様 式 C－19、F－19－1、Z－19 （共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　元 年　 6 月 17 日現在

機関番号：16301
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2016～2018
課題番号：16K10827

研究課題名（和文）脊髄損傷に対する、肋間神経移行術による脊髄回路再生の研究

研究課題名（英文）Spinal cord regeneration by intercostal nerve transfer for spinal cord injury

研究代表者
森野　忠夫（Morino, Tadao）

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20380248

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,600,000円

研究成果の概要（和文）：脊髄損傷の治療法は未だ確立されていない。今回の研究で、ラット胸髄損傷モデルを用いて、損傷部位より頭側の肋間神経の断端を、損傷部位をまたいで、損傷部位尾側の脊髄内に移行した。術後8週目で有意に歌詞運動機能の改善を認めた。移行した肋間神経断端から軸索の脊髄内への進展は、テクニカルな原因で確認できなかったが、過去の論文では進展すると報告されている。移行した肋間神経の細胞体に発現していたmRNAを移行した後に切断した（コントロール）のものと比較すると、パスウエイ解析によって軸索誘導因子を含むものが多く見つかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
現時点では肋間神経移行が脊髄損傷の治療法となる確証はないが、今回のラットを用いた研究で、運動機能の回復が見込まれることが示された。また、肋間神経を移行することによってその細胞体に発現するmRNAはm軸索進展を促進するものが多くみつかり、それらを活性化する薬物を投与することにより、残存する神経細胞体からの軸索進展を促す可能性が示された。今後は、脊髄損傷ラットにその薬物を直接硬膜内注射するなどして運動機能回復が得られるかを検討する必要がある。直接の治療にはまだ結びつかないが、その可能性のあるパスウエイを見つけたことは意義のあることと考える。

研究成果の概要（英文）：A cure for spinal cord injury has not yet been established. In this study, using the rat thoracic spinal cord injury model, the stump of the intercostal nerve on the cranial side of the injury site was transferred into the spinal cord caudal to the injury site across the injury site. At 8 weeks after surgery, the hindlimb motor function of transferred rat was significantly improved than that of control animals. Progression of the transcostal nerve stump into the spinal cord of the axon was not confirmed by technical causes, but has been reported to progress in past papers. As compared to the mRNA expressed in the somata of the transferred intercostal nerve, which was transferred and then cut (control), pathway analysis revealed that many contained axonal inducer mRNAs.

研究分野：脊髄損傷

キーワード：脊髄損傷　肋間神経移行　後肢運動機能　軸索進展

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９、ＣＫ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

脊髄損傷（脊損）は四肢の麻痺が永続する忌避すべき病態であるが、現時点で有効な治療法はない。基礎研究での脊損治療の概念は、現在大きく分けて、「2 次損傷の抑制」と「脊髄再生」の 2 つがある。2 次損傷の抑制には様々な薬剤が候補に挙がっている。現時点で臨床応用されているものはステロイド大量療法のみであるが、その効果は疑問視されている。脊髄再生は iPS 細胞や ES 細胞移植が報告されているが、未だ有力な研究の 1 つであるにすぎない。結果として、脊損の治療は約 20 年前からほとんど進歩しておらず、break through が求められている。

２．研究の目的

我々の研究は、脊損部位より頭側の肋間神経を尾側の脊髄伝導路（後索）に移行して、これまでに実現できていない脊髄回路の再生を試み、行動学的、組織学的に検討することを目的とする。

３．研究の方法

○脊髄部分損傷ラット：ラットはこれまでも使用しているWister rat・メス・3-6ヶ月齢を使用する。イソフルレン麻酔下に第11胸随を後方から露出する。その際には脊髄を傷つけないように慎重に椎弓切除を行う。また、後述する肋間神経移行を行うために、第12胸髄後方も露出しておく。MASCIS impactorを用いて、第11胸髄レベルにて、10g x 25㎜ の強さでcontusionによる部分脊髄損傷を作成する。

○肋間神経移行術：部分脊損または完全脊損を起こした直後に、続けて第7～13胸椎側面を展開し、肋骨のcageに沿って筋肉を展開する。顕微鏡視下の操作に移り、第9肋骨を同定し、その尾側にある肋間神経を起始部から可及的に腹側遠位まで剥離し浮かせ、遠位端で鋭的に切断する。断面を傷つけないように注意する。第12胸髄レベル後方の硬膜をルビーメスにて切開し、後方の感覚神経根の脊髄入力部を同定する。正中から後根神経起始部の間が後索（脊髄伝導路）である。線維方向に沿って、後索背面を鋭のピンセット（INOX No. 5）で分けて、先ほど切断した肋間神経遠位断端を後索内に約1㎜ 埋め込む。引抜きが起こらないように、切開した硬膜と肋間神経の周膜を10-0ナイロン糸で2-3箇所縫合する。肋間神経1 本の場合は右側、2本の場合は両側を行う予定である。止血を加えて閉創する。

○ラットの行動学的評価：損傷後3日目、1,2,3,4,5,6,7,8週目にBBB scoreによる行動学的評価を、実験に関わらない3人に行ってもらう。行動学的回復が上限まで達していないと判断した場合は、観察期間を延長する。

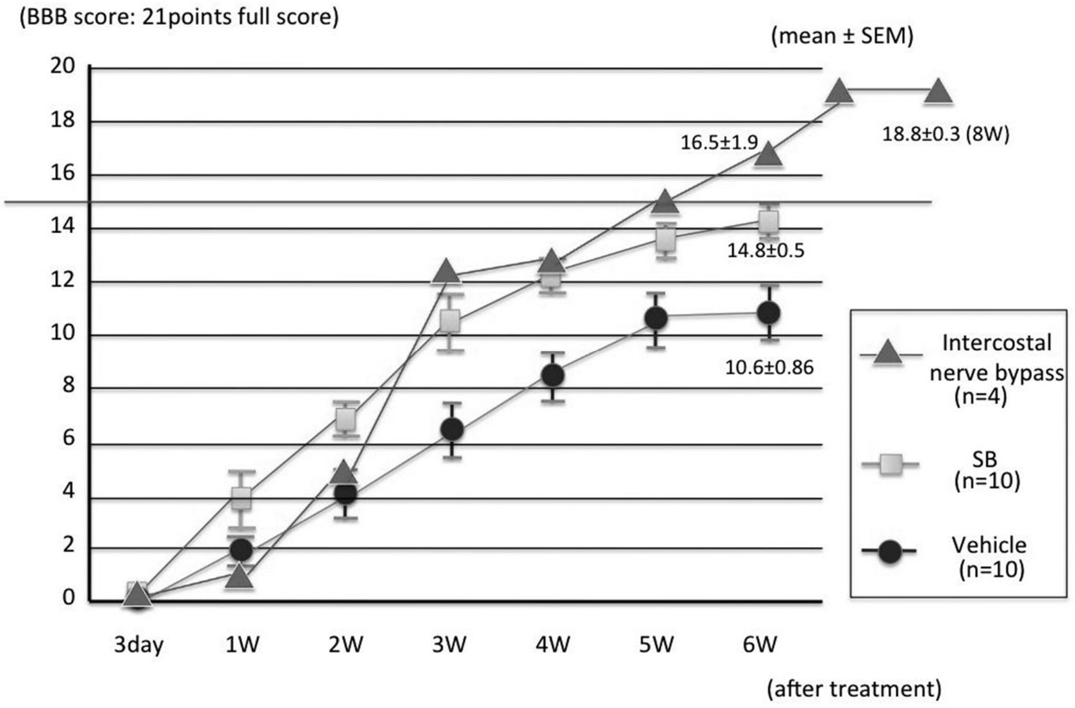
○移行した肋間神経の細胞体におけるmRNA発現の解析：肋間神経移行術を行った脊損ラットの3週目にラット脊髄を取り出し凍結切片を作成後、第9肋間神経の細胞体のある脊髄のスライス（厚さ20μm）5枚から移行した側の前角をレーザーにて顕微鏡視下に切り出してゲノムを抽出した。Controlとして肋間神経を移行した後その肋間神経を切断したモデルを用いた。両群からn=3で抽出したゲノムをマイクロアレイにかけてcontrolに比べて増減しているmRNAを同定してパスウエイ解析を行った。

４．研究成果

肋間神経移行ラットでは、損傷後 2 週目から有意さを持って control 群に比べて下肢運動機能の改善が認められた（図 1）。

マイクロアレイを用いたクラスター解析の結果として、myelin sheath(Cnp, Napb, Fscn1, Hbb,

Mdh1, Mbp, Mag, Mobp, Sirt2)、myelination と axon ensheathment (Nkx6-2, Ugt8, Mbp, Myrf, Mag, Sirt2, Scd2)の mRNA 発現が増強されていた。また、パスウエイ解析では synaptic vesicle cycle (Atpv1a, Atp6v1c1, Nsf, Rab3a, Cltc)と、コリン作動性シナプス(Gnai2, Ache, Camk2g, Pik3r1)の発現が上昇していた。肋間神経移行で損傷部位をまたいでつなぐことによって、損傷していない損傷部位から遠位の脊髄から何らかのシグナルが出て、移行した肋間神経の細胞体で軸索伸展や、新たなシナプス発現のための活動が増えていると推測された。



（図１　肋間神経移行ラット、vehicle ラットの後肢運動機能の推移）

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計　１件）

1. Altered Gene Expression of RNF34 and PACAP Possibly Involved in Mechanism of Exercise-Induced Analgesia for Neuropathic Pain in Rats.

Yamaoka S, Oshima Y, Horiuchi H, Morino T, Hino M, Miura H, Ogata T.

Int J Mol Sci. 2017 Sep 13;18(9). pii: E1962. doi: 10.3390/ijms18091962. （査読有り）

〔学会発表〕（計　０件）

〔図書〕（計　０件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計　０件）

名称：

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計　0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし

６．研究組織

(1)研究分担者
研究分担者氏名：尾形　直則
ローマ字氏名：(Ogata tadanori)
所属研究機関名：愛媛大学
部局名：大学院医学系研究科
職名：准教授
研究者番号（8 桁）：30291503

研究分担者氏名：日野　雅之
ローマ字氏名：(Hino masayuki)
所属研究機関名：愛媛大学
部局名：医学部附属病院
職名：助教
研究者番号（8 桁）：40789137

(2)研究協力者
研究協力者氏名：なし
ローマ字氏名：なし

※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。