

153. 運動トレーニングによる中枢神経回路再構築の機序

藤田 幸

大阪大学 大学院医学系研究科 分子神経科学

Key words : 中枢神経損傷, リハビリテーション, 皮質脊髄路

緒 言

交通事故や高所からの落下などにより中枢神経回路である皮質脊髄路が障害されると、麻痺などの重篤な運動障害が残る。病態解明や治療法確立を目的に、多くの研究が行われてきた。リハビリテーションは運動機能障害の回復を促すが、その効果は限定的で、より効率的なアプローチの開発が求められている。近年、障害を免れた神経軸索が側枝を伸長し、障害を受けていない神経回路に接続することで、「迂回路」を形成し、一部運動機能の自然回復に寄与することが解ってきた¹⁻³⁾。このような神経回路の再構築は、発生過程における神経回路形成と同様に、以下の段階を経て完成されると考えられる^{4,5)}。すなわち、(1) 側枝の伸長 (2) 標的細胞とのシナプス形成、(3) 神経回路に組み込まれない余分な側枝の刈り込みというステップが必要である。側枝形成やシナプス形成を促す手法、薬剤などは、著者を含む複数のグループから報告されている。しかし、余分な側枝を刈り込み、精密な神経回路を形成する機序の詳細は不明である。そこで本研究では、損傷を受けた中枢神経回路がリハビリテーションによって再構築される過程を経時的に観察し、リハビリテーションにより生じる神経回路の変化を理解することを目的とした。これにより、リハビリテーションが神経回路の再構築を促すメカニズムを解明することを目指した。

方法および結果

1. 中枢神経損傷後における側枝の伸長と刈り込み

マウスの胸髄背側半切断による不完全損傷モデルでは、頸髄レベルで脊髄白質を通る皮質脊髄路の軸索から代償的に伸長した側枝が灰白質に侵入し、運動神経やその介在神経である脊髄固有神経と接続して、神経回路を再構築することが知られている。このような代償的な神経回路形成の過程では中枢神経系の発生期と同様に、始めに側枝が過剰に伸長し、不要な側枝が刈り込まれて選択的な神経回路が形成されると考えられる。中枢神経損傷後の側枝数の変化を評価するために、順行性の神経標識剤であるビオチン化デキストラミン (BDA) を皮質脊髄路に注入し、ビオチン-アビジン法による蛍光染色を行い、側枝を可視化した。胸髄 T8 レベルで脊髄の背側半切断を行い中枢神経損傷モデルを作製した。コントロールとして損傷は施さず、脊椎の椎弓切除のみを施した群 (Sham 群) を準備した。その後、皮質脊髄路神経細胞が存在する大脳皮質運動野第 V 層に BDA を注入した。頸髄 C4-C6 レベルの側枝数の合計を、C3 における BDA 陽性の皮質脊髄路軸索数で除算し、標準化した。この値は、コントロールとして用いた Sham 群と比較し、損傷 10 日後において約 10 倍に増加した。また、損傷 28 日後では、損傷 10 日後と比較して、側枝数が優位に減少した (図 1)。以上の結果は、損傷 10 日後から 28 日後にかけて、皮質脊髄路から代償的に伸長した側枝が刈り込みを受けることを示唆している。

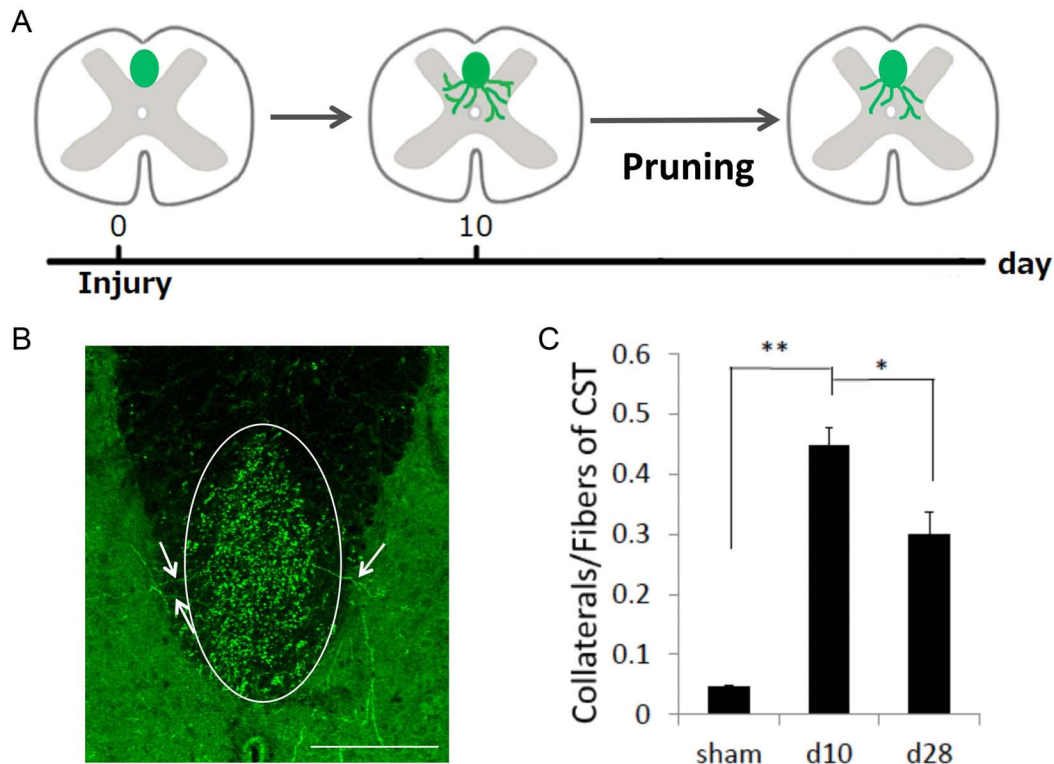


図1. 損傷後の側枝数の経時的な変化

(A) 中枢神経損傷後、代償的に伸長した側枝の経時的な変化。損傷10日後に側枝の伸長が観察され、損傷28日後には側枝数の減少が観察された。(B) 頸髄における代償的な側枝の伸長。皮質脊髄路(白丸)から、灰白質へ向けて側枝の伸長が生じた(矢印)。(C) 側枝数の変化の定量化。損傷10日後と比較し、損傷28日後には有意に側枝数が減少していた。Scale bar: 200 μ m. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, one way ANOVA followed by Tukey-Kramer test.

2. リハビリテーションによる刈り込みの促進

中枢神経損傷後における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用いられてきた。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にした動物実験や、脳損傷や脊髄損傷患者を対象にした臨床研究によって明らかにされてきた^{6,7)}。しかしながら、実際にリハビリテーションによって損傷後の神経回路内にどのような変化が生じ、機能回復がもたらされるのかという点については不明である。そこで本研究では、リハビリテーションが、脊髄損傷後の神経回路にどのような変化をもたらしているのかを検証した。マウスに上記と同様に中枢神経損傷を施した後、リハビリテーション群と非リハビリテーション群に振り分けた。リハビリテーション群に対して、刈り込みが開始されていると考えられる損傷14日後から28日後までRotarodを用いて運動を課した。Rotarodでは、回転する棒の上にマウスをのせ、マウスに回転棒から落下しないよう、バランスを取ることが必要な運動を課する。実験1で、刈り込みにより側枝数の減少が認められた損傷28日後において、リハビリテーション群と非リハビリテーション群における頸髄レベルの側枝数を比較した。その結果、リハビリテーション群において、皮質脊髄路の神経軸索から灰白質へ向けて代償的に伸長する側枝の数が有意に減少していた(図2)。これらの結果は、Rotarodによる運動が、側枝の刈り込みを促すことを示唆している。

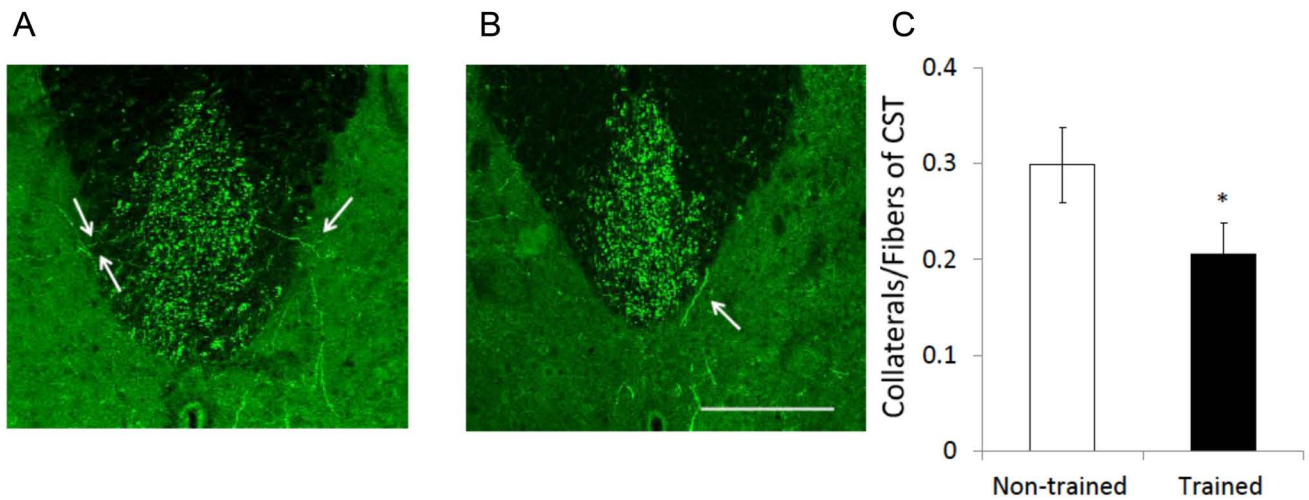


図2. リハビリテーションによる側枝の刈り込み

(A、B) 非リハビリテーション群 (A) とリハビリテーション群 (B) における頸髄レベルの側枝 (矢印)。(C) 側枝数の定量化。非リハビリテーション群と比較し、リハビリテーション群では、側枝数が有意に減少し、刈り込みが亢進していることが示唆された。Scale bar: 200 μ m. * $p < 0.05$, Student's t-test.

3. リハビリテーションによる中枢神経損傷後の運動機能回復

リハビリテーションにより代償的な側枝の刈り込みが促される時期と、運動機能回復の亢進との関連について検証した。実験2と同様に、中枢神経損傷モデルを作製後、Rotarodを用いたリハビリテーション群と非リハビリテーション群のマウスを作製した。オープンフィールド内におけるマウスの行動を観察し、運動機能の評価法であるBMS-scoreにより評価した。また、両群のマウスを損傷14、21、28日後に、格子状の網の上を歩かせて下肢を踏み外す回数を測定するGrid walk testと、バランスに必要な運動機能を評価するRotarod testを用いて運動機能評価を行った。BMS-scoreとGrid walk testでは両群の間に有意な差は検出されなかった。一方で、Rotarod testでは、損傷21日後、28日後において有意に運動機能回復が促されていた。これらの結果は、中枢神経損傷後、神経回路が再構築される過程のうち、刈り込みが生じる時期に行うリハビリテーションが、運動機能の回復に寄与することを示唆している。

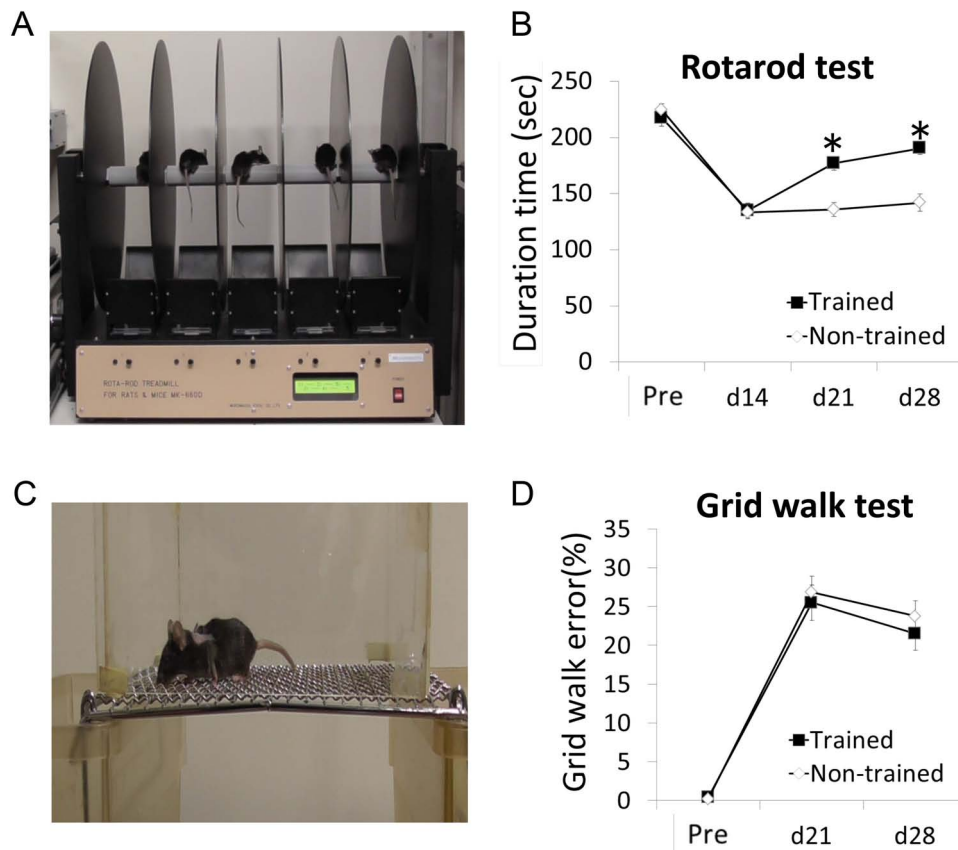


図3. 損傷後におけるリハビリテーションによる運動機能回復

(A) Rotarod test. 回転する棒の上にマウスをのせ、マウスに回転棒から落下しないようなバランスを取らせる運動を課する。(B) Rotarod test による運動機能評価では、損傷 21 日後、28 日後、運動機能の有意な回復が認められた。(C) Grid walk test. 格子状の網の上を歩かせて下肢を踏み外す回数を測定する。(D) Grid walk test ではリハビリテーション群と非リハビリテーション群の間に有意な差は検出されなかった。* $p < 0.05$, Two way repeated ANOVA followed by Tukey-Kramer test.

考 察

本研究により、リハビリテーションが中枢神経損傷後における神経回路再形成の過程で、側枝の刈り込みを促す可能性が示唆された。中枢神経損傷後、皮質脊髄路から伸長する側枝数は損傷後 10 日までに増加し、その後損傷 28 日後にかけて減少した。この結果から、側枝の刈り込みは損傷 10 日後から 28 日後の間に生じることが示唆された。Rotarod を使用したリハビリテーションを行ったマウスは、コントロール群に比べ、刈り込みが生じた後の損傷 28 日後における、皮質脊髄路からの側枝数が有意に減少していた。さらに、刈り込みが生じる時期にリハビリテーションを行うことで、マウスの運動機能回復が促された。本研究により、リハビリテーションによって、側枝の刈り込みが促されるとともに運動機能回復が促進されたことは、側枝の刈り込みが中枢神経損傷後の機能回復の過程で重要な役割を担っていることを示唆する結果である。中枢神経損傷後、側枝の刈り込みを促す分子メカニズムの解明が今後の課題である。

共同研究者

本研究の共同研究者は大阪大学大学院医学系研究科分子神経科学 山下俊英教授、中西徹である。本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝致します。

文 献

- 1) Nakagawa H, Ueno M, Itokazu T, Yamashita T. Bilateral movement training promotes axonal remodeling of the corticospinal tract and recovery of motor function following traumatic brain injury in mice. *Cell death & disease*. 2013;4:e534. doi: 10.1038/cddis.2013.62. PubMed PMID: 23470541; PubMed Central PMCID: PMC3613840.
- 2) 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 : a journal of neurology*. 2012;135(Pt 4):1253-67. doi: 10.1093/brain/aws053. PubMed PMID: 22436236.
- 3) Tanaka T, Fujita Y, Ueno M, Shultz LD, Yamashita T. Suppression of SHP-1 promotes corticospinal tract sprouting and functional recovery after brain injury. *Cell death & disease*. 2013;4:e567. doi: 10.1038/cddis.2013.102. PubMed PMID: 23559001; PubMed Central PMCID: PMC3641325.
- 4) Lang C, Guo X, Kerschensteiner M, Bareyre FM. Single collateral reconstructions reveal distinct phases of corticospinal remodeling after spinal cord injury. *PloS one*. 2012;7(1):e30461. doi: 10.1371/journal.pone.0030461. PubMed PMID: 22291960; PubMed Central PMCID: PMC3265484.
- 5) Luo L, O'Leary DD. Axon retraction and degeneration in development and disease. *Annual review of neuroscience*. 2005;28:127-56. doi: 10.1146/annurev.neuro.28.061604.135632. PubMed PMID: 16022592.
- 6) Lunenburger L, Colombo G, Riener R. Biofeedback for robotic gait rehabilitation. *Journal of neuroengineering and rehabilitation*. 2007;4:1. doi: 10.1186/1743-0003-4-1. PubMed PMID: 17244363; PubMed Central PMCID: PMC1790897.
- 7) Maier IC, Schwab ME. Sprouting, regeneration and circuit formation in the injured spinal cord: factors and activity. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2006;361(1473):1611-34. doi: 10.1098/rstb.2006.1890. PubMed PMID: 16939978; PubMed Central PMCID: PMC1664674.