

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19592059

研究課題名（和文）

二分脊椎症における胎児手術の適用可否に関する基礎的研究：モデル動物を用いた解析

研究課題名（英文）

Basic research on the pathophysiological sequences of neural development on the affected spinal cord using the animal model of spina bifida aperta for applying *in utero* surgery

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・准教授

研究者番号：70304615

研究成果の概要：脊髄先天性奇形の一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、歩行障害を再現できる二分脊椎ニワトリモデルでの運動神経細胞の分化動態を免疫組織学的手法で検討した。その結果、運動神経細胞の発生の初期にわずかな発生遅滞が起こっていることが明らかとなった。これらの結果から二分脊椎症患者の歩行障害発生の抑制に胎児手術という母胎に負荷をかける治療方法の選択には、さらなる検討が必要であると結論できる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：実験動物学、神経解剖学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小児外科学

キーワード：二分脊椎症、ニワトリ、疾患モデル、歩行障害、神経発生異常、脊髄

## 1. 研究開始当初の背景

脊髄先天性奇形の一つである二分脊椎症では脊髄奇形に伴って様々な身体障害が患者の成長に伴って顕在化し、二分脊椎症患者が社会生活を送る上での負担となっている。これまで二分脊椎症の研究では、(1)ヒトの初期胚では脊髄神経組織は正常に発生し、組織学的異常が認められない。(2)ヒトの胎児や新生児では脊髄神経組織の欠損が見られる。(3)ヒツジの胎仔を外科的に処置し、脊髄を羊水環境に暴

露させると神経組織の欠損が生じる。(4)(3)のヒツジ胎仔の後肢骨格筋は機能障害を示すことが示され、これらの事例から、ヒト二分脊椎症患者で顕在化する身体障害は「羊水環境へ長期間暴露されることによる脊髄組織の単純な損傷」が引き起こすとの学説が提示された。この学説を基に、二分脊椎症関連の身体障害発症の抑制を目指した胎児手術が米国を中心に始まっているが、近年、この手術を施しても身体障害を抑制しないという臨床レポー

トが複数の臨床研究グループから発表されている。すなわち、二分脊椎症における胎児手術の適応には、手術による効果に対して母体及び胎児の手術負荷の観点から臨床家内において議論されているところである。そこで、研究代表者は、上記の胎児手術の適応可否やこの手術の評価及び改良を行う上で二分脊椎症及びその関連の身体障害の正しい病態を疾患モデル動物を用いて正確に把握する必要があると考えに至った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、研究代表者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。具体的には、モデル動物における奇形領域の運動及び介在神経細胞の分化動態、運動神経細胞の標的選択動態を明らかにすることを目的とした。



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

本研究では以下の実験を行った。動物実験は岡山大学動物実験規則（平成19年度は岡山大学動物実験指針）に基づき、動物実験計画の承認（OKU-2007239 及び OKU-2008043）を得た後、実施した。なお、麻酔が必要な場合は、ジエチルエーテル吸入による導入麻酔実施後、ペントバルビタール(40mg/kg)の腹腔内投与で実施した。

### (1) 二分脊椎胚の作成

白色レグホンの有精卵を 39.5°C で約 72 時間インキュベートして得た Hamburger and Hamilton stage 18-19 に相当するニワトリ胚の第 26 体節位（第 6 胸椎後部及び第 7 胸

椎前に相当）から尾側に向かい 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。対照群においては蓋板の切開以外は二分脊椎例と同様の処理を行った。

### (2) モノクローナル抗体の作製

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 (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、10% FCS を含む D-MEM 培地で約 10 日間培養した培養上清からプロテイン G カラムを用い、モノクローナル抗体を精製した。その後、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 150 kDa に相当する画分を集め、実験に使用した。

### (3) 免疫組織化学と細胞数の解析

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  $\mu\text{m}$  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 腰髄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) 内転筋を支配する運動神経細胞数の計測

二分脊椎処置を行った胚を孵化させ、孵化 24 時間後に cockroach 様歩行する個体（内転筋機能障害ひよこ）を選別した。その後、5% wheal germ agglutinin (WGA) - horseradish peroxidase (HRP) を含むタイロド液を右内転筋に注入した。注入 24 時間後、心還流固定し、第 5 胸椎部から第 3 腰椎部分を採取した。これから 15  $\mu\text{m}$  の凍結切片を作成し、神経細胞体に逆行性に取り込まれた WGA-HRP を

検出した。細胞数をカウントするために、標本の脊髄前角領域の200倍の顕微鏡画像から、内転筋支配運動神経細胞をカウントした。すなわち、逆行性標識によりトレーサーが顆粒状に運動神経細胞上で認められ、かつ細胞に核が含まれているものをカウントした。データは連続した5枚の合計(750 $\mu$ m相当)をグループにまとめ平均値 $\pm$ 標準偏差で表記した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 運動神経の発生初期(4, 5日齢胚) (図2)

この時期までに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が、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。

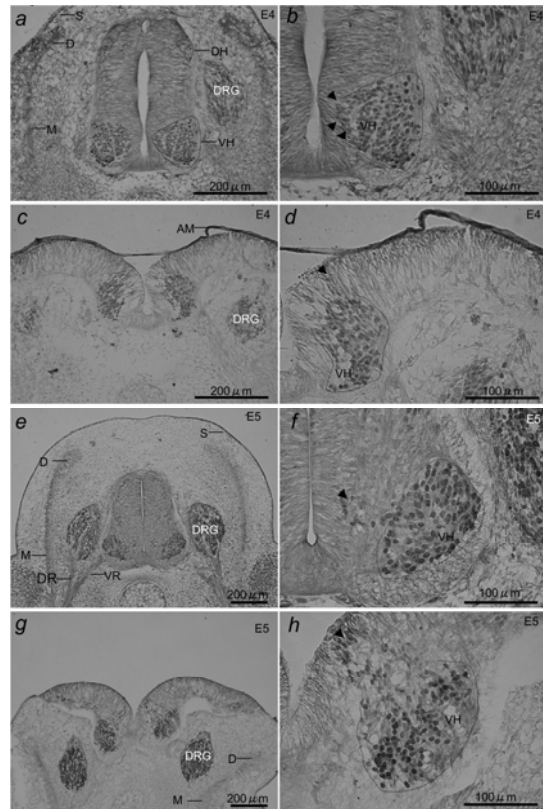


図2 4, 5日齢胚における第3腰髄領域のIslet-1陽性細胞の分布.

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

##### (2) 運動神経の発生中期(5.5, 6日齢胚) (図3)

5.5日に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。

一方6日になると両群ともに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。

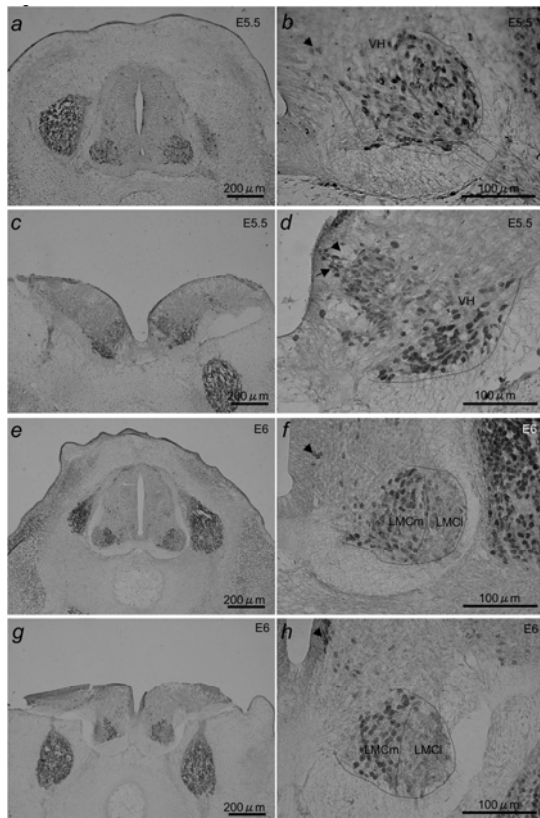


図3 5.5, 6日齢胚における第3腰髄領域のIslet-1陽性細胞の分布. a:正常発生例5.5日胚, b: aの前角領域, c:二分脊椎例5.5日胚, d: cの前角領域, e:正常発生例6日胚, f: eの前角領域, g:二分脊椎例6日胚, h: gの前角領域

### (3) 運動神経の発生後期 (7, 8, 9日齢胚)

7日になると前角が発達し正常では外側に, 二分脊椎では腹側に前角が張り出してくる。前角の内部も内側にIslet-1陽性細胞が集合し, 正常ではその外側に, 二分脊椎では腹側にIslet-1陰性細胞が集合する。9日になると, 正常ではIslet-1陽性細胞はほとんど見られなくなり, 細胞質がIslet-1弱陽性である運動ニューロンが前角を占めるようになった。

### (4) Islet-1陽性ニューロン数の変化 (図4)

正常ではIslet-1陽性ニューロンは初期に増加し, 5日にピークに達し, その後減少する。

一方, 二分脊椎ではこのようなピークは認められず, 緩やかに減少していた(図4)。

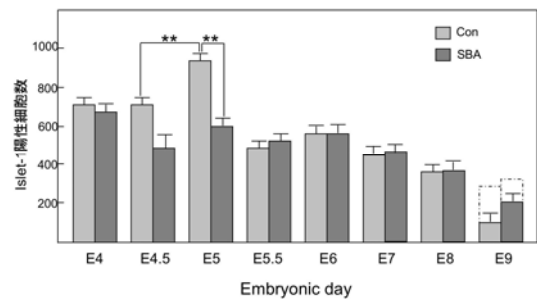


図4. 4~9日齢胚におけるIslet-1陽性細胞数の推移. Con:正常発生例, SBA:二分脊椎例. 値は平均値±標準偏差で示し, \*は有意差 $p < 0.01$ を示す。

### (5) 内転筋を支配する運動神経細胞の分布 (図5)

第1腰椎から第3腰椎の間の内転筋を支配する運動神経細胞数は, 正常発生例で $457 \pm 108$ 個であった。二分脊椎例のそれは $653 \pm 95$ 個で, 正常発生例よりも多い傾向を示したが, 統計的に有意な差ではなかった( $P < 0.07$ )。なお, 正常発生例における内転筋を支配する運動神経細胞数は第2~3腰椎を中心とした凸型をなしており, この結果はLandmesserのデータとほぼ一致する。また, 正常発生例における内転筋を支配する運動神経細胞の前角領域における配置も, Landmesserの報告と一致して, 前角のやや内側に塊状に分布していた。それに対して, 二分脊椎例の場合, 第1腰椎~第3腰椎の運動神経細胞は平板な, やや広がった分布となっていたばかりか, 正常発生例と異なり, 内転筋を支配する運動神経細胞の配置が特定の領域に集中せず, 前角領域の広範に分布していた。

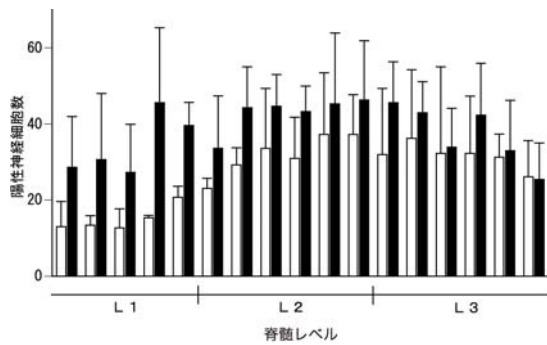


図5. 2日齢のヒヨコにおける内転筋を支配する運動神経数. □ : 正常発生例, ■ : 二分脊椎例. 値は平均値±標準偏差で示した。

#### (6) 結果のまとめ

本研究において正常発生例のIslet-1陽性細胞数は一過性に増加し、その後、徐々に減少していったが、二分脊椎例ではこのような一過性の細胞数の増加が見られない。むしろ、二分脊椎例では発生がちょうど24時間ほど遅れて進行していることを示唆していた。通常、正常に発生した胚の神経系の発生では細胞の過剰増殖とそれに続くアポトーシスによって標的を支配できない細胞が排除されることが知られている。このような発生過程がどの程度神経回路網の構築に寄与しているかは、不明な点が多いが、本研究で明らかになった正常発生例と二分脊椎例との間でみられた神経細胞動態の違いは、研究代表者の研究グループが2006年発表した論文で提示している二分脊椎症状態を呈する脊髄領域において神経細胞の初期発生異常が起こり、これが歩行障害の原因となるという仮説を支持していると思われる。当初、本研究で用いたclone39.4D5ハイブリドーマが産生する抗Islet-1抗体はIslet-1及びIslet-2を認識するとの報告もあり、平成20年度は予定を変更し、平成19年度の結果を再確認するためにより特異性の強いクローン40.2D4のモノクローナル抗体を用い結果の再現を試み、これの再現が観察された。

興味深いことに、このような発生の遅れは運動神経細胞数の減少には繋がっていなかつ

たが、正常発生例と二分脊椎例では内転筋を支配する運動神経細胞の脊髄配置の違いが見られた。すなわち、二分脊椎例の内転筋を支配する運動神経細胞の配置は正常発生例と異なり、L1-L3髄節に均一に分布していた。この結果は、本モデルの奇形領域において、見かけ上、正常であっても神経細胞の分化が正しく推移しないことを強く示唆している。

本研究では、歩行障害を起こす二分脊椎モデル動物において、二分脊椎様状態の脊髄で運動神経細胞の発生プロセスに異常が起こっている可能性を示した。したがって、十分な病態が解明されていない現状に置いて、母胎と胎児を危険にさらす可能性のある胎児手術を本奇形に適応することには効果に較べて、リスクが大きいのではないかとと思われる。しかしながら、二分脊椎症の病態は不明点が数多くあり、より詳細な解析を実施することによって胎児手術のメリットが再発見される可能性も否定できない。よって、当初の計画したように、数種類の抗体を組み合わせたさらなる実験を行う必要があると考えている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計3件)

①Shigemoto K, Kubo S, Chen J, Hato N, Abe Y, Ueda N, Kobayashi N, Maeda K, Mominoki K, Miyazawa A, Ishigami A, Matsuda S, Maruyama N, Myashtenia gravis experimentally induced with muscle-specific kinase, *Annals of the New York Academy of Sciences*, *Ann N Y Acad Sci*, 2008; 1132: 93-98.

②Chen J, Saito S, Kobayashi N, Sato K, Terashita T, Shimokawa T, Mominoki K, Miyawaki K, Sano A, Matsuda S, Expression patterns in alternative

splicing forms of prosaposin mRNA in the rat Facial nerve nucleus after facial nerve transection, Neuroscience Research, Neurosci Res, 2008; 60(1), 82-94.

③藤原 隆, 昆 和典, 樫木勝巳, 大沼俊名. 組織常在性線維芽細胞は新生血管の内皮細胞に分化する. 顕微鏡 43:90-94, 2008. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

①藤原 隆, 昆 和典, 樫木勝巳, 大沼俊名. 血管新生における線維芽細胞の血管内皮細胞への分化転換に関する形態学的研究. 第 40 回日本臨床分子形態学会総会ならびに学術集会, シンポジウム 3 「新生血管形成の基礎と臨床」, 福岡国際会議場, 福岡市, 2008. 10. 3-4.

②Fujiwara T, Kon K, Mominoki K, Oonuma T., A new mechanism of angiogenesis: Incorporation of tissue-resident fibroblasts into newly formed blood vessels and their concomitant transdifferentiation into vascular endothelial cells. 15<sup>th</sup> International Vascular Biology Meeting, Sydney, Australia, 2008. 6. 1-5.

③藤原 隆, 昆 和典, 樫木勝巳, 大沼俊名. 組織常在性線維芽細胞は新生血管の内皮細胞に分化する. 第 113 回日本解剖学会総会・学術集会, シンポジウム「線維芽細胞の多様性と分化転換」, 大分大学医学部, 由布市, 2008. 3. 27-29.

④樫木勝巳, 王敏, 絹谷政江, 藤原隆, 小林直人, 松田正司. 二分脊椎モデル動物の奇形脊髄領域の運動神経細胞の分化動態. 第 138 回日本獣医学会. 酪農学園大学, 江別市, 2007. 9. 2. -4.

[図書] (計 1 件)

① 藤原 隆, 樫木勝巳, 松田正司, 血管の構

造. 血管内皮細胞をめぐる疾患, 島田和幸編, 真興交易医書出版部, 東京, pp13-28, 2007

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

樫木 勝巳 (MOMINOKI KATSUMI)

岡山大学・自然生命科学研究支援センター・准教授

研究者番号 : 70304615

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

藤原 隆 (FUJIWARA TAKASHI)

愛媛大学・総合科学研究支援センター・准教授

研究者番号 : 30036496