 哲史、宮田 信吾、本間 智           |
| 2. 発表標題<br>脳損傷後の機能回復における自発運動とチロシン脱リン酸化酵素の役割 |
| 3. 学会等名<br>第124回 日本解剖学会全国学術集会               |
| 4. 発表年<br>2019年                             |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>田中 貴士、上野 将紀、本間 智             |
| 2. 発表標題<br>自発的な身体運動は脳損傷後の機能回復を効果的に促進させる |
| 3. 学会等名<br>第24回 日本基礎理学療法学会学術大会          |
| 4. 発表年<br>2019年                         |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Takashi Tanaka, Masaki Ueno  |
| 2. 発表標題<br>Genetic SHP-1 suppression and voluntary exercise have synergistic effects on motor recovery after brain injury |
| 3. 学会等名<br>第43回 日本神経科学大会  |
| 4. 発表年<br>2020年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

|         |                           |                       |    |
|---------|---------------------------|-----------------------|----|
| 6. 研究組織 | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------|---------------------------|-----------------------|----|