

山下俊英

大阪大学大学院医学系研究科・教授

中枢神経障害後の神経回路再編成と機能回復のメカニズムの解明

§1. 研究実施の概要

本研究は、げっ歯類および霊長類の成体における脳障害後の代償性神経回路の形成と機能回復のメカニズムを、運動神経回路に着目して解明することを目標としている。特に、研究代表者が開発した神経回路修復モデルを用いて、運動神経回路の可塑性を制御する分子メカニズムの解明を行っている。まず運動神経回路の再形成の抑制機構として、軸索再生阻害因子の受容体である PIR-B に着目し、そのシグナル伝達機構を解明し、in vivo での役割を明らかにした。その結果、軸索再生阻害因子の作用を抑制するとともに、軸索伸展を促進する因子の作用を強めることで有効な回路の修復が得られることが判明し、新たな分子標的 SHP を同定することができた。次に、マウス片側脳挫傷後に、皮質脊髄路の軸索枝は対側に伸長し、目的のニューロンとシナプスを形成し、その後不要な軸索枝が刈り込みを受けるという3つのプロセスを経ることを明らかにしてきたが、本研究ではその分子機構を明らかにした。特に軸索枝の対側への伸長を促進するキーとなる因子とその受容体を同定することができ、そのシグナルを抑制することで、運動機能の回復と神経回路の修復が遅延した。また片側脳挫傷後に、GABA_A 受容体の発現抑制に基づく、皮質神経細胞の活性化が、機能回復を促進する役割を担うことがわかった、このことは、リハビリテーションの効果の科学的基盤となりうる。最後に、ヒトの脳梗塞、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 剖検例を用いて、様々な因子の発現解析を行っているところであり、さらにサルにおいて片側大脳損傷モデルの作成を行い、回路のトレーシングに着手しているところである。今後、得られた基礎的知見を土台として、神経回路の脱落を阻止しその修復を促進する治療法の開発に繋げたい。

§2. 研究実施体制

(1) 山下グループ

- ① 研究分担グループ長: 山下 俊英 (大阪大学大学院医学系研究科、教授)
- ② 研究項目: 中枢神経障害後の神経回路再編成と機能回復のメカニズムの解明
 - ・マウス脳障害後の皮質脊髄路の可塑性制御機構の解明
 - ① 運動神経回路の回路再形成の抑制機構

- ②皮質脊髄路の回路再形成の分子メカニズムの解明
- ③不要な軸索枝の刈り込み現象の解明

(2)望月グループ

- ①研究分担グループ長:望月 秀樹 (北里大学医学部、教授)
- ②研究項目:ヒトでの脳障害後の皮質脊髄路の可塑性制御機構の解明
 - ・霊長類での脳障害後の皮質脊髄路の可塑性制御機構の解明
 - ①急性期脳梗塞、Binswanger型白質脳症、ALS剖検例による脊髄軸索再生阻害因子ならびにその受容体、回路再形成誘導因子の発現解析
 - ②脊髄interneuronsによる運動神経細胞変性の広がり

(2)高田グループ

- ①研究分担グループ長:高田 昌彦 (京都大学霊長類研究所、教授)
- ②研究項目:サルモデルによる皮質脊髄路の可塑性制御機構の検討
 - ・霊長類での脳障害後の皮質脊髄路の可塑性制御機構の解明
 - ①サルの片側脳損傷のモデルにおける皮質脊髄路の可塑的変化の解析

§3. 研究実施内容

(文中の番号は(4-1)に対応する)

・マウス脳障害後の皮質脊髄路の可塑性制御機構の解明

本研究では、げっ歯類および霊長類の成体における脳障害後の代償性神経回路の形成と機能回復のメカニズムを、運動神経回路に着目して解明することを到達目標とする。本研究では、研究代表者が開発した神経回路修復モデルを用いて、運動神経回路の可塑性を制御する分子メカニズムの解明を行っている。以下に、平成22年度に行った研究の方法と結果を述べる(大阪大学山下グループ)。

① 運動神経回路の回路再形成の抑制機構

ミエリンに局在する軸索再生阻害因子の受容体 PIR-B による運動神経回路の再形成の抑制について明らかにする目的で、PIR-B ノックアウトマウスに脊髄損傷を作製し、その後の機能回復を観察した。PIR-B ノックアウトマウスと wild type マウスの間で、運動機能に相違は見られず、皮質脊髄路の再生も認められなかった⁴。マウス片側脳挫傷後のモデルにおいても、同様の結果を得ている(Omoto et al., J. Neurosci., 2010)。この事実より、PIR-B の抑制だけでは、中枢神経回路の再生は望めないことが示唆される。

そこで PIR-B のシグナル伝達機構について明らかにすることで、新たな分子標的の探索を試みた。その結果、軸索再生阻害因子である MAG が PIR-B に結合することによって、以下の2つの働きが起こることを見いだした。①PIR-B の細胞内ドメインにチロシン脱リン酸化酵素である SHP-1 および SHP-2 が集積する。②PIR-B と神経成長因子 BDNF の受容体である TrkB が結合すること、また、SHP-1/2 は TrkB を不活性化することで、TrkB による軸索の伸展作用を抑制することである。次に、成体マウスの視神経を損傷させ、SHP siRNA を眼内に投与すると、通常では再生しない視神経の軸索が再生した²。この作用は、PIR-B が持つ軸索の再生を阻害する作用をブロックするとともに、軸索を成長させる機能を持つ TrkB の作用を促進させたことによってもたらされたものであることがわかった(図1)。したがって中枢神経回路の修復のためには、軸索再生阻害因子の作用を取り除くだけでは不十分で、軸索の伸展を促進することも重要であることが示唆された。

②皮質脊髄路軸索の標的部位への誘導機構

マウスの片側大脳皮質を広範に損傷させることにより、感覚運動野の神経細胞を死滅させた。これにより、対側の前後肢が麻痺するが、日にちの経過とともに徐々に運動機能が回復する。それとともに、健常側の皮質脊髄路が、頸髄の部分で対側に軸索枝を伸ばし、propriospinal neurons と intersegmental neurons とシナプスを形成する。この代償性神経回路が機能回復に必須であることをすでに見いだしていた。また片側脳挫傷後に、皮質脊髄路の軸索枝は①対側に伸長し、②目的のニューロンとシナプスを形成し、その後に③不要な軸索枝が刈り込みを受けるという3つのプロセスから成ることをすでに見いだしていた。本研究においては、in vivo における運動神経回路の可塑性を制御する分子機構を明らかにすることで、成体における神経回路の再編成のメカニズムを解明することを目標としている。この目的のために、脊髄レベルで本来の皮質

脊髄路の投射が消失した部分(標的ニューロン)で特異的に発現が変化している因子の網羅的解析を行ったところ、特定の因子(未発表データ)が interneurons において発現上昇を示すことを見いだした。皮質脊髄路にはその因子に対する受容体が発現しており、健常側大脳皮質でのその受容体の発現を、siRNAを用いて抑制したところ、軸索枝の対側への投射が減少し、運動機能の回復が遅延した。このことから、①のプロセスに interneurons から分泌される特定の因子が必須であることが証明された。本研究成果については論文準備中であるため、因子についてはここでは公表を控える。

一方で、片側脳挫傷後に健常側の脳皮質神経細胞の活動が高まることがわかっている。研究代表者らは、GABA_A 受容体の発現が、損傷後に抑制されることを見いだした。GABA 受容体の agonist を大脳皮質に作用させると、その後の運動機能の回復と皮質脊髄路の対側への投射が抑制された。この結果より、GABA_A 受容体の発現抑制に基づく、皮質神経細胞の活性化が、機能回復を促進する役割を担うことが示された³。皮質神経細胞の活動性を高める手法としては、リハビリテーションが挙げられる。したがってこの成果は、リハビリテーションの有効性の科学的基盤となりうるものである。

また皮質脊髄路軸索枝の対側への投射の際、ephrin-B3 の発現の消失している部分を通して、対側に至ることがわかった⁷。この結果は、ephrin-B3 などの軸索再生阻害因子は、いつも回路の修復を阻害しているわけではなく、軸索を特定の部位に誘導する役割を担っていることを示唆するものである。本成果は②のプロセスの解明に寄与するものとなりうる。

③ 不要な軸索枝の刈り込み現象の解明

研究代表者は *in vitro* の軸索脱落評価システムを確立している。これは ES progenitor cells から glutamatergic neurons に分化させるシステムであり、galectin を投与することにより、軸索変性を惹起することができる。この系を用いて、軸索変性の分子機構を明らかにする目的で、さまざまな細胞内シグナルを制御する因子の作用を観察しているところである。

・霊長類(サルおよびヒト)での脳障害後の皮質脊髄路の可塑性制御機構の解明

ヒトの脳梗塞、筋萎縮性側索硬化症(ALS)剖検例を用いて、頸髄および腰髄での軸索再生阻害因子およびその受容体、回路の再形成誘導因子の発現解析を行っているところである。まず、ALS 剖検脳を用いて脊髄(propriospinal neurons、segmental interneurons、motor neurons)の単一神経細胞の同定を行うためのシステムを構築中である。具体的には、脳および脊髄はフォルムアルデヒドで固定後、マイクロスライサーで 200um の厚さの切片を作製する。マイクロマニピュレータを用いて単一神経細胞にルシファーイエローを注入し、樹状突起を含めた神経細胞形態を可視化することを目指している。(北里大学望月グループ)。また、サルを用いて片側脊髄損傷モデルの作製を行い、皮質脊髄路の形態学的解析に着手している(京都大学高田グループ)。具体的には、可塑性がより有効に働く(皮質脊髄路の臨界期前)と予測される幼若期のサルと成熟したサル(皮質脊髄路の臨界期後)を比較することによって、可塑性を容易に誘導できる臨界期を決定するとともに、その時期の脊髄において回路再形成を制御する因子(Wnt7a、

BDNF、GCSF 等)の発現状態を検討する。また、皮質脊髄路の可塑的变化を追跡する際、従来の順行性トレーシングに加えて、狂犬病ウイルスを用いた逆行性越シナプスの神経回路トレーシングにより、大脳皮質運動野から脊髄 (propriospinal neurons、segmental interneurons、motor neurons)、さらに筋肉に至る多シナプス性運動神経回路の形態学的解析を行うための系を立ち上げているところである。

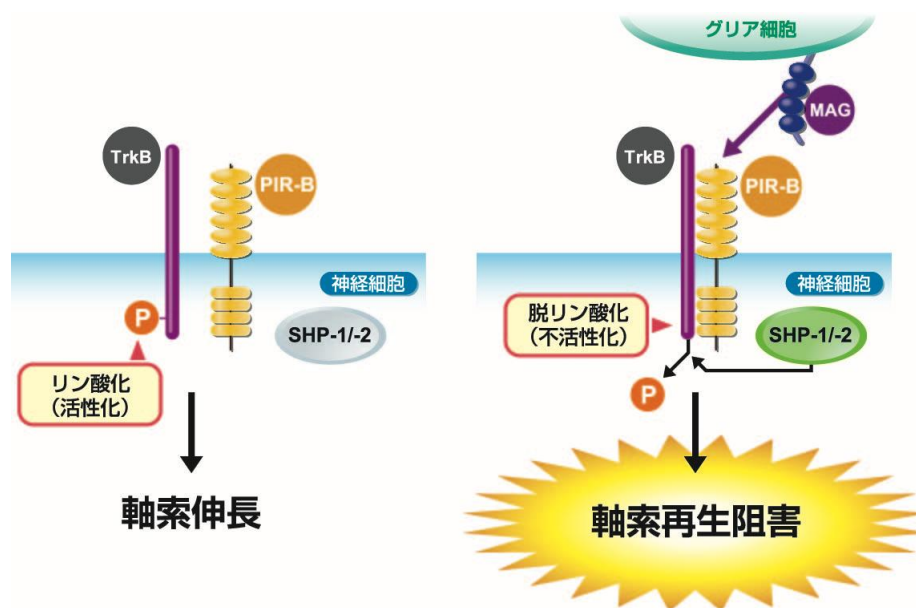


図1: SHPを介した軸索再生阻害メカニズム

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Muramatsu, R., Kubo, T., Mori, M., Nakamura, Y., Fujita, Y., Akutsu, T., Okuno, T., Taniguchi, J., Kumanogoh, A., Yoshida, M., Mochizuki, H., Kuwabara, S. and Yamashita, T. RGMA modulates T cell responses and is involved in autoimmune encephalomyelitis. *Nature Medicine* 17, 488-494 (2011). doi:10.1038/nm.2321
2. Fujita, Y., Endo, S., Takai, T. and Yamashita, T. Myelin suppresses axon regeneration by PIR-B/SHP-mediated inhibition of Trk activity. *EMBO J.* (2011). doi:10.1038/emboj.2011.55
3. Lee, S., Ueno, M. and Yamashita, T. Axonal remodeling for motor recovery after traumatic brain injury requires downregulation of γ -aminobutyric acid signaling. *Cell Death Dis.* 2, e133 (2011). doi:10.1038/cddis.2011.16
4. Nakamura, Y., Fujita, Y., Ueno, M., Takai, T. and Yamashita, T. Paired

- immunoglobulin-like receptor B knockout does not enhance axonal regeneration or locomotor recovery after spinal cord injury. *J. Biol. Chem.* 286, 1876-1883 (2011). 10.1074/jbc.M110.163493
5. Hagihara, M., Endo, M., Hata, K., Higuchi, C., Takaoka, K., Yoshikawa, H. and Yamashita, T. Neogenin: A receptor for bone morphogenetic proteins. *J. Biol. Chem.* 286, 5157-5165 (2011). 10.1074/jbc.M110.180919
 6. Ohara, R., Hata, K., Yasuhara, N., Mehmood, R., Yoneda, Y., Nakagawa, M. and Yamashita, T. Axotomy induces axonogenesis in hippocampal neurons by a mechanism dependent on Importin β . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 405, 697-702 (2011). doi:10.1016/j.bbrc.2011.01.108
 7. Omoto, S., Ueno, M., Mochio, S. and Yamashita, T. Corticospinal tract fibers cross the ephrin-B3-negative part of the midline of the spinal cord after brain injury. *Neurosci. Res.* 69, 187-195 (2011). doi:10.1016/j.neures.2010.12.004