

「脳の機能発達と学習メカニズムの解明」
平成16年度採択研究代表者

鍋倉 淳一

自然科学研究機構・生理学研究所・教授
発達生理研究系・生体恒常機能発達機構研究部門

発達および障害回復期における神経回路の再編成機構

1. 研究実施の概要

発達脳では、広汎に活性化される機能回路がまず形成され、その後、より細かな機能回路単位の絞込みが行われ、成熟した回路が完成する。これら多くの変化は、内外環境による神経回路活動に依存性のプロセスであり、高次脳機能においてはしばしば臨界期が存在する。さらに、成熟した脳の障害後の回復期に、障害および関連領域において活動領域および回路の再編成が観察される。また、動物モデルにおいて、種々の障害後早期に、多くの未熟期に特有な回路特性が再現することが明らかになってきている。このことから再生回路の再編成においても、発達期と同様のプロセスが再現されることが示唆される。本研究では、ヒトおよびサルにおいて障害後の回復期における脳活動領域の変化を検討するとともに、その背景にある回路レベルでの変化を理解するために、未熟期および障害回復期におこる機能回路の変化の共通性および特殊性を抽出・比較する。これにより機能回復を目的とした回路再構築に向けた神経回路基盤の情報を蓄積する。

これまで、ヒトの脳梗塞後の回復期早期には、障害関連機能の作動時には、より広い領域の活動が観察され、その後絞り込みが起こることが観察され、障害後の機能回復と活動領域の変化の時期が密接に関連していることが明らかになってきた。ヒトにおいて障害後の機能回復を促進する手段として鏡療法が脳機能に与える影響を調査し、鏡療法が脳の可塑性変化に関与している可能性を示した。また、サルを用いた研究により、機能回復期におけるリハビリの有効性およびリハビリ開始の臨界期の存在がPETによる脳イメージングにより明らかにした。また、サル虚血脳で、急性期にアポトーシスを指標にして予測した障害領域と、リハビリテーション後の慢性期のPETによる評価により、リハビリテーションの効果を定量的に評価出来る可能性を示した。これらの脳機能の変化の基盤として、大脳皮質神経回路の変化について検討を加えた。障害部位においてはシナプスの形成・消失が障害回復期に盛んに起こることが脳梗塞モデルマウスの大脳皮質回路で観察された。そのメカニズムについて、多光子励起顕微鏡を生体に応用し、脳内免疫細胞であるミクログリアのシナプス監視機構について検討し、障害脳におけるミクログリアによるシナプス除去に対する関与を明らかにし

た。また、大脳皮質回路形成・再編にGABA応答が重要な関わりをしていることが発達期において確認された。

今後は、ヒト、サルおよびマウスにおける研究をさらに展開し、障害・発達期における回路再編機構について総合的な理解を推進する。

2. 研究実施内容(文中にある参照番号は4.(1)に対応する)

本研究は、障害回復期に一旦形成された機能回路に起こる再編成の理解のため、1) 成熟した脳の障害後、機能回復に伴う大脳皮質活動領域の変化について、ヒトおよび障害モデル動物における非侵襲的計測法による観察と合わせて、背景にある活動回路の再編成の回路基盤を理解する。2) この回路再編の理解のために、発達期および再生期における活動神経回路再編成の基本原理の解明を進めることを目的とする。

ヒトにおける障害回復の脳機能評価装置としての近赤外線トポグラフィの高精度化・安定化技術を確立するため、頭部位置による擬陽的計測 Artifact の評価、光トポグラフィ計測データ分析ソフトウェアの開発を行った。また、今年度は障害された脳機能の再構築を賦活する方法についても検討をはじめ、近年注目されている鏡療法(Mirror therapy)が脳機能に与える影響を検証した。鏡療法は運動している非麻痺手を鏡に写し、麻痺手が運動しているような錯覚を与える訓練法であるが、健常被験者を対象として計測した場合、一次感覚運動野の側性化のバランスに変化が生じ、非運動手の運動を司る領域が活性化することを示した。この結果は脳卒中患者では障害側の脳機能を促進させ、神経回路の再構築または回復を促す可能性を示している。

サル大脳皮質虚血/梗塞モデルではアップルテストによる pick-up 時間を指標とした運動機能回復過程および PET を用いたベンゾジアゼピン結合評価を用いた障害領域の変化を検討した結果、運動リハビリ群では対照群に対し活動領域の改善が観察された。さらに、リハビリ開始時期を遅延させると機能回復の程度が遅延とともに低下し、障害後 14 日目からの開始では、リハビリの効果が消失した。更に、PET を用いて障害領域を検討した結果、早期リハビリ施行群では、軽度障害領域の減少と正常領域の増加が観察されたのに対し(軽度障害部位の回復)、リハビリ遅延群では、リハビリ施行による著明な変化は観察されなかった。これは、リハビリの脳障害部位かおよび機能の回復に対するリハビリ開始の臨界期が存在する可能性を示唆する。

脳障害後は虚血による急性障害からの回復という治療方針とともに、今後は亜急性期に新たな障害への予測・対処が新たな脳障害治療指針となる。亜急性に発生する脳障害を、アポトーシスマーカーを用いて予測の検討を行うため、新たなアポトーシスのバイオマーカーの開発に着手した。新規アポトーシス評価用 PET プローブである $[^{18}\text{F}]$ FIHB(特許公開前のため、詳細情報は開示不可)の有用性を、ラットおよびサルの虚血脳で評価した。まず、ラット脳虚血 PIT モデルを用いて、処理 1 日後に小動物 PET を用いて $[^{18}\text{F}]$ FIHB の脳内分布を計測し、計測後に、脳を摘出して TTC 染色で障害部位を描出すると同時に、アポトーシスの特異的マーカーである Bcl-2 の免疫組織学的解析を行った。その結果、 $[^{18}\text{F}]$ FIHB の脳内分布は、免疫組織学的にアポトーシスと同定された部位と良く一致しており、この PET プローブの亜急性期におこるアポトーシス部位の予測への有用性が確認された。次に、サル脳虚血モデルにおいて、虚血再還流 3

時間の時点で虚血障害が起こった半球の一部に高い集積を示し、この集積部位は同一個体で 4 週間後に $[^{15}\text{O}]$ ガスおよび $[^{11}\text{C}]\text{Ro15-1788}$ で評価した神経障害部位と良く一致していた。これらの結果は、 $[^{18}\text{F}]\text{FIHB}$ がアポトーシス部位の検出に有用で、急性期の PET 計測によって慢性期の神経障害を予測できる事を示唆するものであった。

これらの結果の背景にある機能回路再編を検討するため、大脳皮質虚血・再還流/梗塞モデルマウスの大脳障害部位における回路再編の長期観察法の確立とし

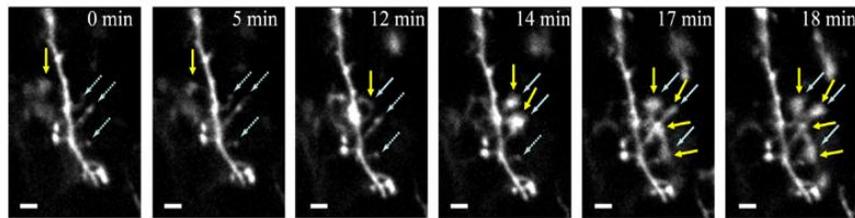


図 1 ミクログリアの突起(黄色矢印)が複数のシナプス(青色矢印)に特異的に連続してコンタクトする。しかし、樹状突起へのコンタクトは見られない。正常マウス。

図 1

て、多光子顕微鏡観察技術の in vivo への応用技術の開発を行った。観察技術・精度高度化を前年度に引き続き行い、世界最高レベルの最深部到達度の達成とともに、長時間のサブミクロンレベルの微細構造の連続観察技術の構築を達成した(成果は Crest 12: 2008 年 5 月で公開)。この観察技術を上記手法で作成した脳梗塞モデル動物に適用し、脳内微細構造、特にシナプス前構造であるシナプスブートン構造、シナプス後構造である棘突起(スパイン)の長期変化を同一個体で観察している(図 1)。回路の再編として、昨年に引き続き障害時に脳内免疫細胞であるミクログリアのシナプス監視機構と障害脳における変化について、ミクログリアと大脳皮質錐体細胞の両方に GFP が発現しているマウスを作成し、その相互関係を正常時および虚血障害細胞で観察した。正常時には、ミクログリアの突起(黄矢印)は約 1 時間毎に 5 分間シナプス(青矢印)に選択的にコンタクトすることが判明した。これに対して、障害回路では接触時間が 1 時間以上に著しく延長するとともに、シナプス全体を包み込み、しばしば、長時間コンタクト後にシナプスの消失(Stripping)が観察された(図 2)。これは障害回路におけるシナプス再編成を引き起こすメカニズムとして注目されるとともに、生体脳におけるシナプス除去のはじめての経時的観察である。また、現在、マウスでは脳障害 2 週間では、正常では非常に安定しているシナプ

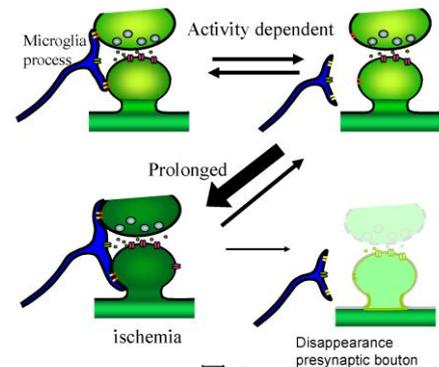
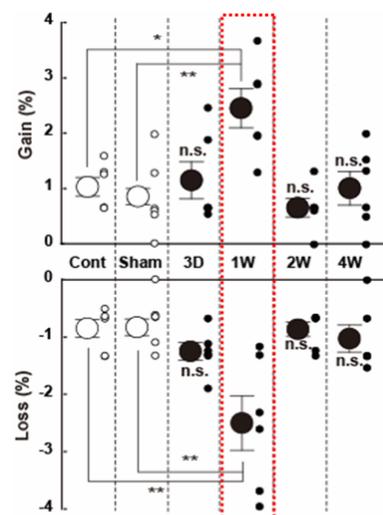


図 2



障害 1 週間後に障害した運動野とは対側の大脳皮質運動野のシナプスの新生・消失が増加し、その後安定化する。

図 3

ス構造の形成・消失ターンオーバーが著しく更新し、4週目には再び安定化することが判明した(図3)。この結果は、脳障害後には脳機能が急速に回復(変化)する時期とその後、回復が鈍化する時期の背景機序かも知れない。また、非可逆的な脳虚血障害では、障害を受けた半球とは対側の大脳皮質領域が代償的に活動することを本研究で報告したが、この障害とは対側の大脳皮質において、その回路のシナプス構造の形成・消失ターンオーバーが障害後4週間まで著しく亢進していることが判明した。さらには、感覚野障害では、正常では応答しない同側の末梢刺激にも応答する様になるとともに、障害後4週目には、その反応様式が同側からの末梢入力に対する回路活動(応答)パターンと類似してくることが観察された。代償機能の獲得過程における機能回路再編のメカニズムの解明につながる可能性が示唆される。

これらの結果から、今後、障害部位の回復・再編のメカニズム、回復の臨界期との連関、さらには、消失した脳内部位の代償機能獲得のメカニズムの解明へとつながることが期待できる。

3. 研究実施体制

(1)「神経回路再編機構研究」グループ

①研究分担グループ長:鍋倉 淳一(自然科学研究機構 教授)

②研究項目

- ・障害モデル動物作成と発達期における回路再編成機構
- ・多光子顕微鏡を用いた同一個体脳内回路の回復期における長期観察
- ・GABA 機能の発達および障害における可塑的变化と分子基盤の検討

(2)「ヒト脳機能回復計測」グループ

①研究分担グループ長:加藤 宏之(国際医療福祉大学病院 教授)

②研究項目

脳血管障害患者の脳機能回復過程に関する光トポグラフィ・fMRI を用いた検討

(3)「サル脳活動回復測定」グループ

①研究分担グループ長:塚田 秀夫(浜松ホトニクス(株)中央研究所 PET センター長)

②研究項目

障害モデル動物における活動領域の変化と再臨界期:活動領域の変化について、動物用 PET を用いた検討

(4)「細胞内クロール調節機構解析」グループ

①研究分担グループ長:福田 敦夫(浜松医科大学 教授)

②研究項目

神経回路の発達・再編と再臨界期への Cl⁻ transporter の関与の証明:胎生期に BrdU で発生細胞をラベルし、生後0日齢で新生仔の大脳皮質に focal freeze-lesion を作成し、

傷害部位への移動細胞の出生時期を同定した。GABA 細胞の早期の移動とそれらから放出される GABA が濃度勾配を形成しており、これが皮質板細胞の出生時期依存性の異常な細胞移動に関与して、その結果微小脳回が形成される可能性が示唆された。

また、ラットの三叉神経一次ニューロン結紮傷害モデルでは、傷害側の脊髓路核尾部での KCC2 の減少と神経節での NKCC1 の増加があり、このような $[Cl^-]_i$ 変化が傷害側における興奮伝播の拡大と痛覚過敏に関与することを明らかにした。

(5)「小脳シナプス発達機構研究」グループ

①研究分担グループ長:橋本 浩一(東京大学 准教授)

②研究項目

・発達期・再生期の小脳における神経回路の機能的再編成の基本原理の解明

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表 (原著論文)

鍋倉グループ

1. Iohara K, Zheng, L, Wake H, Ito M, Nabekura J, Wakita H, Nakamura H, Into T, Matsushita K, Nakashima M (2008) A Novel Stem Cell Source for Vasculogenesis in Ischemia: Subfraction of Side Population Cells from Dental Pulp, Stem Cell 26:2408-2418, 2008.
2. Kitamura A, Ishibashi H, Watanabe M, Takatsuru Y, Brodwick M, Nabekura J (2008). Sustained depolarizing shift of the GABA reversal potential by glutamate stimulation in hippocampal neurons. Neuroscience Research 62:270-277
3. Ishibashi H, Hirao K, Yamaguchi J, Nabekura J (2008) Inhibition of chloride outward transport by gadolinium in cultured rat spinal cord neurons. Neurotoxicology 30 155-159..
4. Kitamura A, Ishibashi H, Watanabe M, Takatsuru Y, Brodwick M, Nabekura J (2008). Sustained depolarizing shift of the GABA reversal potential by glutamate stimulation in hippocampal neurons. Neuroscience Research 62:270-277
5. Wake H, Moorhouse, AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J. Resting Microglia Directly Monitor The Functional State of Synapses *in vivo* and Determine The Fate of Ischemic Terminals. Journal of Neuroscience, 2009 April, scheduled.

加藤グループ

6. Imai I, Takeda K, Shiomi T, Taniguchi T, Kato H: Sensorimotor cortex activation during mirror therapy in healthy right-handed subjects: A study with near-infrared spectroscopy. J Phys Ther Sci 20(2), pp.141-145, 2008.
7. 武田湖太郎, 渡邊観世子, 郡司幸也, 加藤宏之: 頭部傾斜が Near-infrared

- spectroscopy 計測へ与える影響. 脳科学とリハビリテーション 8, pp.21-24, 2008.
8. 武田湖太郎, 加藤宏之: Near-infrared spectroscopy データ解析ソフトウェアの開発. 脳科学とリハビリテーション 8, pp.15-20, 2008.
 9. 平野大輔, 谷口敬道, 武田湖太郎, 岩崎博之, 下秀秀夫: 近赤外分光法(NIRS)による脳機能計測を用いた重症心身障害児・者の個別応答の明確化. 発達障害研究, 30(5), pp.388-396, 2008.
 10. 海老原彰, 田中裕一, 渡辺英寿, 小幡亜希子, 市川祝善: 酸素吸入光トポグラフィーによる脳虚血診断法の開発. BRAIN and NERVE: 神経研究の進歩 60, pp.547-553, 2008.

塚田グループ

11. K. Hashimoto, T. Ishima, Y. Fujita, M. Matsuo, T. Kobashi, M. Takahagi, H. Tsukada, M. Iyo, Phencyclidine-induced cognitive deficits in mice are improved by subsequent subchronic administration of the novel selective $\alpha 7$ nicotinic receptor agonist SSR180711, *Biol Psychiatry* 63 (2008) 92-97.
12. Noda, Y. Murakami, S. Nishiyama, D. Fukumoto, S. Miyoshi, H. Tsukada, S. Nishimura, Amyloid imaging in aged and young macaques with [^{11}C]PIB and [^{18}F]FDDNP, *Synapse* 62 (2008) 472-475.
13. S. Maruyama, H. Tsukada, S. Nishiyama, T. Kakiuchi, D. Fukumoto, N. Oku, S. Yamada, *In Vivo* quantitative autoradiographic analysis of brain muscarinic receptor occupancy by antimuscarinic agents for overactive bladder treatment, *JPET* 325 (2008) 774-781.
14. K. Hashimoto, S. Nishiyama, H. Ohba, M. Matsuo, T. Kobashi, M. Takahagi, M. Iyo, T. Kitashoji, H. Tsukada, [^{11}C]CHIBA-1001 as a novel PET ligand for alpha-7 nicotinic receptors in the brain: A PET study in conscious monkeys. *PLoS ONE* 3 (2008) e3231.
15. K. Shiba, S. Nishiyama, H. Tsukada, K. Ishiwata, K. Kawamura, K. Ogawa, H. Mori, The potential of (-)-*o*-[^{11}C]methylvesamicol for diagnosing cholinergic deficit dementia. *Synapse* 63 (2009) 167-171.
16. H. Ohba, N. Harada, S. Nishiyama, T. Kakiuchi, H. Tsukada, Ketamine/xylazine anesthesia alters [^{11}C]MNPA binding to dopamine D₂ receptors and response to methamphetamine challenge in monkey brain, *Synapse* (In press).
17. S. Muramatsu, T. Okuno, Y. Suzuki, T. Nakayama, T. Kakiuchi, N. Takino, A. Iida, F. Ono, K. Terao, N. Inoue, I. Nakano, Y. Kondo, H. Tsukada, Multi-tracer assessment of dopamine function after transplantation of embryonic stem cell-derived neural stem cells in a primate model of Parkinson's disease, *Synapse* (In press).
18. T. Urakami, A.T. Kawaguchi, S. Akai, K. Hatanaka, H. Koide, K. Shimizu, T. Asai, N. Harada, H. Tsukada, N. Oku, In vivo distribution of liposome-encapsulated hemoglobin determined by positron emission tomography. *Artif Organs* (In press).

19. D. Fukumoto, A.T. Kawaguchi, M. Haida, M. Yamano, Y. Ogata, H. Tsukada, Liposome-encapsulated hemoglobin reduces the size of cerebral infarction in rats: Effect of oxygen affinity. *Artif Organs* (In press).

福田グループ

20. Saitsu, H., Kato, M., Mizuguchi, T., Hamada, K., Osaka, H., Tohyama, J., Uruno, K., Kumada, S., Nishiyaman, K., Nishimura, A., Okada, I., Yoshimura, Y., Hirai, S-i., Kumada, T., Hayasaka, K., Fukuda, A., Ogata, K. and Matsumoto, N. *De novo* mutations in the gene encoding STXBP1 (MUNC18-1) cause early infantile epileptic encephalopathy. *Nat. Genet.* 40:782-788, 2008.
21. Koyama, Y., Matsuzaki, S., Gomi, F., Yamada, K., Katayama, T., Sato, K., Kumada, T., Fukuda, A., Matsuda, S., Tano, Y. and Tohyama, M. Induction of amyloid β accumulation by ER calcium disruption and resultant upregulation of angiogenic factors in ARPE19 cells. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 49:2376-2383, 2008.
22. Kilb, W., Hanganu, I.L., Okabe, A., Shimizu-Okabe, C., Fukuda, A. and Luhmann, H.J. Glycine receptors mediate excitation of subplate neurons in neonatal rat cerebral cortex. *J. Neurophysiol.* 100:698-707, 2008.

橋本グループ

23. Kano M, Hashimoto K, Tabata T. Type-1 metabotropic glutamate receptor in cerebellar Purkinje cells: a key molecule responsible for long-term depression, endocannabinoid signalling and synapse elimination. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, 363, 2173-2186, 2008
24. Hashimoto K, Yoshida T, Sakimura K, Mishina M, Watanabe M, Kano M. Influence of parallel fiber-Purkinje cell synapse formation on postnatal development of climbing fiber-Purkinje cell synapses. *Neuroscience*, in press.

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数 : 0 件 (CREST 研究期間累積件数 : 0 件)