

令和5年度研究助成 成果報告講演(2)

全脳光計測・光操作システム を用いた脳神経回路修復 メカニズムの解析



酒井 誠一郎

さかい せいいちろう

東京科学大学 難治疾患研究所
神経炎症修復学分野 助教
博士(生命科学)

ご略歴

2007年	東北大学理学部生物学科卒業
2012年	東北大学大学院生命科学研究科博士課程修了 博士 (生命科学)
2011年 - 2013年	日本学術振興会特別研究員
2013年 - 2017年	理化学研究所脳科学総合研究センター 研究員
2017年 - 2023年	東京都医学総合研究所 研究員
2023年 - 現在	東京科学大学難治疾患研究所 助教

生物の根幹をなす特性の一つに、生体内外の環境変化や経験に応じて自らの構造や機能を変化させる「可塑性」がある。脳は、この可塑的能力を顕著に発揮する臓器であり、神経回路を動的に作り変えることで記憶の形成や学習を実現し、新たな状況に適応した行動を可能にする。この可塑性は、脳卒中などによる脳の損傷という重大な事態に対しても発揮され、失われた機能を補完・代償するための適応プロセスとして機能している。本研究では、脳梗塞モデルマウスを用いて、脳損傷後に神経回路がどのように変化することで機能回復が起こるのか、またそのプロセスの分子メカニズムを解明するために研究を行った。

脳卒中は、脳血管の閉塞によって細胞死が起こる脳梗塞と脳血管が破裂する脳出血に大別されるが、これらは本邦における死因の第四位を占めており、回復後も深刻な後遺症が残ることから寝たきりの主な原因となっている。脳卒中発症直後には、虚血や出血による直接的なダメージや過剰な神経興奮によるダメージによって神経細胞死が起こる。発症から数日の間に、死んだ細胞から放出されるタンパク質や核酸などの内因性の炎症惹起因子 (damage-associated molecular patterns, DAMPs) によって脳内で炎症が起き、さらなる神経細胞死が誘導される。このようにして正常な脳機能が失われることにより、手足の運動や感覚機能の障害、あるいは言語障害などの高次脳機能障害が生じる。その後数週間から数ヶ月に渡る回復期にはある程度の機能回復が見られるが、この回復過程では失われた脳機能を代償する神経回路が新たに作られる必要があるとされている。また、リハビリテーションは、この神経回路再構築を促進することによって機能予後を向上させると考えられている。実際に、脳卒中モデル動物を用いた研究では、脳損傷後に神経細胞の軸索や樹状突起の伸長、シナプス形成の促進などが観察されており、これら神経細胞の可塑性を促進することによって神経症状が改善することが報告されている[1],

[2]。しかし、脳損傷後の神経突起伸長やシナプス形成によって具体的にどのような神経回路が再構築されることが機能回復に寄与するのかが十分に解明されていない。

哺乳類の大脳皮質は、運動・視覚・聴覚・体性感覚などの機能ごとに担当する領野が分かれており、それぞれの領野内で近傍の神経細胞同士が接続する局所神経回路と領野間を遠距離でつなぐ神経回路によって大脳皮質内の神経回路は構成されている。感覚や運動の情報処理には、それぞれの担当領野内の局所神経回路に加えて皮質領野間を繋ぐ神経回路が重要であることが知られており、多様な感覚と運動の情報統合が適切な行動の実現に必要であると考えられる。脳損傷によってある領野の機能が失われてしまった場合に、別の領野が機能代償することで失われた機能が回復するためには皮質領野間の神経回路を新たに繋ぎ変える必要であると我々は予想し、脳梗塞後の機能回復を担う大脳皮質領野間の神経回路変化を探索した。

本研究では、マウスの大脳皮質一次体性感覚野に直径2 mm程度の脳梗塞を作製した。行動実験による感覚運動機能の評価を行ったところ、脳梗塞発症後およそ1ヶ月の間に感覚運動機能の回復が見られた。この回復期において大脳皮質領野間の神経回路がどのように変化するかを明らかにするために、カルシウム感受性蛍光タンパク質GCaMPを大脳皮質の神経細胞に発現するマウスを用いて広域カルシウムイメージングを行うことで、大脳皮質神経回路の経時的な変化を観察した[3]。広域カルシウムイメージングは、GCaMP発現マウスの頭皮を切開して頭蓋骨越しに顕微鏡観察を行うことにより、大脳皮質全域の神経活動を2ヶ月以上の長期間にわたって同一個体から安定して計測することが可能である(図1)。脳は麻酔下においてもリズム的な自発的な活動パターン(デルタ波)を示すが、この活動パターンは神経回路の構造を反映しており、神経接続の強い脳領域どうしは同期した神経活

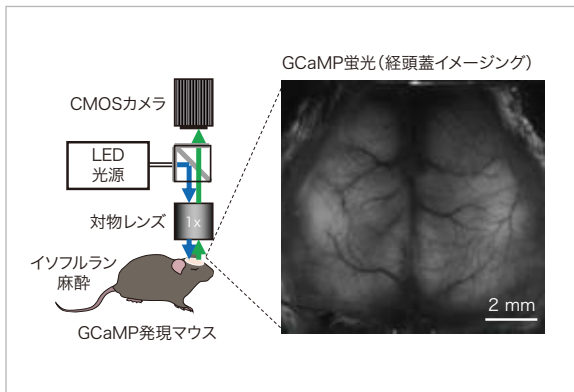


図1: 大脳皮質の広域カルシウムイメージング

動を示すと考えられる。そこで、脳梗塞前と発症後8週間の麻酔下における神経活動を計測し、脳梗塞後に皮質領野間の機能的結合がどのように変化するかを領野間の活動同期性の解析によって調べた。その結果、脳梗塞発症1週間後には大脳皮質の広い領域で機能的結合の低下が見られたが、脳梗塞2週間後には脳梗塞巣近傍の一次体性感覚野と運動野の間で顕著に機能的結合が増強し、脳梗塞8週間後まで強い結合

性が維持されていた(図2)。また、光感受性イオンチャネル・チャンネルロドプシンを運動野の神経細胞に発現させ、チャンネルロドプシン光刺激によって生じる運動野-体性感覚野間のシナプス伝達をホールセルパッチクランプによって計測したところ、脳梗塞発症2週間後にシナプス伝達の増強が見られた。次に、脳梗塞後にシナプス結合が強化される運動野-体性感覚野の神経回路が実際に機能回復に寄与しているのか検証するために、化学遺伝学(DREADD)を用いて神経回路選択的に活動を抑制する実験を行った。ウイルスベクターを用いて抑制性のDREADD受容体を運動野-体性感覚野の神経細胞に特異的に発現させ、脳梗塞回復期終了後にDREADDリガンドを投与することで神経回路選択的に神経活動を抑制して神経症状に与える影響を行動実験で評価した結果、脳梗塞後に一旦は回復していた感覚運動機能が再び悪化したことから、運動野-体性感覚野回路が脳梗塞後の機能回復を担っていることが示唆された。

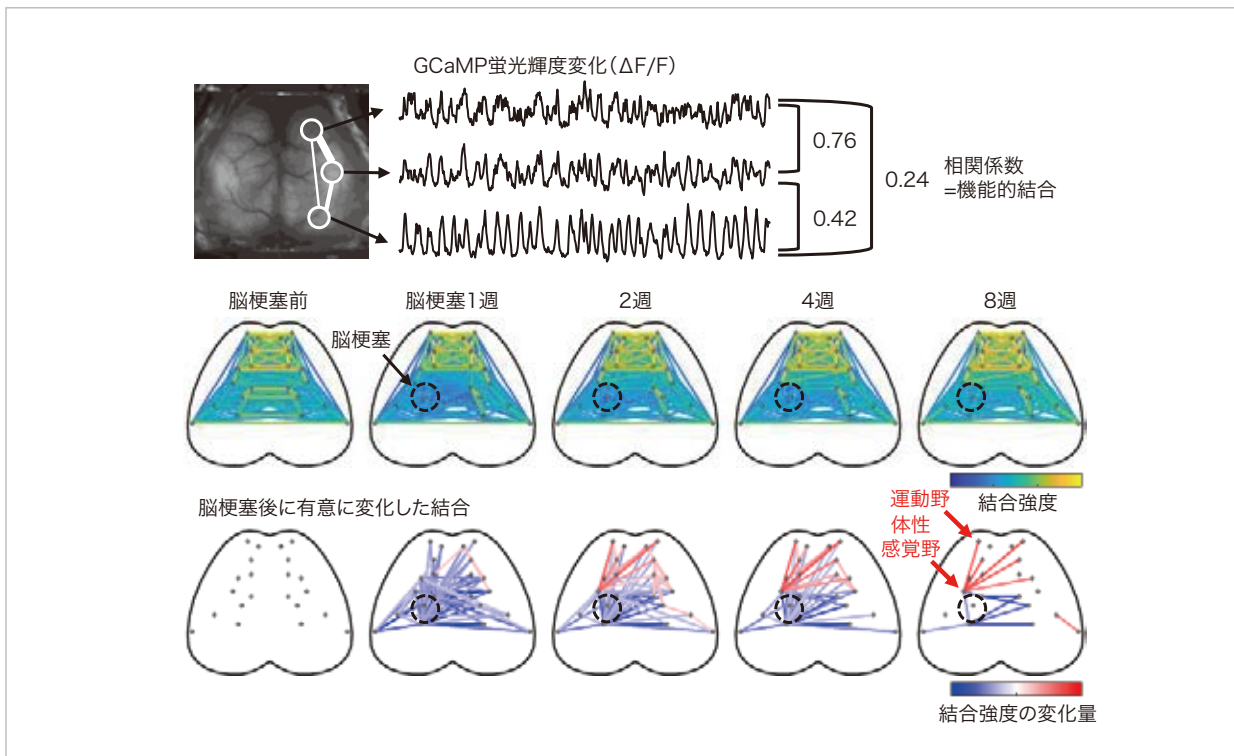


図2: 大脳皮質領野間の活動相関から脳梗塞後の機能的結合の変化を解析

我々はまた、運動野-体性感覚野回路が脳梗塞後に強化される分子メカニズムに関して、次世代シーケンスによる遺伝子発現解析を行った。マウスの脳から運動野の神経細胞を抽出してシングルセルRNA-seqを行った結果、脳梗塞発症2週間後にシナプス形成や軸索伸長などの神経修復で働く遺伝子の発現増加が見られた。これらの修復性の遺伝子発現増加は、特に皮質領野間の軸索投射を担う神経細胞サブタイプにおいて顕著であり、サブタイプ特異的な神経修復プログラムが存在することを示唆している。脳梗塞巣周辺部の神経細胞における修復性の遺伝子発現がヒストン修飾によって誘導されることを我々は先行研究において見出しているが[4]、運動野-体性感覚野回路における脳梗塞後の修復性遺伝子発現についても発現誘導メカニズムの解明を目指して更なる研究を進めている。

以上の研究により、脳梗塞後の機能回復過程において、運動野から体性感覚野へのトップダウン回路が機能的・構造的に再構築され、それが失われた感覚機能の代償に必須の役割を果たしていることが明らかになった。また、この神経回路再構築は運動野における神経細胞サブタイプ特異的な遺伝子発現プログラムによって制御されていることが示唆された(図3)。

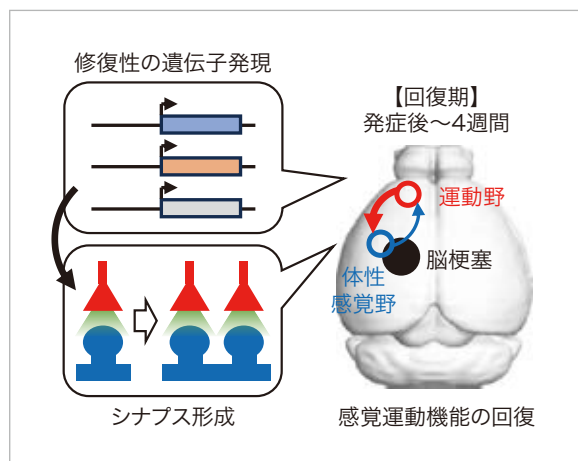


図3: 運動野-体性感覚野の回路強化によって機能回復が起こる

大脳皮質はそれ単体で働くのではなく、視床や大脳基底核などの他の脳領域とループ回路や双方向性の回路を形成し、脳領域どうしが連携することによって機能している。我々は現在、視床や大脳基底核といった脳深部領域を含めた全脳レベルでの動態解明を目指して研究を行っている。顕微鏡で直接観察できない脳深部の神経活動は広域カルシウムイメージングではとらえることができないので、光ファイバーを脳深部に挿入して蛍光を計測するファイバーフォトメトリーを採用し、全脳活動を計測できるシステムの開発を進めている。大脳皮質の広域カルシウムイメージングとファイバーフォトメトリーを組み合わせることにより、脳梗塞後の神経回路再構築における視床・基底核と大脳皮質の機能的な連関を解明することが可能になる。また、光遺伝学を用いて神経活動を操作することで神経回路の構造や機能をより詳細に解析することが可能になるので、神経活動計測システムに時空間的なパターンで光操作を行うための光照射装置を追加することで、全脳の光計測と光操作を行えるシステムの開発を目指している。

本研究で得られた成果は、脳卒中後の機能予後を改善させるための新たなリハビリテーション手法や、神経回路再構築を促進する分子標的薬の開発に繋がる基盤的な知見を提供するものである。将来的には、本技術をアルツハイマー病などの神経変性疾患の脳動態解析にも応用し、統合されたシステムとしての全脳の動作原理および病態解明に貢献したいと考えている。

参考文献

- [1] Sakai S, Shichita T. Inflammation and neural repair after ischemic brain injury. *Neurochemistry International* 130, 104316 (2019)
- [2] Sakai S, Shichita T. Role of alarmins in poststroke inflammation and neuronal repair. *Seminars in Immunopathology* 45, 427-435 (2023)
- [3] 酒井 誠一郎 . マウス大脳新皮質の慢性広域カルシウムイメージング法 . *日本神経回路学会誌* 27, 66-73 (2020)
- [4] Nakamura A, Sakai S et al. PLA2G2E-mediated lipid metabolism triggers brain-autonomous neural repair after ischemic stroke. *Neuron* 111, 2995-3010 (2023)