

機関番号：14401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21700381

研究課題名 (和文) 脳損傷疾患における代償性神経回路の形成機序の解明

研究課題名 (英文) Mechanism of compensatory neural network formation after brain injury

研究代表者

上野 将紀 (UENO MASAKI)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40435631

研究成果の概要 (和文)：

脳損傷は神経機能に重篤な障害を及ぼすが、その後機能は一定の自然回復を示す。本研究では、大脳皮質運動野の損傷後、残存した神経回路が新たな回路を形成して、障害された運動機能を自然回復させることをはじめて実証した。さらに、この新規神経回路形成に関わる一連の分子群 (BDNF-TrkB、GABA、MAG/Nogo/OMgp-PirB、EphA4-EphrinB3) の働きを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

Brain injury that results in an initial behavioral deficit is frequently followed by spontaneous functional recovery. In the present study, we showed that reorganization of the remnant neural network was crucial for spontaneous recovery of motor function following brain injury in mice. Furthermore, we identified several key signals (BDNF-TrkB, GABA, EphA4-EphrinB3, MAG/Nogo/OMgp-PirB) that modify this new network formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：大脳損傷、神経回路、可塑性、皮質脊髄路、運動機能、自然回復

1. 研究開始当初の背景

外傷・梗塞といった要因により脳が傷害されると神経機能に重篤な障害を及ぼすが、その後、機能は一定の自然回復を示すことがある。この自然回復には、残存した神経回路の可塑的变化が寄与すると考えられているが、未だ実証されていない。大脳が損傷を受けると、運動の指令を司る皮質脊髄路を構成する大脳皮質神経細胞の消失に伴い、その支配領域である反対側の手肢に運動障害・麻痺を引き起こす。同様に皮質脊髄路が傷害される脊髄

損傷モデルでは、近年、代償性の神経回路形成が機能回復に関与する、ということが実証された。この研究成果は、大脳損傷を含めた他の中枢神経損傷の病態においても、代償性に神経回路形成が起こり、運動機能回復に寄与する可能性を示唆する。しかしながら代償性の神経回路の存在、さらにはそれが形成されるメカニズムは、未解明のままである。

2. 研究の目的

大脳損傷後に運動機能の回復をもたらすに

は、神経の可塑的变化により代償性に新規神経回路が形成され機能することが重要であると考えられる。しかしながら代償性の神経回路の存在とそれが形成されるメカニズムは、未解明のままである。本研究では、脳損傷後に起こる代償性神経回路形成の同定とそのメカニズムの解明を行い、「新たな神経回路の形成を促進する」という脳損傷疾患に対する新たな治療的戦略を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 脳損傷後における運動機能の解析
成体マウスの片側大脳損傷後、前肢運動機能を測定するため、Staircase test (前肢により餌をつかむ能力を測定)、Ladder walk test (はしご上を適切に歩行できるかを測定)、Cylinder test (筒内での探索行動中に自らの体を支える能力を計る)を用いて、損傷後に運動機能がどのように回復していくかを解析した。

(2) 代償性神経回路の形成部位の同定
片側大脳損傷後、反対側の大脳皮質感覚運動野に順行性のトレーサー (BDA) を注入し、残存した皮質脊髄路の軸索が中枢神経のどの部位で代償性の神経回路を形成しているのかを同定した。さらに、代償性に投射した軸索分枝がどの神経細胞と回路を形成するのかを組織レベルで詳細に検討した。特に、運動に関わると考えられる、運動ニューロンへ投射する介在性ニューロン、頸髄下位へ投射するpropriospinal neuronに着目した。それぞれ、WGAを用いた筋肉からの経シナプス逆行性トレース、頸髄下位からの蛍光microsphereを用いた逆行性トレース、を用いてラベルし、BDAでトレースした皮質脊髄路軸索分枝との回路形成を観察した。

(3) 代償性神経回路の機能回復への寄与

(2) で同定した神経回路が機能回復に寄与しているかどうかを解明した。まず、同回路を電気刺激し、前肢の筋活動が促されるかを計測した。次に、同回路を切断した場合に、自然回復した機能が再び低下するか否かを観察した。

(4) 新生児における脳損傷後の代償性神経回路形成の同定

出生2~21日マウスの片側の大脳皮質感覚運動野を吸引除去し、脳損傷モデルを作出した。その後(2)と同様の解析を行い、回路形成の程度を比較した。

(5) 代償性神経回路の形成に関与する因子の探索

脳損傷後に、内在性に代償性神経回路の形成を促す因子あるいは阻害している因子を同定し、神経回路形成への役割を明らかにすることを目的とした。そのために、①軸索伸長・分枝形成促進因子、②軸索伸長・分枝形成

阻害因子、に着目した。①軸索伸長・分枝形成促進因子：BDNF、NT3、Netrin、IGF-1、Wntや神経伝達物質 (GABA) などの関与に着目した。これら因子の発現パターンをin situ hybridizationなどを用いて明らかにした。発現していた因子についてsiRNAや阻害剤によるノックダウンとレンチウイルスによる過剰発現を行い、神経回路形成への影響を探った。②軸索伸長・分枝形成阻害因子：損傷した軸索の再生が成体中枢神経組織でほぼ起こらない理由の1つとして、軸索伸長阻害因子の発現があげられる。本研究では特にミエリン由来軸索伸長阻害蛋白 (Nogo、MAG、OMgp、EphrinB3) に着目し、これら因子を阻害することにより軸索の可塑性 (代償性神経回路の形成) が促されるかを検討した。そのためにNogo、MAG、OMgpの新規受容体であるPirBノックアウトマウスを用いて、代償性神経回路形成と機能回復がもたらされるか否かを検討した。またEphrin B3とその受容体であるEphA4の発現パターンをin situ hybridizationを用いて明らかにした。

4. 研究成果

(1) 皮質脊髄路の代償性神経回路形成による機能回復：大脳皮質運動野の損傷後、残存した皮質脊髄路が脊髄内で新たな神経回路を形成し、障害された運動機能を自然回復させることをはじめて実証した。マウスの左側大脳皮質運動野を損傷すると、皮質脊髄路の消失に伴い右前肢の運動機能が障害されるが、その後機能は自然回復した。損傷のない右側大脳皮質から伸びる皮質脊髄路をラベルすると、通常脊髄の左側へ投射している神経軸索が、損傷後、正中を超えて右側に新たに投射することを見いだした。この軸索は、頸髄灰白質の2種類の脊髄介在ニューロンに接続していた。右側大脳皮質運動野を電気刺激すると、通常左前肢を支配するところが、右前肢の筋運動を促した。残存した皮質脊髄路を自然回復後に切断すると、運動機能は再び低下した。このことから、新たに形成された神経回路が機能の自然回復に寄与することが実証された。

(2) ミエリン関連因子による代償性神経回路の形成阻害作用：新生児期において脳損傷を引き起こしたところ、上記の皮質脊髄路の新たな神経回路の形成は成体と比べ顕著に増加した。生後15日を超えて脳損傷を起こした場合には、この回路形成は低下した。この時期が、脊髄におけるミエリンの形成時期と相関していたことから、ミエリン関連蛋白が神経の可塑性を阻害している可能性が示唆された。そこで、ミエリン関連軸索伸長阻害因子MAG、Nogo、OMgpの新規受容体であるPirBのノックアウトマウスを用いて解析し

た。その結果、ノックアウトマウスで大脳損傷を起こしても、野生型マウスと比べて回路形成および機能回復の促進は認められなかった。これは、一般に信じられているミエリン神経可塑性阻害仮説を否定する重要な発見となった。また、別のミエリン関連軸索伸長阻害因子 EphrinB3 の発現パターンを調べた所、脊髄正中での発現パターンが成体脳では維持されていなかった。従って、EphrinB3 の発現消失が、内在性の皮質脊髄路の軸索伸長を可能にしていることが示唆された。

(3) 代償性神経回路の形成をもたらす因子の発見：脳損傷後に起こる皮質脊髄路の代償性回路の形成メカニズムの解析を行った。その成果として、まず、大脳皮質における GABA シグナルの低下が神経回路形成を促すことを見いだした。脳損傷後、非損傷側大脳皮質で GABA receptor の発現低下と神経活動の上昇が認められた。GABA アゴニストである Muscimol 投与により GABA シグナルを増強すると、皮質脊髄路の新規神経回路形成が抑制され、運動機能の自然回復も抑制された。以上の結果から、GABA シグナルの低下が代償性神経回路の形成に必要なことが見いだされた。さらに、軸索伸長・分枝形成促進因子の発現パターンを頸髄において調べた所、BDNF の発現が顕著に認められた。そこで BDNF あるいはその受容体である TrkB を siRNA 投与によりノックダウンすると、皮質脊髄路の新規神経回路形成が顕著に抑制された。一方で、レンチウイルスを用いて BDNF を強制発現すると回路形成が促進された。このことから、BDNF-TrkB シグナルが代償性神経回路形成の鍵をにぎる分子メカニズムであることがはじめて明らかとなった。

本研究の一連の成果は、機能回復をもたらす代償性神経回路の形成を促すメカニズムを広く明らかにしており、「新たな神経回路の形成を促進する」という脳損傷疾患に対する新たな治療的戦略を構築するために多大な貢献をすることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Ueno M, Yamashita T. Kinematic analyses reveal impaired locomotion following injury of the motor cortex in mice. *Exp Neurol.* in press, 2011. 査読有
2. Lee S, Ueno M, Yamashita T. Axonal remodeling for motor recovery after traumatic brain injury requires downregulation of γ -aminobutyric acid signaling. *Cell Death Dis.* 2 e133, 2011. 査読有

3. Nakamura Y, Fujita Y, Ueno M, Takai T, Yamashita T. Paired immunoglobulin-like receptor B knockout does not enhance axonal regeneration or locomotor recovery after spinal cord injury. *J Biol Chem.* 286(3) p1876-83, 2011. 査読有

4. Omoto S, Ueno M, Mochio S, Yamashita T. Corticospinal tract fibers cross the ephrin-B3-negative part of the midline of the spinal cord after brain injury. *Neurosci Res.* 69(3) p187-95, 2011. 査読有

5. Omoto S, Ueno M, Mochio S, Takai T, Yamashita T. Genetic deletion of paired immunoglobulin-like receptor B does not promote axonal plasticity or functional recovery after traumatic brain injury. *J Neurosci.* 30(39) p13045-52, 2010. 査読有

6. Kurihara D, Ueno M, Tanaka T, Yamashita T. Expression of galectin-1 in immune cells and glial cells after spinal cord injury. *Neurosci Res.* 66(3) p265-70, 2010. 査読有

7. Nakayama J, Takao T, Kiuchi H, Yamamoto K, Fukuhara S, Miyagawa Y, Aoki M, Iwatsuki K, Yoshimine T, Ueno M, Yamashita T, Nonomura N, Tsujimura A, Okuyama A. Olfactory mucosa transplantation following spinal cord injury improves voiding efficiency by suppressing detrusor sphincter dyssynergia in rats. *J Urol.* 184(2) p775-82, 2010. 査読有

8. Aoki M, Kishima H, Yoshimura Y, Ishihara M, Ueno M, Hata K, Yamashita T, Iwatsuki K, Yoshimine T. Transplantation of whole-layer olfactory mucosa promotes restricted functional recovery in rats with complete spinal cord injury. *J Neurosurg: Spine.* 12(2) p122-30, 2010. 査読有

9. Tanaka T, Ueno M, Yamashita T. Engulfment of axon debris by microglia requires p38 MAPK activity. *J Biol Chem.* 284(32) p21626-36, 2009. 査読有

10. Muramatsu R, Ueno M, Yamashita T. Intrinsic regenerative mechanisms of central nervous system neurons. *Biosci Trends.* 3(5) p179-83, 2009. 査読有

[学会発表] (計 12 件)

1. ○Uesugi N, Ueno M, Fujita Y, Yamashita T. p75 neurotrophin receptor mediates ephrin-B3 signaling for axonal growth inhibition. *BMB* 2010. 神戸、2010年12月8日、ポスター
2. ○Ueno M, Yamashita T. Intraspinal rewiring of the corticospinal tract

compensates lost function after brain injury. Neuroscience 2010. San Diego, CA. 2010年11月15日、ポスター

3. ○Omoto S, Ueno M, Mochio S, Takai T, Yamashita T. Genetic deletion of paired immunoglobulin-like receptor B does not promote axonal plasticity or functional recovery after traumatic brain injury. Neuroscience 2010. San Diego, CA. 2010年11月14日、ポスター

4. ○Yoshimura N, Ueno M, Kishima H, Iwatsuki K, Yoshimine T, Yamashita T. JNK mediates axon degeneration and suppresses recovery of motor function after spinal cord injury in mice. 第69回日本脳神経外科学会 福岡、2010年10月27日、口頭発表

5. ○Ueno M, Yamashita T. Impaired treadmill locomotion following traumatic brain injury in mice. Neuro 2010. 神戸、2010年9月4日、ポスター

6. ○Lee S, Ueno M, Yamashita T. Downregulation of GABA signaling enhances axonal rewiring and contributes to spontaneous recovery of motor functions after traumatic brain injury. Neuro 2010. 神戸、2010年9月4日、ポスター

7. ○Omoto S, Ueno M, Mochio S, Takai T, Yamashita T. Genetic deletion of paired immunoglobulin-like receptor B does not promote axonal plasticity or functional recovery after traumatic brain injury. Neuro 2010. 神戸、2010年9月3日、ポスター

8. ○Nakamura Y, Fujita Y, Ueno M, Yamashita T. Paired immunoglobulin-like receptor B knockout does not enhance axonal regeneration or locomotor recovery after spinal cord injury. Neuro 2010. 神戸、2010年9月3日、ポスター

9. ○上野将紀、山下俊英 皮質脊髓路の脊髄内回路再形成による大脳損傷後の運動機能回復 第23回神経組織の成長・再生・移植研究会学術集会、大阪、2010年5月22日、ポスター発表

10. ○上野将紀、山下俊英 新生児脳におけるミクログリアによる神経細胞への生存促進作用 第14回グリア研究会、大阪、2009年11月14日、口頭発表

11. ○Ueno M, Yamashita T. Corticospinal tract forms new neural circuits and contributes to spontaneous functional recovery after cortical injury. 第32回日本神経科学大会、名古屋、2009年9月16日、ポスター

12. ○Ueno M, Yamashita T. Compensatory neural network formation after cortical

brain injury. International Congress of Physiological Sciences 2009. 京都、2009年7月30日、ポスター

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/molneu/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 将紀 (UENO MASAKI)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40435631