

る空間順序記憶運動課題を用い(Hikosaka, et al., 1995), 図5のような測定条件で行った。

### C. 結果

図6は5秒間の移動平均処理を行ったデータをトポグラフィカルイメージとして表現した一例である。課題の遂行をはじめて約5秒経過して前頭極部の血流が上昇しはじめ, 10-15秒後に多くの場所でピークとなる傾向がみられた。

一般に, 光トポグラフィーでは図1に示したような幾つかの仮定のもとに Beer-Lambert 法則を適応することが可能であることが分かっている。また, 脳機能におけるニューロン活動との対応づけについては図2に示すような fMRI によるシグナル検出性との関連が明らかになりつつある。

こうした背景から, 我々は酸素化ヘモグロビンの動態を局所ニューロン活動の指標とした。

図7は2X5タスクを行ったときのパフォーマンスに関するスコアの一例を示す。学習による効果はタスクの成功率を上昇させ, 反応時間を減少させる。パフォーマンスに関するスコアより学習段階を初期, 中期, 完成期の3つに分けた。完成期においては学習された運動は skill(技)としてほぼ自動的に行えるまでに上達していると云える。

前頭葉の各皮質領域における活動の推移を3つの学習段階に沿って検討した(図8)。左右の背側前頭前野ではサルの実験結果にほぼ一致する形で学習の進行に従って活動が低下する傾向を示した。前補足運動野では fMRI による実験結果に一致する形で中期の活動が増加する傾向を示した。今回我々の実験で明らかになったのは前頭極とよばれる領域の活動であった。この領域は fMRI においては測定ノイズをひろいやすいため精度の高いデータが得られにくい。また前頭極の機能は脳の最高次中枢であるともいわれ, その働きについては未

だ明らかにされていない。我々の実験結果は, 前頭極の働きが複雑な空間順序記憶運動課題の実行に重要な役割を担っていることを示唆した。

### D. 考察

今後は健常人による基礎データをもとに, 遷延性の意識障害に罹患した患者の脳機能予後を評価する方法の確立をめざす。複雑な機能を有する中枢神経系の機能評価は決して一元的なものではあり得ないため, さまざまな手法による多角的な視点からの評価が必要であると思われる。

### E. 結果発表

#### Journals Articles

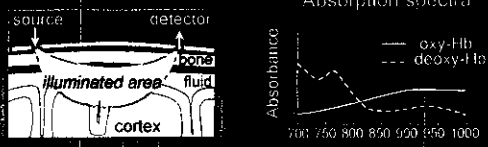
1. Kitamura, Y. T., Kubota, K., Seike, Y., Imabayashi, M., Miyai, I., Suzuki, T. and Yanagida, T. "Motor-evoked potentials following transcranial magnetic stimulation during recovery after a stroke." *Recent Advances in Human Brain Mapping 1232C*: 907-914 (2002)
2. Okuzaki, T., Hirano, S., Kobashi, S., Hata, Y. and Takahashi, Y. "A rough set based clustering method by knowledge combination." *IEICE Trans. on Inf. and Syst.* (in press) (2002)
3. Nagamune, K., Taniguchi, K., Kobashi, S., and Hata, Y. "Ultrasonic nondestructive evaluation for embedded objects in concrete aided by fuzzy logic." *IEICE Trans. on Inf. and Syst.* (in press) (2002)

#### Refereed Proceedings

1. Zui, T., Kobashi, S., Kitamura, Y. T., Hata, Y. and Yanagida, T. "Data driven analysis of hemodynamic response delay in event-related fMRI using wavelet transform." *The IEEE Workshop on*

1

**Near-Infrared Spectroscopy**



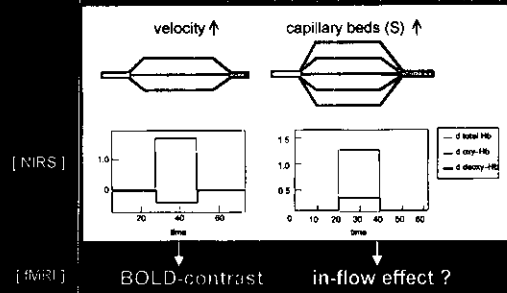
Physical assumption: constant optical path length  
**Beer-Lambert law (modified)**  
 ↓  
 concentration changes of oxy- and deoxy-Hb

Physiological assumption: negligibly small changes in the extracerebral hemodynamics

2

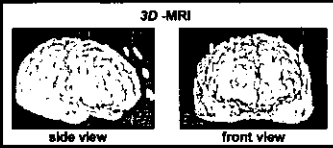
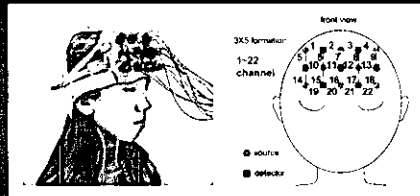
**NIRS detects hemodynamic changes**

- 1) mainly from the capillaries on the activated cortical area.
- 2) typically consisting of an increase in [oxy-Hb].
- 3) a decrease in [deoxy-Hb] corresponding to the BOLD-contrast is explained by the increase of velocity as well as CBF.



3

**The arrangement for optical probes and the positioning onto the rendering surface of 3D-reconstructed MRI**

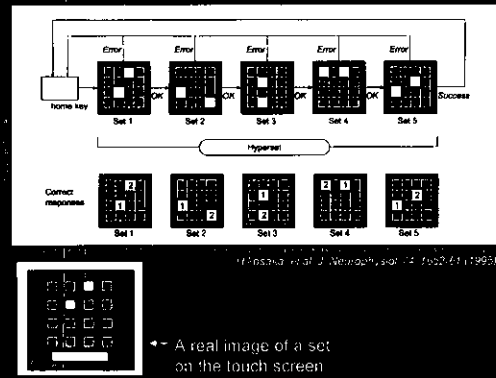


Perpendicular distance from probes to brain surface =  $27.0 \pm 2.7$  (mm)

[NIRS] Sakuma et al. Opt. Eng. 47(10) 104001 (2008)

4

**Behavioral task for procedural learning**

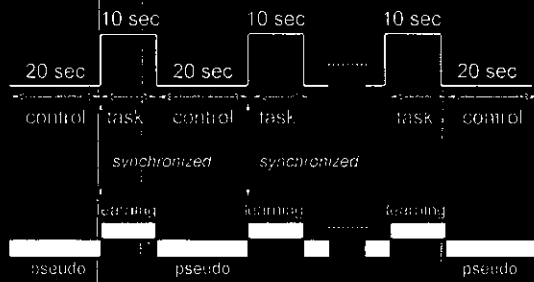


[NIRS] Sakuma et al. J. Neurosci. 29(42):13520-31 (2009)

5

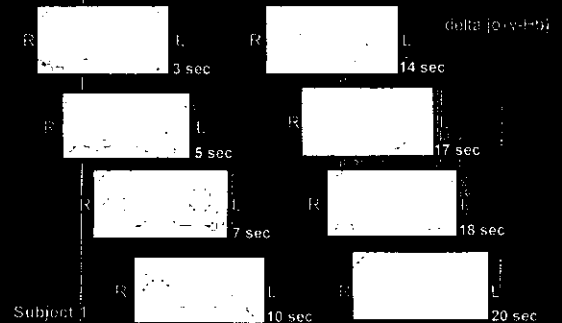
**Experimental protocol**

6 task/control alternating epochs



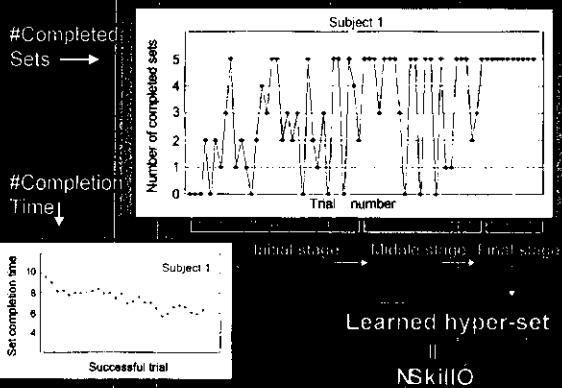
6

**Topographical images of functional activation in the prefrontal cortex during a procedural learning task.**



7

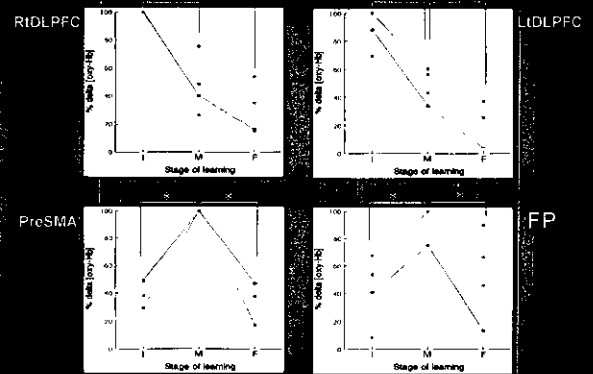
**Performance parameters**



Learned hyper-set  
 ||  
 NSkillO

8

**Results 2**



[NIRS] Sakuma et al. J. Neurosci. 29(42):13520-31 (2009)

- Mathematical Methods in Biomedical Image Analysis: 113-120, Hawaii, Dec. (2001)
2. Kitamura, Y. T., Kobashi, S., Hata, Y., Takeda, M. and Yanagida, T. "Dissociation in human prefrontal cortex on a procedural learning-related activation: A study by near-infrared optical topography." The annual meeting of the Society for Neuroscience (SFN), Orland, Nov. (2002)
  3. Kobashi, S., Matsumoto, T., Hata, Y., Kitamura, Y. T., and Yanagida, T. "Fuzzy laterality index for determining the language dominance using near-infrared spectroscopy." The 4<sup>th</sup> International Forum on Multimedia and Image Processing (IFMIP), Jun. (2002)
  4. Kobashi, S., Zui, T., Hata, Y., Kitamura, Y. T., and Yanagida, T. "Wavelet based analysis of the hemodynamic response delay in event-related functional MRI." The 8<sup>th</sup> annual meeting of the Organization for Human Brain Mapping (HBM), Sendai, Jun. (2002)
  5. Kobashi, S., Matsumoto, T., Hata, Y., Kitamura, Y. T., and Yanagida, T., "Fuzzy logic approach to investigating the language dominance using near-infrared spectroscopy." The 8<sup>th</sup> annual meeting of the Organization for Human Brain Mapping (HBM), Sendai, Jun. (2002)
  6. Nagamune, K., Kobashi, S., Kondo, K., Hata, Y., Kitamura, Y. T., and Yanagida, T. "Challenge to the development of a transcranial sonography system." The Knowledge-based Intelligent Information Engineering Systems & Allied Technologies, 604-608, Sep. (2002)
  7. Shimizu, T., Nagamune, K., Kobashi S., Kondo, K., Hata, Y., Kitamura, Y. T., and Yanagida, T. "An automated ultrasound discrimination system of tissue under an obstacle by fuzzy reasoning." The 1<sup>st</sup> international conference on Soft Computing and Intelligent Systems, Oct. (2002)
  8. Hata, Y., Shimizu, T., Kobashi, S., Kondo, K., Kitamura, Y. T., and Yanagida, T. "A fuzzy logic approach to transcranial sonography system with placement free." The 1<sup>st</sup> international conference on Information Technology & Applications (ICITA2002), Nov. (2002)
- F. 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

正木 慶大

Doronbekov Talant K

荻野 淳

三好 紀子

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(受傷後約1週間~1ヶ月)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った。

今年度までに検討した患者は、頭部外傷 31 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。

頭部外傷例 31 例のうち、14 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、現時点では、左半球前半部の損傷が、回復しがたい言語性記憶障害と関連している可能性があることが示唆された。

#### 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34例(うち外傷例31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14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、31例中24例であった。また、最も多い脳損傷部位は左側頭葉であり、31例中15例

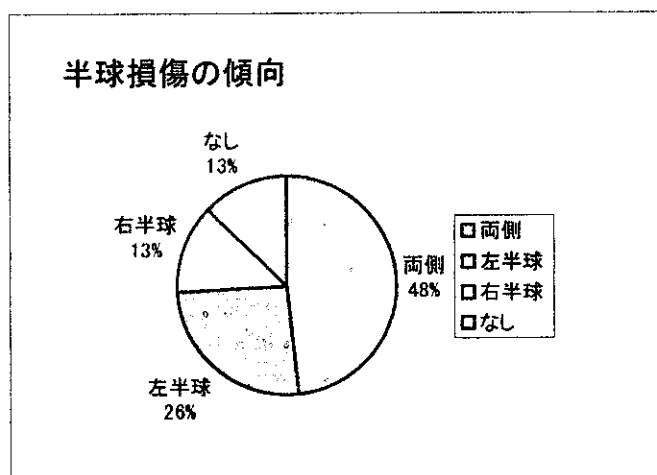
であった。

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、31例の患者のうち22例の患者で言語性記憶力障害を認め、うち13例の患者で左側頭葉の損傷を認めた。15例の患者で視覚性記憶力障害を認め、うち7例で右前頭葉ないし側頭葉の損傷を認めた。14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。9例の患者で注意障害を認め、うち5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。

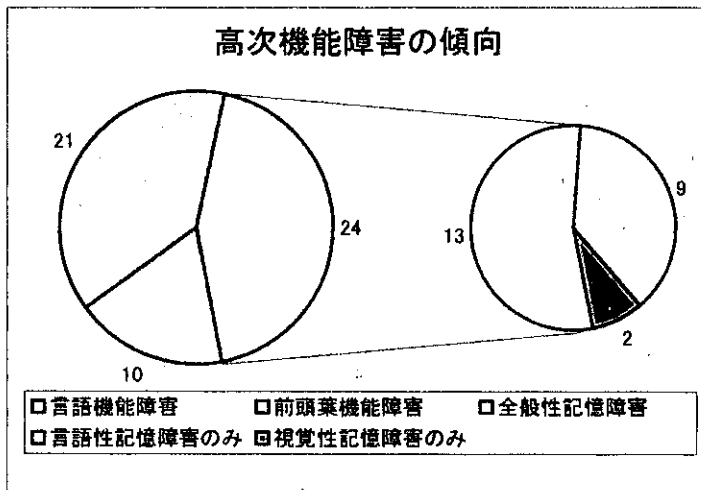
結果の詳細を以下に述べる。

#### 1. 初期評価の結果

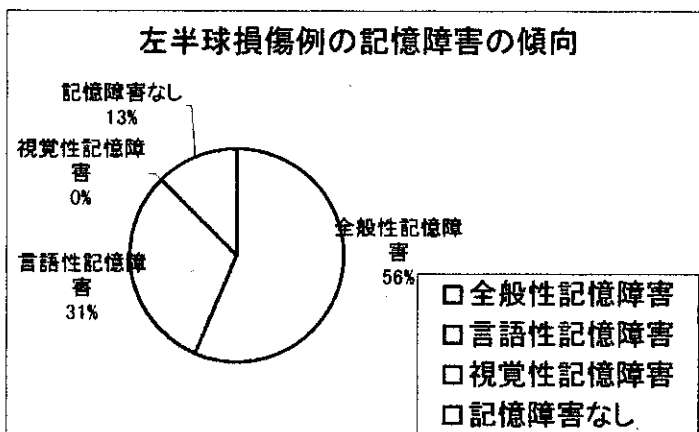
(1)まず、MRIによって判定した大脳半球損傷の傾向は、下グラフのごとく、半数が両側損傷であり、一側損傷では左半球損傷例が多かった。



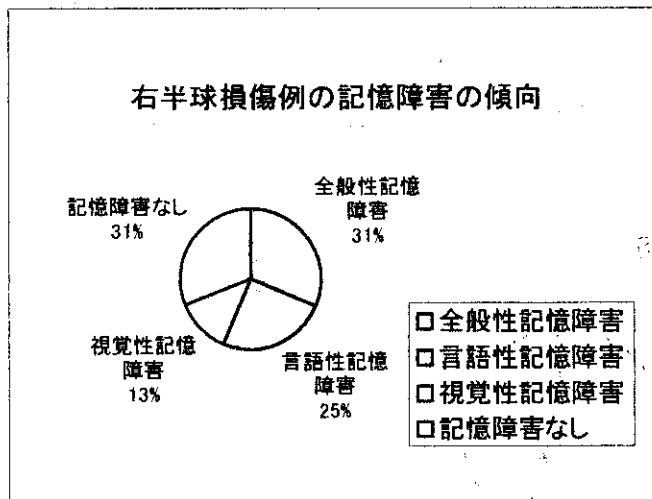
(2) 高次機能障害の全体的傾向に関しては、下グラフのごとく、記憶障害、前頭葉機能障害を呈する例が多かった。また、記憶障害に注目してみると全般性記憶障害、言語性記憶障害を呈する例が多く、視覚性記憶障害のみを呈する例は少なかった。



(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(8例)では、7例で言語性記憶障害を認め(うち4例は全般性記憶障害)、4例で言語機能障害を認めた。

(6) 右半球に局限した損傷例では(5例)では、3例で高次脳機能障害を認めず、1例で視覚性記憶障害、言語機能障害を認め、1例で注意集中障害を認めた。(7) 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、左側頭葉や両側前頭葉損傷が多く、言語性記憶障害のみを呈する例では、両側側頭葉損傷が多く、また視覚性記憶障害のみを呈する例では、全例右前頭葉損傷を認めた。

(8) 蘇生後脳症例では3例とも脳損傷を認めず、高次脳機能障害では、主に言語性記憶障害や語想起障害が認められた。

## 2. 追跡調査の結果

31例の脳外傷患者のうち、14例において半年後から二年後までの追跡調査を行なった。

(1) 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) 残り11例のうち10例で記憶障害を認め、その中でも初期評価時に全般性記憶障害を認めた4例のうち、受傷半年後に1例では言語性記憶の改善はみられなかったものの、視覚性記憶が正常域に回復した(B群)。1例は記憶障害の改善はみられず(C

群)、2例は全般性記憶の改善がみられた(D群)。

全般性記憶障害 4例 1例は視覚性記憶の改善 言語性記憶は改善せず(B)  
1例は記憶障害改善せず(C)  
2例は全般性記憶の改善(D)

(3)また、初期評価時に言語性記憶障害のみを認めた5例のうち、3例は受傷半年後に正常域に回復し(E群)、2例は改善がみられなかった(F群)。

言語性記憶障害5例 3例は正常域に改善(E)  
2例は改善みられず(F)

(4)初期評価時に視覚性記憶障害のみを認めた1例は、受傷半年後に正常域に回復した(H群)

視覚性記憶障害 1例 1例は正常域に改善(H)

以上の患者群A~Hの局所脳損傷を比べてみると、

A群3例は3例とも局所脳損傷を認めず。

B群1例は、脳梁膨大部のび慢性軸索損傷を認めた。

C群1例では、左前頭部硬膜外血腫と頭頂葉の挫傷巣を認めた。

D群2例は、2例とも両側前頭葉の損傷を認め、うち1例では、左側頭葉と脳梁膨大部にも損傷を認めた。

E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、左後頭葉挫傷巣を認めた1例であった。

F群2例では、1例で左前頭葉から側頭葉に及ぶ損傷と右側頭葉の損傷を認め、1例では両側側頭葉と左前頭葉の挫傷巣を認めた。H群1例では、右前頭葉、左後頭葉挫傷巣と左前頭葉硬膜下血腫を認めた。

蘇生後脳症例の追跡調査1例では、高次脳機能の改善は認められなかった。

#### D. 考察

脳外傷を受けて一命をとりとめながら、障害の残る人々の数は、近年著しい増加をたどっているが、これは救急医療が

より早く効果的に行われるようになったこと、専門病院に早く安全に移送されることになったこと、救急医学的管理が進歩したことによる。脳外傷はあらゆる年齢層



で起こるが、特に子供や青年では長期にわたる障害を及ぼす最大の原因となっている。その中でも、身体障害以上に問題となるのが、いわゆる高次脳機能障害である。

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、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昨年までと同様の所見が得られた。初期評価では、昨年、一昨年に引き続き両側半球損傷を含め、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も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ほぼ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高次脳機能障害を認めない例が多かった。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。

追跡調査についての過去の報告からは、頭部外傷における言語性記憶障害回復の困難な要因として、左半球前半球の挫傷や側頭葉内側面の萎縮、慢性脳損傷が挙げられており、一方、回復良好な要因としては、左側頭葉後半部皮質の病巣、前頭葉限局の脳挫傷が挙げられている。今回の我々の調査で、半年後に記憶障害の改善しなかった C、F 群ではいずれも、左前頭葉の損傷が見られ、同部位が回復しがたい記憶障害に関連していることが示唆された。一方、半年後に記憶障害の回復が見られた D、E、H 群では、明らかな受傷部位との関連は見出せなかった。

脳外傷における認知機能障害に対する治療的アプローチは、患者に自らの障害の認識を促し、その障害に対する代償方法を見つけ、代償的行動を獲得させることであるとされているが、実際にはかなり困難といえる。これは、脳外傷において、患者本人の認知障害に関する自覚が低下している場合が多いためである。過去の研究からも同様の知見が得られており、今回の我々の印象とも一致する。

## E. 結論

今回の我々の調査では、高次脳機能障害を呈する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

憶障害が多いことが示された。また、前頭葉を含む左半球前半部の損傷が、回復しがたい言語性記憶障害と関連している可能性があることが示唆された。

今後更なる症例の蓄積による受傷部位と高次脳機能障害の傾向についての確認が必要であり、追跡調査においても同様に症例の蓄積と、認知機能障害に対する病識との関連などを含めた明確な回復過程の調査が必要である。

#### F. 研究発表

1. 論文発表      なし

#### 2. 学会発表

第21回日本痴呆学会『高次機能障害を主症状とする頭部外傷例の病像解析』  
大阪大学大学院精神医学講座 神経心理研究室八田直己、正木慶大、荻野淳、三好紀子、Doronbekov Talant K、徳永博正、数井裕光、池尻義隆、西川 隆、武田雅俊

#### 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」)

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 であることを見い出した。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が関連していることが示唆された。さらにこのbinding partnerがグングリオシド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い出した。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

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い出した。

### 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(Cip1/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) Yamashita, T., Higuchi, H., and Tohyama, M. (2002) The p75 receptor transduces the signal from myelin-associated glycoprotein to Rho.

J. Cell Biol. 157, 565-570.

- 2) Tanaka, H., Yamashita, T., Asada, M., Mizutani, S., Yoshikawa, H. and Tohyama, M. (2002) Cytoplasmic p21<sup>Cip1/WAF1</sup> regulates neurite remodeling by inhibiting Rho-kinase activity. J. Cell Biol. 158, 321-329.
- 3) Kubo, T., Yamashita, T., Yamaguchi, A., Sumimoto, H., Hosokawa, K. and Tohyama, M. (2002) A novel FERM domain including guanine nucleotide exchange factor is involved in Rac signaling and regulates neurite remodeling. J. Neurosci. 22, 8504-8513.
- 4) Neumann, H., Schweigreiter, R., Yamashita, T., Rosenkrantz, K., Wekerle, H. and Barde, Y.A. (2002) Tumor necrosis factor inhibits neurite outgrowth and branching of hippocampal neurons by a Rho dependent mechanism. J. Neurosci. 22, 854-862.
- 5) 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. (2002) Peg3/Pw1 is involved in p53-mediated cell death pathway in brain ischemia/hypoxia. J. Biol. Chem. 277, 623-629.
- 6) Kubo, T., Yamashita, T., Yamaguchi, A., Hosokawa, K. and Tohyama, M. (2002) Analysis of genes induced in peripheral nerve after axotomy using cDNA microarrays. J. Neurochem. 82, 1129-1136.
- 7) Miyake, S., Yamashita, T., Taniguchi, M., Tamatani, M., Sato, K. and Tohyama, M. (2002) Identification and characterization of a novel mitochondrial tricarboxylate carrier. Biochem. Biophys. Res. Commun. 295, 463-468.
- 8) Miyake, S., Yamashita, T., Taniguchi,

M., Tamatani, M., Sato, K., Kawai, Y., Senba, E., Mitsuda, N., Hori, O., Yamaguchi, A. and Tohyama, M. (2002) Expression of mitochondrial tricarboxylate carrier TCC mRNA and protein in the rat brain. *Mol. Brain Res.* 100, 67-73.

- 9) Che, Y.H., Yamashita, T., Higuchi, H. and Tohyama, M. (2002) Changes in mRNA for choline transporter-like protein following facial nerve transection. *Mol. Brain Res.* 101, 122-125.
- 10) Che, Y.H., Yamashita, T. and Tohyama, M. (2002) Changes in mRNA for VAMPs following facial nerve transection. *J. Chem. Neuroanat.* 24, 147-152.
- 11) Kasai, K., Yamashita, T., Yamaguchi, A., Yoshiya, K., Kawakita, A., Tanaka, H., Sugimoto, H. and Tohyama, M. (in press) Induction of mRNAs and proteins for Na/K ATPase  $\alpha$  1 and  $\beta$  1 subunits following hypoxia/reoxygenation in astrocytes. *Mol. Brain Res.* In press

## 2. 学会発表

- 1) 山下俊英, 遠山正彌: 軸索再生因子と阻害因子の作用機序—Rho の活性を制御する分子メカニズム、第 25 回日本神経科学大会シンポジウム、東京、2002
- 2) Higuchi H., Yamashita T., Tohyama M. (2002) Cloning of a novel protein that interacts with p75NTR intracellular domain. The 3rd Asian Pacific International Congress of Anatomists (APICA).
- 3) Higuchi H., Yamashita T., Tohyama M. (2002) cAMP-dependent protein kinase phosphorylates the p75 receptor and regulates its localization to lipid rafts. Cold Spring Harbour Meeting.
- 4) 水野龍義、山下俊英、遠山正彌 (2002) ニューロトロフィンによる priming のメカニズムの解析. 第 107 回日本解剖学会総会.
- 5) 青木美和、山下俊英、遠山正彌 (2002) Eph/ephrin の神経分化への関与. 第 107 回日本解剖学会総会.
- 6) 田中啓之、山下俊英、遠山正彌 (2002) 幼若ニューロンの再生阻害因子に対する耐性機構. 第 107 回日本解剖学会総会.
- 7) 久保盾貴、山下俊英、山口淳、遠山正彌 (2002) 新規軸策誘導因子の同定とその機能解析. 第 107 回日本解剖学会総会.
- 8) 樋口晴久、山下俊英、遠山正彌 (2002) ニューロトロフィン受容体 p75 を介したシグナル伝達. 『脳を守る』シンポジウム.
- 9) 久保盾貴、山下俊英、遠山正彌 (2002) 新規軸策誘導因子の同定とその機能解析. 『脳を守る』シンポジウム.
- 10) 田中啓之、山下俊英、遠山正彌 (2002) 幼若ニューロンの再生阻害因子に対する耐性機構. 『脳を守る』シンポジウム.
- 11) 水野龍義、山下俊英、遠山正彌 (2002) ニューロトロフィンによる priming のメカニズムの解析. 第 25 回日本神経科学大会.
- 12) 青木美和、山下俊英、遠山正彌 (2002) Eph/ephrin の神経分化への関与. 第 25 回日本神経科学大会.
- 13) 吉矢和久、山下俊英、遠山正彌 (2002) ラット頭部外傷後の側脳室周囲における遺伝子発現. 第 25 回日本神経科学大会.
- 14) 久保盾貴、山下俊英、遠山正彌 (2002) 新規軸策誘導因子の同定とその機能解析. 第 45 回日本神経化学学会大会.
- 15) 田中啓之、山下俊英、遠山正彌 (2002) 幼若ニューロンの再生阻害因子に対する耐性機構. 第 45 回日本神経化学

会大会.

16) 樋口晴久、山下俊英、遠山正彌  
(2002)ニューロトロフィン受容体 p75を介  
したシグナル伝達. 第45回日本神経化  
学会大会.

17) 河西克介、塩崎忠彦、田中裕、速形俊  
昭、嶋津岳士、山口淳、山下俊英、遠山  
正彌、杉本壽 (2002) 神経組織障害時に  
おける MKP-1 と神経細胞死の関係、第  
25回日本神経外傷学会.

## E. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

出願番号: 特願 2002-97058

発明者: 遠山正彌、山下俊英、樋口晴久

発明の名称: ニューロトロフィン受容体をリ  
ン酸化する新規 Protein Kinase A のスプラ  
イスバリエント

出願人: 科学技術振興事業団

出願日: 平成 14 年 3 月 29 日

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 鯨形 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  
田崎 修 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:** 損傷後の中枢神経において神経再生が起こることが最近報告されている。しかし、その神経再生は非常に限られたものであり、有効な神経再生とは言えない。我々は、哺乳類成体の中枢神経系に存在する神経幹細胞の再生能力を利用し、損傷後の中枢神経、特に頭部外傷後の中枢神経に有効な神経再生を起こすことを考えている。本研究の目的は、頭部外傷後の神経幹細胞の状態を把握し、内在性神経幹細胞からの神経新生を促すことである。頭部外傷モデル動物として、cortical impactor を用いたラット脳挫傷モデルを用いた。昨年度の報告で、頭部外傷後の中枢神経において、神経幹細胞が存在することの知られている側脳室周囲、海馬歯状回で神経幹細胞の増殖と思われる細胞増殖が見られること、損傷部位には外傷後 2 週間までは有効な神経細胞の新生が認められないことを報告した。更に、外傷後の側脳室周囲における遺伝子発現の profiling を、cDNA マイクロアレイ法を用いて行ったことを報告した。今年度は、cDNA マイクロアレイ法で profiling した遺伝子について、RT-PCRによる発現上昇の確認、in situ hybridizationによる側脳室周囲での発現局在の確認を行った。現在、発現上昇の確認できた遺伝子について、神経幹細胞での機能の解析、生体内での機能の解析を行っているところである。同時に、成体の内在性神経幹細胞への成長因子・ホルモンの投与、遺伝子の導入を行い、外傷後の神経幹細胞からの神経新生を検討しているところである。

#### A. 研究目的

昨年度も報告したとおり、我々は中枢神経損傷後の神経再生を目指している。成体内にも存在することの知られている神経幹細胞に着目し、幹細胞移植によってではなく、内在性神経幹細胞の神経新生能力を利用することにより、神経を再生しようと考えている。最近の報告 (Cell 110, 429-441, 2002; Nature Medicine 8, 963-970, 2002)

により、げっ歯類の脳梗塞モデルにおいて内在性神経幹細胞から神経新生が起こり、損傷部位へ新しい神経細胞が供給されることが示された。この報告により哺乳類成体内の神経幹細胞に損傷部位へ新しい神経を供給する潜在能力のあることが初めて示された。このような潜在能力をもつ神経幹細胞の外傷後の動向を理解し、その潜在能力を引き出すことにより神経再生を起こすことが本研究の目的である。我々の用いた頭



部外傷モデルは、大脳皮質を中心とした脳挫傷モデルであり、発生の段階でこの部位に神経を供給する神経幹細胞は、側脳室周囲に存在することが知られている。現在、外傷後の側脳室周囲遺伝子発現の変化を、cDNA マイクロアレイ法を用いて解析し、外傷後の側脳室周囲の環境を解明を試みているところである。更に、側脳室周囲の神経幹細胞へ増殖因子・ホルモンを作用させ、或いは遺伝子を導入することによる神経新生を図っている。

## B. 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。

### ① 頭部外傷後の側脳室周囲細胞の増殖

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。両側側脳室周囲に損傷後4日目をピークとする細胞増殖が認められ、外傷後の神経幹細胞の増殖が示唆された。(Fig.1 昨年度報告済)

### ② 外傷後の側脳室周囲の遺伝子発現

頭部外傷後の側脳室周囲神経幹細胞を制御するメカニズムを把握するため、外傷後の側脳室周囲の遺伝子発現を、cDNA マイクロアレイ法を用いて行った。昨年度も報告したとおり、外傷後の側脳室周囲において97遺伝子の発現上昇と204遺伝子の発現低下を認めた(Fig.2)。

この中からピックアップした遺伝子のうち、calmodulin 2、gelsolin、MARCKS-like protein、cornichon-like protein、metallothionein 3、Bak protein、PSD-95、neurochondrin、nasal embryonic LH-RH factor の9遺伝子について、RT-PCRによる遺伝子発現の上昇を確認した(Fig.2)。更に、calmodulin 2、gelsolin、MARCKS-like protein、metallothionein 3については、in situ hybridization により側脳

室周囲での発現の局在を確認した(Fig.3)。

現在、発現の確認できた遺伝子について、TAT protein、或いはレトロウイルスを用いることにより、神経幹細胞へ遺伝子導入し、in vitro、in vivoにおける機能解析を行っているところである。

### ③ 頭部外傷モデルラットにおける神経再生

頭部外傷モデルラットに、EGF、FGF、prolactin などの成長因子・ホルモンを脳室内投与することによる神経再生効果を、現在、解析中である。また、neuronal 遺伝子の遺伝子導入による効果についても解析中である。

## C. 考察

中枢神経損傷後、失われてしまった中枢神経機能は、完全には再生しない。これは、神経細胞の再生能力に限界があるためである。そこで我々は、神経幹細胞の神経新生能力に着目した。しかし、神経幹細胞の成体内での役割、更には、損傷中枢神経における神経幹細胞の役割、更には神経幹細胞を制御するメカニズムはほとんど判っていない。損傷後の神経幹細胞による神経再生を目指すためには、このメカニズムを解明することが極めて重要である。現在我々の行っている頭部外傷後側脳室周囲の遺伝子発現の解析は、このようなメカニズムを解明する足がかりになると考えている。また、発生段階、或いは in vitro で神経幹細胞からの神経新生を促す分子、遺伝子が既に多数報告されており、こういった分子、遺伝子の頭部外傷モデル動物への導入も、神経再生への足がかりになると考えている。

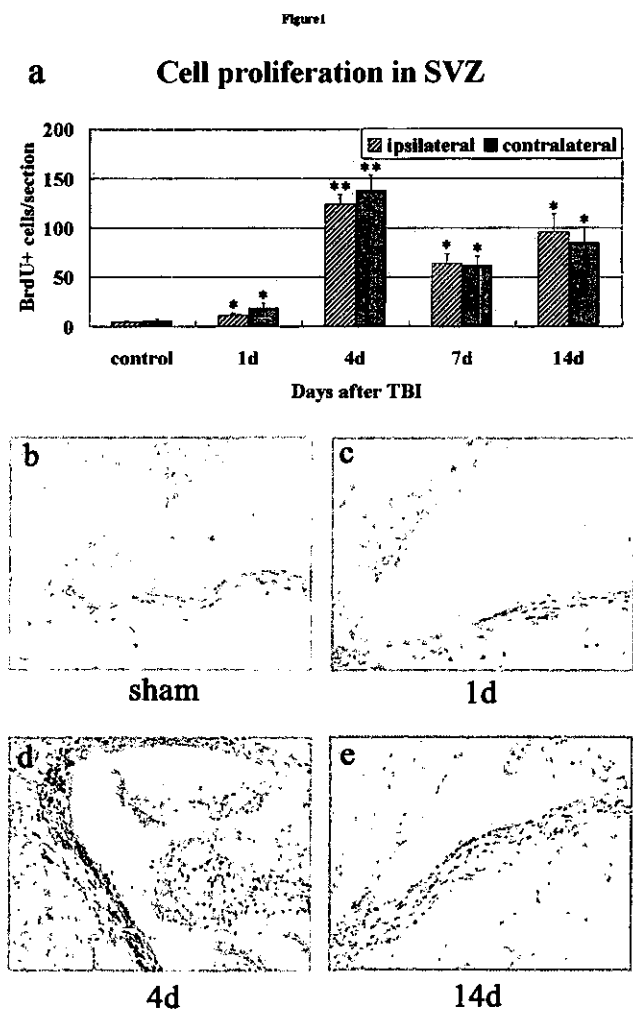


Fig. 1. Cell proliferation in SVZ after TBI. *a*, Cell proliferation in the SVZ was significantly increased at 4 days after TBI, and persisted until 14 days. Asterisks indicate significant difference from control, \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$  (Student's *t* test). *b*, Baseline mitotic activity in the ipsilateral SVZ of sham-operated rats by BrdU labeling and immunohistochemistry. BrdU-positive cells were not significantly increased at 1 day after TBI (*b*; ipsilateral). At 4 days after TBI, cell proliferation was increased (*c*; ipsilateral), and prolonged until 14 days after TBI (*d*; ipsilateral).

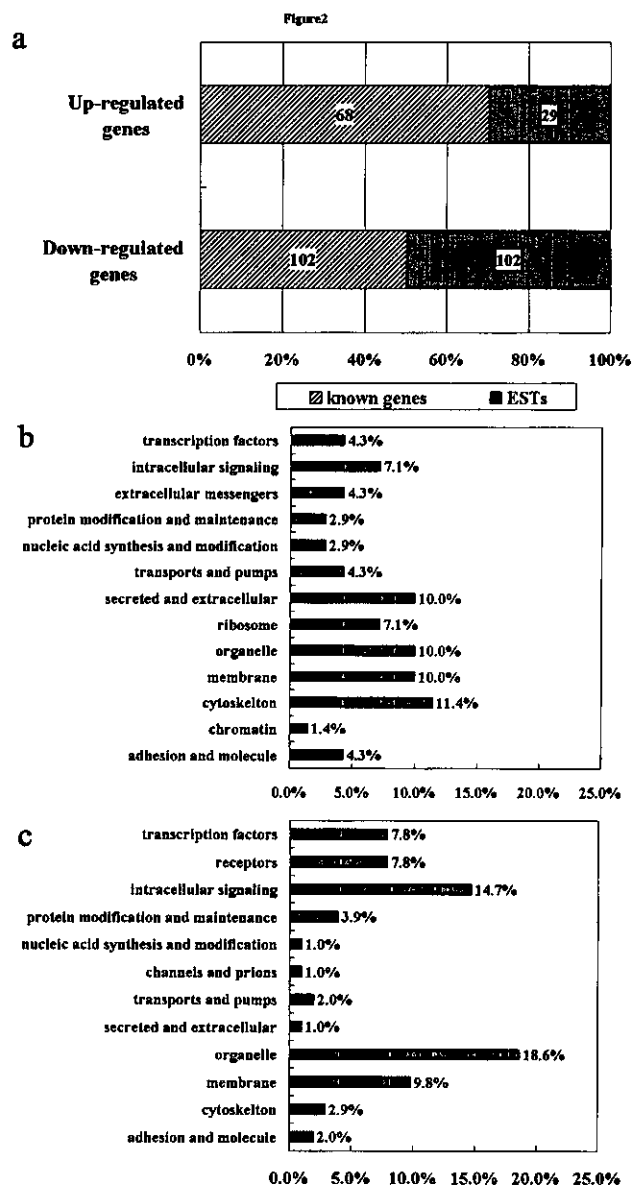


Fig. 2. *a*, The number of the up-regulated and down-regulated genes. *b*, Categorization of up-regulated known genes according to their function. *c*, Categorization of down-regulated genes.

Figure3

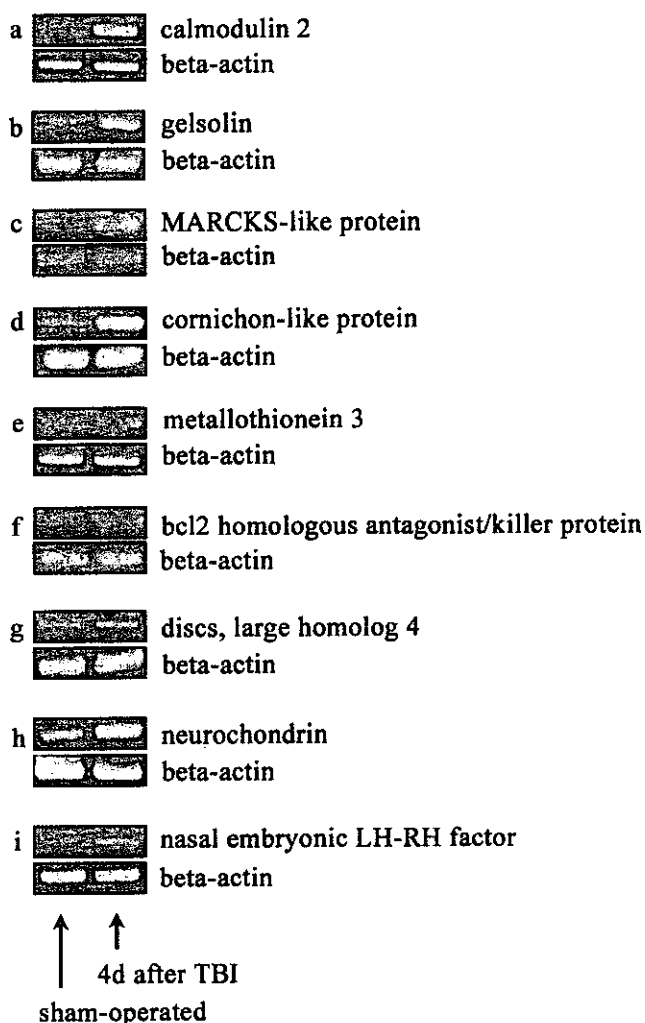
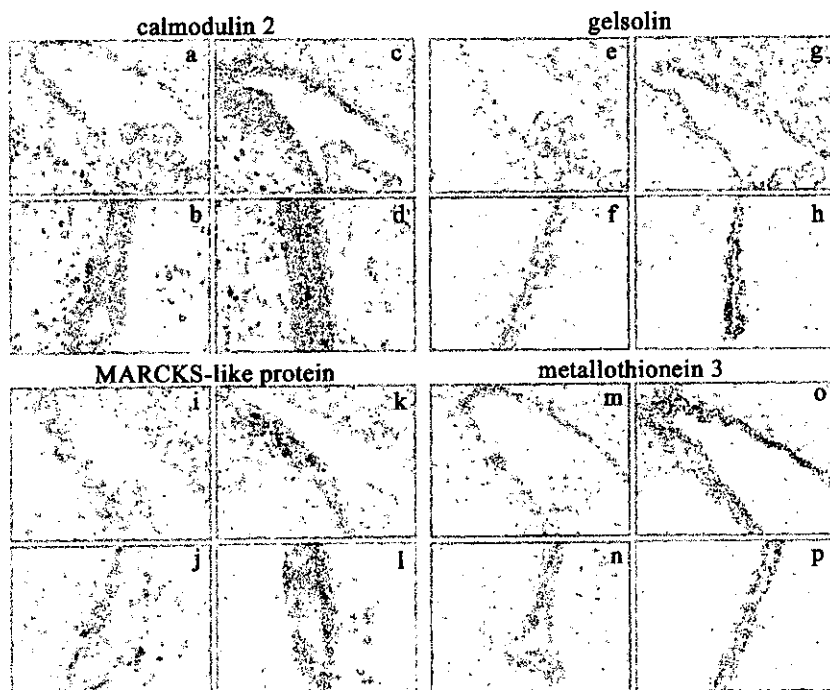


Fig. 3. Differential expression of mRNA determined by RT-PCR. Samples were taken from SVZ of sham-operated rats (left side) and rats with TBI (right side).

Fig. 4. *a-d*) Expression of Calm 2 mRNA ( $\times 200$ ). Calm 2 mRNA was induced predominantly in the cells of subependymal layer after TBI, although it seems not to be induced in the ependymal cells (*a,b*), whereas it was mildly expressed in the control (*c,d*). *e-h*) Expression of Gelsolin mRNA ( $\times 200$ ). Gelsolin mRNA was intensely observed in the ependymal and subependymal layers 4 days after TBI (*e,f*), whereas it was mildly expressed in the control (*g,h*). *i-l*) Expression of MLP mRNA ( $\times 200$ ). MLP mRNA was broadly induced around ventricular zone after TBI (*i,j*). There were fewer intense signals in the subventricular zone of sham-operated rats (*k,l*). *m-p*) Expression of Metallothionein 3 mRNA ( $\times 200$ ). Metallothionein 3 was detected in ependymal and subependymal layers and up-regulated after TBI (*m,n*), whereas it was mildly expressed in the control (*o,p*).

Figure4



#### D. 研究発表

##### 1. 論文発表

Gene expression profile in subventricular zone after traumatic brain injury. (英文雑誌に投稿中)

##### 2. 学会発表

- 1) 2002 年日本炎症再生学会(東京)  
ラット頭部外傷後の側脳室周囲における遺伝子発現

- 2) 2002 年日本神経科学学会(東京)  
cDNA マイクロアレイ法を用いたラット頭部外傷モデルにおける側脳室周囲の遺伝子発現の解析

#### 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