

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18515

研究課題名（和文）脊髄電気刺激併用運動療法が損傷脊髄の機能回復を促進する分子生物学的メカニズム

研究課題名（英文）Molecular biological mechanism underlying improvement of functional recovery after the exercise therapy combined with the electrical stimulation of injured spinal cord

研究代表者

小早川 和（Kobayakawa, Kazu）

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：40772322

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：腰髄電気刺激療法と、電気刺激とトレーニング併用の効果をRNA-Seqを用いて解析した。脊髄半切後一回の腰髄電気刺激で、positive regulation of neuron differentiation, positive regulation of neurogenesis等のG0-term関連遺伝子の発現が優位に増加した。脊髄半切後に電気刺激と歩行訓練を1週間併用すると、neuron projection development, axonogenesis, synapse, myelinationなど軸索と髄鞘の再生促進を示唆するG0-termに含まれる遺伝子の発現が増加していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果、脊髄損傷後の脊髄電気刺激自体に脊髄内在性神経幹細胞のニューロンへの分化を促し、アストログリアを軽減する効果がある事が示唆された。また、組織学的にも電気刺激によってシナプス蛋白増加が起きる事が確認された。本研究結果は脊髄電気刺激と四肢トレーニングの併用が神経回路再構築を介して、脊髄損傷の運動機能回復を促進する可能性を示している。

研究成果の概要（英文）：The effects of electrostimulation (ES) of lumbar spinal cord or the combined use of ES and training were analyzed by using RNA-Seq. The expression of genes related to G0-term such as positive regulation of neuron differentiation or positive regulation of neurogenesis was significantly increased by single ES after hemisection of the spinal cord. When ES and training were used in combination for one week after spinal cord hemisection, the expression of genes related to G0-term such as neuron projection development, axonogenesis, synapse and myelination was increased, which suggests promotion of axon and myelin regeneration.

研究分野：脊髄損傷

キーワード：脊髄損傷 電気刺激 リハビリテーション シナプス

1. 研究開始当初の背景

長きにわたり再生不能と考えられてきた中枢神経にも実際には可塑性が存在する事が明らかとなり、かつては積極的治療困難とされた脊髄損傷においても機能回復を促進する治療法が次々に考案され、近年国内でも積極的に臨床試験が行われている。UCLA 等海外の研究機関で開発された脊髄損傷患者に対する脊髄電気刺激併用トレーニング療法は重症の麻痺が遺残した患者の随意運動を回復させる事が明らかになっており、一定の治療効果が証明され、今後種々の治療法と組み合わせる事によって効果が高まる事が期待される。しかしながら、この脊髄電気刺激併用トレーニング療法の効果に関する分子生物学的メカニズムは全く不明であり、またなぜ治療効果が限定的なのか、さらにはどうすれば実用的な患者の ADL を改善させるほどの効果が得られるのかは全く分かっていない。これら損傷脊髄の機能回復に関わる因子を網羅的に解析するため、動物実験によって脊髄損傷後に電気刺激併用トレーニング後に腰髄の RNA シークエンス (RNA-Seq) を行えば、全ての現象に関してバイアス無しに解析できる可能性がある。

しかし、損傷後の腰髄に変化を起こしたのが脊髄の電気刺激なのか、運動トレーニングなのか、それとも電気刺激と運動トレーニング両者の併用によってはじめて脊髄に変化が起きるのかすら不明である。そこで、申請者はまずラット脊髄半切を行なった後にトレッドミルで歩行訓練のみを行い、歩行訓練 17 日目の腰髄の RNA-Seq を行った。その結果、トレーニング群の腰髄では、非トレーニング群に比べて 36 種類ものシナプス関連遺伝子の発現が増加しており、その中でも興奮性シナプスの発生・新規構築に重要なポストシナプス蛋白の NGL-2 (netrin-G ligand 2) 陽性のシナプスが増加している事が明らかになった (Kobayakawa et al., *Neurorehabilitation and Neural Repair*, 2019)。この結果は、トレーニングだけでも損傷脊髄の腰髄におけるシナプスに変化を与え得る事を明らかにし、さらにはトレーニングに電気刺激を併用した際の影響も今回の解析手法によって探索する事が可能である事を示している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、RNA-Seq を用いて刺激を受けた脊髄の網羅的な遺伝子発現解析を行う事によって、脊髄電気刺激療法および脊髄電気刺激を併用したトレーニング療法の効果発現メカニズムを明らかにする事である。

3. 研究の方法

ラット胸髄半切後に腰髄電気刺激のみ行う群、腰髄電気刺激と歩行トレーニングを併用する群を作成し、腰髄電気刺激療法の遺伝子発現に与える効果と、トレーニングを併用した際に得られる効果を RNA-Seq を用いて解析する。また、マウス頸髄半切後に電気刺激を行い、頸髄電気刺激が頸髄のシナプス再構成と上肢運動機能回復に与える影響を解析する。

4. 研究成果

(1) ラット胸髄損傷後の腰髄電気刺激とトレーニングによる治療効果の解析

まず我々は、初回の電気刺激が腰髄に与える影響を RNA-Seq を用いて解析した。その結果、1 度の電気刺激が脊髄の “neurogenesis”, “neuron differentiation” などの神経再生に関与する遺伝子群の発現増加を引き起こす事が明らかになった(次項図 1)。神経幹細胞の marker である Sox2 の遺伝子発現が増加し、発生における neuron の分化と遊走に必要な Tcf4、シナプスの機能を調節する Vgf など、神経分化に関わる遺伝子 18 種類の増加が引き起こされる事が判明した。この事は脊髄内在性神経幹細胞の存在と、1 セッションの電気刺激で幹細胞のニューロンへの分化が開始される可能性と、更には継続的な電気刺激療法への反応のポテンシャルを暗示している。

そこで研究提案者らはさらに電気刺激を継続し、トレッドミルトレーニングを併用した後に再度 RNA-Seq 解析を行った。すると、“axon”, “dendrite” “neuron projection” 等、実際に神経細胞の分化やシナプス形成が起きたことを示唆する結果が得られた(次項 図 2)

1 回目の脊髄電気刺激によって “neurogenesis”, “neuron differentiation” 等の神経再生に関与する遺伝子群の発現増加が引き起こされ、継続的な電気刺激により “axon”, “dendrite”, “neuron projection” 等、実際に神経細胞の分化やシナプス形成が起きた事を示唆する遺伝子群の発現増加が起きたことから、電気刺激によって内在性神経幹細胞の分化が引き起こされた可能性が高い。近年、ヒトの神経幹細胞を培養中に電気刺激することで、アストロサイトへの分化を抑制し、逆にニューロンや脱髄した軸索の再髄鞘化に必要なオリゴデンドロサイトへの分化を促進したとの報告があり、我々の研究の結果を併せて考えると、生体内でも電気刺激により内在性の神経幹細胞の分化を調節して脊髄再生を促進可能である事を示唆している

(Tomaskovic-Crook et al., Adv. Healthcare Mater. 2019).

図 1: GO-term クラスタリング: 電気刺激でニューロン分化に関わる遺伝子発現が増加

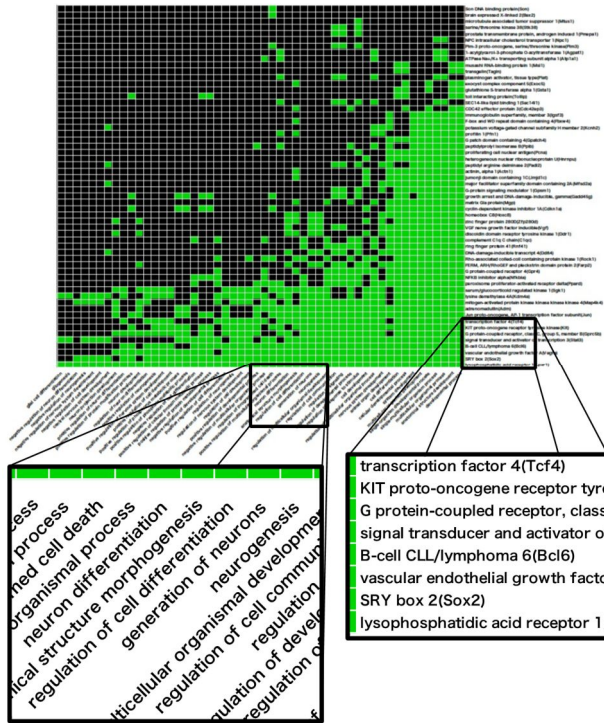
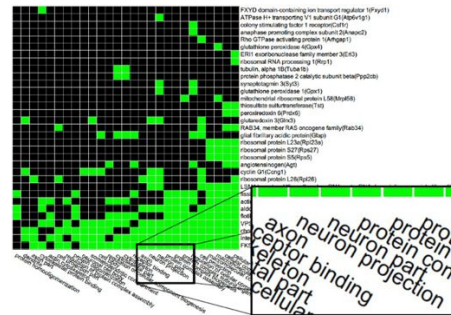


図 2: 脊髄電気刺激を継続すると neuron、軸索、シナプスに寄与する遺伝子発現が増加



(2) マウス頸髄損傷後の頸髄電気刺激が脊髄に与える影響の解析

これまで我々は、胸髄損傷後の電気刺激が腰髄や下肢運動機能に与える影響に注目して解析してきたが、頸髄損傷患者に対する経皮的脊髄電気刺激が上肢機能を回復させるという研究効果が海外から報告されている。そこで我々は、頸髄損傷に対する頸髄電気刺激が与える病態生理学的影響を解明するために、マウス頸髄半切後の脊髄電気刺激モデルを確立した。8 週齢 C57BL/6 マウスの第 5 頸椎椎弓を切除して第 5 頸髄右半側を切断し、第 7 頸椎椎弓を切除し、0.35 mm のエナメル線を第 4, 6 頸椎椎弓下硬膜外に尾側から挿入して設置した。第 1,2 胸椎椎弓と電極を瞬間接着剤で固定した。これにより安定的かつ愛護的に電気刺激する実験系を確立した(下図 3)。1 日 1 回 20 分間の電気刺激を Rectangular Pulse, 200 μsec, 50Hz, 1-4V の条件で実施したところ、電気刺激に伴い頸髄半切した対側の損傷尾側のニューロンにおける PSD95 の発現増加を認めた。この結果から、頸髄介在ニューロンに対する上位からの入力を増加させる試みが、脊髄電気刺激の神経回路再構築及び上肢運動機能回復を促す治療法につながる可能性が示唆された。

図 3: マウス頸髄半切後脊髄電気刺激モデル

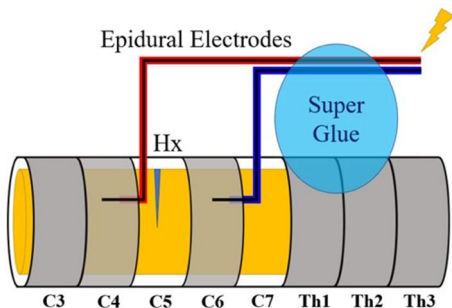
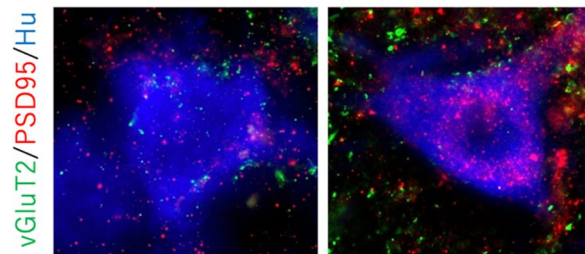


図 4: 電気刺激後の頸髄ではポストシナプス蛋白が増加
電気刺激なし 電気刺激あり



本研究の結果、脊髄損傷後の脊髄電気刺激自体に脊髄内在性神経幹細胞のニューロンへの分化を促し、アストログリオーシスを軽減する効果がある事が示唆された。また、組織学的にも電気刺激によってシナプス蛋白増加が起きる事が確認された。本研究成果は脊髄電気刺激と四肢トレーニングの併用が神経回路再構築を介して、脊髄損傷の運動機能回復を促進する可能性を示している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kawano Osamu, Maeda Takeshi, Mori Eiji, Takao Tsuneaki, Sakai Hiroaki, Masuda Muneaki, Morishita Yuichiro, Hayashi Tetsuo, Kubota Kensuke, Kobayakawa Kazu, Kaneyama Hironari	4. 巻 58
2. 論文標題 How much time is necessary to confirm the diagnosis of permanent complete cervical spinal cord injury?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Spinal Cord	6. 最初と最後の頁 284 ~ 289
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41393-019-0366-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Saiwai Hirokazu, Okada Seiji, Hayashida Mitsumasa, Harimaya Katsumi, Matsumoto Yoshihiro, Kawaguchi Ken-ichi, Iida Kei-ichiro, Kobayakawa Kazu, Yokota Kazuya, Maeda Takeshi, Tsuchiya Kuniyoshi, Arizono Takeshi, Saito Taichi, Nakaie Kazutoshi, Iwamoto Yukihide, Nakashima Yasuharu	4. 巻 83
2. 論文標題 Long-term outcomes of spinal meningioma resection with outer layer of dura preservation technique	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 68 ~ 70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jocn.2020.11.026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawano Osamu, Maeda Takeshi, Sakai Hiroaki, Masuda Muneaki, Morishita Yuichiro, Hayashi Tetsuo, Kubota Kensuke, Kobayakawa Kazu, Yokota Kazuya, Kaneyama Hironari	4. 巻 8
2. 論文標題 Significance of the neurological level of injury as a prognostic predictor for motor complete cervical spinal cord injury patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Spinal Cord Medicine	6. 最初と最後の頁 1 ~ 7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10790268.2021.1903139	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kobayakawa K, Ohkawa Y, Yoshizaki S, T, Saito T, Kijima Ken, Yokota K, Hara M, Kubota K, Matsumoto Y, Harimaya K, Ozato K, Masuda T, Tsuda M, Tamura T, Inoue K, Edgerton V. R, Iwamoto Y, Nakashima Y, Okada S	4. 巻 5
2. 論文標題 Macrophage centripetal migration drives spontaneous healing process after spinal cord injury	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eaav5086
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.aav5086	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kobayakawa Kazu, DePetro Kyleigh Alexis, Zhong Hui, Pham Bau, Hara Masamitsu, Harada Akihito, Nogami Jumpei, Ohkawa Yasuyuki, Edgerton V. Reggie	4. 巻 33
2. 論文標題 Locomotor Training Increases Synaptic Structure With High NGL-2 Expression After Spinal Cord Hemisection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurorehabilitation and Neural Repair	6. 最初と最後の頁 225 ~ 231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1545968319829456	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hata Kazuhiro, Kobayakawa Kazu, Saiwai Hirokazu, Tamaru Tetsuya, Iura Hirotaka, Haruta Yohei, Ono Gentarou, Kitade Kazuki, Maeda Takeshi, Nakashima Yasuharu, Okada Seiji	4. 巻 Publish Ahead of Print
2. 論文標題 Epidural Fat Tissue is More Effective for Scar Prevention Than Conventional Subcutaneous Fat Grafting After Laminectomy in a Mouse Model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Spine	6. 最初と最後の頁 online
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/BRS.0000000000004281	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 小早川 和
2. 発表標題 末梢血由来マクロファージの脊髄内求心性遊走は脊髄損傷後の自然回復過程を促進する
3. 学会等名 第93回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小早川 和
2. 発表標題 Tumor Attachment Angle: A new method for predicting dural attachment location of spinal meningioma
3. 学会等名 第49回日本脊椎脊髄病学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小早川 和
2. 発表標題 Interactive centripetal migration of macrophages and astrocytes enhances spontaneous recovery after spinal cord injury
3. 学会等名 第49回日本脊椎脊髄病学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kazu Kobayakawa
2. 発表標題 Locomotor Training Increases NGL-2-positive Synaptic Structure After Spinal Cord Hemisection
3. 学会等名 ISCOS2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小早川 和
2. 発表標題 マクロファージの求心性遊走は脊髄損傷後の自発的な治癒過程を促進する
3. 学会等名 第54回日本脊髄障害医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazu Kobayakawa
2. 発表標題 Centripetal migration of infiltrating macrophage drives spontaneous healing process after spinal cord injury
3. 学会等名 ORS2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------