

分担研究報告書

(脳科学研究事業「中枢神経損傷後の機能回復機構の解明、治療法の開発」)

「頭部外傷後の高次神経機能の変化について」

分担研究者 西川 隆 大阪大学大学院医学系研究科精神医学 講師
協力研究者 八田 直己 大阪大学大学院医学系研究科精神医学

研究要旨:頭部外傷患者の高次脳機能障害について、障害の実態と回復過程を検討するため、大阪大学医学部附属病院救命救急センターへ搬送され入院した患者のうち、高次脳機能障害が疑われた患者に対して神経心理学的評価を行った。急性期を脱して検査可能となった時点でMMSE, SLTA, WMS-R, WCST, go-no go test, 信号動作, パントマイム, 手指呼称について初期の評価を行い、また可能な限り受傷後半年毎に追跡検査を行なった。今年度までに検討した患者は、頭部外傷 24 例、蘇生後脳症 3 例であった。最も多い受傷原因は交通外傷であり、最も多い脳損傷部位は左前頭葉であった。また最も多い脳機能障害は言語性記憶障害であった。10 例の患者について追跡調査が可能であった。回復過程に関していまだ明瞭な結果を抽出しうる例数ではないが、現時点では、脳損傷が局在し脳機能の障害領域が限局する症例では良好な予後が期待できることが示唆される。

A. 研究目的

頭部外傷については、低体温療法等種々の治療法の発達により生命予後が著しく改善した。しかし、それに伴って頭部外傷患者の生活的・社会的予後が新たな問題となり、なかでも、麻痺などの運動障害の程度に比して生活場面での認知や行動の障害が目立つ、いわゆる高次脳機能障害の影響が注目されている。本研究では、外傷後の高次脳機能の評価を通して、その障害の実態と回復過程に関する調査を行った。

B. 対象と方法

対象は、平成 13 年度以降の当院救命救急センター入院患者のうち、高次脳機能の変化が疑われた患者で、神経心理学的検査が可能であった 27 例(うち外傷例 24 例、蘇生後脳症例 3 例)。

方法は、各患者に、全般的認知機能評価として MMSE、言語機能評価として SLTA、記憶評価として WMS-R、前頭葉機能評価として RCPM、WCST、go-no go test、行為の評価として信号動作、パントマイム、手指呼称を施行した。

うち 10 例の患者で、受傷後半年毎に追跡検査を行うことができた。

C. 研究結果

今回の調査において、最も多かった脳外傷の受傷原因は交通外傷であり、24例中21例であった。また、最も多い脳損傷部位は左側頭葉であり、24例中11例であった。

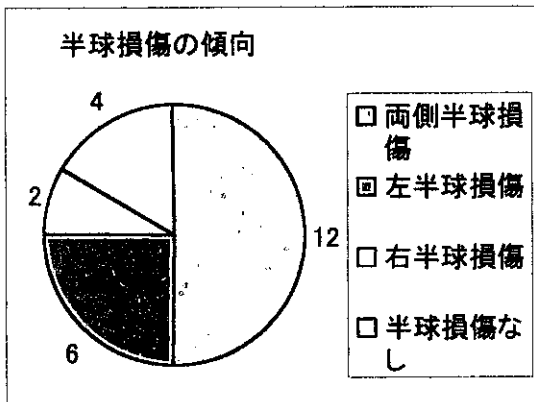
これらの対象脳外傷患者に対して、受傷後約一週間から約一ヶ月の時点で上記の神経心理学的諸検査による初期評価を行なった。その結果、24例の患者のうち17例の患者で言語性記憶力障害を

認め、うち11例の患者で左側頭葉の損傷を認めた。11例の患者で視覚性記憶力障害を認め、うち6例で右前頭葉ないし側頭葉の損傷を認めた。13例の患者で語想起障害を認め、うち9例の患者で前頭葉の損傷を認めた。6例の患者で注意障害を認め、うち4例の患者で前頭葉の損傷を認めた。この結果は、現在広く知られている脳機能の局在と一致している。

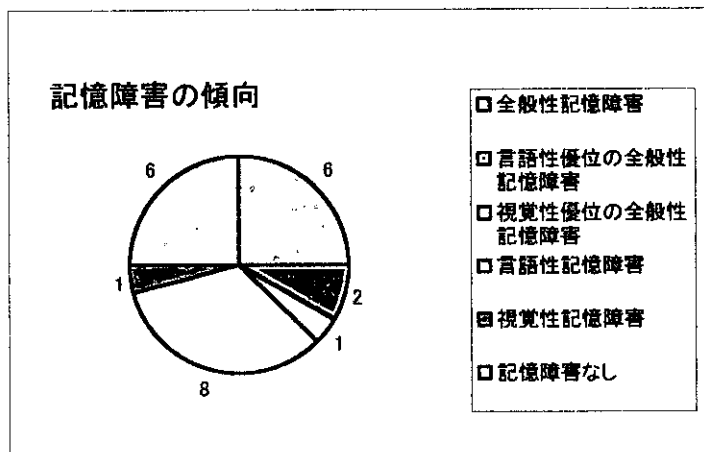
結果の詳細を以下に述べる。

1. 初期評価の結果

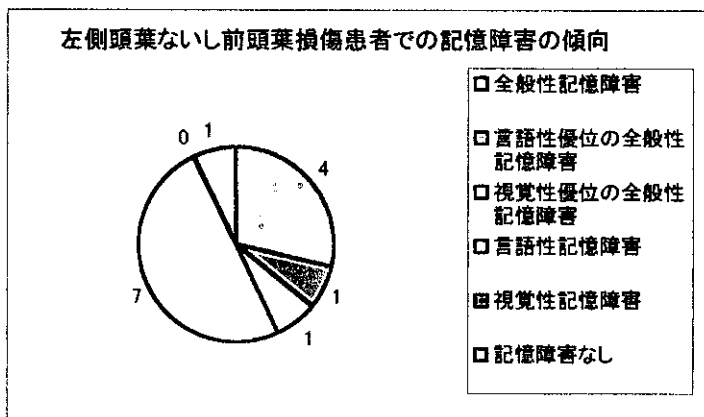
(1)まず、MRIによって判定した大脳半球損傷の傾向は、下グラフのごとく、半数が両側損傷であり、一側損傷では左半球損傷例が多かった。



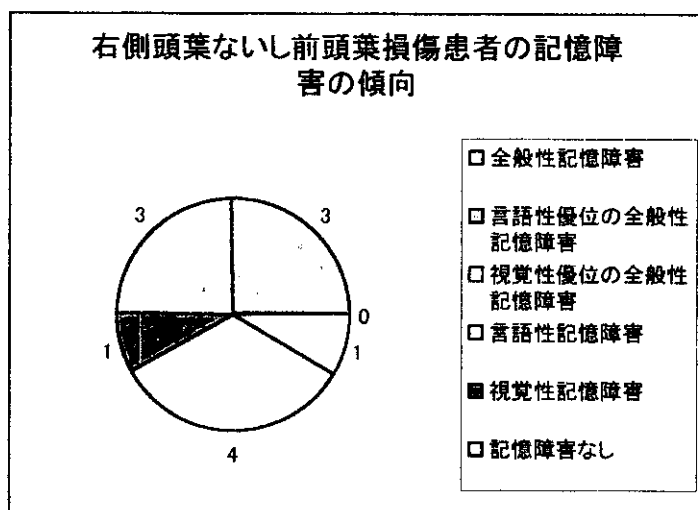
(2)記憶障害の全体的傾向に関しては、下グラフのごとく、言語性記憶障害を呈する例が多かった。



(3)左半球損傷患者(両側半球損傷患者を含む)の記憶障害に注目してみると、下グラフのごとく、言語性記憶障害を呈する例が多かった。



(4)右半球損傷患者(両側半球損傷患者を含む)の記憶障害に注目してみると、下グラフのごとく、言語性記憶障害、視覚性記憶障害と共に、記憶障害を認めない例も認められた。



(5)左半球に局限した損傷例(6例)では、全例言語性記憶障害を認め、右半球に局限した損傷例(2例)では、高次脳機能障害を認めなかった。

(6)次に、記憶障害を呈した症例の脳損傷部位の傾向を検討してみると、全般性記憶障害を呈する例では、左側頭葉や左右前頭葉損傷が多く、言語性記憶障害を呈する例では、明らかな局所傾向を認めず、また視覚性記憶障害を呈する例では、両半球損傷が多かった。

(7)蘇生後脳症の3例では、全例ともMRIによって局在性脳損傷が検出できなかったが、1例で言語性記憶障害、1例で語想起障害、1例で全般性記憶障害と注意障害を主とする広範な脳機能障害を認めた。

2. 追跡調査の結果

(1) 24例の脳外傷患者のうち、10例において半年後もしくは一年後まで追跡調査を行った。初期評価時に高次脳機能障害を認めなかった3例は半年後にも障害を認めなかった(A群)。

高次脳機能障害なし 3例 全例障害なし(A)

(2) 初期評価時に全般性記憶障害を認めた3例のうち、受傷半年後に2例では言語性記憶の改善はみられず、視覚性記憶が正常域に回復した(B群)。1例は視覚性記憶の改善はみられず、言語性記憶の中等度の改善がみられた(C群)。

全般性記憶障害 3例 2例は視覚性記憶の改善 言語性記憶は改善せず(B)
1例は視覚性記憶改善せず 言語性記憶も中等度の改善(C)

(3) 初期評価時に言語性記憶障害のみを認めた4例のうち、3例は受傷半年後に正常域に回復し(D群)、1例は改善がみられなかった(E群)。

言語性記憶障害4例 3例は正常域に改善(D)
1例は改善みられず(E)

(4) 以上の患者群A~Eの局所脳損傷を比べてみると、A群3例のうち2例は局所脳損傷を認めず、1例は左右前頭葉と後頭葉に挫傷巣を認めた。B群2例は、それぞれ局所脳損傷を認めない1例と、脳梁膨大部のび慢性軸索損傷を認めた1例であった。C群1例では、左前頭葉硬膜外血腫と頭頂葉挫傷巣を認めた。D群3例は、それぞれ左側頭葉挫傷巣のみの1例と、左側頭葉脳内血腫を認めた1例、左前頭葉硬膜外血腫、左後頭葉挫傷巣を認めた1例であった。E群1例では、左側頭葉、後頭葉挫傷巣を認めた。

D. 考察

過去の研究から、頭部外傷による高次脳機能障害の病態においては注意障害・記憶力障害が重要な意義を有することが示唆されている。とりわけ言語性記

憶障害は社会生活に及ぼす影響が大きく、左半球前半部の挫傷や側頭葉内側面の障害・彌慢性脳損傷などを有する症例では、記憶障害が回復しがたいために社会復帰を目指す上で大きな障壁となることが指摘されている。

我々の調査結果においても同様の所見が得られた。今回の調査では、昨年に引き続き左半球損傷例が多かったが、これを反映して、高次脳機能の障害領域に関しては言語性記憶障害を有する例が多かった。また、左半球に限局した脳損傷例では全例で言語性記憶障害を認め、右半球に限局した脳損傷例では全例で高次脳機能障害を認めなかった。症例数が多くないため明確な結論は出せないが、これらの結果は、高次脳機能障害の病態においては言語性記憶障害の関与が大きいために、頭部外傷後に高次脳機能障害が顕在化する症例には左半球損傷が多く、そもそも右半球に限局した損傷例が我々の調査の対象に挙がるのが少ないことを反映しているのかもしれない。

追跡調査についてはさらに症例数が少なく、受傷部位と高次脳機能の予後の関連について明確には論じ得ないが、損傷部位が限局していること、および、初期評価時の高次脳機能の障害領域が限局していることが、良好な予後に関連している可能性が示唆される。

E. 結論

今回の我々の調査では、頭部外傷例では左半球損傷が多いこと、初期評価時に言語性記憶障害が多いこと、損傷部位が限局しており初期評価時の高次脳機能障害が限局した障害であることが良好な予後に関連している可能性が示唆された。

今後更に初期評価の症例を蓄積し、

受傷部位や高次脳機能障害の傾向を確認するとともに、追跡調査の症例を増やし、明確な回復過程の傾向を探る予定である。

F. 研究発表

論文発表

1. Nishikawa T, Okuda J, Mizuta I, Ohno K, Jamshidi J, Tokunaga H, Ikejiri Y, Nakagawa Y, Yoshimine T, Tanabe H, Takeda M: Conflict of intentions due to callosal disconnection. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*, 71: 462-471, 2001
2. Mizuno-Matsumoto Y, Ishijima M, Shinosaki K, Nishikawa T, Ukai S, Ikejiri Y, Nakagawa Y, Ishii R, Tokunaga H, Tamura S, Date S, Inoue T, Shimojo S, Takeda M: Transient global amnesia (TGA) in an MEG study. *Brain Topography* 13: 269-274, 2001
3. 西川 隆、池尻義隆、正木慶大、中川賀嗣、徳永博正、吉山顕次、武田雅俊: Pick 病の反復行動に対する選択的セロトニン再取込み阻害剤の効果 強迫スペクトラム障害の観点から. *精神医学* 43: 251-258, 2001
4. 西川 隆、武田雅俊: エピソード記憶のメカニズム. *神経進歩* 45: 171-183, 2001
5. 西川 隆、篠崎和弘、武田雅俊: カラー口絵 皮質変性性痴呆. *日本医師会雑誌* 125(第 8 号付録): 4, 2001
6. 武田雅俊、篠崎和弘、西川 隆: 痴呆と偽痴呆. *日本医師会雑誌*

- 125(第8号付録): 2-7, 2001
7. 池尻義隆、篠崎和弘、西川 隆、武田雅俊. アルツハイマー病の初期の薬物治療. 精神科治療学 16: 429-432, 2001
 8. 西川 隆、水田一郎、武田雅俊: 高齢者と痴呆老人の行為障害 - 強迫行為とその周辺. 老年精神医学雑誌 12: 903-908, 2001
 9. 西川 隆, 池尻義隆, 武田雅俊: 老化と記憶. 老年精神医学雑誌 12: 1246-1252, 2001

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

分担研究報告書

(脳科学研究事業「中枢神経損傷後の機能回復機構の解明、治療法の開発」)

「外傷後遅発性進行性脳萎縮(Delayed Neuronal Loss)の機序の解明」

分担研究者 塩崎 忠彦 大阪大学大学院医学系研究科生体機能調節医学講座 助手
研究協力者 島津 岳士 大阪大学大学院医学系研究科生体機能調節医学講座 助教授
田中 裕 大阪大学大学院医学系研究科生体機能調節医学講座 助教授
速形 俊昭 大阪大学大学院医学系研究科生体機能調節医学講座 助手

研究要旨: 外傷後遅発性進行性脳萎縮(delayed neuronal loss)は、従来は致死であった最重症頭部外傷患者を中等度脳低温療法によって救命し、長期追跡することによって我々が初めて見出した病態である(J Neurotrauma, 2001)。『中等度脳低温療法がdelayed neuronal lossの発生にどのように関与しているか』を調べるために、1998年から2年間にわたって行われた多施設研究(平成10・11年度脳科学研究事業)の症例(34℃群45例と37℃群46例)を追跡調査した。全症例とも受傷後2年以上経過しているが、どちらの群にもdelayed neuronal lossは認められなかった。この結果から、Delayed neuronal lossの発生には、脳の温度を34℃に下げたことではなく、高い頭蓋内圧が強く関与していると考えられた。また、delayed neuronal lossを呈している3症例で、それぞれfollow up CT(受傷10年後、5年半後、4年半後)を撮影したが、やはり現在もdelayed neuronal lossが緩徐に進行していることが確認された。

A. 研究目的

中等度脳低温療法を施行した重症頭部外傷患者のうち、長期追跡調査が可能であった17例の意識レベルの回復と頭部CT画像所見の変化を解析した結果、半数にあたる8例が従来考えられてきた経過とは全く違う経過をたどっていることが判明した。すなわち、これらの症例では意識レベルが時間経過(月単位)とともに改善しているにもかかわらず、CT画像では逆に低吸収領域が時間経過と共に拡大して脳萎縮が進行していた。このような現象は今まで報告されておらず、我々はこの現象を『delayed neuronal loss』と名付けた(J Neurotrauma, 2001)。この変化は、①受傷後1ヵ月半から2ヶ月頃に出現し始め、月単位・年単位で緩徐に拡大する、②脳表

の基本構造を保ちながら萎縮していく、③皮質動脈の分布を超えることはない、等の特徴がみられた。ちなみに1987年から1992年の間の症例で、『従来の治療法で頭蓋内圧をコントロールできた21症例』と『従来の治療法で頭蓋内圧を20mmHg未満にコントロールできなかったが中等度脳低温療法を施行しなかった17例のうち生存した2例』では、delayed neuronal lossを認めなかった。

今回の研究目的は、1998年2月から2000年1月にかけて行われた多施設臨床研究の対象患者の追跡調査を継続し、『頭蓋内圧は低いが中等度脳低温療法を併用した患者(34℃群)』と『頭蓋内圧は低く脳平温療法を施行した患者(37℃群)』とを比較することによって、中等度脳

低温療法が delayed neuronal loss の発生にどのように関与しているかを調べることである。また、delayed neuronal loss を呈した症例の、さらに長期的な予後追跡調査 (follow up CT を含む) を施行した。

B. 研究方法

対象は、1998年2月から2000年1月の2年間にわたって行われた多施設研究(平成 10・11 年度脳科学研究事業)にエントリーした91例(34℃群45例と37℃群46例)である。対象患者を受傷後1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、9ヶ月、12ヶ月、可能なら18ヶ月と24ヶ月後に追跡調査し、患者の回復度合いの確認と頭部CT検査を施行した。

我々が最初に報告した8例の患者のうち、追跡調査の可能な症例では、来院してもらって follow up CT を撮影した。

C. 研究結果

1998年から2年間にわたって行われた多施設研究(平成 10・11 年度脳科学研究事業)の症例(34℃群45例と37℃群46例)を現在も追跡調査中である。これらの症例は、従来の治療法で頭蓋内圧を 25mmHg 未満にコントロールできる『頭蓋内圧の低い症例』である。全症例とも受傷後2年以上経過しているが、どちらの群にも delayed neuronal loss は認められていない。

我々が最初に報告した8例の患者のうち、2例は転居先不明で追跡不可、2例は招致に応じてもらえず追跡不可、1例は擁護施設に入っていて出診不可の状態、結局受傷10年後、5年半後、4年半後の3例で follow up CT を撮影することができた。

症例1:17歳女性。交通事故により右急性硬膜下血腫、脳挫傷を受傷した。来院時

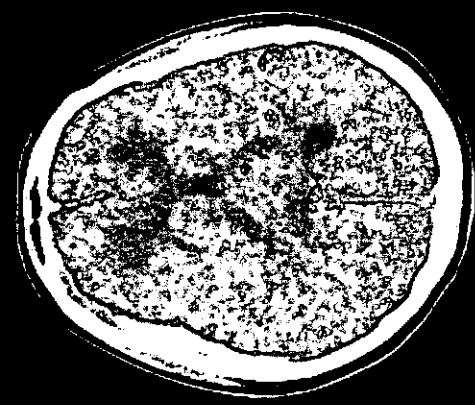
GCS6点で、当科退院時(受傷後1ヶ月半)は植物状態であった。図1に示すように、受傷1ヶ月の時点では明らかな脳萎縮を認めなかったが、その後徐々に右半球のみの脳萎縮が進行していった。ところが、画像上の脳萎縮とは逆に受傷3ヶ月後より徐々に意識が回復し、受傷4年後には高校に復学し、その後2年間で高校を卒業した。受傷8年後より大学に通い、現在に至る。現在、少しぎこちないが杖なしでも自力歩行可能であり、元気に大学に通っている。驚いたことに、受傷後10年経過した現在も、CT画像上では右半球に限局した片側性の脳萎縮が緩徐に進行していることがわかる(図1)。

症例2:22歳男性。交通事故により右急性硬膜下血腫、脳挫傷を受傷した。来院時GCS5点で、当科退院時(受傷後1ヶ月)は植物状態であった。症例1と同様に、受傷1ヶ月の時点では明らかな脳萎縮を認めなかったが、その後徐々に右半球のみの脳萎縮が進行していった。ところが、この症例の場合も画像上の脳萎縮とは逆に受傷2ヶ月後より徐々に意識が回復し、受傷6ヶ月後にはほぼ受傷前のレベルにまで改善した。受傷後4年半経過した現在、四肢の運動機能障害も認めず、保護作業場ではあるが非常に高度な作業をこなし、社会復帰をめざして元気に働いている。この症例の場合も、受傷後4年半経過した現在も、CT画像上では右半球に限局した片側性の脳萎縮が緩徐に進行している。

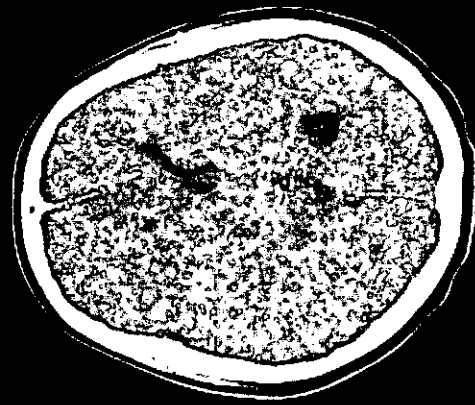
症例3:52歳女性。交通事故により右急性硬膜下血腫、脳挫傷を受傷した。来院時GCS8点で、当科退院時(受傷後1ヶ月)は植物状態であった。症例1と同様に、受傷1ヶ月の時点では明らかな脳萎縮を認めなかったが、その後徐々に右半球のみ

外傷性遅発性進行性脳萎縮 (Delayed Neuronal Loss) の1例

受傷当時
17歳(女性)



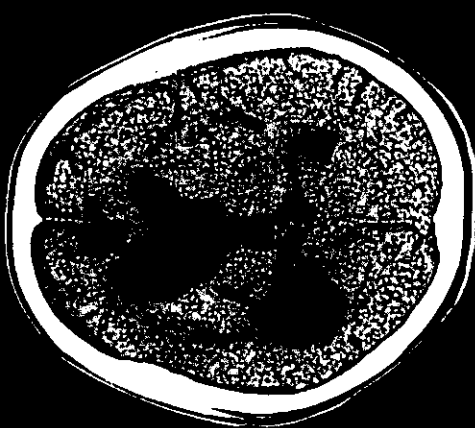
来院時



1週間後



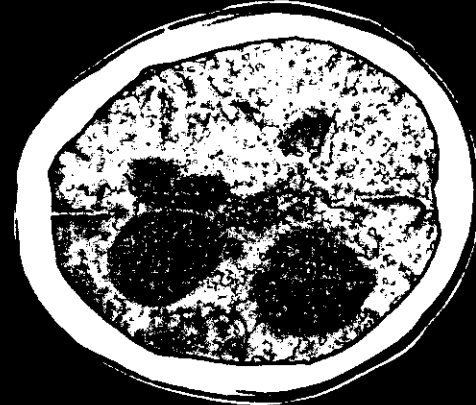
1ヶ月後



5ヶ月後



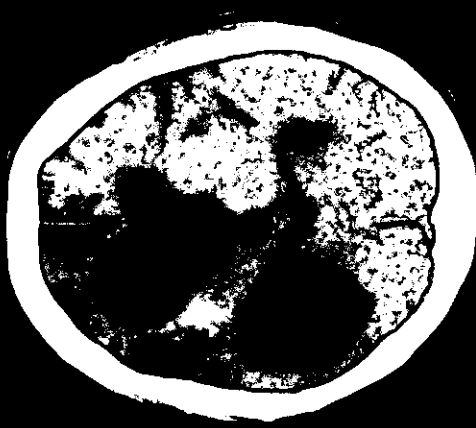
2年後



5年後



6年後



10年後

の脳萎縮が進行していった。ところが、この症例の場合も画像上の脳萎縮とは逆に受傷2ヶ月後より徐々に意識が回復し、受傷6ヶ月後にはほぼ受傷前のレベルにまで改善した。受傷後5年半経過した現在、歩行に軽度の障害を認めるものの、主婦として問題無く社会生活を送っている。この症例の場合も、やはり受傷後5年半経過した現在も、CT画像上では右半球に限局した片側性の脳萎縮が緩徐に進行している。

D. 考察

我々が delayed neuronal loss に関する最初の論文を発表 (J Neurotrauma, 2001) した時には、delayed neuronal loss は『頭蓋内圧は高いが中等度脳低温療法の併用によりコントロールすることができた最重症患者』にのみ観察された現象であった。その時に対象となった患者群には『頭蓋内圧は高いが中等度脳低温療法を併用しなかった』ために、生存したのは17例中わずか3例で、そのうち長期追跡調査が可能だったのは2例であった。したがって、2群間の比較を行うことができず、delayed neuronal loss の発生に中等度脳低温療法が強く関与しているかどうかは断定できなかった。

今回の研究結果から、頭蓋内圧が従来の治療法で25 mmHg未満にコントロールできる患者(いわゆる頭蓋内圧の低い患者)に中等度脳低温療法を併用しても delayed neuronal loss が認められないことが判明した。このことより、中等度脳低温療法そのものが delayed neuronal loss を引き起こしているのではなく、長時間の頭蓋内圧亢進や他の条件が相互作用を及ぼしあつて delayed neuronal loss が惹起されるものと

考えられた。

今後は、今回長期追跡調査が可能であった3例のさらなる追跡を継続することと、delayed neuronal loss の発生が予想されるような症例(従来の治療法で頭蓋内圧をコントロールできずに中等度脳低温療法を併用したような生存例)の長期経過を綿密に追跡調査していく必要がある。

E. 結論

Delayed neuronal loss の発生には、脳の温度を 34°C に下げたことではなく、高い頭蓋内圧が強く関与していると考えられた。

また、受傷10年後、受傷5年半後、受傷4年半後の3症例で、それぞれ follow up CT を撮影したが、やはり現在も delayed neuronal loss が緩徐に進行していることが確認された。

F. 研究発表

【論文発表】

Shiozaki T, Akai H, Taneda M, Hayakata T, Aoki M, Oda J, Tanaka H, Hiraide A, Shimazu T, and Sugimoto H.: Delayed hemispheric neuronal loss in severely head-injured patients. J Neurotrauma 18: 665-674, 2001.

【研究発表】

なし

G. 知的所有権の取得状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案特許 | なし |
| 3. その他 | なし |

分担研究報告書
(脳科学研究事業「中枢神経損傷後の機能回復機構の解明、治療法の開発」)

『中枢神経再生のメカニズムの研究』

分担研究者 山下俊英

大阪大学大学院医学系研究科未来医療開発専攻ポストゲノム疾患解析学講座
プロセッシング機能形態分野

研究要旨:哺乳類では大人の中枢神経は再生しないといわれてきた。その理由のひとつとして、一旦損傷された軸索が再び伸展しないことが古くから知られているが、このメカニズムについては明らかではない。本研究では、神経回路を再形成することにより、中枢神経損傷による機能障害を修復させる戦略を開発することを目標とし、神経再生阻害因子ならびに軸索誘導因子の単離、機能解析を行った。myelin associated glycoprotein (MAG)は再生阻害因子であるが、我々はニューロトロフィン受容体 p75 が MAG 受容体であることを見出し、MAG による Rho の活性化により神経突起の伸展を抑制していることを示した。さらにこのシグナルを阻害するペプチドを開発した。また軸索誘導に関与する新規の遺伝子 FIR を単離した。その機能解析をおこなった結果、FIR は Rac に対する guanine nucleotide exchange factor であり、海馬の神経細胞の突起伸展を抑制することが明らかになった。一方、幼若ニューロンは阻害因子に対して不応性であることが知られている。この分子レベルでのメカニズムがわかれば、成熟ニューロンにも応用することができると考えられるが、本研究により細胞質に存在する p21(WAF1/Cip1)が Rho kinase を不活性化し、阻害物質による Rho の活性化刺激をその下流で止めるためであることを示した。これら一連の研究により、神経細胞の軸索誘導を司る共通の細胞内シグナルとして small GTPase が重要な役割を果たしていることが明らかになり、軸索再生治療のターゲットとして注目される。

A. 研究の目的

脳や脊髄など中枢神経が、外傷や出血・梗塞により損傷を受け、神経障害が出現すれば通常治癒しない。その理由のひとつとして、大人の中枢神経では十分な神経新生がおこらず、損傷された組織を修復する力が不十分であることがあげられ

る。これに対しては、神経細胞を移植する可能性、また内因性の幹細胞を修復に役立てる可能性があり、急速な研究の進歩により再生医学に明るい光を投げかけている。ところがもうひとつの重要な理由として、中枢神経では細胞が生存していたとしても、軸索が再生しないことがあげられる。脊髄損傷のように軸索が損傷された場合、

細胞自体が生き残るような状態であっても、やはり治癒しない。中枢神経回路の再形成を目指す時、神経軸索の誘導という問題は重要なテーマである。我々はこの問題を解決するために、第一ステップとして、軸索伸展に阻害的に働く因子の同定、またその作用機序を明らかにすることを目的とする。そして第二ステップとして、軸索誘導のメカニズムを明らかにし、一旦失われたシナプス形成を回復させるための方法の開発を目的とする。本研究のゴールは中枢神経損傷による機能障害を、神経回路を再形成することにより修復させるストラテジーを開発することである。

B. 研究方法と結果

1. MAG 受容体の同定

MAG の受容体は binding partner と機能的なシグナルを伝達する因子からなる。この機能的なシグナルを伝達する因子がニューロトロフィン受容体 p75 であることを見出した。MAG は大人の DRG neuron あるいは生後の小脳顆粒細胞の突起伸展を阻害するが、この効果は P75 ノックアウトマウスから得た神経細胞では見られなかった。また p75 を発現する細胞では MAG は Rho を活性化したが、p75 を発現しない細胞では Rho の活性化は見られなかった。これらより MAG は p75 を介して、Rho を活性化することにより、神経突起の伸展を阻害していること示された。また MAG binding と p75 の細胞膜表面での局在が一致しており、binding partner と p75 が連関していることが示唆された。さらにこの binding partner がガングリオシド GT1b であることを見出し、GT1b と p75 が受容体複合として機能していることを証明した。

MAG の効果を阻害する方法として、p75 の細胞内ドメインに付着するペプチドを開発し、これが Rho の p75 への付着を防ぐことによりサイレンサーとして働いていることを

見出した。このペプチドは中枢神経再生を促進する薬剤として使える可能性がある。

2. ニューロトロフィン受容体 p75 のシグナル伝達

突起伸展を促進するニューロトロフィンと逆の作用を持つ MAG が同一の受容体 p75 に結合するにもかかわらず、作用発現は逆であるという現象は、p75 の幅広いシグナルを反映している。この現象を解明するために、p75 のシグナル伝達の質に関する決定機構の解明を試みた。その結果ニューロトロフィンで活性化された p75 は cAMP-PKA を活性化し、更に自身をリン酸化することによって、シグナル伝達の場合であるラフトに移動し、シグナル伝達の質を変えていることを見出した。

3. 軸索伸展阻害に関与する新規因子 FIR

末梢神経の再生時、シュワン細胞で発現上昇してくる新規の遺伝子を単離した。これは新規の Rac に特異的な Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) であり、ERM ドメインを有していた。受容体からのシグナルによりその機能が制御されていることが示唆された。FIR と名付けたこの Rac GEF を胎生期の海馬ニューロンに発現させると、神経軸索の伸長が抑制され、神経軸索の誘導因子として機能していることを示した。

4. 軸索伸展阻害物質に対する耐性機構

幼弱神経細胞の軸索は容易に再生し、軸索伸展阻害因子に不応性である。このメカニズムの解明を試みた。幼弱神経細胞に特異的に発現している遺伝子の探索を行い、cyclin dependent kinase inhibitor である p21(Cipl/WAF1)を捉えた。この因子は通常は核に発現し細胞分化に関わっているが、分化後は細胞質に移動し、Rho

kinaseを直接不活性化し突起伸展作用をもたらすことが明らかになった。Rhoの下流でその経路を阻害することにより、Rhoを活性化する刺激に対して不応性になることがわかった。

C. 考察及び結論

中枢神経再生が可能でない原因としては次の3つの要因が考えられている。

- 1) ミエリンに再生阻害因子が存在している
- 2) 中枢神経は再生力が弱い
- 3) 新たな神経細胞が生まれてこない

これまで我々は要因1、2についてのメカニズム解明に焦点を絞って、研究を進めてきた。1についての研究成果により、再生阻害因子の作用をブロックする方法の開発に繋がっていくものと期待される。2については再生促進因子の探索をさらに行っており、現在までに顔面神経損傷モデルを用い、いくつかの有望な因子を単離し機能解析をしているところである。

上に述べたことは神経の軸索切断による機能喪失をいかに回復させるかに焦点を当てているが、損傷が大きく細胞死に至った場合には適用できない。それは中枢神経細胞は一般に新生しないためである。しかし最近成人の脳にも神経幹細胞が存在していることが示され、問題はこの幹細胞が必要な時に障害を修復するために働かないことであると考えられる。幹細胞が神経に分化し、適当な場所に移動し、軸索を伸ばしシナプスを形成するまでの、いずれのステップが成人の脳において抑制されているのかを現在調べている。

D. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tanabe, K., Tachibana, T., Yamashita, T., Che, Y.H., Yoneda, Y., Ochi, T.,

Tohyama, M., Yoshikawa, H., and Kiyama, H.: The small GTP-binding protein TC10 promotes nerve elongation in neuronal cells, and its expression is induced during nerve regeneration in rats. *J. Neurosci.* 20: 4138-4144, 2000

- 2) Che, Y.H., Tamatani, M., Yamashita, T., Gomi, F., Ogawa, S., and Tohyama, M.: Changes in mRNA of protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase following facial nerve transection. *J. Chem. Neuroanat.* 17 (4): 199-206, 2000
- 3) Taniguchi, M., Yamashita, T., Kumura, E., Tamatani, M., Kobayashi, A., Yokawa, T., Maruno, M., Kato, A., Ohnishi, T., Kohmura, E., Tohyama, M., and Yoshimine, T.: Induction of aquaporin-4 water channel mRNA after focal cerebral ischemia in rat. *Mol. Brain Res.* 78: 131-137, 2000
- 4) Sakata, K., Yamashita, T., Maeda, M., Moriyama, Y., Shimada, S. and Tohyama, M.: Cloning of a lymphatic peptide / histidine transporter. *Biochem. J.* 356: 53-60, 2001
- 5) Neumann, H., Schweigreiter, R., Yamashita, T., Rosenkrantz, K., Wekerle, H., and Barde, Y.A.: Tumor necrosis factor inhibits neurite outgrowth and branching of hippocampal neurons by a Rho dependent mechanism. *J. Neurosci.* 22: 854-862, 2002
- 6) Yamaguchi, A., Taniguchi, M., Hori, O., Ogawa, S., Tojo, N., Matsuoka, N., Miyake, S., Kasai, K., Sugimoto, H., Tamatani, M., Yamashita, T. and Tohyama, M.: Peg3/Pw1 is involved in p53-mediated cell death pathway in brain ischemia/hypoxia. *J. Biol. Chem.* 277: 623-629, 2002
- 7) Miyake, S., Yamashita, T., Taniguchi, M., Tamatani, M., Sato, K., Kawai, Y.,

Senba, E., Mitsuda, N., Hori, O., Yamaguchi, A. and Tohyama, M.: Expression of mitochondrial tricarboxylate carrier TCC mRNA and protein in the rat brain. Mol. Brain Res. in press

- 8) Che, Y.H., Yamashita, T., Higuchi, H., Yoshikawa, H., and Tohyama, M.: Changes in mRNA for choline transporter-like protein following facial nerve transection. Mol. Brain Res. in press

2. 学会発表

- 1) Yamashita, T. : Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth. Ascona Meeting , Ascona, Switzerland, 2000
- 2) 山下俊英、遠山正彌: 神経の発生と再生、新適塾千里神経懇話会、大阪、2001
- 3) 山下俊英、遠山正彌: ニューロトロフィン受容体のシグナル伝達、滋賀医科大学シンポジウム、滋賀、2001

E. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

分担研究報告書

(脳科学研究事業「中枢神経損傷後の機能回復機構の解明、治療法の開発」)

頭部外傷後の内在性神経幹細胞による神経再生

分担研究者 鎌形 安行 大阪大学大学院医学系研究科生体機能調節医学講座 助手
研究協力者 塩崎 忠彦 大阪大学大学院医学系研究科生体機能調節医学講座 助手
速形 俊昭 大阪大学大学院医学系研究科生体機能調節医学講座 助手
吉矢 和久 大阪大学大学院医学系研究科生体機能調節医学講座博士課程

研究要旨：中枢神経損傷後の神経再生の方法として、近年、損傷した中枢神経への幹細胞移植（ES細胞、神経幹細胞、骨髄幹細胞）が盛んに行われている。しかし、移植した幹細胞は損傷中枢神経において、ニューロンへ分化するよりもグリアへ分化する傾向にあり、パーキンソン病モデル、脊髄損傷モデルなどの一部を除いては、有効な神経再生の方法とはなっていない。本研究の目的は、①外傷後の神経幹細胞を取り巻く環境を把握すること、②内在性神経幹細胞を用いた神経再生への道を検討し、有効な神経再生への方法を模索することである。外傷モデル動物としては、cortical impactorを用いた機械的頭部外傷モデルラットを使用した。①非外傷ラットの中枢神経においては内在性の神経幹細胞からのニューロン新生が行われているが、アデノウイルスで側脳室周囲の神経幹細胞をラベルした外傷モデルラットにおいては神経幹細胞の増殖は認められるもののニューロン新生が抑制される傾向にあった。これは損傷後の中枢神経において神経幹細胞からニューロンへの分化を抑制する機構が存在を示唆している。そこで、外傷後の側脳室周囲の遺伝子発現をcDNAマイクロアレイ法により解析した。外傷後、側脳室周囲に99遺伝子の有為な発現上昇、207遺伝子の有為な発現低下を認めた。②内在性神経幹細胞へ neuronal 遺伝子を導入し、神経再生を試みている。

A. 研究目的

再生医学において幹細胞の応用が盛んに行われている。神経の分野では、ES細胞・骨髄幹細胞から神経細胞の分化が可能となった。また、ヒトを含めた哺乳類の成体にはニューロン・グリアに分化することのできる多分化能をもった神経幹細胞の存在することがわかっている。これらの幹細胞を用いた動物実験が徐々に行われつつあり、中枢神経損傷モデル動物において、主に

幹細胞移植による神経再生の研究が行われている。

移植した幹細胞は、ドナーに生着するものの、neurogenesisよりもむしろ gliogenesis を起こす傾向にあり、現時点では有効な神経再生方法とはなっていない。そこで我々は、成体に内在する神経幹細胞から neurogenesis を促すことを考えた。哺乳類成体内に存在する神経幹細胞はある領域の neurogenesis に寄与していることが近年

報告されている。しかし、成体内神経幹細胞の本当の役割はまだ分かっていない。また、損傷中枢神経の再生は、特定の領域においては neurogenesis が起こるといふ報告もあるが、損傷部位においては gliogenesis による再生が中心である。そこで我々は、neurogenesis を起こす潜在能力を持つ内在性神経幹細胞に、neuronal 遺伝子を強制発現することによりニューロンへ分化させ、neurogenesis を起こせるのではと考えた。その足がかりとして、まず、損傷中枢神経において neurogenesis を抑制し gliogenesis を促すメカニズムを解明するため、損傷脳における神経幹細胞の動向と幹細胞の存在する側脳室周囲の遺伝子発現を解析した。

研究方法と結果

頭部外傷モデルとしては cortical impactor を用いた成体ラットの機械的脳挫傷モデルを使用した。まず神経幹細胞の動向を BrdU、GFP ラベルしたアデノウイルスを用いて解析した。

① 外傷モデル(側脳室周囲・海馬歯状回)における BrdU 陽性細胞 (Fig.1)

頭部外傷モデルラットに BrdU を腹腔内投与し、損傷後の増殖細胞を経時的に解析した。両側側脳室周囲、外傷側海馬歯状回に損傷後 4 日目をピークとする細胞増殖が認められた。海馬における細胞増殖は片側性であり、外傷による直接の細胞増殖が考えられたが、側脳室周囲の細胞増殖は、何らかの間接的刺激による神経幹細胞の増殖が示唆された。

② 側脳室周囲細胞の外傷後の動向 (Fig.2)

側脳室に GFP ラベルしたアデノウイルスを注入し、側脳室周囲の細胞をラベルすることにより外傷後のその動向を解析した。コントロールラットにおいては GFP 陽性細胞が外傷2週間後、ニューロンとなり大脳皮質

に移動しているのが観察された。外傷ラットでは、外傷 2 週間後まで GFP 陽性細胞の移動は認められなかった。外傷後の急性～亜急性期には、側脳室周囲の神経幹細胞からの neurogenesis は抑制され、gliogenesis にも寄与していないことが示唆された。

次に、側脳室周囲において外傷後急性～亜急性期に神経幹細胞の増殖、neurogenesis の抑制を制御するメカニズムを解明するため、cDNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現を解析した。

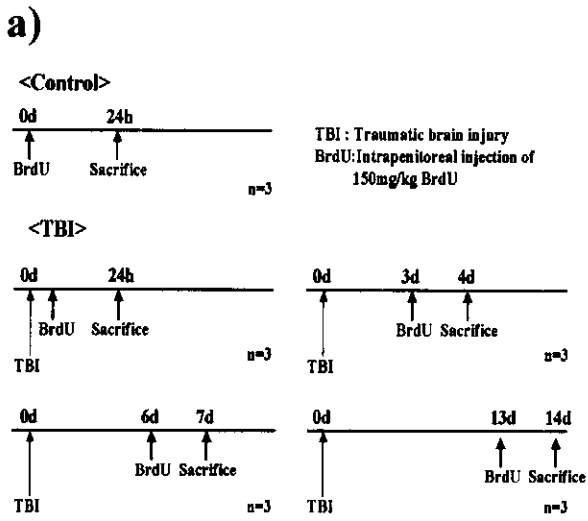
③ 側脳室周囲の外傷後の遺伝子発現 (Fig.3, Fig.4)

細胞増殖がピークであった外傷 4 日目の外傷側側脳室周囲組織から mRNA を抽出し、cDNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現を解析した。外傷後、側脳室周囲に 99 遺伝子の有為な発現上昇、207 遺伝子の有為な発現低下を認めた。発現上昇のみられた幾つかの遺伝子について現在解析中である。

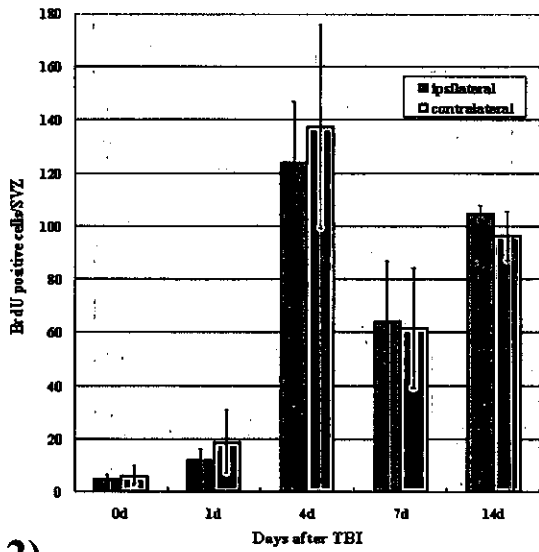
考察

頭部外傷後の中枢神経において損傷部位に反応性アストロサイトが増殖し、やがてグリア瘢痕が形成されることは古くから知られている。また、近年の知見で、損傷部位へ移植した種々の幹細胞がニューロンよりもアストロサイトへ分化する傾向にあることも分かっている。しかしながら、このような外傷後の gliogenesis のメカニズムはほとんど解明されていない。外傷後の神経再生を目指すためには、外傷後の gliosis のメカニズムを解明し、更に neurogenesis、axonal regeneration を促す必要がある。そのためにも、外傷後の neurogenesis を起こす潜在能力のある神経幹細胞の動向を把握し、幹細胞を制御しているメカニズムを解明することは非常に重要である。

Figure 1



b-1)



b-2)

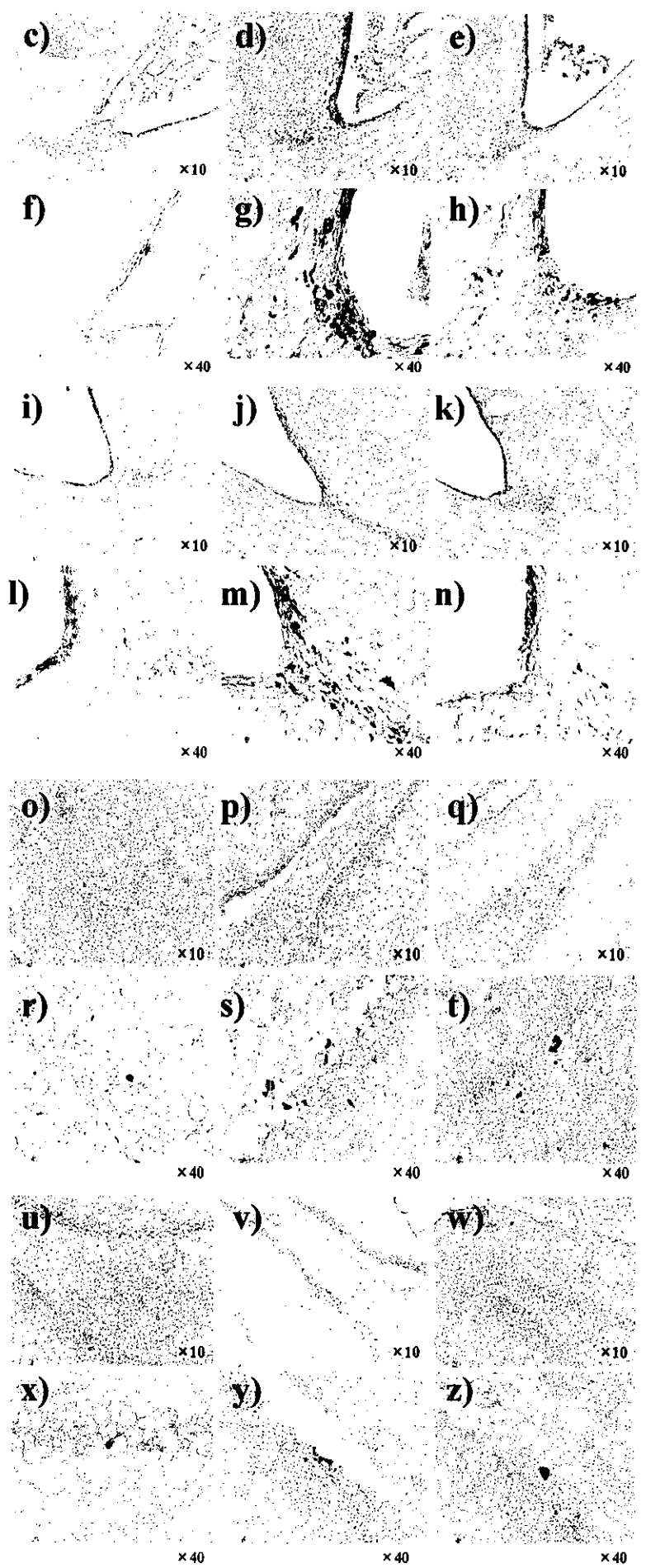
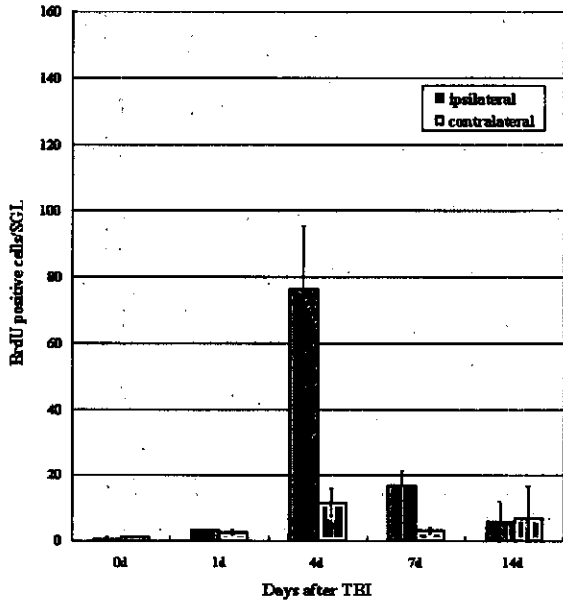


Fig.1 Cell proliferation of SVZ and SGL

a) Time courses of TBI, BrdU administration and sacrifice. b-1) Cell proliferation in subventricular zone. b-2) Cell proliferation in subgranular layer. c-z) Immunohistochemistry by anti-BrdU antibody and DAB. c-h) ipsilateral SVZ. i-n) contralateral SVZ. o-t) ipsilateral SGL. u-z) contralateral SGL. c, f, l, o, r, u, x) 1 day after TBI. d, g, j, m, p, s, v, y) 4 days after TBI. e, h, k, n, q, t, w, z) 7 days after TBI.

Figure 2

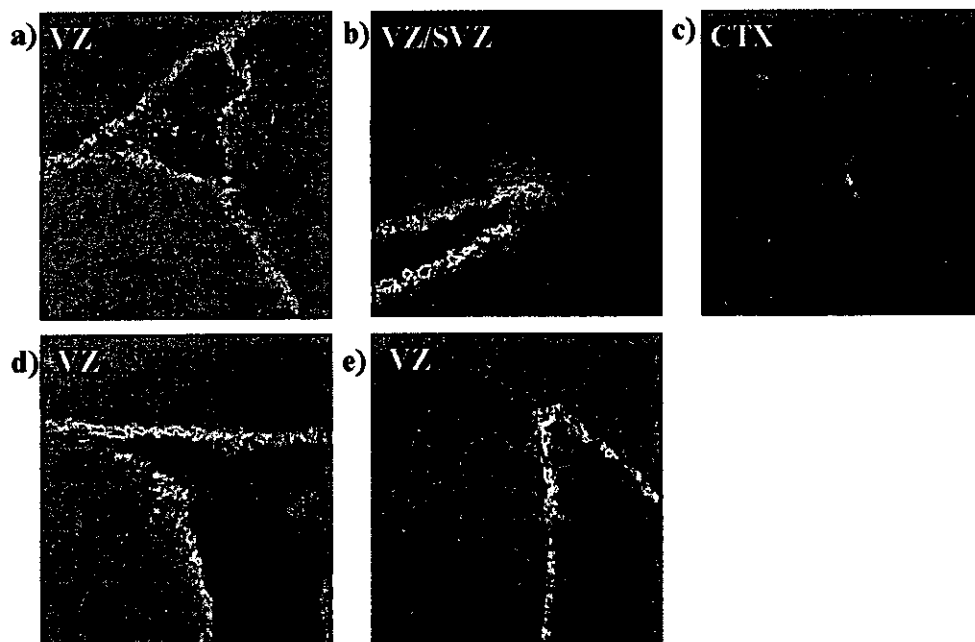


Fig.2 Observation of cells in VZ/SVZ after TBI.

After injecting adenovirus-GFP to ventricular zone of sham-operated and injured rats, we observed GFP-positive cells 1,4,7,14 days after TBI. a) VZ of sham-operated rats 1 day after virus injection. GFP-positive cells existed only in VZ. b) VZ/SVZ of sham-operated rats 7 days after virus injection. GFP-positive cells migrated into SVZ and c) cortex. d) GFP-positive cells existed only in VZ 1 day after TBI and injection of adenovirus. E) 14 days after TBI and virus injection, GFP-positive cells also existed only in VZ and we could not find any migrating cells in cortex.

Figure 3

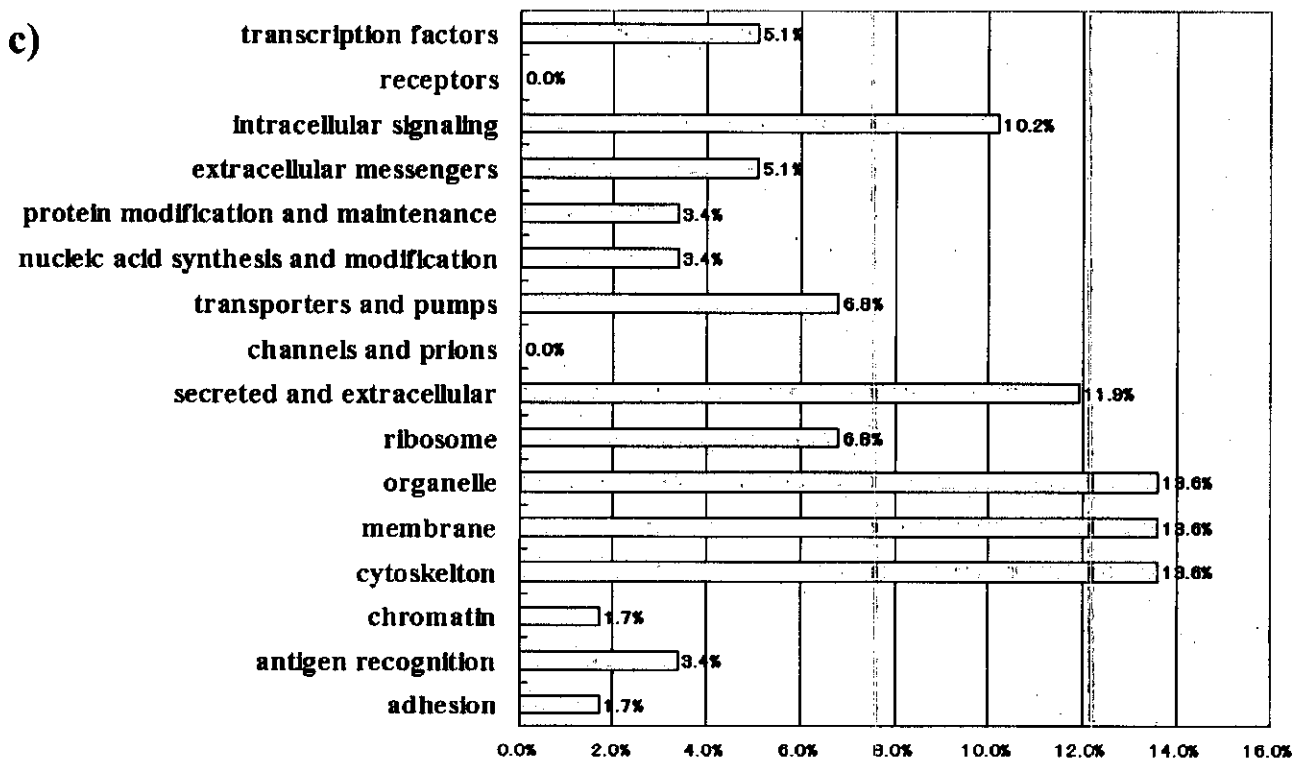
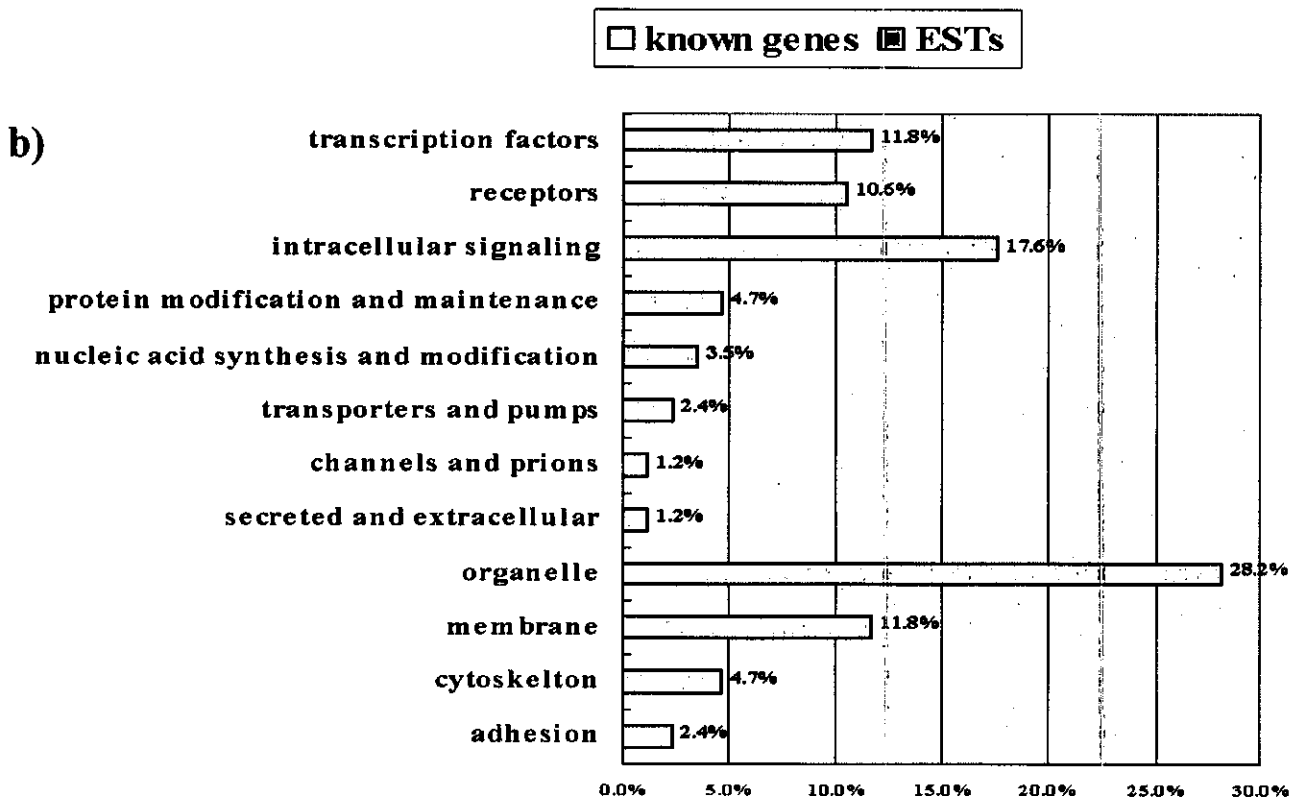
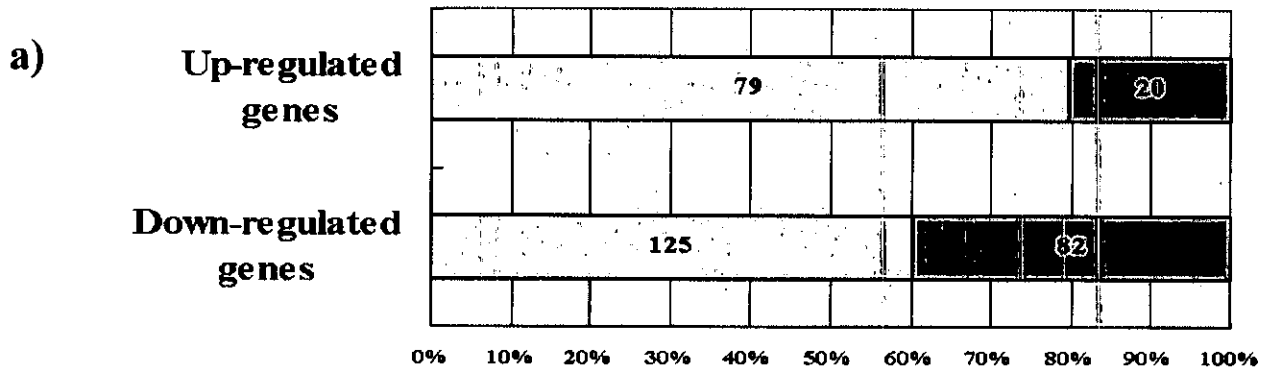


Fig.3 Gene expression in periventricular zone after TBI.

We analysed gene expression in periventricular zone after TBI by using cDNA microarray. a) 99 genes were up-regulated and 207 genes were down-regulated in periventricular zone 4 days after TBI. b,c) Functional hierarchy of b) down-regulated and c) up-regulated genes.

Figure 4

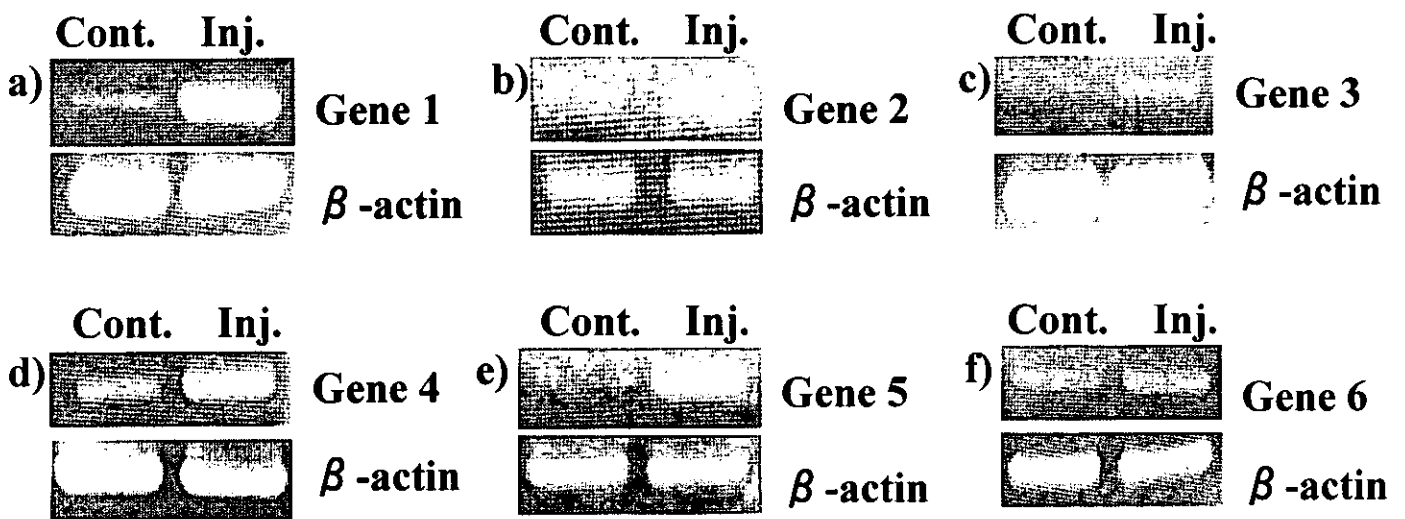


Fig.4 RT-PCR of 6 up-regulated genes.

We performed RT-PCR of 6 up-regulated genes. mRNA was isolated from periventricular zone of sham-operated and injured rats 4 days after sham-operation and TBI. According to analysis of RT-PCR, these genes were also up-regulated in periventricular zone after TBI.