

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. 研究実施体制

### (1) 山下グループ

- ① 研究代表者: 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 主たる共同研究者: 望月 秀樹 (大阪大学大学院医学系研究科、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 主たる共同研究者: 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

## § 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)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中心に、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23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 のシグナル伝達機構の解析を行った。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、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 が集積し、②PIR-B と神経成長因子 BDNF の受容体である TrkB が結合し、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を見いだした (Fujita et al., EMBO J., 2011)。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。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。また PIR-B と p75 が結合して、受容体複合体を形成することを示した<sup>6</sup>。以上の結果より、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必要であることが示唆された。

軸索再生阻害因子である RGM が、主として損傷周囲に集積してくるミクログリアに発現していることを発見し、オリゴデンドロサイトだけではなく、ミクログリアも再生阻害に関わっていることを示した<sup>5</sup>。また RGM の受容体 neogenin のシグナル伝達の解明も進めた。Neogenin は TACE によって切断され、RGM のシグナルを細胞内に伝えることができなくなることを見いだした<sup>3</sup>。さらに RGM が樹状細胞に発現しており、T 細胞の活性化を高める役割を持っていることを見いだした。自己免疫性脳脊髄炎マウスに、RGM 中和抗体を投与すると、脳脊髄炎の発症と増悪を抑制することができた。多発性硬化症患者の単核球を用いて、RGM 中和抗体がサイトカインの放出を抑制することを示した (Muramatsu et al., Nat. Med. 2011)。これらより RGM は多発性硬化症の分子標的として期待される。

グリア細胞に発現する軸索再生阻害因子である CSPG のシグナル伝達機構を明らかにした<sup>9</sup>。

#### 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、経時的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

segmental interneurons 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明らかにしていた。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を目標としている。このために、まず kinema tracer を用いた運動機能の詳細な評価系を確立した<sup>2</sup>。さらに、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、複数の因子が interneurons において発現上昇を示すことを見いだした。これらのうち BDNF に着目して、機能解析を行った。皮質脊髄路には TrkB 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(図1)。このことから、①のプロセスに interneurons から分泌される BDNF が必須であることが証明された<sup>8</sup>。現在、他の因子の①、②、③への寄与について検証中である。

### 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。また *in vivo* における軸索脱落のメカニズムについても解析を進めた。脊髄損傷後に皮質脊髄路の損傷部よりも近位部において軸索の脱落変性が起こるが、この現象に JNK の活性化が必須であることを示した<sup>4</sup>。

### ・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。現在システムを構築しラットでの確認をしている。ALS のモデルとして運動神経特異的に TDP-43 タンパクを発現させたマウスを作成中である。具体的には Thy-1 プロモータ下に赤色蛍光を発現させて神経を標識しその後ろに LoxP 配列で挟んだ TDP-43 を置いたトランスジェニックマウスを作製した。今後、VAchT-Cre マウスや CAMKII-Cre マウスと交配し、TDP-43 を上位あるいは下位運動神経に発現させ神経変性を解析する予定である。コントロールとして AAV-TDP43 における検討を行なっている(大阪大学望月グループ)。

また、サルを用いて片側脊髄損傷モデルを作製し、行動学および形態学的解析を実施した

(京都大学高田グループ)。具体的には、脊髄損傷の前後に精密把持課題を遂行させた結果、損傷後数日で機能回復が始まり、1〜3ヶ月後には損傷前とほぼ変わらない程度にまで回復することを確認した。このようなモデルザルで皮質脊髄路の順行性神経路トレーシングを行い、損傷した脊髄の支配側と反対側の大脳半球において、一次運動野から脊髄 motor neurons に向かって神経軸索が新たに伸長していることを見出した。さらに、反発性軸索誘導因子である ephrin B3 が脊髄正中付近に強く発現していることを霊長類で初めて明らかにした。来年度は、狂犬病ウイルスを用いた逆行性越シナプスの神経路トレーシングにより、脊髄損傷モデルにおいて、一次運動野を含む前頭葉運動関連領野から脊髄 (propriospinal neurons、segmental interneurons、motor neurons)、さらに筋肉に至る多シナプス性神経路の形態学的解析を行うとともに、神経回路再編成に関わる機能分子の発現とその役割について詳細に検討する。

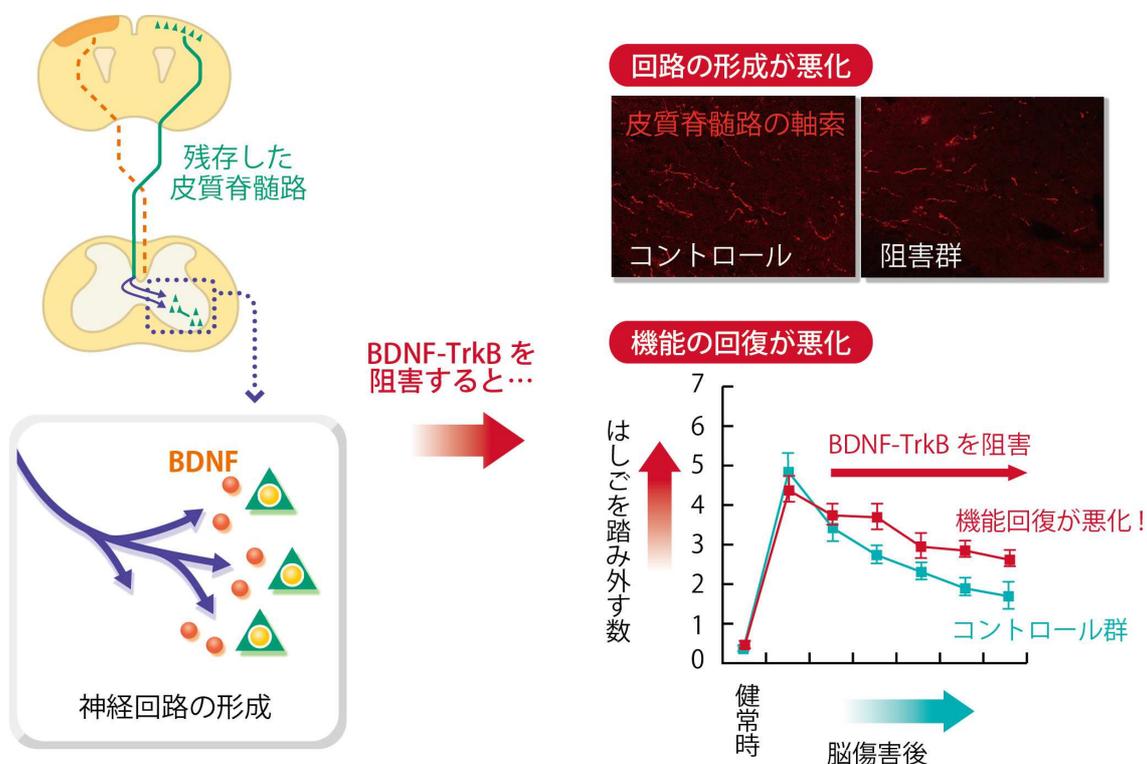


図1: BDNF-TrkB を介した皮質脊髄路の可塑性制御

### §3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

- 論文詳細情報

1. Ohara R, Fujita Y, Hata K, Nakagawa M, Yamashita T. Axotomy induces axonogenesis in hippocampal neurons through STAT3. *Cell Death Dis.* 2:e175, 2011. (doi: 10.1038/cddis.2011.59)
2. Ueno M, Yamashita T. Kinematic analyses reveal impaired locomotion following injury of the motor cortex in mice. *Exp Neurol.* 230, 280-290, 2011. (Doi:10.1016/j.expneurol.2011.05.006)
3. Okamura Y, Kohmura E, Yamashita T. TACE cleaves neogenin to desensitize cortical neurons to the repulsive guidance molecule. *Neurosci Res.* 71, 63-70, 2011. (Doi:10.1016/j.neures.2011.05.012)
4. Yoshimura K, Ueno M, Lee S, Nakamura Y, Sato A, Yoshimura K, Kishima H, Yoshimine T, Yamashita T. C-Jun N-terminal kinase induces axonal degeneration and limits motor recovery after spinal cord injury in mice. *Neurosci Res.* 71:266-277, 2011. (Doi:10.1016/j.neures.2011.07.1830)
5. Kitayama M, Ueno M, Itakura T, Yamashita T. Activated microglia inhibit axonal growth through RGMa. *PLoS ONE* 6:e25234, 2011. (doi:10.1371/journal.pone.0025234)
6. Fujita Y, Takashima R, Endo S, Takai T, Yamashita T. The p75 receptor mediates axon growth inhibition through an association with PIR-B. *Cell Death Dis.* 2:e198, 2011. (doi: 10.1038/cddis.2011.85)
7. Itokazu T, Fujita Y, Takahashi R, Yamashita T. Identification of the neogenin-binding site on the repulsive guidance molecule a. *PLoS ONE* 7:e32791, 2012. (Doi: 10.1371/ journal.pone.0032791)
8. Ueno M, Hayano Y, Nakagawa H, Yamashita T. Intraspinal rewiring of the corticospinal tract requires target-derived brain-derived neurotrophic factor and compensates lost function after brain injury. *Brain* 135:1253-1267, 2012. (doi: 10.1093/brain/aws053)
9. Kurihara D, Yamashita T. Chondroitin sulfate proteoglycans downregulate spine formation in cortical neurons by targeting tropomyosin-related kinase B (TrkB). *J Biol Chem.* in press.

#### (3-2) 知財出願

- ① 平成 23 年度特許出願件数(国内 0 件)

② CREST 研究期間累積件数(国内 0 件)