

【第141回生涯教育講座】

損傷後の神経回路修復のメカニズム

ふじ
藤た
田ゆき
幸

キーワード：脳，神経，回路，ゲノム，治療

要 旨

人間の中枢神経系は、脳と脊髄から構成され、全身の情報伝達において重要な役割を果たす。神経細胞はネットワークを形成し、シグナル伝達を行うが、交通事故や高所からの落下による中枢神経回路の障害は、運動機能や感覚機能に深刻な影響を及ぼす可能性がある。中枢神経損傷後の治療法として、リハビリテーションが広く実施されてきた。動物実験や臨床研究により、リハビリテーションの有効性が示されているが、回復メカニズムの詳細は未だ不明な点が多く、効果も限定的である。リハビリテーションによって前頭前野の神経活動が増強し、中枢神経系に作用する栄養因子の発現が増加することが着目されてきた。特に、筆者はクロマチン高次構造の変動が神経栄養因子の発現を制御する可能性に着目し、ヒストン脱メチル化酵素およびヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）の役割を探求することを目指した。本研究の結果から、片側頭部外傷モデルでは、非損傷側でHDAC 2の発現が上昇し、一方でBDNFの発現は低下していることが明らかになった。これらの栄養因子の発現変化が、中枢神経損傷後の運動機能回復を妨げている可能性がある。また、HDAC阻害剤の投与により、頭部外傷後の上肢運動機能の回復傾向が示された。さらに、局所回路標識によって、損傷を免れた軸索からの側枝伸長による代償的な回路再形成が機能回復に寄与することが示唆された。今後の研究では、神経栄養因子の発現を誘導する薬剤とリハビリテーションの併用による運動機能回復の効果をさらに検証する必要がある。エピジェネティック制御機構を標的とした薬剤が、中枢神経損傷後の克服に寄与することが期待される。

■ 背 景

Yuki FUJITA

島根大学医学部医学科解剖学講座（発生生物学）

連絡先：〒693-8501 出雲市塩冶町89-1

島根大学医学部医学科解剖学講座（発生生物学）

人間の中枢神経系は、脳と脊髄から構成されており、全身の情報伝達の中核的役割を担う。神経細胞はネットワークを形成し、シグナル伝達を

行っている。交通事故や高所からの落下によって中枢神経回路が障害されると、情報伝達が途絶し、運動機能や感覚機能に障害が生じる。このような障害は、長期にわたり持続し、日常生活に重大な影響を与える可能性がある。中枢神経回路を構成する神経軸索が損傷によって一度切断されると、その再生は非常に困難である。すなわち、中枢神経の再生能力の低さが、損傷からの機能回復を困難にしている主な原因とされる (Yiu and He, 2006)。

中枢神経損傷後の運動障害や感覚障害に対する治療法として、リハビリテーションが広く実施されてきた。例えば、脊髄損傷後のリハビリテーションによる運動機能の回復効果については、齧歯類や霊長類を対象とした動物実験および脊髄損傷患者を対象とした臨床研究によって実証されている (Lunenburger et al., 2007; Maier and Schwab, 2006)。実際、マウスに対して狭い隙間からエサをつかむ課題を繰り返させることで上肢機能の改善が観察される。また、脊髄損傷患者に対してハーネスで吊り上げ、体重を部分的に免荷した状態でのトレッドミル歩行訓練が、歩行機能の改善に寄与することが示されている。しかし、回復メカニズムの詳細は未だ不明な点が多く、リハビリテーションの効果も限定的であるため、科学的根拠に基づいた新たな治療的アプローチの開発が求められている。従って、リハビリテーションによる運動機能回復メカニズムの解明は、リハビリテーション効果の向上に向けた重要な課題である。

リハビリテーションによって前頭前野の神経活動が増強し、中枢神経系に作用する栄養因子の発現が増加することは既に知られている。しかし、そのメカニズムは未だ十分に解明されていない。

筆者はこれまで、クロマチン高次構造の変動が神経栄養因子の発現を制御することを研究してきた。クロマチン高次構造制御の破綻が中枢神経系の異常を引き起こすことは、多くの研究で報告されている。

筆者は、ヒストン脱メチル化酵素およびヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) がクロマチン高次構造を緩め、転写を活性化することに着目している。ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤やヒストン脱メチル化酵素の機能欠損が脳機能に異常を来すことを示す研究結果も得られている (Fujita et al., 2015; Fujiwara et al., 2016)。これらの結果は、ヒストンのアセチル化およびメチル化の制御が脳機能の発現に重要であることを示唆している。また、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤がシナプス可塑性を促進し、中枢神経回路修復に寄与することが報告されている (Graff et al., 2014; Graff et al., 2012)。したがって、ヒストン脱アセチル化酵素やヒストン脱メチル化酵素を介したクロマチン高次構造の変化が、神経栄養因子の発現を促進し、前頭前野の神経活動を増強するという仮説を検証することが重要であると考えた。これにより、中枢神経損傷後の機能回復メカニズムの一端を解明し、新たな治療法の開発に貢献することを目指した。

■ 方 法

A. 脳損傷モデル作成

マウスの上肢の運動野に該当する部分に損傷を作成する (Ueno et al., 2012)。脳損傷により上肢の運動機能を喪失した状態を人工的に作り出す。Impactor をガス圧により上下させ、目的領域に impactor を落とすことにより損傷を作成する。8 週齢、C57 BL/6J (オスのみ) のマウスを用

意した。マウスに三種混合麻酔をかけ、頭部の皮膚を切開したのち台に固定した。Bregma を同定し、Bregma に接するように左半球側に直径 4 mm の円状に頭蓋骨を切り取った。目的部位の脳表面に impactor を接触させ、脳表面を基準値 (高さ 0) に設定した。Impactor を上昇させ、その状態で、impactor の先端のみを下に 1 mm ずらした。再びガス圧を調節し、impactor を高さ 0 地点まで下降させることにより深さ 1 mm の損傷を作成した。

B. 脳損傷後における遺伝子発現変化

背景で述べた考察から、TBI (traumatic brain injury) 後、HDAC の発現が上昇し、BDNF の発現が低下している時期があると推察された。その検証のため、TBI モデルマウスを用いて TBI 後の HDAC、BDNF の発現を確認した。マウスには 8 週齢、C57 BL/6J (オスのみ) を用いた。脳損傷後の遺伝子発現変化を見るため、頭部外傷 (controlled cortical impact) 後 1 週間毎に 6 週後まで経時的に RNA 抽出を行いそれぞれ逆転写し cDNA を得た。得られた cDNA に対し primer として HDAC 1~11 また BDNF を用いて、real-time-PCR を行った。標準化のため GAPDH、 β -actin を用いた。同じ作業を 2 度同時に行い、結果にはその平均値を用いた。それぞれの primer における CT 値を出し、comparative Ct 法により各週における HDAC、BDNF の発現量の相対比を求めた。また、sham として開頭作業のみ行ったマウスに対しても同様の手順で HDAC、BDNF の発現を調べた。

C. Ladder walk test による運動機能回復作用の検証

脳損傷したマウスの運動機能の回復過程を

ladder walk test により検証した。ladder walk test はマウスに ladder を渡らせ、その際に、利き手側の上肢の ladder を踏み外す回数をカウントするテストである。1 匹あたり 3 回 ladder を渡らせ、drop 数にはその平均を用いた。また、ladder に慣らすため、どのマウスも drop 数をカウントする前に一度、ladder を渡らせてトレーニングを行った頭部外傷前日に ladder を渡らせ、健常時の運動機能を評価した。頭部外傷を行い、その後、1 週間毎に 6 週間目まで評価した。最後の二週間は、実験 4 と同様に一部のマウスに HDAC inhibitor を投与した。

D. Reaching test による HDAC 阻害剤の運動機能回復作用の検証

脳損傷したマウスを二つの群に分け、inhibitor を投与した群、control 群との両方で運動機能を評価し、inhibitor により運動機能が回復するという仮説が正しいのか検証する。運動機能の評価には single pellet reaching test を用いた。C57 BL/6 J マウスを 10 匹用意し、獣医師のアドバイスの下、食餌制限を 2 日間行った。その翌日から 2 日間 pre-training を行った。これはマウスを透明 BOX に慣れさせペレットの味を覚えさせるために行い、マウスをチャンバーに入れて三つのスロット (右・左・中央) の前に多めにペレットを置き、20 分観察する。Pre-training 終了後、翌日に利き手決定を行う。利き手決定では三つのスロットの届きやすい場所に餌を 1 つずつ置いて 5 分放置し、その後スロットよりやや内側にペレットを置き、手を伸ばさないと取れない状況を作り、伸ばした方の手を記録した。先に 20 回伸ばした方を利き手と定義した。

利き手決定後、2 週間にわたり連日トレーニング

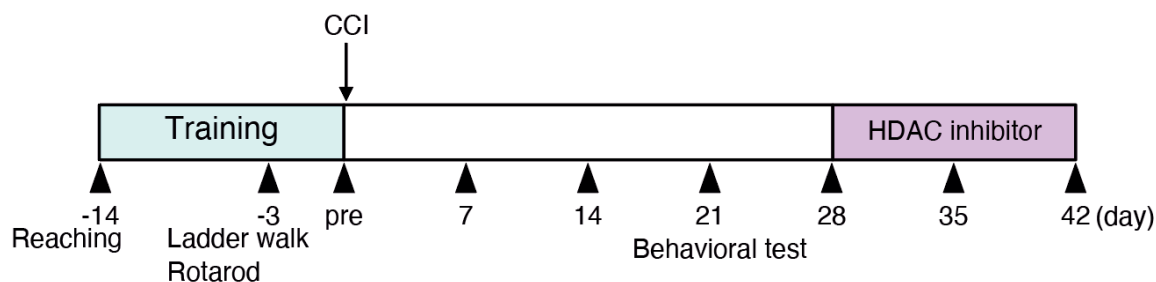


図1. 行動試験のタイムコース

グを行い，終了後，脳損傷前のデータ（4段階。評価の詳細については後述）を記録したのち，頭部外傷を行った。その後脳損傷したマウスに対し，損傷後1週間から6週間まで1週間に一度運動機能の評価を行った（single pellet reaching test）。なお評価基準は以下の4通りである。（評価基準 Success: ペレットを落とさずに口まで運ぶ，drop: ペレットを掴むが途中で落とす，no grasp: 狙いは正確だが掴むことはできない，miss: 空振り）。損傷28日目より，class 1 HDAC inhibitor (CI-994) 10 mg/kg，またはコントロールとしてDMSOを1日1回腹腔内投与した（図1）。

■ 結 果

A. 脳損傷モデル作成

インパクターをガス圧によって上下動させ，マウスの大脳皮質運動野に相当する部位に重りを落下させることにより，片側頭部外傷モデルを作成した。非損傷側大脳皮質に対する損傷側大脳皮質の割合は30.3%であった。

B. 脳損傷後における遺伝子発現変化

頭部外傷後におけるHDAC 2およびBDNFの発現量の変化を図2に示す。HDAC 2の発現は，sham群と比較して，頭部外傷後5週目において有意に上昇していることが確認された。一方，BDNFの発現は，sham群と比較して，頭部外傷後6週目において有意に低下していることが認められた。この結果から，背景に述べた通り，脳損傷後にBDNFの発現低下が生じ，シナプス形成

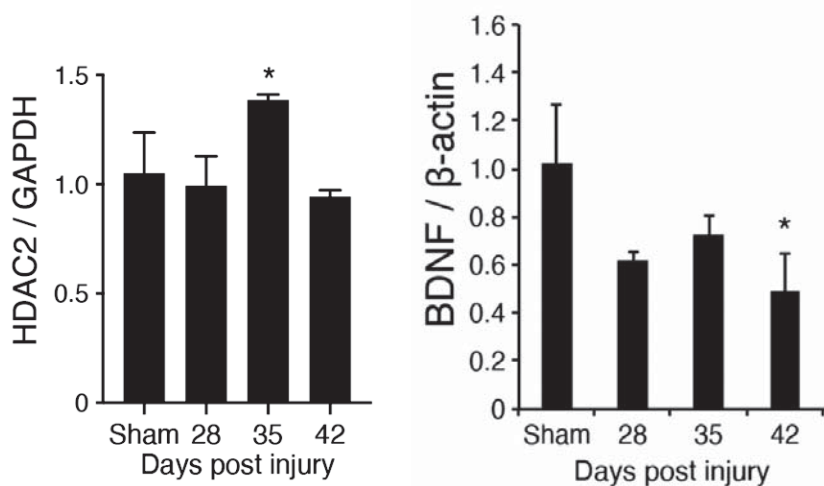


図2. HDAC 2 (左), BDNF (右) の発現量の変化

の効率が低下していることが示唆された。また、HDAC 2 の発現が BDNF の発現と逆相関しているため、HDAC 2 の発現を抑制することで BDNF の発現を誘導できる可能性があると考え、以下の実験を実施することとした。

C. Ladder walk test による運動機能回復作用の検証

図3には、頭部外傷前，day 7，day 14，day 21，day 28，day 35，および day 42におけるマ

ウスの ladder walk テストでのエラー数を示す。縦軸の「number of errors」は、損傷前後においてマウスが梯子を踏み外した回数を示しており、グラフ上部に行くほど運動機能の低下を示す。頭部外傷前には、マウスはほぼ踏み外すことなく梯子を渡りきることができる。損傷後 day 7 において、マウスが梯子を踏み外す回数はピークに達し、その後回復傾向を示す。HDAC 阻害剤投与群では、control 群と比較してエラーが少ない傾向がみられたが、有意差は認められなかった。

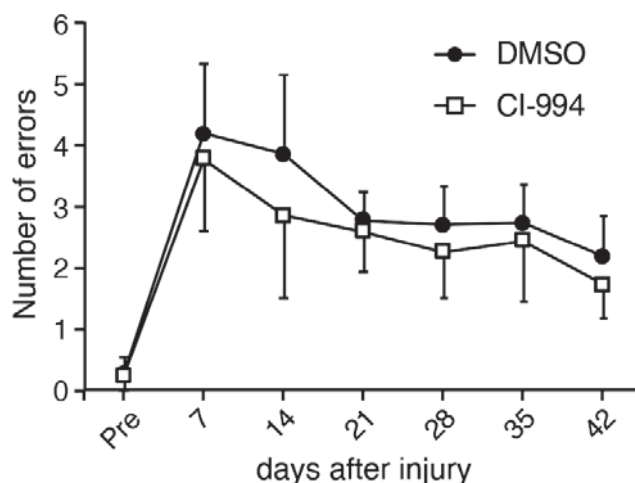


図3. Ladder walk test による運動機能回復作用の検証

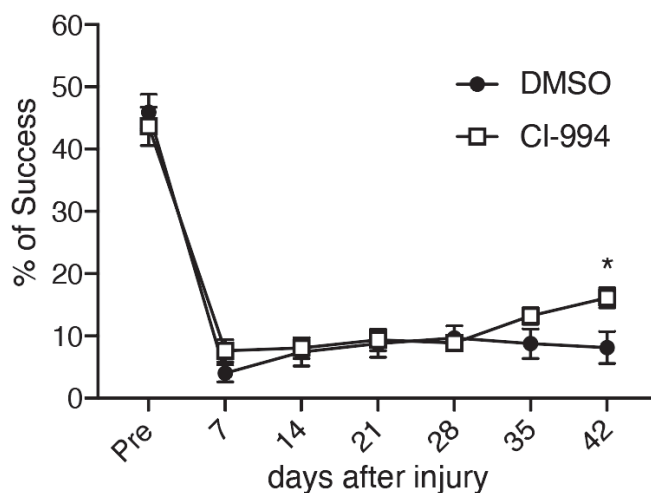


図4. Reaching test による HDAC 阻害剤の運動機能回復作用

D. Reaching test による HDAC 阻害剤の運動機能回復作用の検証

損傷後のマウスの運動機能回復過程を詳細に検証するために Reaching テストを実施した。この試験では、マウスに小さなペレット状の餌を上肢で取らせるトレーニングを行い、上肢の運動機能を評価する。頭部外傷後には、上肢の機能が低下し、ペレットを落とす回数が増加する。図4には、損傷前、day 7, day 14, day 21, day 28, day 35, および day 42におけるマウスの Reaching テストでの成功率を示している。HDAC 阻害剤投与群では、control 群と比較してペレットを落とす回数が有意に減少した。

■ 考 察

以上から、片側頭部外傷モデルでは非損傷側において損傷5週間目で HDAC 2 の発現が上昇している事が分かった。一方、BDNF に関しては sham と比べて、頭部外傷後6週間目で発現が低下していることが分かった。このような栄養因子の発現減少が、中枢神経損傷後の運動機能回復の妨げになっていると推察される。また片側頭部外傷モデルにおいて、損傷5週間目に非損傷側で HDAC 2 の発現が上昇することが明らかになった。一方、BDNF については、sham 群と比較して頭部外傷後6週間目に発現が低下していることが観察された。このような栄養因子の発現減少が、中枢神経損傷後の運動機能回復の障害要因であると考えられる。リハビリテーションは栄養因子の発現を促進するため、本研究では HDAC 阻害剤を用いて栄養因子の発現を効率的に誘導する方法

を検討した。HDAC 阻害剤の投与により、頭部外傷後の上肢運動機能の回復傾向が示された。今後、神経栄養因子発現を誘導する薬剤とリハビリテーションの併用による運動機能回復の効果をさらに検証する必要がある。

交通事故や高所からの落下による中枢神経損傷は、四肢の運動や感覚麻痺を引き起こし、患者の社会復帰を阻害する可能性がある。機能障害の長期化の原因は、外傷による中枢神経回路の破綻に起因すると考えられる。そのため、治療には損傷を受けた神経回路の再構築が求められる。しかしながら、損傷された中枢神経の軸索は再生が極めて困難であり、中枢神経再生治療の開発は困難とされてきた。一方で、損傷を免れた軸索からの側枝伸長による代償的な回路再形成が運動機能回復に寄与することが示されている。脊髄損傷後の運動機能を司る皮質脊髄路の再構築が達成できれば、機能回復の可能性が高い。本研究で使用した HDAC 阻害剤のようなエピジェネティック制御機構を標的とした薬剤が神経栄養因子の発現を誘導し、運動機能回復を促進することが示された。このような薬剤は、中枢神経損傷の克服に寄与することが今後期待される (Sada et al., 2020; Zhang et al., 2018)。

■ 謝 辞

本研究は、研究遂行にあたり多くのご助言を戴きました先生方、関係者の皆様に厚くお礼申し上げます。

COI: なし

参 考 文 献

- 1) Fujita, Y., Fujiwara, K., Zenitani, S., and Yamashita, T. (2015). Acetylation of NDPK-D Regulates Its Subcellular Localization and Cell Survival. *PLoS One* **10**, e 0139616.
- 2) Fujiwara, K., Fujita, Y., Kasai, A., Onaka, Y., Hashimoto, H., Okada, H., and Yamashita, T. (2016). Deletion of JMJD 2 B in neurons leads to defective spine maturation, hyperactive behavior and memory deficits in mouse. *Transl Psychiatry* **6**, e 766.
- 3) Graff, J., Joseph, N.F., Horn, M.E., Samiei, A., Meng, J., Seo, J., Rei, D., Bero, A.W., Phan, T.X., Wagner, F., *et al.* (2014). Epigenetic priming of memory updating during reconsolidation to attenuate remote fear memories. *Cell* **156**, 261-276.
- 4) Graff, J., Rei, D., Guan, J.S., Wang, W.Y., Seo, J., Hennig, K.M., Nieland, T.J., Fass, D.M., Kao, P.F., Kahn, M., *et al.* (2012). An epigenetic blockade of cognitive functions in the neurodegenerating brain. *Nature* **483**, 222-226.
- 5) Lunenburger, L., Colombo, G., and Riener, R. (2007). Biofeedback for robotic gait rehabilitation. *J Neuroeng Rehabil* **4**, 1.
- 6) Maier, I.C., and Schwab, M.E. (2006). Sprouting, regeneration and circuit formation in the injured spinal cord: factors and activity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **361**, 1611-1634.
- 7) Sada, N., Fujita, Y., Mizuta, N., Ueno, M., Furukawa, T., and Yamashita, T. (2020). Inhibition of HDAC increases BDNF expression and promotes neuronal rewiring and functional recovery after brain injury. *Cell Death Dis* **11**, 655.
- 8) 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.
- 9) Yiu, G., and He, Z. (2006). Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nat Rev Neurosci* **7**, 617-627.
- 10) Zhang, S., Fujita, Y., Matsuzaki, R., and Yamashita, T. (2018). Class I histone deacetylase (HDAC) inhibitor CI-994 promotes functional recovery following spinal cord injury. *Cell Death Dis* **9**, 460.