

令和元年6月17日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07030

研究課題名(和文) 新生仔ラット脊髄切断モデルにおける補償的一次感覚神経投射の解析

研究課題名(英文) Analysis of compensatory primary sensory projections in a neonatal rat spinal cord transection model

研究代表者

船越 健悟 (Funakoshi, Kengo)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：60291572

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：新生仔期に脊髄を切断したラットでは、後肢の運動機能が自発的に回復するが、このとき末梢から脊髄の運動領域への感覚神経の投射が増加している。運動ニューロンの周りには、ペリニューロナルネットとよばれる細胞外マトリックスが存在し、シナプス可塑性を調節しているが、感覚入力が増加すると運動機能の回復をもたらすためには、ペリニューロナルネットの主成分であるコンドロイチン硫酸の変化が関係していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

損傷された中枢神経系の機能をいかに回復させるかは、重要な医学的課題の一つであり、国内外でさまざまな取り組みがなされている。本研究の結果は、脊髄損傷からの運動機能の回復においては、末梢から脊髄への感覚入力の増加と、運動領域における細胞外マトリックスの変化が重要な役割を担っていることを示唆するものである。本研究の成果は、成人の脊髄損傷の画期的な治療法の開発につながる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：In neonatal rats whose spinal cord has been transected, spontaneous recovery of hindlimb motor function is concurrent with an increase in nerve projections from the periphery to the motor area of the spinal cord. Around the motor neurons, an extracellular matrix called the perineuronal net regulates synaptic plasticity. We clarified that changes in chondroitin sulfate, the main component of the perineuronal net, were related to the ability of sensory inputs to induce recovery of motor function.

研究分野：神経解剖学

キーワード：脊髄損傷 一次感覚神経 後根神経節 運動ニューロン コンドロイチン硫酸 ペリニューロナルネット

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ラットの脊髄を新生仔期に胸髄レベルで完全切断したモデルでは、成体で脊髄切断を施すよりもはるかに良好な運動機能の回復が認められる。切断部より尾側の腰仙髄は、上位との連絡を失っているにも関わらず、後肢の運動は保たれており、複数の関節を動かすことで移動することが可能であった。われわれは、このモデルにおいて脊髄への一次感覚神経の入力がどのように変化しているかを、Postnatal day 5 (P5) に脊髄切断後4週間経過したラット (P33) の L5 後根神経節に神経トレーサーを注入して調べたところ、脊髄内に標識された一次感覚神経線維はコントロールに比べて著しく増加しており、前角や中間質における神経終末の数も顕著に増加していた。このことから、脊髄の運動領域への一次感覚神経の入力が、新生仔期における脊髄切断によって増加し、これにより後肢運動機能を代償している可能性が考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、新生仔期胸髄完全切断モデルにおいて脊髄内で増加する一次感覚神経が運動機能の回復にどのように関わっているのかを明らかにすることである。そのため、まず、(1) 新生仔期胸髄完全切断モデルにおける脊髄内一次感覚神経投射の経時変化の検討を行った。次に、幼若期に胸髄を完全切断したラットでは、新生仔期に完全切断したモデルと異なり後肢の運動機能がほとんど戻らないことに注目して、(2) 脊髄内一次感覚神経投射増加の臨界期の検討を行った。予想では幼若期に胸髄を完全切断したモデルでは脊髄運動領域への一次感覚神経投射が増加していない可能性があると考えられた。

また、新生仔期胸髄完全切断モデルにおいて脊髄内で増加する一次感覚神経が適切な標的ニューロンとシナプスを形成する条件を探るために、(3) シナプス可塑性を調節しているとされるペリニューロナルネットの発現パターンの解析を運動ニューロンにおいて行った。さらに、(4) 脊髄内一次感覚神経と運動ニューロン間におけるシナプス形成とペリニューロナルネットとの関係の解析を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 脊髄内一次感覚神経投射の経時変化の検討

新生仔期 (P5) に胸髄を完全切断したラットにおいて、切断後1週、2週、4週間経過した後 L5 後根神経節に、順行性トレーサーである 10% ビオチン化デキストラアミン (BDA、分子量 10,000) を 0.5ml 注入した。注入1週間後に、麻酔下で灌流固定し、L5 を含む脊髄を取り出した。作成した凍結切片においてビオチンを可視化し、L5 脊髄運動領域 (前角、中間質) に投射している神経線維の総長と神経終末の数を定量し、コントロール群と比較した。

#### (2) 脊髄内一次感覚神経投射増加の臨界期の検討

新生仔期 (P10) と、幼若期 (P15、P20) に胸髄を完全切断したラットにおいて、P33 に L5 後根神経節に 10% BDA (分子量 10,000) を 0.5ml 注入した。注入1週間後に、麻酔下で灌流固定し、L5 を含む脊髄を取り出した。作成した凍結切片においてビオチンを可視化し、L5 脊髄運動領域 (前角、中間質) に投射している神経線維の総長と神経終末の数を定量し、コントロール群や P5 切断例と比較した。

#### (3) ペリニューロナルネットの発現パターンの解析

新生仔期 (P5、P10) と幼若期 (P15、P20) においてラットを灌流固定し、脊髄を取り出した。頸髄、胸髄、腰髄の凍結切片を作成し、ペリニューロナルネットのコンドロチン硫酸 (CS) 鎖の主成分である、CS-A と CS-C について、コリンアセチルトランスフェラーゼに陽性を示す運動ニューロンにおける発現を免疫組織化学的に調べた。さらに、P5、P10、P15、P20 に胸髄を完全切断したラットを、切断2週間経過後に麻酔下で灌流固定し、L5 を含む脊髄を取り出した。作成した凍結切片において、コリンアセチルトランスフェラーゼに陽性を示す運動ニューロンにおける CS-A と CS-C の発現を免疫組織化学的に調べた。

#### (4) シナプス形成とペリニューロナルネットとの関係の解析

新生仔期 (P5、P10) と幼若期 (P15、P20) に胸髄を完全切断したラットにおいて、切断後1週間経過した後 L5 後根神経節に、10% BDA (分子量 10,000) を 0.5ml 注入した。1週間後に、麻酔下で灌流固定し、L5 を含む脊髄を取り出した。作成した凍結切片において、前角内のコリンアセチルトランスフェラーゼ陽性ニューロンの細胞体に接触するビオチン陽性終末を可視化し、CS-A、CS-C 陽性ペリニューロナルネットとの関係を解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 脊髄内一次感覚神経投射の経時変化の検討

P5 に胸髄を完全切断したラットにおいて、切断後2週間後 (P19) に L5 後根神経節に BDA を注入して P26 における前角と中間質への一次感覚神経投射を観察したところ、軸索長や終末数はコントロール群と比較して有意に高い値を示したが、切断後4週間後 (P33) より低いことが確かめ

られた。このことより、脊髄に投射する一次感覚神経は新生仔に脊髄を損傷すると徐々に増加してゆくことが明らかになった。

#### (2) 脊髄内一次感覚神経投射増加の臨界期の検討

P20 に胸髄を完全切断したラットの L5 後根神経節に、BDA を P33 に注入して前角と中間質への一次感覚神経投射を P40 に観察したところ、予想に反して軸索長や終末数はコントロール群と比較して有意に高い値を示し、P5 に胸髄を完全切断した場合とほぼ同じであることが明らかになった。このことから、P20 切断モデルでは脊髄内一次感覚神経投射は増加するものの、何らかの理由により運動機能回復に結びつかないことが示唆された。このため、脊髄内一次感覚神経投射増加の臨界期を探る計画については、結論が出ないまま中断することとした。

#### (3) ペリニューロナルネットの発現パターンの解析

脊髄運動ニューロンにおけるペリニューロナルネットの生後発達についてはこれまで報告がなかったため、頸髄、胸髄、腰髄の運動ニューロンについてそれぞれ解析したところ、いずれの断面においても CS-A 陽性ペリニューロナルネットは時間の経過とともに発現率が減少してゆくのにに対し、CS-C 陽性ペリニューロナルネットは幼若期 (P15、P20) になると著しく発現率が増加していた。

P5、P10、P15、P20 に胸髄を完全切断したラットの切断 2 週間後では、CS-A 陽性ペリニューロナルネットの発現率は、運動機能の回復しない P15 切断群でコントロールと比較して有意に低かった。これに対し、CS-C 陽性ペリニューロナルネットの発現率は、運動機能の回復しない P15 切断群でコントロールと比較して有意に高く、P20 切断群でも高い傾向がみられた。一方、運動機能の回復する P10 切断群ではコントロールと比較して低い傾向がみられた。このことから、ペリニューロナルネットにおける CS-A と CS-C の発現には著しい違いがあり、CS-C 陽性ペリニューロナルネットの増加は、運動機能の回復に負の影響を及ぼしている可能性が示唆された。

このほか、運動ニューロン以外の細胞、特に CPG を構成するニューロンにおけるペリニューロナルネットの発現についても解析を行っている。

#### (4) シナプス形成とペリニューロナルネットとの関係の解析

新生仔期 (P10) および幼若期 (P15) に胸髄を完全切断したラットのいずれにおいても、L5 運動ニューロンに投射する一次感覚神経の大部分は、運動ニューロンの細胞体において CS-A や CS-C に覆われていない部分に終末していることが明らかになった。運動機能の回復しない P15 切断群では神経終末が CS-C 陽性ペリニューロナルネットに覆われている割合が、運動機能の回復する P10 切断群よりもより低いことが明らかになった。

本研究の開始時において、新生仔期胸髄完全切断モデルにおける後肢運動機能代償には、腰髄の運動ニューロンや、後肢の協調運動を生成する Central Pattern Generator (CPG) への感覚入力が増加が、重要な役割を担っていると推測されていた。本研究の結果は、感覚入力が増加は必ずしも運動機能回復をもたらすものではないことを意味している。また、本研究は運動ニューロンのペリニューロナルネットにおける CS-A と CS-C の発現パターンが、脊髄切断によって大きく変化することを明らかにした。このことより、ペリニューロナルネットにおける CS 鎖の発現パターンの変化がシナプス可塑性を調節し、新生仔期胸髄完全切断モデルにおける後肢運動機能代償をもたらしている可能性が示唆された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 8 件)

Takiguchi M, Morinobu S, Koganemaru R, Sakuyama R, Funakoshi K: Changes in the ratio of chondroitin sulfate A and C of perineuronal net components on spinal motoneurons during postnatal development. 10<sup>th</sup> IBRO World Congress, Daegu, 2019

Funakoshi K, Takiguchi M: Differential expression of chondroitin sulfates in perineuronal nets after complete spinal transection in neonatal rats. The 19th Congress of the International Federation of Associations of Anatomists, London, 2019

Takiguchi M, Ikeda Y, Katsuki K, Akaike T, Shindo K, Funakoshi K: Changes in primary afferent fiber projections and motoneuronal perineuronal nets after spinal cord transection of juvenile rats. Joint Conference of 8th Asia Pacific International Congress of Anatomists and 68th Korean Association of Anatomists. Busan, 2018

赤池隆, 新藤薫, 宮下郁苗, 池田佳彦, 香月健吾, 滝口雅人, 船越健悟: 幼若期脊髄損傷モデルラットにおける一次知覚線維とペリニューロナルネットの解析. 第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 武蔵野, 2018

宮下郁苗, 赤池隆, 新藤薫, 上村直哉, 滝口雅人, 船越健悟: 脊髄損傷ラットへのコンドロイチナーゼABC投与による損傷部とペリニューロナルネットへの影響. 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会, 武蔵野, 2018

Funakoshi K: Compensatory primary sensory projections after neonatal spinal transection. BIT 's 8<sup>th</sup> Annual World Congress of Neurotalk-2017, Barcelona, 2017

池田佳彦, 香月健吾, 丁一澤, 宮下郁苗, 武田昭仁, 滝口雅人, 船越健悟: 新生仔期及び幼若期脊髄損傷ラットにおける一次知覚線維の脊髄への投射による後肢運動メカニズムの解析. 日本解剖学会第104回関東支部学術集会, 横浜, 2016

Funakoshi K: Compensatory primary sensory projections after neonatal spinal transection. Dubai International Healthcare Summit, Dubai, 2016

〔その他〕

ホームページ等

<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~neuroana/>

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。