

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K16377

研究課題名(和文)脳損傷後の神経回路再建および臨床応用への統合的研究

研究課題名(英文)Integrated research of neural network reorganization following brain injury for clinical application

研究代表者

田中 貴士 (TANAKA, Takashi)

近畿大学・東洋医学研究所・助教

研究者番号：30734694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経の再生を促すべく、再生を阻害しているチロシン脱リン酸化酵素(SHP-1)を抑えるとともに、運動によって神経回路の再建を強化することで、脳損傷後の有効な治療手段の確立を目指した。

脳損傷モデルマウスを作製し、脳損傷の2週間前から6週間にわたって運動を実施した。その結果、SHP-1抑制に運動を加えることで神経再生数の増大や運動機能の顕著な回復がみられ、効果的に神経回路が再建された可能性が示唆された。SHP-1の抑制と運動を融合させることで、これまで以上に脳損傷後の神経回路の再建を強化することができた。本研究は、脳障害患者の機能回復における効果的な治療法に繋がる重要な知見である。

研究成果の概要(英文)：Plasticity is quite limited in the adult brain. We examined whether increase of neural network reorganization in mice by combining suppression of src homology 2-containing phosphatase (SHP)-1, which negatively affect axonal reorganization, with exercise. Brain injury mice exercised for 6 weeks from 2 weeks before injury. We observed that the number of regenerative axon was increased and motor function recovery of impaired forelimb was enhanced in these combined treatment mice. Our results indicate that downregulation of SHP-1 and the exercise promotes neural network reorganization and functional recovery after brain injury.

研究分野：神経科学

キーワード：脳損傷 神経回路再建 チロシン脱リン酸化酵素 運動療法

1. 研究開始当初の背景

(1) 脳が損傷を受けると運動障害等の機能障害が生じるが、損傷を免れた皮質脊髄路が代償的に神経回路を再建させることで運動障害はある程度回復することが知られている。しかし、中枢神経の再生能は非常に限定的であるため、脳損傷後の完全な機能回復は困難である。

(2) 近年、中枢神経再生の手段として、神経本来の軸索再生機能を促進させ、軸索再生を阻害している因子を抑制するという2種類の介入が各々実施され、一定の成果をあげている。この上記2要因の双方に關与する因子として着目されるのが、チロシン脱リン酸化酵素 (SHP-1) である。SHP-1 の抑制によって、脳や視神経損傷後の中枢神経の再生が促され、機能回復が増加することが明らかとなっている。また、リハビリテーション (運動療法) が脳損傷などの中枢神経損傷後の運動機能の回復に有用であることも多々報告されており、臨床応用として有用な知見である。しかし、中枢神経損傷後の機能回復における真に効果的な治療法は未だ確立されていないため、機能回復に有用なエビデンスの確立が急務である。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、脳損傷後の頸髄における神経再生 (損傷を免れた皮質脊髄路の麻痺側への側枝形成) および代償性の神経回路の再建に伴う運動機能の回復を効果的に促進させることが目的である。この目的を達成すべく、中枢神経の軸索伸長を二重に阻害している SHP-1 を抑制するとともに、効果的な運動療法を実施することによって、脳損傷後の有効な治療手段の確立を目指した。

(2) 運動が中枢神経損傷後の機能回復に有用であることは過去の報告によって示されているが、どの程度の運動 (運動量)、運動の期間 (運動習慣) などの詳細は明らかではない。そのため、運動の各パラメーターと脳損傷後の神経再生および神経回路の再建との間に關連があるのか否か、また脳損傷マウスにおける、神経再生に効果的な運動量のカットオフ値を見出すことも目的である。

3. 研究の方法

(1) Running wheel を用いた持続的かつ自発的な運動、トレッドミル運動による短時間かつ強制的な運動を各々脳損傷の2週間前から6週間にわたって実施した。なお、Running wheel を用いた運動に対しては、脳損傷前後での運動量を算出した。

(2) 上記の運動を行わない非運動群、運動を実施する運動群、SHP-1 を遺伝的に抑制した

ノックアウト (KO) マウスに運動を実施する SHP-1 KO + 運動群の3群を設定した。全てのマウスに対し、片側の大脳皮質運動野を全て除去する脳損傷モデルを作製した。

(3) SHP-1 の KO および各種運動が脳損傷後の神経再生に効果的であったか評価するため、非損傷側の皮質脊髄路を順行性トレーサーによって標識し、頸髄における神経軸索の麻痺側への代償的な側枝形成 (神経再生の程度) を評価した。

(4) 脳損傷後の麻痺側前肢の運動機能の回復過程を、運動機能評価法である Grid-walking test を用いて評価し、各群間において比較した。

(5) 頸髄において再生された神経軸索 (麻痺側へ侵入した側枝) が麻痺筋を支配する二次ニューロンと新たな神経回路を形成しているのか否かを、麻痺筋に逆行性トレーサーを注入することで解析した。

4. 研究成果

(1) 脳損傷前後6週間に於ける日々の運動量の経過や総運動 (走行) 距離を算出し、運動群と SHP-1 KO + 運動群において比較した (図1)。結果、両群に運動量の差は認められなかった。これは、SHP-1 の KO が運動には影響しないことを示すものである。

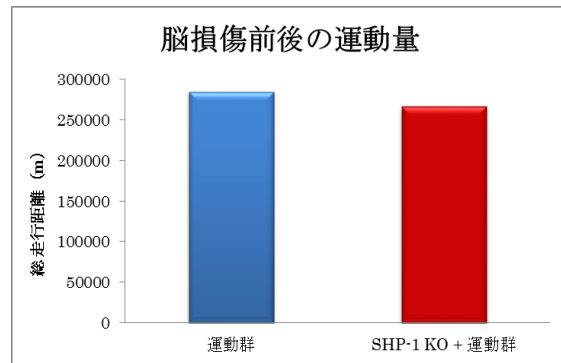


図 1

(2) 非運動群と運動群、SHP-1 KO + 運動群の各々に脳損傷を作製し、損傷領域の大きさおよび頸髄における皮質脊髄路の消失の程度を評価・比較した結果、いずれの群においても顕著な差は認められなかった。この結果は、各群間における脳損傷の程度は変わらないことを示している。

(3) 脳損傷後、頸髄における皮質脊髄路の (麻痺側へ侵入する) 側枝は、非運動群と比較して運動群において増加が認められた。さらに、SHP-1 KO + 運動群においては、非運動群だけでなく、運動のみ群と比較しても麻痺側へ侵入する軸索の伸長や分岐の増大が顕著に認められた (図2)。なお、Running wheel

を用いた持続的かつ自発的な運動が、トレッドミル運動による短時間かつ強制的な運動よりも多くの神経再生を促す傾向にあったため、本成果報告には Running wheel 運動による結果を記載した。神経再生の定量化に当たっては、大脳皮質に注入した順行性トレーサーにより標識された皮質脊髓路によって標準化を行う。本結果は、n 数の不足する群の存在により、統計学的な解析は行えていないため、今後も評価を継続していく。

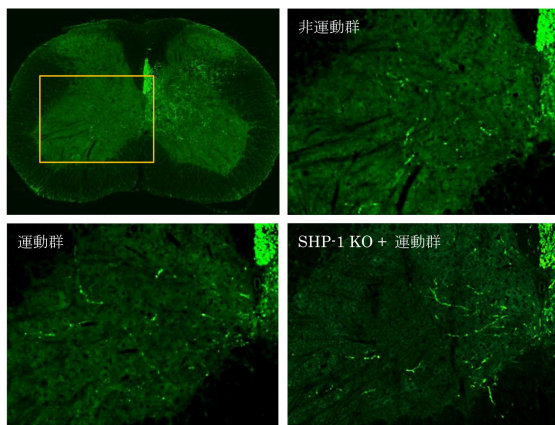


図 2

(4) 前肢の運動機能を Grid-walking test を用いて評価した。その結果、運動群では非運動群よりも回復が良好なことが示され、SHP-1 KO + 運動群においては運動群よりもさらに良好な機能回復傾向が認められた (図 3)。なお、運動機能評価においても n 数不足のため、統計学的な解析は行えていないため、今後も評価継続の必要がある。

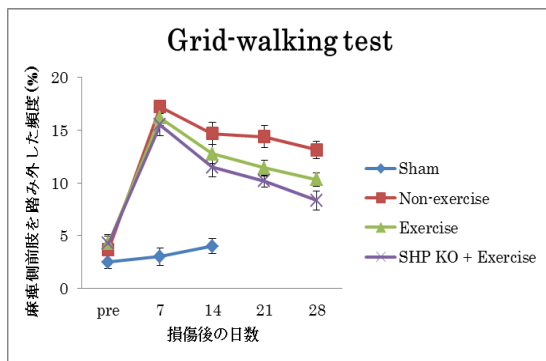


図 3

(5) 一方で、運動量と神経再生および運動機能回復との間には統計学的に有意な結果は得られなかった (未解析の群もあり)。しかし、運動量の多いマウスほど良好な機能回復が得られる傾向が強いことが示されており、更なる解析を進めていく。

(6) 脳損傷後の十分な機能回復には、頸髄の麻痺側における新たな神経回路の再構築が非常に重要であるため、再生神経と麻痺筋を支配する神経が神経回路を形成しているか否かを評価した。その結果、再生神経が麻痺

筋と神経回路を形成していることが明らかになったが (図 4)、数的な問題により各群間においてシナプス形成数の統計学的な解析は困難であった。そこで、機能的なシナプス形成には神経細胞の活性が必須であることから、細胞の活性をとらえるマーカーである c-Fos の検出を行なった結果、持続的な運動群において c-Fos 陽性細胞の増加がみられ、効果的に神経回路の再建が増大した可能性が高いことが示唆された。

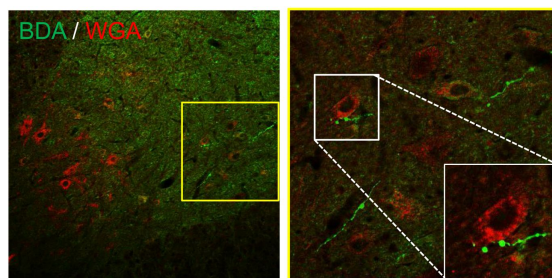


図 4

(7) 以上の結果より、SHP-1 の KO による神経軸索の再生やシナプス形成をターゲットとした分子的介入と神経活動を高める運動療法を融合させることで、脳損傷後の神経再生や運動機能回復をこれまで以上に増強することができた。また、運動量が多いマウスほど良好な機能回復の傾向が得られたため、今後も運動量と機能回復についての解析を進めていく必要がある。さらに、脳損傷後の頸髄における新たな神経回路の形成についても検証を進める。本研究は、脳損傷患者の機能回復における効果的かつ有効な治療法に繋がる重要な知見であると考えられる。

< 引用文献 >

- ・ Nudo RJ. Mechanisms for recovery of motor function following cortical damage. *Curr Opin Neurobiol* 2006; 16: 638–644.
- ・ Murphy TH, Corbett D. Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour. *Nat Rev Neurosci* 2009; 10: 861–872.
- ・ Benowitz LI, Carmichael ST. Promoting axonal rewiring to improve outcome after stroke. *Neurobiol Dis* 2010; 37: 259–266.
- ・ Ueno M, et al. Intraspinal rewiring of the corticospinal tract requires target-derived brain-derived neurotrophic factor and compensates lost function after brain injury. *Brain* 2012; 135: 1253–1267.
- ・ Yamashita T, et al. Multiple signals regulate axon regeneration through the Nogo receptor complex. *Mol Neurobiol* 2005; 32: 105–111.
- ・ Giger RJ, et al. Mechanisms of CNS myelin inhibition: evidence for distinct and neuronal cell type specific receptor systems. *Restor Neurol Neurosci* 2008; 26: 97–115.
- ・ Fujita Y, et al. Myelin suppresses axon

regeneration by PIR-B SHP-mediated inhibition of Trk activity. EMBO J 2011; 30: 1389–1401.

・ Tanaka et al. Suppression of SHP-1 promotes corticospinal tract sprouting and functional recovery after brain injury. Cell Death Dis 2013; 4: e567.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

田中 貴土、持続的運動による脳損傷後の効果的な神経再生メカニズム、第1回 基礎理学療法学 夏の学校、2016年8月20日、新潟(NASPA ニューオータニ)

田中 貴土、中枢神経損傷後の機能回復メカニズムとリハビリテーションへの展望、第1回 再生リハビリテーションセミナー、2015年8月1日、京都(京都大学 杉浦ホール)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕なし

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

田中 貴土 (TANAKA, Takashi)
近畿大学・東洋医学研究所・助教
研究者番号：30734694

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者 なし