脳梗塞後における軸索再生と機能回復

上野 祐司^{1*}, 田中 亮太¹, 卜部 貴夫², 服部 信孝¹

要 旨

脳梗塞後の軸索再生は、損傷後の組織再構築において重要な役割を担い、機能回復とも関連する。筆者は、ラット中大脳動脈閉塞モデルの peri-infarct area において、7 日後の急性期に脱落した軸索や樹状突起は 56 日後の慢性期では再生していることを確認した。In vitro では、虚血後軸索の再生には phosphatase tensin homolog deleted on chromosome 10/Akt/Glycogen synthase kinase 3 β シグナルが関わることを報告した。ラット慢性脳低灌流モデルでは、L-carnitine 経口投与により脳白質において軸索再生と oligodendrocyte の再生によるミエリンの増強が生じ、慢性脳虚血ラットの認知機能障害が改善した。脳梗塞後の軸索再生、機能回復のメカニズムは多岐にわたり、今後軸索再生を目的とした脳梗塞新規治療薬の開発、実用化が期待される。

(脳循環代謝 30: 65~69, 2018)

キーワード: 脳梗塞, 軸索再生, 機能回復, 慢性脳虚血

はじめに

本邦における脳血管障害の有病者数は約 120 万人にのぼり、死亡原因の第 4 位である。また、脳血管障害に費やす医療費は高齢者医療費の 11% を占め、超高齢社会を迎えている本邦では今後さらに増加することが予想される。

近年、急性期脳梗塞に対するアルテプラザー静脈内投与、カテーテルによる血栓回収治療が普及、さらには様々な新規抗血栓薬の登場による予防医療の発展により脳卒中医療は飛躍的な発展を遂げている。しかし、ひとたび脳卒中に陥り急性期治療が奏功せず重度の神経障害が生じた場合、患者や家族の負担は計り知れない。また、脳血管障害に費やす医療費の中でも介護費用は大部分を占める。機能回復を目的とした新規治療法の確立が希求されている。

脳梗塞後における軸索再生は機能障害からの回復とも関連し、患者の機能予後を予測するうえで重要であ

るが、これまでその詳細なメカニズムは十分には解明されていない。本稿では、筆者らが推進した脳梗塞後の軸索再生に関する研究成果を概説する。

損傷後の軸索再生について

末梢神経系と比べて中枢神経系においては軸索の再生が乏しいことが知られているが、その理由の一つとして中枢神経系では、ミエリン中に存在するタンパク質である Nogo, Myelin associated glycoprotein, oligodendrocyte-myelin glycoprotein に代表されるミエリン関連タンパク、損傷部瘢痕組織中に存在するコンドロイチン硫酸プロテオグリカンや semaphorin 3A などの細胞外基質など、軸索の再生を阻害する因子が多彩に存在するためであると考えられている^{1,2)}。一方で、神経細胞内においても損傷後に軸索を再生させる cAMP を介した内在性シグナルがする^{3,4)}。近年、microRNA が軸索の伸展に関与することが報告されている^{5,6)}。筆者らは miR-17-92 cluster に注目し、初代培養神経細胞において miR-17-92 cluster の構成 microRNAs である miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20a, miR-92 は神経細胞体よりも軸索に多く分布することを確認した。神経細胞に miR-17-92 cluster を過剰発現すると、miR-19a の標的分子である phosphatase tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN) の抑制と下流の

¹ 順天堂大学医学部神経学講座

² 順天堂大学医学部附属浦安病院脳神経内科

* 〒113-0033 東京都文京区本郷 2-1-1

TEL: 03-3813-3111 FAX: 03-5800-0547

E-mail: yuji-u@juntendo.ac.jp

doi: 10.16977/cbfm.30.1_65

Fig. 1. ラット脳梗塞モデルの peri-infarct area と軸索再生

Ischemic core の辺縁から 300 μm までの領域である peri-infarct area では脳虚血急性期 7 日では phosphorylated neurofilament heavy chain (pNFH)⁺ 軸索や Myelin basic protein (MBP)⁺ oligodendrocyte の突起は脱落するが、28, 56 日の慢性期には再生される。pNFH と MBP の共発現も増加し oligodendrocyte による軸索への再髄鞘化が認められる。

mammalian target of rapamycin (mTOR) の発現上昇が認められ、軸索も有意に伸展した。miR-17-92 cluster は PTEN/mTOR を調節して軸索の成長に関与することを発見した⁷⁾。

脳梗塞後 peri-infarct area における軸索再生

脳梗塞モデルにおいて ischemic core の辺縁から 300 μm (Fig. 1) までの領域である peri-infarct area では、脳虚血による脳損傷後において構造的かつ機能的な脳組織を再構築する可塑性が存在し軸索も再生される^{8,9)}。Li らは ATRX や GDF10 が peri-infarct area における軸索再生に関連すると報告した¹⁰⁾。

筆者はラット中大脳動脈永久閉塞モデル (middle cerebral artery occlusion: MCAO) を作製し、peri-infarct area において脳梗塞後の軸索再生を評価した¹¹⁾。軸索のマーカーである phosphorylated neurofilament heavy chain (pNFH) の発現は MCAO 7 日目では低下したが、MCAO 後 28, 56 日と慢性期へと経過するにつれて増加していることを確認した (Fig. 1)。MCAO 後 56 日では、再生された軸索は oligodendrocyte により有髄化されていた (Fig. 1)。また、樹状突起や樹状突起棘の再生も認められた。初代神経細胞培養では、oxygen-glucose deprivation (OGD) 後の軸索再生過程を観察し、脳梗塞慢性期に相当する OGD 後 96 時間では pNFH の著明な発現、かつ PTEN 低下、phosphorylated Akt, phosphorylated Glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β) の上昇が認められた。さらに、OGD 後 Akt 阻害薬投与にて

pAkt と下流の pGSK-3 β 発現低下、pNFH 低下が認められ、GSK-3 阻害薬を投与では pGSK-3 β 発現低下、pNFH 発現上昇が認められた。つまり、培養神経細胞では、OGD 後 PTEN/Akt/GSK-3 β シグナルを介して pNFH の発現が調節されていることを発見した。

また、興味深いことに脳梗塞後の軸索再生は peri-infarct area のみならず、梗塞巣から離れた同側脳や反対側脳、赤核、脊髄においても報告されている^{12,13)}。我々の検討でも、反対側の皮質において pNFH の発現が急性期から慢性期にかけて上昇しており¹¹⁾、今後さらなる知見の蓄積が期待される。

L-carnitine の軸索再生、認知機能改善

ラットやマウスにおいて、両側総頸動脈の結紮もしくは微小コイル装着により慢性脳低灌流が誘導され脳白質障害が生じる¹⁴⁾。筆者らはラット慢性脳低灌流モデルにおいて脳血流が約 30% 低下する両側総頸動脈結紮後 3 日間 edaravone を連日投与することで eNOS 発現上昇、内皮細胞障害を抑制させ慢性期の脳白質障害を改善させることを報告した¹⁵⁾。

L-carnitine は抗酸化作用と抗炎症作用を有し¹⁶⁾、末梢閉塞性動脈疾患の患者では跛行の改善、急性心筋梗塞の患者では心筋のリモデリングを促す作用があることが報告されている^{17,18)}。脳梗塞に対する作用としては、ラット一過性脳虚血モデルにおいて抗酸化作用により神経細胞の脱落を抑制していることが報告されている¹⁹⁾。筆者らは、ラット慢性脳低灌流モデル作製後

Fig. 2. ラット慢性脳低灌流モデルにおける L-carnitine の軸索再生
ラット慢性脳低灌流作製後, L-carnitine を 600 mg/kg/日経口投与することで 28 日目の脳白質における pNFH⁺ 軸索の再生を認める. [#] P<0.05 versus vehicle 群

Fig. 3. ラット慢性脳低灌流モデルにおける L-carnitine の髄鞘の肥厚
電子顕微鏡では, 脳白質においてミエリン径は vehicle 群では菲薄化するが, L-carnitine 投与をすることでミエリン径は増大する. L-carnitine による oligodendrocyte への再生作用を示すと考えられる. ^{*} P<0.05, ^{***} P<0.001 versus the sham 群, ^{###} P<0.001 versus vehicle 群

に L-carnitine を投与することで 28 日後の pNFH の発現が上昇し (Fig. 2), PTEN/Akt/mTOR シグナルとの関与を確認した. また, oligodendrocyte に発現する 4-hydroxynonenal や 8-Hydroxydeoxyguanosine を抑制し, ミエリン径の著明な増大が認められた (Fig. 3). L-carnitine は, 慢性脳虚血の脳白質において軸索再生とともに, oligodendrocyte における酸化ストレスを制御することで oligodendrocyte 再生, ミエリンの肥厚を来すことで, ラットの認知機能障害が改善することを報告した²⁰⁾.

今後の展望

脳梗塞による機能障害を改善させる治療法が求められている. 今日では脳梗塞後の機能障害に対して神経幹細胞の移植, 患者から採取した自己骨髄間質細胞投与などの有効性が報告されている^{21, 22)}. しかし, 筆者らが報告した病態機構をはじめ, 脳梗塞後の軸索再生には多岐にわたる分子情報伝達経路が関わることが明らかになった. これらの作用機構を利用した軸索再生作用を有する脳梗塞治療薬が有効かもしれない.

本論文の発表に関して, 開示すべき COI はない.

文 献

- 1) Wang KC, Koprivica V, Kim JA, Sivasankaran R, Guo Y, Neve RL, He Z: Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature* 417: 941–944, 2002
- 2) Kaneko S, Iwanami A, Nakamura M, Kishino A, Kikuchi K, Shibata S, Okano HJ, Ikegami T, Moriya A, Konishi O, Nakayama C, Kumagai K, Kimura T, Sato Y, Goshima Y, Taniguchi M, Ito M, He Z, Toyama Y, Okano H: A selective Sema3A inhibitor enhances regenerative responses and functional recovery of the injured spinal cord. *Nat Med* 12: 1380–1389, 2006
- 3) Cai D, Qiu J, Cao Z, McAtee M, Bregman BS, Filbin MT: Neuronal cyclic AMP controls the developmental loss in ability of axons to regenerate. *J Neurosci* 21: 4731–4739, 2001
- 4) Neumann S, Bradke F, Tessier-Lavigne M, Basbaum AI: Regeneration of sensory axons within the injured spinal cord induced by intraganglionic cAMP elevation. *Neuron* 34: 885–893, 2002
- 5) Dajas-Bailador F, Bonev B, Garcez P, Stanley P, Guillemot F, Papalopulu N: microRNA-9 regulates axon extension and branching by targeting Map1b in mouse cortical neurons. *Nat Neurosci* 2012. Apr 8. doi: 10.1038/nn.3082. [Epub ahead of print]
- 6) Aschrafi A, Schwechter AD, Mameza MG, Natera-Naranjo O, Gioio AE, Kaplan BB: MicroRNA-338 regulates local cytochrome c oxidase IV mRNA levels and oxidative phosphorylation in the axons of sympathetic neurons. *J Neurosci* 28: 12581–12590, 2008
- 7) Zhang Y, Ueno Y, Liu XS, Buller B, Wang X, Chopp M, Zhang ZG: The MicroRNA-17-92 cluster enhances axonal outgrowth in embryonic cortical neurons. *J Neurosci* 33: 6885–6894, 2013
- 8) Carmichael ST, Wei L, Rovainen CM, Woolsey TA: New patterns of intracortical projections after focal cortical stroke. *Neurobiol Dis* 8: 910–922, 2001
- 9) Dancause N, Barbay S, Frost SB, Plautz EJ, Chen D, Zou-bina EV, Stowe AM, Nudo RJ: Extensive cortical rewiring after brain injury. *J Neurosci* 25: 10167–10179, 2005
- 10) Li S, Nie EH, Yin Y, Benowitz LI, Tung S, Vinters HV, Bahjat FR, Stenzel-Poore MP, Kawaguchi R, Coppola G, Carmichael ST: GDF10 is a signal for axonal sprouting and functional recovery after stroke. *Nat Neurosci* 18: 1737–1745, 2015
- 11) Ueno Y, Chopp M, Zhang L, Buller B, Liu Z, Lehman NL, Liu XS, Zhang Y, Roberts C, Zhang ZG: Axonal outgrowth and dendritic plasticity in the cortical peri-infarct area after experimental stroke. *Stroke* 43: 2221–2228, 2012
- 12) Lindau NT, Bänninger BJ, Gullo M, Good NA, Bachmann LC, Starkey ML, Schwab ME: Rewiring of the corticospinal tract in the adult rat after unilateral stroke and anti-Nogo-A therapy. *Brain* 137: 739–756, 2014
- 13) Seymour AB, Andrews EM, Tsai SY, Markus TM, Bollnow MR, Brennenman MM, O'Brien TE, Castro AJ, Schwab ME, Kartje GL: Delayed treatment with monoclonal antibody IN-1 1 week after stroke results in recovery of function and corticorubral plasticity in adult rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 25: 1366–1375, 2005
- 14) Farkas E, Luiten PG, Bari F: Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev* 54: 162–180, 2007
- 15) Ueno Y, Zhang N, Miyamoto N, Tanaka R, Hattori N, Urabe T: Edaravone attenuates white matter lesions through endothelial protection in a rat chronic hypoperfusion model. *Neuroscience* 162: 317–327, 2009
- 16) Ringseis R, Keller J, Eder K: Mechanisms underlying the anti-wasting effect of L-carnitine supplementation under pathologic conditions: evidence from experimental and clinical studies. *Eur J Nutr* 52: 1421–1442, 2013
- 17) Iliceto S, Scrutinio D, Bruzzi P, D'Ambrosio G, Boni L, Di Biase M, Biasco G, Hugenholz PG, Rizzon P: Effects of L-carnitine administration on left ventricular remodeling after acute anterior myocardial infarction: the L-Carnitine Ecocardiografia Digitalizzata Infarto Miocardico (CEDIM) Trial. *J Am Coll Cardiol* 26: 380–387, 1995
- 18) Delaney CL, Spark JJ, Thomas J, Wong YT, Chan LT, Miller MD: A systematic review to evaluate the effectiveness of carnitine supplementation in improving walking performance among individuals with intermittent claudication. *Atherosclerosis* 229: 1–9, 2013
- 19) Al-Majed AA, Sayed-Ahmed MM, Al-Omar FA, Al-Yahya AA, Aleisa AM, Al-Shabanah OA: Carnitine esters prevent oxidative stress damage and energy depletion following transient forebrain ischaemia in the rat hippocampus. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33: 725–733, 2006
- 20) Ueno Y, Koike M, Shimada Y, Shimura H, Hira K, Tanaka R, Uchiyama Y, Hattori N, Urabe T: L-carnitine enhances axonal plasticity and improves white-matter lesions after chronic hypoperfusion in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 35: 382–391, 2015
- 21) Honmou O, Houkin K, Matsunaga T, Niitsu Y, Ishiai S, Onodera R, Waxman SG, Kocsis JD: Intravenous administration of auto serum-expanded autologous mesenchymal stem cells in stroke. *Brain* 134: 1790–1807, 2011
- 22) Tornero D, Wattananit S, Grønning Madsen M, Koch P, Wood J, Tatarishvili J, Mine Y, Ge R, Monni E, Devaraju K, Hevner RF, Brüstle O, Lindvall O, Kokaia Z: Human induced pluripotent stem cell-derived cortical neurons integrate in stroke-injured cortex and improve functional recovery. *Brain* 136: 3561–3577, 2013

Abstract

Axonal outgrowth and functional recovery after stroke

Yuji Ueno¹, Ryota Tanaka¹, Takao Urabe², and Nobutaka Hattori¹

¹Department of Neurology, Juntendo University Faculty of Medicine, Tokyo, Japan

²Department of Neurology, Juntendo University Urayasu Hospital, Tokyo, Japan

Axonal remodeling is critical to reorganization of damaged brain tissue and associated with functional outgrowth after stroke. We analyzed the mechanisms of axonal outgrowth after stroke. In the peri-infarct area of rat brains, axonal outgrowth and myelination were induced from 7 to 56 days after middle cerebral artery occlusion. In primary cortical neurons, phosphatase tensin homolog deleted on chromosome 10/Akt/Glycogen synthase kinase 3 β signaling was related to axonal outgrowth after ischemia. In rat cerebral hypoperfusion, L-carnitine regulated the phosphatase tensin homolog deleted on chromosome 10/Akt/ mammalian target of rapamycin signaling pathway, and enhanced axonal plasticity while concurrently ameliorating oxidative stress and increasing oligodendrocyte myelination of axons, thereby improving white matter lesions and cognitive impairment in rats. Thus, the diverse mechanisms that axons regrow after stroke, potential candidates for a novel therapeutic agent to enhance axonal outgrowth and improve functional outcome human stroke survivors are warranted.

Key words: stroke, axonal outgrowth, functional recovery, brain ischemia