

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 4 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390478

研究課題名（和文）新たな神経可塑性の検討と可塑性を考慮した末梢神経修復成績向上への研究

研究課題名（英文）Investigation of nerve plasticity for the better results of nerve repair

研究代表者

柴田 実 (SHIBATA MINORU)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：50196432

研究成果の概要（和文）：

腕神経叢神経根引き抜き損傷に対し、対側 C7 神経根を切離しその近位端と移植神経を端端縫合して患側神経を再建する方法と、神経根を切離せずに神経根の外膜を部分的に開窓し、移植神経断端を端側縫合し、神経交叉することにより、患側神経を再建する方法がある。いずれの症例の知覚回復も求心性神経刺激が対側腕神経叢をバイパスして対側一次体制感覚野に伝導する可能性を示唆している。この仮説を立証するためにマウスに神経交叉術を施行し、大脳フラビン蛋白蛍光イメージを経頭蓋的にモニタリングし大脳皮質活動を観察した。交叉手術を行っていないマウスでは前肢に与えられた振動刺激は刺激側の対側一次体制感覚野に局限した活動性を示すが同側には殆ど活動性を示さない。神経交叉術後 4 週間後では患側前肢刺激で同側の体制感覚野に局限して反応が見られた。交叉術後 8 週間では両側体制感覚野に反応が見られた。これらの反応は移植神経を切離すると両側とも消失した。青色レーザー光を同側大脳皮質野に照射し、活動抑制をかけると同側と共に対側皮質野の活動も消失したが、このことは同側皮質反応が皮質から皮質を結ぶ経路によって反対側皮質に伝播していることを示すと考えられる。手術未施行のマウス同側皮質野の高頻度直接刺激と同側前肢刺激では両側体制感覚皮質野反応が急性現象としてみられた。中枢の可塑性に深く関与している NMDA レセプターを脳皮質特異的にノックアウトしたヘテロのマウスを用いて、皮質からのシナプス形成をブロックし、同様の実験を行った。ノックアウトマウスではコントロール群に比べ、刺激と対側の反応強度は有意に減弱を認めた。

神経回路形成と再編成に関わるプロトカドヘリン α をノックアウトしたマウスに対し、経頭蓋的に電気刺激を左の体性感覚野に与えたところ、ノックアウトマウスでは対側の体性感覚野の応答は有意に減弱していた。このことから、プロトカドヘリンノックアウトマウスは左右半球間の脳梁連絡が弱いマウスといえる。このマウスを用いて同様の実験を行った。ノックアウトマウスではコントロール群に比べ、刺激と対側の反応強度は有意に減弱を認めた。

以上のことを総合すると半球間における経験依存的可塑性が神経交差移植後の回復に重要な役割を果たしていると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Avulsion of spinal nerve roots in the brachial plexus (BP) can be repaired by crossing nerve transfer via a nerve graft to connect injured nerve ends to the BP contralateral to the lesioned side. Sensory recovery in these patients suggests that the contralateral primary somatosensory cortex (S1) is activated by afferent inputs that bypassed to the contralateral

BP. To confirm this hypothesis, the present study visualized cortical activity after crossing nerve transfer in mice through the use of transcranial flavoprotein fluorescence imaging. In naïve mice, vibratory stimuli applied to the forepaw elicited localized fluorescence responses in the S1 contralateral to the stimulated side, with almost no activity in the ipsilateral S1. Four weeks after crossing nerve transfer, forepaw stimulation in the injured and repaired side resulted in cortical responses only in the S1 ipsilateral to the stimulated side. At eight weeks after crossing nerve transfer, forepaw stimulation resulted in S1 cortical responses of both hemispheres. These cortical responses were abolished by cutting the nerve graft used for repair. Exposure of the ipsilateral S1 to blue laser light suppressed cortical responses in the ipsilateral S1, as well as in the contralateral S1, suggesting that ipsilateral responses propagated to the contralateral S1 via cortico-cortical pathways. Direct high-frequency stimulation of the ipsilateral S1 in combination with forepaw stimulation acutely induced S1 bilateral cortical representation of the forepaw area in naïve mice. Cortical responses in the contralateral S1 after crossing nerve transfer were reduced in cortex-restricted heterotypic GluN1 (NMDAR1) knockout mice. Functional bilateral cortical representation was not clearly observed in genetically manipulated mice with impaired cortico-cortical pathways between S1 of both hemispheres. Taken together, these findings strongly suggest that activity-dependent potentiation of cortico-cortical pathways has a critical role for sensory recovery in patients after crossing nerve transfer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2010年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2011年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：形成外科学

キーワード：神経交叉術 神経端側縫合 大脳イメージング

1. 研究開始当初の背景

われわれは神経トレーサーとして、神経細胞からその軸索全長を染色・観察可能な adenovirus vector を用いた末梢神経研究方法を確立し、世界中でも極めて特色ある研究を行ってきた。I: 神経端側縫合術における神経再生(adenovirus vector を用いた神経再生経路全長の検討)

神経端側縫合を行うと、支配髄節が重複する正中神経ドナーの場合、collateral sprouting (adenovirus vector を用いることにより、その形態を撮影し、世界で初めて撮影・報告した) による再生は少なく、組み合わせた両神経支配レベル近位から多くの再生線維が直接下降しており、尺骨神経がドナーの場合、逆に前者が多かった。また、いずれの神経の組み合わせでも、本来、染色されるはずのない、切断されたレシピエント神経である筋皮神経の支配髄節を含めた髄節レ

ベルが染色されており、縫合部ドナー神経線維から側芽が出て神経再生するばかりでなく、より近位から合目的な神経再生が起り、損傷された軸索の神経細胞からも、再生軸索が伸びることを証明し、前角および後根神経細胞レベルでの合目的な神経可塑性が存在することを初めて明らかにした。

II: 神経交叉術 その1 (交叉移植術)

下位腕神経叢引き抜き損傷臨床症例で、健側 C7 神経根に患側血管付き神経尺骨神経を端側縫合し、患側正中神経内側枝を端縫合・再建した。この症例で、術後早期から6年後の現在まで、前頸部浅層を通した移植尺骨神経の叩打により、一貫して患側正中神経領域に Tinell 徴候を認めた経験から対側大脳体制感覚野支配の原則に変化が起きうる可能性があると考え、マウス左右正中神経を神経移植で交叉再建し、患肢振動刺激を加え、経頭蓋的に、常在大脳フラビン蛋白の活性化で発

する蛍光性を高感度カメラでダイナミック・モニタリングし、賦活される大脳領野を観察・記録した。その結果、グループ I: 患側左前肢刺激にて両側体性感覚野にシグナルの出現を認めた。前胸部皮下で移植神経切離後はシグナルは消失。(n=6/6) グループ II: 左前肢刺激にて両側体性感覚野にシグナル出現。左橈骨・筋皮神経切離後も両側にシグナルを認めた。これらのことから、交叉神経移植を行うと両側の体性感覚野のシグナルが出現することから、神経可塑性により、合目的な脳の機能的再構築が起きると考えられた。

2. 研究の目的

これまで、脳梗塞後における大脳シナプス再構築に代表される脳可塑性の存在が、機能回復に極めて重要な役割をはたしていることが判明している。われわれは末梢神経再生研究の成果から、大脳より下位の脊髄、末梢神経レベルにも合目的に作用する神経可塑性が存在することを新しく明らかにしたが、本研究では、この存在をより明らかにするよう検証・展開し、かつ合目的な神経可塑性の作用を促すことのできる、すぐれた神経修復法を工夫・考案することである。

3. 研究の方法

マウスの脳内在フラビン蛋白の発する自己蛍光を経頭蓋的に高感度カメラで記録、大脳活動状況をイメージとして解析神経交差移植(isograft)を使用手術を施行した C57BL/6 マウスの左前肢に振動刺激を与え、大脳体性感覚野の刺激に対する応答を検討
8 週齢 C57BL/6♂ マウス 顕微鏡下手術 11-0 ナイロン使用

グループ I (N=10) 両側正中 (MN)、尺骨神経 (UN) 幹を切離し、別マウスの坐骨神経を同種移植し、左正中、尺骨神経を右へ繋ぎ換える。同時に左橈骨神経 (RN) 筋皮神経 (McN) は切離、結紮。術後、6~8 週間後に腹腔内ウレタン麻酔下に左前肢を振動刺激し、経頭蓋的に大脳賦活野のモニタリングする

グループ 2 (N=10) 同様に神経移植を行うが、左 RN, McN は温存する。術後 6~8 週間後にモニタリング。その後、左 RN, McN を切離し、再度モニタリングを行い、シグナルの変化を記録。移植神経はいずれも前胸部皮下を走行させる

評価検討方法

その 1 青色光 ($\lambda = 450 \sim 490 \text{ nm}$) 照射による神経活動抑制による解析同側反応領域に 90 分間照射し同側反応領域の神経活動を抑制したのち、同様の刺激を与え、モニタリングを行い、照射領域および、照射をしていない対側領域の反応により、対側へのシグナルが脳梁を介するか否か、それぞれのグル

ープで検討する

その 2 ノックアウトマウスによる検討

NMDA (N-methyl-D-aspartate) 受容体ノックアウトマウス、カドヘリン(細胞接着因子)ノックアウトマウスを用いて上記グループ 1, 2 を作成しフラビン蛋白ダイナミックイメージングを行って脳梁介在シグナル伝達について検討する。

4. 研究成果

端側接合交叉モデル術後 8 週で左前肢に振動刺激し、両側大脳体制感覚領野の反応が明確にモニタリングされた。特徴的なこととして同側大脳反応は、反対側領野に較べ反応が低く、反対側大脳領野の反応は端端吻合モデルのそれと同等の反応を示していた。シグナルの強さを正常値に補正して反応の強さを比較すると端側接合交叉モデルの反対側大脳領野の反応量は端端接合モデルのそれに較べて有意に大きな反応を示していた。

これらの結果から、端側神経交叉モデルでは同側大脳領野の反応が端端交叉モデルのそれよりより少ない影響を受けている事が判明した。

このことは、端側接合交叉臨床例の知覚回復が常に患側に限局されて感知、回復してくるメカニズムに関連している現象と考えられた。これを考察すると末梢神経端側縫合後には反対側大脳対性感覚領野シナプス単位内の神経細胞のうちでも体制感覚刺激により発火反応する細胞のグループとしないグループが生ずると考えられる。これと脳梁を介する両側大脳領野の連合現象が寄与して交叉神経接合により、これまで知られていない神経可塑性が作用すると考えられる。

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 2 件)

1. Yamashita H, Chen S, Komagata S, Hishida R, Iwasato T, Itohara S, Yagi T, Endo N, Shibata M, Shibuki K.: Restoration of contralateral representation in the mouse somatosensory cortex after crossing nerve transfer. PLoS One. 2012;7(4):e35676.

Epub 2012 Apr 20. 査読有り

2. Komagata S, Chen S, Suzuki A, Yamashita

H, Hishida R, Maeda T, Shibata M, Shibuki K.: Initial phase of neuropathic pain within a few hours after nerve injury in mice. J Neurosci. 2011 Mar 30;31(13):4896-905. 査読有り

〔学会発表〕(計4件)

1. 57th Annual Meeting for American Orthopedic Research Society
January 13-16, 2011 Long Beach, USA
Crossing Nerve Transfer in the Upper Extremity Produces Bilateral Somatosensory Cortical Representation In Mice. Yamashita, H, Komagata, S, Shanlin, C, Iwasato, T, Itohara, S, Yagi, T, Hishida, R, Endo, N, Shibata, M, Katsuei Shibuki

2. 第53回日本手外科学会学術集会
2010年4月14、15日 新潟市
末梢神経交差移植後の両側性体性感覚野応答 Bilateral somatosensory cortical responses after peripheral nerve crossing ;山下 晴義、陳 山林、柴田 実、澁木 克栄、遠藤 直人

3. 第32回日本神経科学会 2009/09/18
名古屋市
Nerve crossing produces bilateral somatosensory cortical representation in mice (P3-c26) Haruyoshi Yamashita, Seiji Komagata, Chen Shanlin, , Takuji Iwasato, Shigeyoshi Itohara, Ryuichi Hashida, Naoto Endo, Minoru Shibata, Katsuei Shibuki.

4. The 36th congress of the International Union of Physiological July 27-August1, 2009 Kyoto , Japan

PERIPHERAL NERVE CROSSING PRODUCES BILATERAL SOMATOSENSORY CORTICAL RESPONSES IN MICE

Haruyoshi Yamashita, Shanlin Chen, Seiji Komagata, Takuji Iwasato, Shigeyoshi Itohara, Ryuichi Hishida, Naoto Endo, Minoru Shibata, Katsuei Shibuki

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 実 (SHIBATA MINORU)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：50196432

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし