

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：13101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K21237

研究課題名（和文）脳卒中後の皮質脊髄路再編における抑制性回路の制御機構の統合的解明

研究課題名（英文）Integrative elucidation of regulatory mechanisms of inhibitory circuits for corticospinal tract reorganization after stroke

研究代表者

井上 貴博（Inoue, Takahiro）

新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号：20964521

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、神経活動の制御をになう抑制性GABAニューロンに着目し、皮質脊髄路の神経活動や回路再編を制御するメカニズムを統合的に明らかにすることを目的とした。本研究を通して、大脳皮質GABAニューロンの標識や時空間特異的な脱抑制操作を可能とする手法を確立し、GABAニューロンと皮質脊髄路の接続様式や脱抑制操作がもたらす作用を見出した。また、脳卒中後の回路再編を促進する方法論の一端が明らかになり、再編をもたらし因子を網羅的に探索する実験基盤も確立することができた。本成果は、皮質脊髄路再編における抑制性回路の制御機構の統合的な理解に貢献すると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳卒中などの脳血管障害により中枢神経がダメージを受けると、神経回路が破綻し様々な機能障害が生じる。運動機能障害をはじめとする身体機能の障害は、本邦において介護を要する主な原因となっているが、根本的な治療法は確立していない。一方、障害を逃れて残存した回路の再編は、機能回復に寄与することがわかってきており、回路再編の制御が機能回復に向けた治療標的になると考えられている。本研究が見出した大脳皮質の抑制性回路による制御機構に関する知見は、再編をもたらし基本原理の理解や、機能回復を促進する新たな治療戦略の確立に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Reorganization of corticospinal tract (CST) contributes to motor function recovery after stroke. Although neural activity could be one of the key factors for CST rewiring, the underlying mechanism remains largely unknown. In this study, we focused on cortical GABA neurons and established several tools to study the structure and function of inhibitory circuit. We revealed the connection pattern between GABA neurons and CST neurons and the effect of disinhibitory manipulation on CST activity and rewiring after stroke. In addition, we established the experimental system to analyze cell-type-specific gene expression. Our data and tools will contribute to understand the mechanism of CST rewiring regulated by inhibitory circuit.

研究分野：リハビリテーション科学

キーワード：神経回路 皮質脊髄路 抑制性ニューロン 神経活動 脳卒中 再編

1. 研究開始当初の背景

脳卒中などの脳血管障害により中枢神経がダメージを受けると、神経回路が破綻し様々な機能障害が生じる。運動機能障害をはじめとする身体機能の障害は、本邦において介護を要する主な原因として知られ、自立した社会生活を困難にする。しかし、障害を完全に克服する根本的な治療法は確立していないのが現状である。

一方、げっ歯類を対象とした基礎研究の知見として、障害を逃れて残存した神経回路は再編し、機能回復に寄与することが近年明らかになりつつある¹。特に、運動を担う皮質脊髄路は、投射先の脊髄内で発芽し、局所的に新たな回路を形成することで障害された運動機能を代償する。したがって、機能回復を促す治療戦略として、回路再編の制御が標的となることが期待される。

過去の研究から、リハビリテーションや各種の刺激法により回路の再編が増強することが示されている^{2,3}。そのため、回路網を形成するニューロンの神経活動は、回路再編を促す上で重要な要素であると考えられる。しかし、神経活動の制御をになう抑制性ニューロンが、脳卒中後の皮質脊髄路にどのように作用し再編を制御するのか、いまだ多くの点が不明のままである。

2. 研究の目的

本研究では、皮質脊髄路を対象として、大脳皮質における抑制性 GABA ニューロンが、脳卒中後の回路再編へもたらす作用とその機序を明らかにすることを目的とした。「抑制性 GABA ニューロンの時空間特異的な脱抑制操作により、脳卒中後の皮質脊髄路再編を促すことができるか」という仮説を、分子・構造・機能の観点から検証し、回路再編機序の統合的な解明を試みた。また本研究を通して、GABA ニューロン特異的な標識や活動操作法を確立することで、脳卒中後の機能回復を促進する新たな治療開発への足がかりになると考えた。

3. 研究の方法

(1)GABA ニューロンの標識と皮質脊髄ニューロンへの接続

遺伝子工学的手法と細胞培養により、各ニューロンを蛍光標識するためのアデノ随伴ウイルス(AAV)を作製した。麻酔下において、マウスの大脳皮質に mCherry 発現を誘導する特定の AAV を局所注入し、GABA ニューロンを標識した。皮質脊髄ニューロンは、逆行性の EGFP 発現 AAV を用いて脊髄から逆行性に標識した。任意の日数後に灌流固定を行い、mCherry で標識した GABA ニューロンと、GFP で標識した皮質脊髄ニューロンとの接続を組織学的に観察した。

(2)GABA ニューロンの脱抑制操作と皮質脊髄路への作用の検証

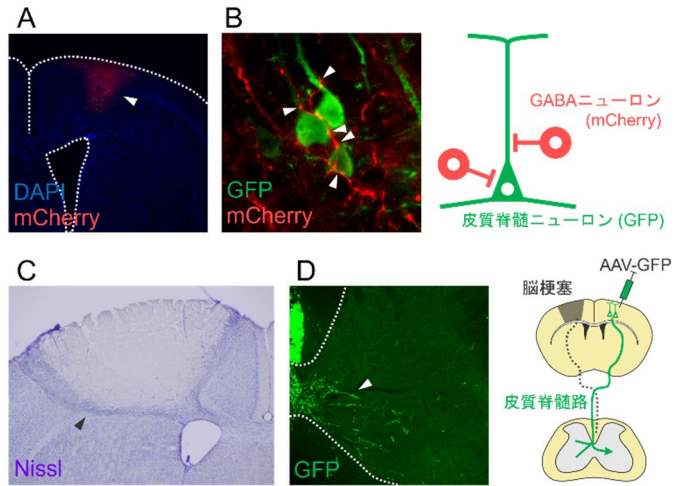
脱抑制操作を可能とする AAV と神経細胞の活動を可視化する AAV を用いて、GABA ニューロンと皮質脊髄ニューロンをそれぞれ標識した。任意の日数後、大脳皮質運動野において、皮質脊髄ニューロンの活動計測を行い、GABA ニューロンの脱抑制操作にともなう作用を検証した。

また、マウス脳梗塞モデルを用いて、脳卒中後の皮質脊髄路の再編に与える影響についても検証した。脳梗塞を作製後、残存した皮質脊髄路を、順行性の EGFP 発現 AAV を注入して標識した。任意の日数後、脊髄を組織学的に観察し、軸索の伸長様式を解析した。本モデルの病変部位は、ニッスル染色を行い観察した。また、各種の遺伝子改変マウスを交配させ、細胞種特異的な mRNA 抽出を行い、再編をになう領域における遺伝子発現解析を試行した。

4. 研究成果

(1) GABA ニューロンの標識と皮質脊髄ニューロンへの接続

mCherry 発現を誘導する特定の AAV の注入により、大脳皮質運動野の GABA ニューロンを局所的に標識し可視化することに成功した(図 A)。また、遺伝学的に GABA ニューロンが標識されている遺伝子改変マウスを用いて、本標識方法の特異性を確認することができた。さらに、本標識方法と皮質脊髄ニューロンの標識を組み合わせたマウスの組織切片を観察したところ、GABA ニューロンは、皮質脊髄ニューロンの細胞体や樹状突起など多様な部位に接続していることを組織学的に見出した(図 B)。このことから、大脳皮質運動野における GABA ニューロンは、直接的かつ多様な接続様式により皮質脊髄路へ接続していることが明らかになった。



図：大脳皮質 GABA ニューロンの標識とマウス脳梗塞モデルを用いた検証

(2) GABA ニューロンの脱抑制操作と皮質脊髄路への作用

脱抑制操作を可能とする AAV を(1)と同様の手法で注入し、GABA ニューロンの脱抑制操作を行ったところ、皮質脊髄ニューロンの神経活動が顕著に増強した。続いて、脳梗塞モデルマウスを用いて(図 C)障害対側の大脳皮質から伸びる皮質脊髄路の発芽に着目し(図 D)、GABA ニューロンの時空間特異的な脱抑制操作により再編を促すことができるか検証を行った。当初想定していた条件では再編はほとんど促進されなかったものの、新たな仮説に基づき複数の条件を試行した結果、一部の条件下において、皮質脊髄路の再編を促進する所見が得られた。遺伝子発現解析の実験系においては、ニューロンやグリア細胞を中心に細胞種特異的なマーカー遺伝子の発現解析を行い、標的細胞種の mRNA を特異的に抽出できていることを確認した。

以上、本研究は抑制性ニューロンと皮質脊髄路の接続様式や、脱抑制操作がもたらす作用を見出し、回路再編を促進する方法論の一端を明らかにした。分子機序は不明のままとなったが、今後の研究において、本研究で確立した実験系を活用することにより、再編を誘導する分子を網羅的に探索することが可能となっている。本研究の成果は、脳障害後の回路再編機序の統合的な理解に貢献すると期待される。

<引用文献>

1. 井上 貴博, 上野 将紀. (2023). 中枢神経の障害にともなう皮質脊髄路の再編. *神経心理学* 39(1): 30-39.
2. Ishida A, Kobayashi K, Ueda Y, et al. (2019). Dynamic Interaction between Cortico-Brainstem Pathways during Training-Induced Recovery in Stroke Model Rats. *The Journal of Neuroscience*, 39(37), 7306-7320.
3. Wahl AS, Büchler U, Brändli A, et al. (2017). Optogenetically stimulating intact rat corticospinal tract post-stroke restores motor control through regionalized functional circuit formation. *Nature communications*, 8(1), 1187.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 井上 貴博, 上野 将紀	4. 巻 39
2. 論文標題 中枢神経の障害にともなう皮質脊髄路の再編	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 神経心理学	6. 最初と最後の頁 30-39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.20584/neuropsychology.17171	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Inoue Takahiro, Ikegami Ryo, Takamatsu Yasuyuki, Fukuchi Mamoru, Haga Sanae, Ozaki Michitaka, Maejima Hiroshi	4. 巻 799
2. 論文標題 Temporal dynamics of brain BDNF expression following a single bout of exercise: A bioluminescence imaging study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 137120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2023.137120	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井上 貴博
2. 発表標題 運動による可塑性を強化するためのGABAを標的とした薬理的アプローチ
3. 学会等名 第28回 日本基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

運動が支える脳の健康. 新潟大学脳研究所 脳研コラム. 2023年7月
<https://www.bri.niigata-u.ac.jp/research/column/001981.html>

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
---------	---------