

研究報告書

「中枢神経傷害における神経回路による恒常性機能の破綻と回復メカニズムの解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 上野 将紀

1. 研究のねらい

外傷や血管障害により中枢神経系が傷害されると、神経回路網の破綻に伴い、運動・感覚といった身体機能や自律神経・免疫系をはじめとする恒常性維持機構が失われ、重大な障害をもたらす。これら脳や脊髄の障害に対する有効な治療法は未だ確立されていない。機能回復をもたらすには、破綻した神経回路を新たに作り直すことが必要であるが、成体において回路が再生する能力はきわめて限定的であり、完全な機能回復には至らない。一方で、一度失われた機能は、その後一定の回復傾向を示したり、あるいは逆に増悪するなど変容することが知られており、病態の回復過程を大きく左右していく。これら機能の変化には、残存した回路の可塑的・代償的变化が寄与すると推定されているが、その実体は不明のままである。回路が可塑的に変化する機序が明らかになれば、その変化を制御することで、回路の再建と機能の回復をうながす重要な治療戦略となる可能性がある。

本研究では、「運動および自律神経、免疫制御の神経回路」に着目し、中枢神経の障害後に代償性に変化する神経回路の実体を明らかにするとともに、その回路の形成機序の解明に挑む。これら解析から、神経回路がおよぼすと考えられる生体恒常性の破綻および回復過程の実体を明らかにする。最終的には、回路を再建し恒常性機能の回復をもたらす治療戦略の構築を目指す。本研究の成果をもとに、中枢神経の障害後に正しい神経回路の形成を促し機能を回復へと導くことが可能となれば、脳や脊髄の障害に対して有用な治療方法となることが期待できる。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、健常脳、障害脳における神経回路の詳細な接続様式と機能の解析を行うことにより、神経回路が通常どのように動作し、また障害後に、どのような回路の変化が生体の恒常性を破綻させ、あるいは回復に寄与するかを、「運動および自律神経、免疫制御の神経回路」に着目して明らかにした。

まず免疫機能を制御する自律神経回路に着目し、解析を行った。その結果、脊髄損傷後に起こる免疫機能の低下が、免疫を制御する神経回路の異常な活動により引き起こされることを発見した。脳・脊髄障害後の死亡要因の第一位は感染症であり、免疫機能の低下がその要因であると考えられているが、免疫機能が低下するメカニズムは不明のままであった。その原因として本研究では、免疫器官である脾臓と接続する神経回路に着目した。その結果、脊髄損傷により一度回路が破綻すると、免疫器官を制御する回路が、脊髄内で代償的に新たな回路網を形成することを見いだした。新たな回路内での神経細胞の活動を遮断すると、

免疫機能の低下が回復することを明らかにした。本研究から、脊髄の障害後に神経原性に起こる免疫機能低下の新たな病態メカニズムが明らかになった。神経系を制御して免疫機能を改善する新たな治療法の開発につながると期待される。

また、筋と接続して運動機能を制御する神経回路の解析も行った。その結果、健常脳内において複雑な運動機能を制御する根幹となる回路を見出した。この成果は、障害後、機能を回復するにはどのような回路の再建が必要であるのか、その神経基盤を明らかにするものである。さらには、脊髄の障害後に、運動回路の再生を抑制している分子3種を新たに見出した。これら分子は、機能的な回路を再建するための重要な治療標的分子になると期待される。

(2) 詳細

研究テーマA「脊髄損傷後の自律神経回路の再編による免疫機能低下のメカニズムの解明」

脊髄損傷患者の死亡要因は、肺炎や敗血症を伴う感染症が第一位である。これら感染症は、免疫機能の低下により発症すると考えられるが、なぜ脊髄の障害で免疫機能が低下するのか、その原因は不明のままであった。

本研究では、免疫機能を制御する自律神経回路に着目し、それら回路が、脊髄損傷後の免疫機能の変化にいかに関わるか探ることを目的とした。脊髄損傷後、自律神経系の破綻により起こる症状として、自律神経過反射が知られる。この病態では、血圧の急上昇とそれに伴う心拍数の低下、頻繁な発汗や頭痛など、自律神経機能の異常を引き起こす。これら症状は、交感神経系の過剰な活性化により起こると考えられている。通常、交感神経系は脳幹部から胸髄へと至る神経回路により適切に活動が制御されているが、この回路が脊髄損傷により破壊されると、損傷部より下位の交感神経回路が制御を失い、過剰に活性化してしまうとされる。交感神経系の最終神経伝達物質であるノルアドレナリンが免疫細胞に対し負の作用を持つことが知られることから、本研究は、免疫器官に接続する交感神経の過活動が、免疫器官の機能を抑制する可能性について検討した。

まず、免疫器官である脾臓と接続する交感神経回路が、脊髄損傷後どのように変化するか解析した。脳や脊髄から脾臓へ至る神経回路は、複数の神経細胞の接続により成り立つが、この回路に組みする神経細胞を標識するため、経シナプス逆行性トレーサーである Pseudorabies virus (PRV) を脾臓に注入し、回路網を可視化した。脊髄損傷後の回路を観察した結果、損傷部より下位の脊髄内において、回路に接続する神経細胞数の増加が観察された。すなわち、損傷後に脾臓と接続する神経回路が再編し、新たな回路網を形成することが明らかになった。

脊髄内の交感神経回路を構成する神経細胞は、脊髄からの最終出力細胞である交感神経節前ニューロンと脊髄介在ニューロンである。損傷後の回路網に新たに組み込まれた神経細胞の種類を調べたところ、Vglut2 陽性の興奮性脊髄介在ニューロンであった。したがって、これら興奮性細胞が回路網に新たに加わることで交感神経が過剰に活性化し、免疫機能を低下させると想定された。この事象を確認するため、ケモジェネティクス(化学遺伝学的手法)により、興奮性神経細胞の活動を遮断する方法を確立した。人工的に改変した Gi タンパク質共役型のムスカリン受容体 hM4Di を、アデノ随伴ウイルス(AAV)をベクターとして、Vglut2 陽

性の脊髄介在ニューロンのみを発現させ、次に、脊髄損傷後に hM4Di のリガンド CNO を長期間投与し、Vglut2 陽性神経細胞の活動を抑制した。マウスにおいて、脊髄損傷後には、脾臓の萎縮と免疫細胞の減少を伴う免疫機能の低下が観察されたが、Vglut2 陽性神経細胞の活動を抑制すると、脾臓の萎縮と免疫細胞の減少を顕著に抑えることができた。これら結果から、脊髄損傷後、損傷部の下位において残存した脾臓に接続する交感神経回路が、興奮性神経細胞との接続を増やして変化し、この回路の活性化が免疫機能を低下させることが明らかになった。

本研究から、脊髄の障害後に、神経回路が変化して免疫機能を低下させる新たな病態メカニズムを明らかにすることができた。本成果は、*Nat Neurosci.* 19(6): 784–787, 2016 にて発表した(主な研究成果リスト、論文1)。

研究テーマ B 「中枢神経系—筋をつなぐ運動回路の接続解析」

運動機能は、上位中枢と脊髄を結ぶ多様な回路により成り立つとされるが、なかでも大脳皮質と脊髄を結ぶ「皮質脊髄路」は、自発・巧緻運動に必須の重要な回路とされる。この回路は、脳や脊髄の障害においてしばしば破綻し、重篤な運動障害を引き起こすことから、本回路を再建する手法の確立が求められている。この回路は私たちの以前の研究で、脳の障害後に可塑的に変化し、新たにできた回路が自然回復に寄与することが示されている (Ueno et al., *Brain* 2012)。神経回路が再編する機序をより詳細に解明するには、そもそも健常状態での回路の構成や動作原理を明らかにする必要がある。特に皮質脊髄路が、どのような接続様式をもって複雑な巧緻運動を制御するのか、その原理はほとんどわかっていなかった。

本研究では、遺伝子改変マウスや神経トレーサーを駆使して、皮質脊髄路の接続様式を詳細に解析した。その結果、同回路のなかに多様な内在回路が存在することを見出した。本成果は、運動を制御する神経回路の動作原理の解明に寄与するとともに、障害後、機能を回復するにはどのような回路の再建が必要であるのか、その神経基盤を明らかにするものである。本成果は、未発表である。

研究テーマ C 「新規の回路形成促進モデルの開発」

成体において軸索の伸長や再生が起こりにくい要因として、1) 軸索周囲環境に存在する軸索伸長阻害因子(外的要因)、2) 軸索伸長を促す神経細胞内シグナルの枯渇(内的要因)が考えられている。これまで多くの軸索伸長阻害因子(MAG, Nogo, OMgp, Ephrin, RGM, CSPG など)が同定されているが、これらを単独で除去しても軸索の再生は顕著には起こらないため、再生を効果的に促す分子標的の探索が求められている。

本研究では、軸索伸長の反発を担う軸索ガイダンス分子 Semaphorin ファミリー、細胞骨格を制御する低分子量 G タンパク質 RhoA、mTOR pathway の阻害蛋白である PTEN を標的に、外的・内的要因を排除する遺伝子改変マウスを用いて、脊髄損傷により破綻した運動回路の再生を促すことができるか検討した。その結果、皮質脊髄路の再生を促進する実験モデルの開発に成功した。これら分子は、機能的な回路を再建するための重要な分子標的になると期待される。本成果は、未発表である。

3. 今後の展開

本研究から、中枢神経系の障害後に、神経回路の変化により交感神経回路が活性化し、免疫機能が低下する新たな病態メカニズムが明らかになった。免疫系に対する神経回路の動作原理を詳細にし、その活動を効果的に制御できるようになれば、免疫機能を改善し感染症のリスクを抑える新たな治療法の開発に結びつくと期待される。

また交感神経回路の活性化は、免疫系のみならず、血圧や心拍数、消化機能、体温、発汗など、多岐にわたる自律神経機能にも影響を与える。本研究の成果は、脳や脊髄の障害後に起こる、これら機能の疾患メカニズムの理解へも結びつくと期待される。

本研究から、中枢神経系が障害を受けると、残存した回路が変容し機能回復へ影響を与えることがわかってきた。障害脳、健常脳双方を対象に、回路の構成、動作原理、形成機序を探求し、障害後に回路が変容するメカニズムを理解することで、機能回復へ導く適切な接続を持った神経回路を再建することが可能になると期待される。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

研究目的の達成状況: 本研究では、免疫や運動回路を軸として、中枢神経系の障害後に、神経回路の変化によって恒常性機能が破綻し、また変容していくメカニズムを解明することを目指した。その結果、脊髄損傷後の回路の再編により免疫機能が低下していくという新しい病態メカニズムを明らかにすることができた。また、運動回路の再編過程を解析するために必須であった、健常脳における運動回路の詳細な接続様式と動作原理を明らかにすることができた。またこの回路の再生促進モデル2種の開発にも成功した。これら成果から、運動回路の機能的な再編をうながすための重要な基礎データ、技術基盤を確立できた。本研究を通して、上記計4つの大きな課題を解決し、当初の目標をおおむね達成できたと考える。

研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況): データ収集・解析補助、実験動物管理等で研究補助員や学生と協力する研究実施体制を構築した結果、効率よく研究を進行することができた。研究費は、1. 各神経細胞種をラベルする多様な遺伝子組換えマウスの作成・入手とその維持費、2. 神経回路をラベルし制御することを可能とする多様なウィルス、ツールの作成・入手費用、3. 神経回路解析に必要な各種試薬類の購入費、等に主に使用し、その結果、健常脳、障害脳双方における回路の詳細な接続様式と動作原理を明らかにすることができた。

研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む): 本研究では、脳や脊髄の障害後に、回路が障害後に再編し、機能の変容をもたらすことを明らかにした。特に、回路の変化が免疫低下を引き起こすという新しい病態メカニズムを示すことができた。この成果は、原因のわからなかった脊髄障害後の免疫機能低下に対する新たな治療標的を提示するものである。また、その他脳脊髄の障害後に起こる自律神経疾患に対しても、病態メカニズムへ多くの示唆を与えると考えられる。また運動を司る神経回路については、回路の基礎となる動作原理や再生をうながすための分子標的を明らかにした。これら成果は、中枢神経の障害後に、機能回復へと導く回路を再建するための重要な足がかりとなり、霊長類での研究を経て、将来的には、ヒトでの脳脊髄障害の治療法へ貢献することが期待される。

その他領域独自の評価項目: 本研究では、神経-免疫システムを新たな臓器連関ととらえ、脊髄

の障害を起点として、時間経過とともに免疫の恒常性維持機構が破綻していく神経原性の免疫機能低下のメカニズムを明らかにした。この成果は、本領域において推進された、多臓器間にて維持される生体の恒常性機構が時間経過とともに破綻するという新たな視点から、疾患の発症機序の解明に成功したものである。本研究の成果は、多臓器間の機能ネットワークで結ばれた恒常性維持機構とその破綻のメカニズムとして疾患を統合的に理解し、また生体全体を捉えた治療法の開発へ資するという、本領域の目標に大きく貢献するものとする。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

本研究課題では運動神経、自律神経、および免疫制御の神経回路に着目し、中枢神経の障害後に代償性に変化する神経回路の実体を明らかにするとともに、その回路の形成機序の解明を目指した。その結果、脊髄損傷患者の主な死亡要因である感染症は、新たに形成される神経回路を介して免疫機能が低下することが原因であることを明らかにした。すなわち、トレーサーによる神経経路の可視化やケモジェネティクスの手法により、脊髄損傷により一度神経回路が破綻すると、免疫器官を制御する神経回路が脊髄内で代償的に新たな回路網を形成すること、新たな回路内での神経細胞の活動を遮断すると、免疫機能の低下が回復することを明らかにした。本研究から、脊髄損傷時に神経系を制御して免疫機能を改善する新たな治療法開発への期待が導かれた。この研究成果は Nature Neuroscience に発表した。その他、皮質脊髄路には多様な内在回路が存在することを見出すとともに皮質脊髄路の再生を促進する実験モデルの開発に成功した。研究者は、総説や招聘講演、学会発表等多数を行っている。さきがけ研究期間内に帰国後、国内の大学で教授として研究室を主宰することとなっており、今後の活躍が十分に期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Ueno M, Ueno-Nakamura Y, Niehaus J, Popovich PG, Yoshida Y. Silencing spinal interneurons inhibits immune suppressive autonomic reflexes caused by spinal cord injury. **Nat Neurosci.** 19(6): 784-787, 2016.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

(総説、著書)

1. 上野将紀、Phillip Popovich、吉田富. 脊髄損傷後の自律神経回路の再編成による免疫機能低下のメカニズム. 実験医学. 羊土社. 34(14), 2328-2331, 2016.
2. Ueno M, Yamashita T. The brain-immune network in spinal cord injury. **Neurodegenerative Disorder as Systematic Diseases**. Keiji Wada (Ed.), Springer, 41-66, 2015.

3. Ueno M, Fujiki R, Yamashita T. A selector orchestrates cortical function. *Nat Neurosci*. 17(8): 1016–1017, 2014.
4. Ueno M, Yamashita T. Bidirectional tuning of microglia in the developing brain: from neurogenesis to neural circuit formation. *Curr Opin Neurobiol*. 27C: 8–15, 2014.

(講演)

1. 上野将紀. 脳脊髄障害後の神経回路の再編とその動作原理. 大阪大学分子神経科学セミナー. 大阪. 2016年9月. 招待講演
2. 上野将紀. 脳脊髄障害後の神経回路の再編成と動作原理. 東京医科歯科大学学内セミナー. 東京. 2015年12月. 招待講演.

(学会)

1. Ueno M, Ueno-Nakamura Y, Niehaus J, Popovich PG, Yoshida Y. Rewiring of sympathetic circuitry and immune suppression after spinal cord injury. Neuroscience 2016, San Diego, CA. 2016年11月.
2. Ueno-Nakamura Y, Ueno M, Niehaus J, Lu QR, Yoshida Y. Semaphorins limit axon regeneration after spinal cord injury. Neuroscience 2016, San Diego, CA. 2016年11月.
3. Ueno M, Ueno-Nakamura Y, Niehaus J, Lu QR, Yoshida Y. Semaphorins limit axon regeneration after spinal cord injury. 16th International Symposium of Neural Regeneration, Pacific Grove, CA. 2015年12月.
4. Noble B, Ueno M, Eroglu C, Yoshida Y, Popovich PG. Enhanced synaptogenesis in autonomic circuitry following spinal cord injury. 16th International Symposium of Neural Regeneration, Pacific Grove, CA. 2015年12月.
5. Gu Z, Sarrad N, Baccei ML, Li J, Ueno M, Liang M, Martin JH, Yoshida Y. Skilled grasping requires non-apoptotic Bax/Bak-mediated corticospinal circuit refinement. Neuroscience 2015. Chicago, IL. 2015年10月.
6. Gu Z, Sarrad N, Ueno M, Liang M, Li J, Baccei ML, Martin JH, Yoshida Y. Coordinating flexor and extensor muscle activity requires Bax/Bak-caspase-dependent synaptic refinement of corticospinal circuits underlying skilled movements. Wiring the brain, Cold Spring Harbor, NY. 2015年3月.
7. Kalambogias J, Gu Z, Ueno M, Kumanogoh A, Martin JH, Yoshida Y. Elimination of cortico-motoneuronal connections during development by Sema6D-PlexA1-mediated axon pruning in mice. Neuroscience 2014. Washington. 2014年11月.
8. Gu Z, Kalambogias J, Han W, Kawasaki Y, Ueno M, Blatz E, Liang M, Weirauch M, Sestan N, Martin JH, Yoshida Y. Construction of species-specific corticospinal circuit by differential activation of Sema6D/PlexA1-mediated axon pruning. 79th Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology Cognition. Cold Spring Harbor, NY. 2014年5月.
9. Tanaka T, Fujita Y, Ueno M, Yamashita T. Suppression of SHP-1 promotes functional corticospinal tract rewiring after brain injury. Neuroscience 2013, San Diego, CA. 2013年11月.

10. Hasebe N, Fujita Y, Ueno M, Yoshimura K, Fujino Y, Yamashita T. Soluble β -amyloid precursor protein alpha peptide (sAPP α) binds to p75 neurotrophin receptor (p75NTR) to promote neurite outgrowth. Neuroscience 2013, San Diego, CA. 2013 年 11 月.

(プレスリリース、ニュース)

1. 「神経回路が免疫機能を抑制するメカニズムを発見～脳脊髄障害で起こる感染症の新たな治療法に光～」 JST プレスリリース 2016 年 4 月 <http://www.jst.go.jp/pr/info/info1177/>
2. Researchers Find Possible Treatment for Suppressed Immunity from Spine Injuries. シンシナティ小児病院プレスリリース 2016 年 4 月
<https://www.cincinnatichildrens.org/news/release/2016/spine-injury-research-4-18-2016>
3. 「免疫抑制的自律神経反射を抑えるしくみをマウスで解明」 日本せきずい基金ニュース No.69, 2016 年 6 月