

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11509

研究課題名(和文) 歩行障害を示す二分脊椎モデル動物における脊髄機能障害の病態に関する基礎的研究

研究課題名(英文) Pathophysiological research on the neural development of the affected spinal cord using the animal model of spina bifida

研究代表者

縦木 勝巳 (Mominoki, Katsumi)

岡山大学・自然生命科学研究支援センター・教授

研究者番号：70304615

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、脊髄先天性奇形の1つである二分脊椎症における奇形脊髄領域での神経細胞発生異常の有無に注目し、歩行障害を再現する二分脊椎モデルの基礎的な病態を明らかにすることである。一方で、本研究の最終的な目的となる二分脊椎症モデル動物の病態とヒト二分脊椎症患者の病態とを比較する上で、当初から用いてきたモデルでは不都合が生じた。そこで、本研究において二分脊椎モデルの作成方法に改良を加えることとした。その結果、これまでに比べてヒトの二分脊椎症患者によく似た症状を示すモデルの作出が可能となった。このモデルも実験対象に加えることによって、より社会的に意義ある結果が得られる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

二分脊椎症は非致死性脊髄奇形であることから胎児を直接対象とした臨床研究による病態解析には自ずと限界がある。さらに、マウス等の哺乳動物で作製された疾患モデルの場合にはその全てが致死経過を辿ることが報告されている。これらから本症の奇形領域における詳細な病態について十分な評価が行われていない。今後、胎児手術の適用の可否を含め、iPS細胞等を用いた再生医学研究の進展によって期待される神経組織或いは神経細胞の移植等の再生医療を本症に適応させるためには、二分脊椎症患者と同様に、生きた状態にある二分脊椎症モデル動物を使っての正確な病態把握が不可欠である。

研究成果の概要(英文)：This research using the animal model with spina bifida, which is one of the congenital malformation of a partial spinal cord, was operated to investigate the pathophysiology of the leg dysfunction in this model, using clues to understanding the nature of the neuronal development in the normal and/or abnormal the spinal cord region. On the other hand, in comparing the pathological condition of the spina bifida model animal, which is the final objective of this study, with the pathological condition of human spina bifida, the model used from the beginning caused inconvenience. Therefore, we decided to improve the method of creating the spina bifida model in this study. As a result, it has become possible to create a model that exhibits symptoms that are more similar to those of human spina bifida. It was suggested that the addition of this model to the experimental subjects may lead to more socially meaningful results.

研究分野：神経発生解剖学

キーワード：二分脊椎症 モデル動物 歩行障害 神経発生異常 運動神経 神経伝導路

1. 研究開始当初の背景

これまでの二分脊椎症の研究、特に、本症への胎児手術適応に関する研究では、以下の事項が報告されている。

- (1)二分脊椎症の胎児でも脊髄神経組織は正常に発生し、当初、組織学的異常が認められない。
- (2)第三四半期以降の胎児や新生児では脊髄神経組織の欠損が見られる。
- (3)妊娠中期（75日目）までにヒツジ胎仔を外科的に処置し、脊髄を羊水環境に暴露させると前項目を再現し、出産後（妊娠150日目）、後肢骨格筋は機能障害を示す。
- (4)上記のヒツジ胎仔の開放脊髄を、開放処置25日後に再閉鎖すると、脊髄組織が保存され、脳奇形や後肢骨格筋機能障害が起こらない。

以上から、ヒト二分脊椎症患者で顕在化する身体障害等の併発症は、「羊水環境へ長期暴露による脊髄組織の単純な損傷」が引き起こし、「暴露時間の短期化によって脊髄組織の保存と併発症の発症抑制が期待できる」との学説が提示された。この学説を基に、米国を中心として二分脊椎症の胎児に対しての子宮内手術が実施されている。しかし、この手術を施しても脳奇形や身体障害を抑制しないというレポートが複数の臨床研究グループから発表されている等この奇形の病態について議論が錯綜している。この病態を明らかにするには動物モデルを用いた実験的な解析が必要である。

2. 研究の目的

脊髄先天性奇形の一つである二分脊椎症の患者では、脊髄の奇形以外にも水頭症やアーノルド・キアリ奇形といった脳奇形や歩行障害等が併発することが知られている。胎児手術を本症に適用するには、患者の体で起こっているのか具体的な病態の把握が、その効果とリスクの判定に不可欠であるが、その病態は未だ不明な点が多く残されている。本申請研究は、研究代表者らが開発した歩行障害を示す二分脊椎ニワトリモデル（図1）を用い、前述の学説の出発点となっている(1)の事実が正しいのか否かを明らかにすることである。すなわち、歩行障害を示す二分脊椎症モデル動物での、歩行障害の病態を明らかにし、二分脊椎症の胎児手術適用の



判定となる基礎的なデータを得ることを目的に実施する。

図1. 2日齢正常発生例(a)と腰椎(b)、胸椎(c)二分脊椎ヒヨコ。

3. 研究の方法

すべての動物実験は岡山大学動物実験委員会の承認を得た後、実施した。麻酔が必要な外科的処置を行う場合には、専用の麻酔ボックスに動物を入れ、4 - 5%のイソフルラン混合エアーを徐々に充満させ、麻酔導入した。その後、2 - 3%のイソフルラン混合エアーを麻酔マスクを用いて送気・吸引させ、動物を麻酔状態下におき、外科的処置を行った。

(1)二分脊椎胚の作成

白色レグホンの有精卵を39.5で約72時間インキュベートして得たHamburger and Hamiltonのニワトリ胚の標準テーブル表(1951, reprinted 1992)に基づき、stage 18-19に相当するニワトリ胚をピックアップし、第26体節位(第6胸椎後部及び第7胸椎前部に相当)の神経管ルーフプレートに尾側方向に5-7体節分切開し、二分脊椎胚を作成した。手術後、卵殻の穴を透明なテープで覆い孵卵器に戻した。神経管ルーフプレートの切開以外は二分脊椎例と同様の処理を行うが、神経管ルーフプレートの切開を行わない擬処置群を対照群として用いた。

(2)モノクローナル抗体の作製

実験に使用するモノクローナル抗体はDSHB(アイオワ州立大学運営)からハイブリドーマ細胞(clone: 39.4D5 [Islet-1及びIslet-2を認識]、40.2D6 [Islet-1のみを認識])を入手し、これからIgG画分を分取した。すなわち、ハイブリドーマ細胞を10%FCSを含むD-MEM培地で培養、培養上清を回収、これからプロテインGカラムに吸着したIgG画分を回収した。その後、脱塩を兼ねて回収した画分をゲル濾過クロマトグラフィーカラムにアプライし、約150kDaに相当する画分を集め、この画分を濃縮して実験に使用した。

(3)二分脊椎例における運動神経細胞の分化異常の追跡

適当なステージに達したニワトリ胚を心還流法で固定し、固定後第2~4腰椎位に相当する領域を切り出した。切り出した材料を用い、15 μ mの凍結切片を作成し、免疫染色を行った。1

次抗体には前述のモノクローナル抗体を用い、2次抗体にはビオチン化あるいは蛍光化抗マウス抗体を用いた。陽性細胞数を第3腰椎節相当の領域の切片3枚毎に数えた。データは平均値±標準誤差で示し、群間差は分散分析の後にBonferroniの多重比較法を用いた。

(4)二分脊椎例における運動神経細胞の電気生理学的解析

二分脊椎の奇形領域における運動神経細胞の生理的機能を解析するために、二分脊椎例の2日齢ヒヨコの大腿部を通過する左側の坐骨神経及び下腿部のヒラメ筋を剖出、坐骨神経には電気刺激用プローブを、ヒラメ筋筋腹には筋電図記録用プローブを留置、二分脊椎例におけるヒラメ筋の筋電図を記録して正常例のデータと比較した。

4. 研究成果

(1) 二分脊椎例における運動神経細胞の分化異常の追跡 (図2及び図3)

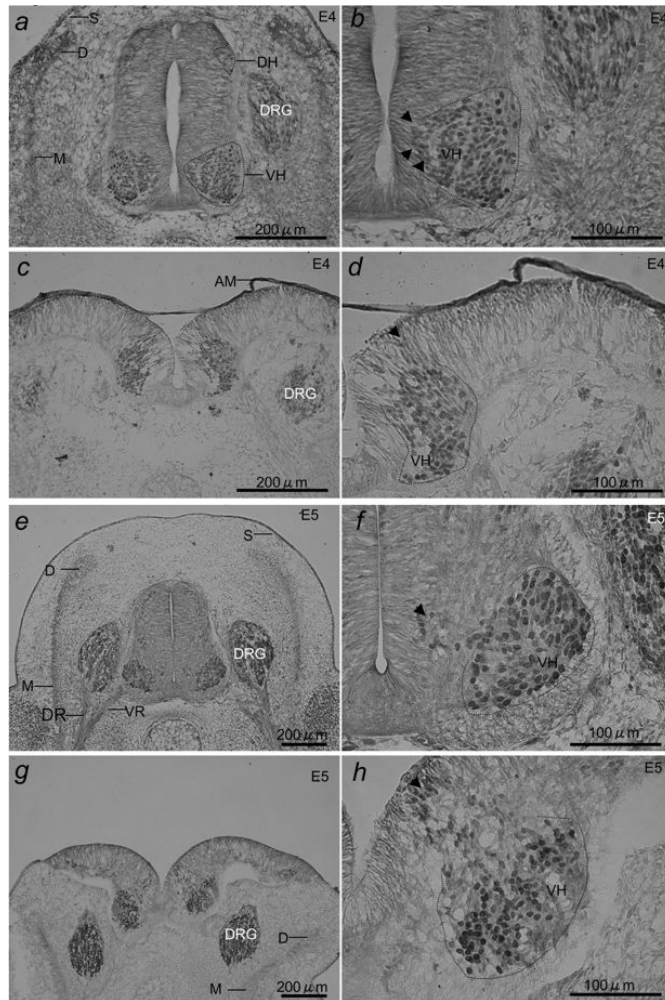


図2 4、5日齢胚における第3腰椎領域のIslet-1陽性細胞の分布。
a:正常発生例4日胚、b:aの前角領域、c:二分脊椎例4日胚、d:cの前角領域、e:正常発生例5日胚、f:eの前角領域、g:二分脊椎例5日胚、h:gの前角領域

二分脊椎処置の時期から24時間の間、正常群の脊髄では上衣層と外套層の境界が明瞭となり、両層とも紡錘形をした細胞が密となって存在する。一方、二分脊椎群では、上衣層と外套層の境界は正常群と同様、明瞭であり、両層には紡錘形の細胞が多数存在するが、外套層では細胞間隙が大きく脊髄全体が比較的幼弱な印象を受ける。後根神経節は二分脊椎群でも正常群のそれと遜色なく発生するが脊髄の変形に伴って脊髄前角よりもさらに腹側に位置している。両群ともに前角と後根神経節にはIslet-1陽性細胞が多く見られるが、後角や中間帯には陽性反応が無い。前角の位置は両群とも腹外側部にあるが、正常群の前角は境界が明瞭である。しかしながら、二分脊椎群では変形し、その境界も明瞭でない。上衣層から前角領域に移動中のIslet-1陽性細胞は4日齢胚で両群とも神経管側に多数認められる。5日になると正常群の上衣層と前角領域間の陽性細胞数は減少するが、二分脊椎群では神経管付近からの遊走が続く。その結果、正常では前角領域のIslet-1陽性細胞は比較的均一な染色像を示し整然と並んでいるが二分脊椎群では前角領域の細胞シグナルの濃さも不均一で細胞の方向も不規則な状態を示すことになる。

二分脊椎処置24時間を過ぎるステージでは正常群では上衣層と前角間の移動細胞はかなり少数となるが二分脊椎ではより多くの細胞移動が続く。この時期二分脊椎では個体により像が多

少異なるが、前角は二種類の細胞集団に区分されることが多い。すなわち外側に強いシグナルを示す Islet-1 陽性細胞が、内側には比較的弱いシグナルを示す細胞が位置している。その後、両群とも移動細胞は少なくなり、同じような像を呈する。そして両群とも前角の運動神経は外側の Islet-1 陰性ニューロンと内側の Islet-1 陽性ニューロンとに分かれ、その境界は明瞭である。

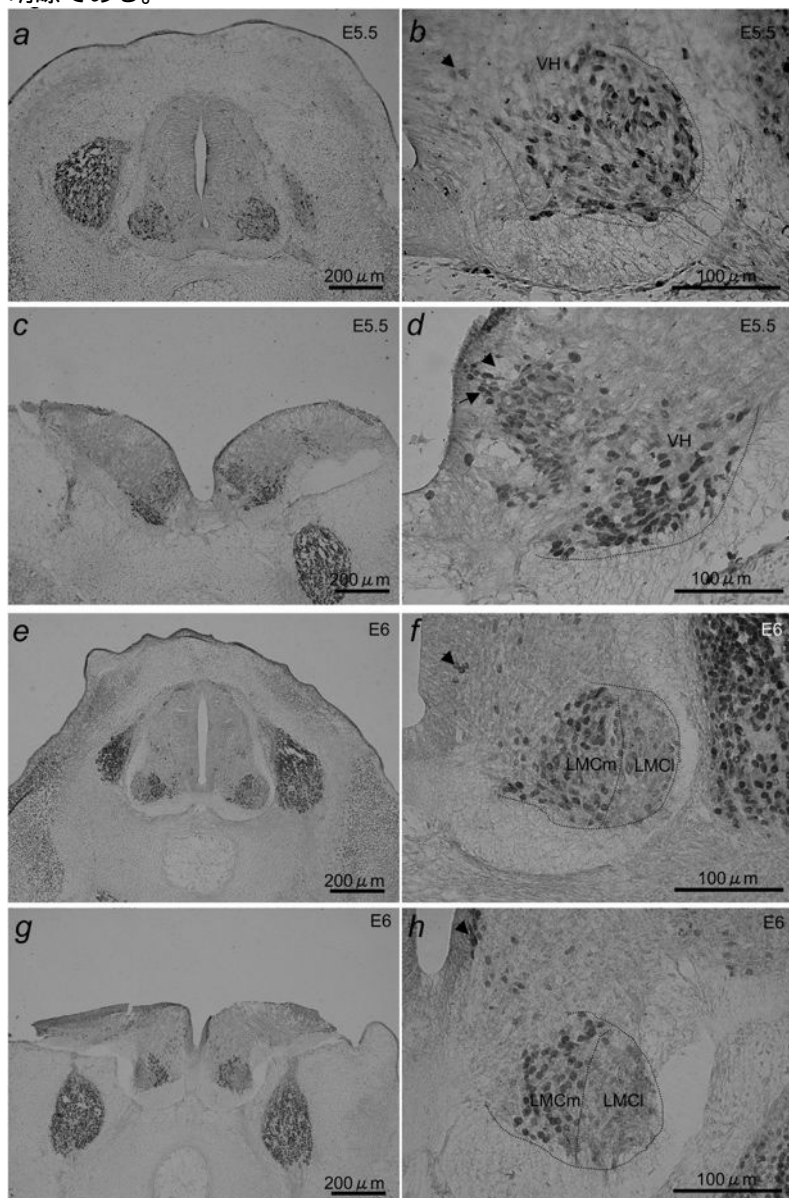


図3 5.5、6日齢胚における第3腰椎領域の Islet-1 陽性細胞の分布。a:正常発生例 5.5 日胚、b : a の前角領域、c : 二分脊椎例 5.5 日胚、d : c の前角領域、e:正常発生例 6 日胚、 f : e の前角領域、 g : 二分脊椎例 6 日胚、 h : g の前角領域

(3) 二分脊椎例における運動神経細胞の電気生理学的解析

これまでのモデル動物では二分脊椎例において運動神経数の変化は見られないが、各骨格筋を支配している運動神経細胞体の分布が異なることがわかった。二分脊椎例において見られる歩行障害の原因としておそらく知覚神経の伝導路異常が発生、歩行障害の発症が骨格筋の協調的な動きが阻害され誘導されたものであると推測できる。しかし、運動神経の骨格筋支配状態については不明である。よって、本解析を行い二分脊椎例と正常例で比較した。

正常例及び二分脊椎例ともに、得られた筋電図の波形に違いは認められなかった。例数を重ねて検討する必要があるが、末梢神経の走行と支配筋肉の関係、すなわち末梢側の神経機能は、二分脊椎例であっても正常に構築されていることが示唆される。

(4) 二分脊椎モデル動物作成方法の改良

本研究計画では、モデル動物を用いた病態解析をより正確に実施するとの観点から、嚢胞型の二分脊椎の作出を目的にモデル動物の作出方法の改良を試みた。すなわち、改良点としては、図4に示したように処置後に実体顕微鏡下でニワトリ胚を1/250sec以上のシャッタースピードで高感度高速撮影し、撮影した映像を用いて体節位を正確に同定するよう

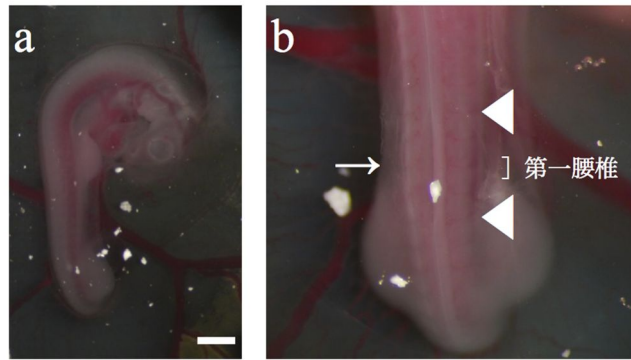


図4. 二分脊椎処置を行ったニワトリ胚の一例
 a:ニワトリ処置を行ったHamburger & Hamilton Stage18-19ニワトリ胚。白バーの長さは1mmである。b:左の写真から胸部以下を拡大した写真。矢印は後肢パッドの前位辺縁位置を示し、矢頭は二分脊椎処置のために切開した範囲を示す。

にした。これまで体節位の同定は実体顕微鏡を使った肉眼観察で行っていたために、鏡像の低コントラスト化及び心拍出による動きのために体節の輪郭が不鮮明であって、その体節位の同定が困難であったのが、今回の改良によって正確に処置した神経管の体節位の同定が可能となった。具体的には、後肢パッドの前部辺縁を位置する体節の位置を確認し、これを第21体節と第22体節と同定した（ヒヨコで第一腰髄になることを確認済みである）。これから外れた処置胚を実験から排除することで安定したサンプリングと二分脊椎奇形のサイズの調整が可能となった。

安定したサンプリング及び変異サイズの微調整が可能となったので、ヒヨコとなった時に特定の2髄節分の椎弓欠損がおこるように二分脊椎処置をニワトリ胚におこなったところ（図4）これまで作成が困難であった嚢胞性二分脊椎症様の奇形をもったヒヨコが生まれた（図5）。これまで本モデルの作出では、広範囲の神経管ループプレート切断が必要であった。そのためにヒトでは重症例となる脊椎裂タイプの二分脊椎のみ再現可能であった。一方、今回改良した作出方法では、より範囲を狭めることでヒト二分脊椎症患者で発生例が比較的多い嚢胞性二分脊椎タイプの奇形をもったヒヨコの作出に成功した。この新モデルを使うことによって、これまで明らかにできなかった二分脊椎症の病態を解明することができるようになることが期待できる。

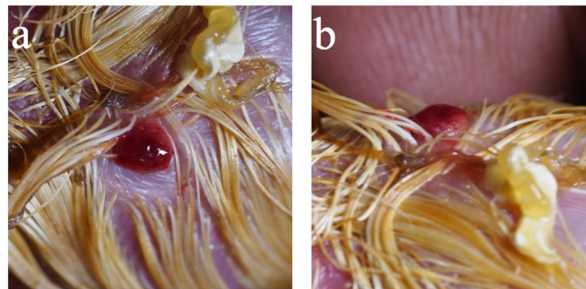


図5. 嚢胞性二分脊椎症様の奇形をもったニワトリヒヨコ
 a:背面図、b:側面図を示し、嚢胞に覆われた脊髄の一部が背面に突出していた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	藤原 隆 (Fujiwara Takashi) (30036496)	広島文化学園大学・看護学部・教授 (35412)	
研究分担者	平山 晴子 (Hirayama Harko) (40635257)	岡山大学・自然生命科学研究支援センター・助教 (15301)	