

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

### ・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24年度に行った研究の方法と結果を述べる。

#### ① 運動神経回路の回路再形成の抑制機構

前年度において、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機構を明らかにしていた。すなわち、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、PIR-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、PIR-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ていた。当該年度においては、SHP-deficient heterozygous mouse に脳挫傷を作成した。このマウスは、wild type mouse よりも運動機能の回復が早く、また皮質脊髄路の軸索枝形成も促進された<sup>11</sup>。また軸索再生阻害因子として働く ephrin-B3 の作用は、Eph 受容体だけでなく、p75 受容体によっても運ばれることを発見し、p75 を抑制することで、損傷した視神経が再生することを示した<sup>10</sup>。さらに、反応性アストロサイトに発現している軸索再生阻害因子 CSPG が、樹状突起の形成も抑制すること、またこの作用は TrkB の抑制に基づくものであることを示した<sup>4</sup>。一方、軸索再生阻害因子である RGM のシグナル伝達機構ならびに機能解析をこれまで進めてきたが、当該年度においては、RGMa が neogenin 受容体に結合するドメインを見いだした<sup>5</sup>。以上の成果により、神経回路再形成の抑制機構がさらに明らかになった(大阪大学山下グループ)。

#### 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。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。また脊髄において BDNF 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、軸索枝伸展のプロセスに、interneurons から分泌される BDNF が必須であることが証明された<sup>2</sup>。また bilateral movement training により、この皮質脊髄路の可塑的な変化が促進され、運動機能の回復も高まった<sup>8</sup>。本知見は、リハビリテーションの科学的な基盤になりうるものである(大阪大学山下グループ)

プ)。

中枢神経を傷害する様々な疾患によって炎症が惹起され、この炎症に伴い、新生血管が生成される。この新生血管が、皮質脊髄路の軸索枝形成の速度を速め、運動機能の回復を促進していることを、局所脊髄炎モデルを用いて突き止めた。軸索枝の形成を促進する作用は、血管内皮細胞から分泌される prostacyclin によって誘導されることを発見した<sup>1</sup>。また脊髄損傷後に、helper T cell のうち Th1 cells を移入すると、運動機能の回復が高まることを見いだした<sup>3</sup>。これらの発見によって、神経回路の修復過程には、神経系以外の生体システムも重要な役割を演じているという新たなコンセプトを確立した(大阪大学山下グループ)。

他方、cAMP 上昇は、軸索延伸効果を認めることは周知のごとくであるが、cAMP 依存性で、脳において高発現している CRTC1 が軸索延伸に与える影響について検討している。(以下非公開部分)CRTC1KO マウスを作成し、効果を検討しているところであるが、CRTC1KO マウスは着床不全が認められ、多くがヘテロ体であり、CRTC1-deficient heterozygous mouse においては、軸索伸展作用が軽度抑性傾向にあるため、今現在、Cre-LoxP system による脳特異的 CRTC1KO マウスを作成中で、更なる検討を加える予定である(大阪大学望月グループ)。

### 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た<sup>9</sup>。これは ES progenitor cells から glutamatergic neurons に分化させるシステムである。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。また発達期の皮質脊髄路ニューロンの生存をミクログリアが支えていることを明らかにした<sup>7</sup>。皮質脊髄路の軸索の経路にミクログリアが集積しており、fractalkine の受容体である CX3CR1 の活性化を通じて、ミクログリアから放出される free IGF-1 が、ニューロンの生存を維持していることを示した。これは発達期の神経回路の形成機構であるが、ALS など運動神経回路が脱落する変性疾患においても、同様のメカニズムが存在する可能性がある(大阪大学山下グループ)。

### ・サル脳障害後の皮質脊髄路の可塑性制御機構の解明

軸索再生阻害因子 RGMa の霊長類における役割を確認するために、成体アカゲザルの皮質脊髄路を頸髄部分で損傷させるモデルを用いて、RGM 中和抗体を局所に投与し、その後の機能回復を調べている(大阪大学山下グループ)。

さらに、サルを用いて片側の外側皮質脊髄路(直接路)を損傷した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。脊髄損傷モデルザル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において、狂犬病ウイルスを用いた逆行性越シナプスの神経トレーシングにより、残存している皮質脊髄路、いわゆる間接路の構築を調べた。損傷直後に同側の脊髄に狂犬病ウイルスを注入した例では、反対側の一次運動野に局限して越シナプスのニューロンラベルが観察された。このことから、一次運動野だけでなく運動前野や補足運動野か

らの出力を中継する直接路とは異なり、間接路は一次運動野からの出力のみを中継することが明らかになった。また、機能回復した後に損傷側と同側の脊髄に狂犬病ウイルスを注入した例では、両側の一次運動野に越シナプスのニューロンラベルが観察された。このことは、リハビリテーションによる機能回復に損傷側と同側の一次運動野が関与する神経回路の再編成が寄与することを示唆している(京都大学高田グループ)。

#### ・ヒト脳障害後の皮質脊髄路の可塑性制御機構の解明

ヒトの筋萎縮性側索硬化症(ALS)、多系統萎縮症(MSA)の剖検例を用いて、錐体路、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施行した。現在のところ対照例と比較して有意な差は認められなかった。TDP-43をAAVベクターにより脊髄前角細胞に投与し、神経変性の過程を確認した。細胞死は確認できたが、異常蛋白発現による傷害部位の伸展は確認できなかった。現在望月の研究室が大阪大学に移動したため、ALSから下記成人脳血管障害に集中して検討している(大阪大学望月グループ)。

成人脳血管障害に関しては、白質脳症を呈する遺伝性脳血管障害と軸索延伸の検討を開始した。NOTCH3を原因遺伝子とするCADASIL、CSF-1Rを原因遺伝子とするHDLS(hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids)についての*in vitro*での検討また、TGF-1beta,BMPシグナリングとの関わりとの検討を施行している。NOTCH3のhot spotにあるNOTCH3 R90C, R141C, R169Cをアデノ化し、ヒト血管平滑筋細胞(HVSMC)に強制発現した後、初代神経細胞との共培養を作成し、検討した。まず、HVSMC上に、ラット初代神経細胞を培養すると、著明に軸索伸展作用が亢進した。上記NOTCH3 mutant 体発現HVSMC上にラット初代神経細胞を共培養しても、NOTCH3 WTと軸索伸展作用は同等であった。しかしながら、共培養後に10%OGD(Oxygen glucose deprivation)24時間暴露すると、R141C, R169C mutant 体発現HVSMCでは、軸索伸展作用が野生型に比して、抑制されていた。DN-MAML1(13-74)、NOTCH3 ICD、HES-1-luciferaseなどの結果より、NOTCH3シグナルと軸索伸展作用の抑性については、関連性は得られなかった。他方、HDLSでは、CSF1Rのチロシンキナーゼドメインでの変異が多く、CSF1R細胞内シグナリングと軸索伸展作用について、更に検討を進める(大阪大学望月グループ)。

### §3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

##### ● 論文詳細情報

1. Muramatsu, R., Takahashi, C., Miyake, S., Fujimura, H., Mochizuki, H. and Yamashita, T. (2012) Neovessels formed through CNS inflammation promote neural rewiring. *Nature Medicine* 18, 1658-1664. (DOI: 10.1038/nm.2321)

2. Ueno, M., Hayano, Y., Nakagawa, H. and Yamashita, T. (2012) Intraspinal rewiring of the corticospinal tract requires target-derived brain-derived neurotrophic factor and compensates lost function after brain injury. *Brain* 135, 1253-1267. (DOI: 10.1093/brain/aws053)
3. Ishii, H., Jin, X., Ueno, M., Tanabe, S., Kubo, T., Serada, S., Naka, T. and Yamashita, T. (2012) Adoptive transfer of Th1-conditioned lymphocytes promotes axonal remodeling and functional recovery after spinal cord injury. *Cell Death Dis.* 3, e363. (DOI: 10.1038/cddis.2012.106)
4. Kurihara, D. and Yamashita, T. (2012) Chondroitin sulfate proteoglycans downregulate spine formation in cortical neurons by targeting tropomyosin-related kinase B (TrkB) protein. *J. Biol. Chem.* 287, 13822-13828. (DOI: 10.1074/jbc.M111.314070)
5. Itokazu, T., Fujita, Y., Takahashi, R. and Yamashita, T. (2012) Identification of the neogenin-binding site on the repulsive guidance molecule a. *PLoS ONE* 7, e32791. (DOI: 10.1371/journal.pone.0032791)
6. Jin, X., Ishii, H., Bai, Z., Itokazu, T. and Yamashita, T. (2012) Temporal changes in cell marker expression and cellular infiltration in a controlled cortical impact model in adult male C57BL/6 mice. *PLoS ONE* 7, e41892. (DOI: 10.1371/journal.pone.0041892)
7. Ueno, M., Fujita, Y., Tanaka, T., Nakamura, Y., Kikuta, J., Ishii, M. and Yamashita, T. (2013) Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. *Nat. Neurosci.* (DOI: 10.1038/nn.3358)
8. Nakagawa, H., Ueno, M., Itokazu, T. and Yamashita, T. (2013) Bilateral movement training promotes axonal remodeling of the corticospinal tract and recovery of motor function following traumatic brain injury in mice. *Cell Death Dis.* 4, e534. (DOI: 10.1038/cddis.2013.62)
9. Fujiki, R., Sato, A., Hata, K., Tashiro, F., Yasuhara, Y., Miyazaki, J., Yoneda, Y., Fujitani, M. and Yamashita, T. (2013) Improvement in protocol to generate homogeneous glutamatergic neurons from mouse embryonic stem cells reduced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 430, 604-609. (DOI: 10.1016/j.bbrc)
10. Uesugi, N., Kimura, Y. and Yamashita, T. (2013) Suppression of the p75 receptor signal attenuates the effect of ephrin-B3 and promotes axonal regeneration of the injured optic nerve. *Cell Death Dis.* (in press)
11. Tanaka, T., Fujita, Y., Ueno, M., Shultz, L.D. and Yamashita, T. (2013) Suppression of SHP-1 promotes functional corticospinal tract rewiring after brain injury. *Cell Death Dis.* (in press)