

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：24303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890198

研究課題名(和文) 脊髄損傷後の大脳皮質での神経回路の可塑性における逆行性軸索輸送の機能の解明

研究課題名(英文) Retrograde axonal transport contributes to neural plasticity in motor cortex after spinal cord injury

研究代表者

大原 亮(OHARA, RYO)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80636986

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：我々はラットの海馬神経細胞の分離培養の実験で、軸索損傷後に新たな軸索が生じる現象(軸索新生)を認め、さらにp-stat3が損傷シグナルとして逆行性軸索輸送により細胞体まで運搬され軸索新生を引き起こすことを確認した。脊髄損傷モデルラットを用いたin vivoの実験では、ウェスタンブロッティング法を用いた解析では、損傷部、損傷より吻側部のいずれにても、p-stat3の発現上昇を認めた。この結果から、p-STAT3が逆行性軸索輸送により運搬されている可能性が示唆された。しかし、神経回路の可塑性に関与しているかについてはさらなる研究が必要である。

研究成果の概要(英文)：We showed that a new neurite arise from a cell body and becomes a new axon after axotomy in hippocampal neurons in dissociated culture and retrograde transport of phosphorylated stat3 (p-stat3) by importin-dynein complex contributes to inducing the neuritogenesis after axotomy in our previous reports. In this time, we tried to show the retrograde transport of p-stat3 contributes to inducing reconstruction and plasticity of neural network in motor cortex in vivo by using spinal cord injury model rat. We showed that the level of p-stat3 increased after spinal cord injury in not only the injury site but also the rostral site to the injury site by Western blotting. This result suggested that p-stat3 was transported by retrograde axonal transport after spinal cord injury. But further studies are required to show whether the retrograde transport of p-stat3 contributes to inducing reconstruction and plasticity of neural network in motor cortex.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：神経内科学

キーワード：脊髄損傷後 逆行性軸索輸送 神経回路の可塑性

1. 研究開始当初の背景

(1) 軸索損傷後の軸索新生と逆行性軸索輸送

末梢神経損傷後の軸索再生のメカニズムとして、損傷シグナルが軸索損傷部位から細胞体へ逆行性に伝わり軸索再生が生じると考えられている (Neuron 2005;18:276-283)。またラットの後根神経節の実験では末梢側軸索を損傷後に中枢側を切断すると、本来再生困難である脊髄内へ軸索再生することが知られている (Nature 1984;309:791-793)。この現象は“conditioned lesion paradigm”と呼ばれ、末梢側軸索損傷により損傷シグナルが細胞体にまで逆行性に運ばれた為に神経細胞が本来持っている再生能力を増強したことが示唆される。我々は、ラット胎児の海馬神経細胞の分離培養を行い、極性獲得後の神経細胞の軸索を切断し、タイムラプス顕微鏡下で観察したところ、切断数時間後に細胞体から新たな突起が生じ軸索化する現象(軸索新生)を認めた (Biochem Biophys Res Commun 2011;405:697-702)。さらにリン酸化 stat3 (p-stat3) が逆行性軸索輸送を担うモーター蛋白である dynein と核内輸送蛋白である importin により、損傷シグナルとして損傷部位より逆行性軸索輸送を介し細胞体にまで伝達され細胞体より軸索新生が生じることを明らかにした (右上図) (Cell Death and Disease 2011 2,e175)。

(2) 中枢神経(脊髄)損傷後における大脳皮質での神経回路の可塑性

運動野を損傷すると運動障害が生じるが、その後機能回復を示すことがある。動物モデルの実験にて機能回復に伴って、運動野の体部位局在に変化が生じることが知られている。運動野そのものではなく脊髄に損傷を受けた後にも、運動野での機能的な変化が生じることが明らかになっている (Science 2007;318:1150-5)。マカクザルにおいて皮質脊髄路を切断すると、一時的に重篤な運動麻

痺が生じるが、その後精密把握の回復が生じる。機能回復に伴って、把握運動時に健常時とは異なった運動野の活動がみられることの報告があり、脊髄損傷後に大脳皮質運動野の機能変化が生じることで運動機能回復が実現した可能性が考えられる (J Comp Neurol 2009;51:493-506)。このような観点から我々は、「損傷を受けた神経細胞では、損傷シグナルが軸索損傷部から逆行性軸索輸送により大脳皮質の神経細胞体にまで伝わることにより神経回路の再構築(可塑性)が生じ、これらを制御することにより脊髄損傷後の大脳皮質における神経回路の可塑性を促し得るのではないか」と考えた。

2. 研究の目的

(1) 過去に脊髄損傷・多発性硬化症モデルマウスを用いた実験において大脳皮質レベルでの神経回路の可塑性についての報告を認めているがそのメカニズムについては解明されていない。また、脊髄損傷時の大脳皮質の神経回路の可塑性には、『軸索が損傷された』という情報が逆行性軸索輸送により大脳皮質の錐体神経細胞体にまで伝達される必要がある。前述した我々の *in vitro* の実験結果に基づき、p-stat3 が損傷シグナルとして軸索切断部より逆行性軸索輸送により大脳皮質まで運搬され神経回路の再構築(可塑性)が生じ、さらに運動機能回復に寄与することを証明することが目的である。

脊髄損傷マウスでの大脳皮質運動野第 V 層錐体神経細胞の形態学的変化の確認

脊髄損傷モデル群とコントロール群での大脳皮質第 V 層の錐体神経細胞の形態学的変化(軸索・樹状突起の数・長さ、branching の数)を評価する。軸索のマーカーである抗 Tau-1 抗体、樹状突起のマーカーである抗 MAP-2 抗体を用い大脳皮質の免疫組織染色を行い観察する。

タイムラプスイメージングによる大脳皮質運動での神経回路の再構築の観察

2光子顕微鏡を使用し脊髄損傷ラットの生体脳の大脳皮質錐体神経細胞を観察し、神経回路の再構築、軸索新生などをタイムラプスイメージングで観察する。

大脳皮質での神経回路の可塑性に対する逆行性軸索輸送の関与の解明

逆行性軸索輸送を抑制する方法として、Chromophore-assited Laser inactivation法 (CALI法)を用いる(Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1988;95:4293-4298)。CALI法により、脊髄損傷部での逆行性軸索輸送を担うモーター蛋白である dynactin を局所的かつ特異的に不活化し、逆行性軸索輸送を阻害する。この手法による逆行性輸送の阻害時での神経回路の可塑性を control 群と比べ、上記により確認する。

p-stat3 の損傷シグナルとしての機能の解明

我々は *in vitro* の実験にて軸索切断後の軸索新生のメカニズムとして、p-stat3 が損傷シグナルとして損傷部位より逆行性軸索輸送を介し細胞体にまで伝達され細胞体より軸索新生が生じることを明らかにした。今回、脊髄損傷マウスを用い、大脳皮質での神経回路の再構築(可塑性)に p-stat3 が損傷シグナルとして寄与しているのではないかと仮説を立て、証明することが目的である。具体的には脊髄損傷モデルマウスでの脊髄損傷軸索部、大脳皮質第V層錐体神経細胞での p-stat3 の発現とその経時的变化を、免疫組織染色、western blotting 法で検討する。さらに stat3 の活性化阻害剤である AG490 を脊髄損傷部に投与し、大脳皮質第V層の錐体神経細胞の形態学的変化と運動機能回復度を非投与群とで比較、検討する。

(2) 本研究の意義

ラットなどの動物モデルでは中枢神経損傷後でも、ある程度機能回復することが知られている。また脊髄損傷後に大脳皮質運動野のマッピングが変化するなど、大脳皮質での神

経回路の再構築・可塑性を示唆する報告を認めるが、この神経回路の可塑性のメカニズムを解明し制御できれば中枢神経再生につながると思われる。一方、損傷部より上位の大脳皮質レベルで神経回路の再構築が生じるためには『損傷を受けたという情報が大脳皮質にまで逆行性に伝達される』必要が考えられる。末梢神経軸索切断の実験では、何らかの転写因子などの損傷シグナルが逆行性輸送により細胞体にまで伝わり軸索再生に関わるとの報告があるが、中枢神経再生と逆行性軸索輸送の関連性を示した報告は認められない。また我々はラット胎児の海馬神経細胞を用いた実験で、軸索切断後に p-stat3 が損傷シグナルとし逆行性軸索輸送により運ばれることを証明した。この軸索損傷後の軸索新生が神経回路の可塑性を一部反映するモデルと考えられ、今回脊髄損傷ラットを用いた *in vivo* の実験において、神経回路の再構築のメカニズムとして p-stat3 の逆行性輸送が明らかになれば、中枢神経回路の可塑性を制御することができ、中枢神経損傷後の機能回復を促進する治療法につながる可能性が考えられる。

3. 研究の方法

本研究では脊髄損傷後の大脳皮質での神経回路の可塑性のメカニズムに逆行性軸索輸送が関与し、さらに細胞体に伝わる損傷シグナルを同定することが目的である。その要点としては以下の4段階に分けられる。

(1) 脊髄損傷後の大脳皮質運動野での神経回路の形態学的な変化や軸索新生の確認

メスの生後8週の C57BL/6J マウスに胸椎9/10レベルで背側椎弓切除を行い、脊髄背側部から一定の深さをメスにて脊髄を切断する。(J Biol Cell 2011;286:1876-83) また大脳皮質第V層の錐体神経細胞の同定には、retrograde tracer である fluoro gold や Alexa Flour 488 を conjugate した Chorela

Toxin B を脊髄損傷部より注入し、大脳皮質第 V 層で錐体神経細胞をラベルする（未発表だがすでに確認済み）。次に脊髄損傷マウスを用い、損傷後（6 時間、1 日、3 日、7 日、14 日後）に retrograde tracer

でラベルした大脳皮質の錐体神経細胞の形態学的変化（軸索・樹状突起の数、長さ、分枝の数について計測）について、軸索、樹状突起の各々のマーカーである Tau-1, MAP2 抗体を用い免疫組織染色にて検討する。また、脳損傷ラットを用い、脳損傷後に pyramidal neuron をスライスカルチャーにて観察し、コントロール群と比べ axonal sprouting が増加した（軸索から枝を優位に多く出していた）との報告を認めている（Journal of Neuroscience 1995;15:8234-8245）。上記にて脊髄損傷後の大脳皮質での神経回路の変化が生じる時期を同定できれば、2 光子顕微鏡を用いて、脊髄損傷マウスの大脳皮質第 V 層をタイムラプスイメージングで観察を行い、retrograde tracer にてラベルした錐体神経細胞を観察し、細胞体からの軸索新生の有無を検討する。

（2）CALI 法による逆行性軸索輸送の阻害

逆行性軸索輸送を担うモーター蛋白である dynein が微小管のレールに結合することにより、軸索末端より細胞体へ、栄養因子・ニューロフィラメント・代謝産物・変性した蛋白などを運搬する。また dynactin が、dynein の intermediate chain に結合し、輸送機能を発現すると考えられている。逆行性軸索輸送を抑制する方法として dynactin を CALI 法により、局所的かつ特異的に不活化する手法を用いる。CALI 法は、対象の蛋白質に対して特異的かつ機能を阻害しない抗体にマラカイトグリーンなどの色素を結合させ細胞内に注入し、そこに光を照射することによりフリーラジカルを発生させることにより特定のタンパク質を不活化する確立された方法である

(Proc.Natl.Acad.Sci.USA1988;95:4293-4298)。さらに dynactin は 11 個のサブユニットから構成されているが、そのサブユニットの一つである dynamitin(p50)を標的タンパクとする。dynamitin に体する抗体である anti-gmp23-48k/dynamitin antibody (KLLGPDAAINLADPDGC) を作成し、マラカイトグリーン (MG) を結合させた MG-anti-gmp23-48k/dynamitin antibody を脊髄損傷マウスの脊髄損傷部に注入し、レーザー光を照射することにより脊髄損傷部での p50 を不活化させる手法を用いる。CALI 法により p50 を不活化させることにより dynactin が崩壊しその機能を失うことがすでに報告されており、本研究はその方法論に準じて行う。(Biochem Biophys Res Commun 1997;233: 295-299, Biochem Biophys Res Commun 2008;372:418-422)。

（3）逆行性軸索輸送の阻害による脊髄損傷後の大脳皮質レベルでの神経回路可塑性への影響についての検討

CALI 法により、逆行性輸送を阻害時での脊髄損傷マウスの大脳皮質運動野での錐体神経細胞の形態学的変化（軸索・樹状突起の数、長さ、分枝の数について計測）について損傷後（6 時間、1 日、3 日、7 日、14 日後）に大脳皮質の錐体神経細胞の形態学的変化について Tau-1, MAP2 抗体を用いた免疫組織染色にて検討する。

（4）脊髄損傷後における p-stat3 の損傷シグナルとしての機能の解明

脊髄損傷後（3 時間、6 時間、1 日、3 日、7 日、14 日後）の各時間、脊髄損傷部（胸髄 Th9/10）、損傷よりやや吻側部（頸髄部）大脳皮質運動野の各部位で、抗 stat3 抗体、抗 p-stat3 抗体を用い免疫組織染色を行い、軸索内（大脳皮質では錐体神経細胞体内）での p-stat3 活性を空間的、経時的変化を検討する。また同様に、損傷後各時間、各部位の組織を採取し、各々のサンプルからタンパクを

回収し、western blotting 法を用い、p-stat3 の空間的、経時的変化を検討する。また、stat3 の活性化阻害剤である AG490 を脊髄損傷部に投与し、脊髄損傷後の大脳皮質で運動野の錐体神経細胞の形態学的変化（軸索・樹状突起の数、長さ、分枝の数について計測）を検討し、さらに下肢運動機能について、脊髄損傷後 1、3、5、7、14、21 日後に Basso mouse scale(BMS)open-field score で、また 28 日後に grid-walking test で評価し、回復度をコントロール群と比較、検討する。

4 . 研究成果

(1)大脳皮質運動野第 5 層錐体神経細胞の同定

脊髄損傷後の大脳皮質運動野での神経回路の形態学的変化を免疫染色を用い確認する為に、大脳皮質運動野第 5 層錐体神経細胞を、GFP microsphere、fluoro gold や Alexa Flour 488 を conjugate した Cholera Toxin B などの retrograde tracer を用い標識することを試みた。脊髄損傷後ラットの頸髄に各々の retrograde tracer を注入し、1 週間後に還流固定を行い大脳皮質運動野の切片化を行った。その結果、GFP microsphere よりも Fluoro gold や Alexa Flour 488 を conjugate した Cholera Toxin B を用いた方が、大脳皮質運動野錐体神経細胞の描出が良好であり、その細胞体、神経突起を確認することができた。

(2) 脊髄損傷後に p-STAT3 の発現が上昇する

我々はラット胎児海馬神経細胞を用いた in vitro の実験にて軸索切断後の軸索新生のメカニズムとして、p-stat3 が損傷シグナルとして損傷部位より逆行性軸索輸送を介し細胞体にまで伝達され細胞体より軸索新生が生じることを明らかにした。この現象を脊髄損傷モデルラットを用い、損傷後 3 時間、24 時間後に、損傷部、損傷部よりも吻側の脊

髄での p-STAT3 の発現に関して、ウェスタンブロットング法を用い検討した。結果、損傷部、損傷部より吻側部のいずれにおいても、コントロールと比べ、p-STAT3 の発現上昇を認めた。損傷部のみならず、損傷部より吻側部でも p-STAT3 の発現上昇を認めたことから脊髄損傷後に p-STAT3 が逆行性軸索輸送により運搬されている可能性が示唆された。しかし、神経回路の可塑性に関与しているかについてはさらなる研究が必要である。

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

大原亮:Axotomy induces axonogenesis in hippocampal neurons through stat3. 第 54 会日本神経学会学術大会 2013 年 6 月 1 日 東京

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大原 亮 (OHARA, Ryo)

京都府立医科大学・神経内科・助教

研究者番号：80636986