

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 28 日現在

機関番号：82404

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24300197

研究課題名(和文)慢性期脊髄損傷をモデルとした神経回路の Manufacturing 戦略に関する研究

研究課題名(英文) Manufacturing neural circuit in chronic spinal cord injury models

研究代表者

赤居 正美 (AKAI, Masami)

国立障害者リハビリテーションセンター(研究所)・研究所・研究所顧問

研究者番号：80143452

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄損傷後のリハビリテーションを神経回路の可塑的環境の誘導と、反復訓練による運動プログラムの再獲得の両面からとらえた、可塑的環境誘導として活性化型p38投与によるミクログリア活性化、運動プログラムへの介入として免荷式歩行訓練とその効果を評価する無線式下肢筋電図による痙縮モニタリングを行った。ミクログリアの活性化は下肢運動機能の改善を誘導する事、痙縮モニタリングは重度な脊髄損傷ラットにおいてもリハビリテーションによる回復過程を鋭敏に捉えられる事が明らかとなった。脊髄損傷リハビリにおける薬剤併用、訓練前の適応症例選定、訓練効果の正確な判定、についての実験手法が整備された。

研究成果の概要(英文)：The process of rehabilitation for spinal cord injury consists of tissue reorganization and use-dependent plasticity. In the current study, we attempted to induce inflammation within injured spinal cord for tissue reorganization. We also established the assessment of spasticity during body-weight supported treadmill training. The delivery of dominant active p38 induced microglia activation, which leads to reduced scar and better motor function after spinal cord injury in mice. Spasticity was successfully monitored by wireless EMG implantation into hind limbs of rat. These experimental settings would enable us to develop novel rehabilitation strategy, including pharmacological intervention, precise pre- and post-training evaluation.

研究分野：リハビリテーション医学

キーワード：リハビリテーション 脊髄損傷 歩行機能 痙縮 ミクログリア

## 1. 研究開始当初の背景

運動に関連する組織の人為的改変 (manufacturing) は、細胞や組織が外的刺激や環境に応じて変化する性質を利用し、その外的刺激を適切に制御することで得られてきた。中でも中枢神経疾患における運動機能障害に対しては神経回路 (ハードウェア) の可塑的環境の誘導と、反復訓練による運動プログラム (ソフトウェア) の再獲得の両面からのアプローチが考えられる。

我々はこれまで慢性期脊髄損傷に対する部分免荷式歩行訓練をモデルに脊髄歩行プログラムの再駆動に必要な訓練要素を明らかにしてきた(Kamibayashi K, Akai M et al., *Exp Brain Res* 2010)。そしてステップ運動による荷重感覚入力脊髄内の歩行制御中枢の活動を高め、歩行の障害因子である痙縮・共収縮を抑えることを明らかにしてきた。こうした訓練効果は一回の訓練では数時間で消失するため、繰り返しの訓練を行うこととなるが、効果の定着のメカニズムは未だ不明であり、神経リハビリテーション分野の課題となっている。

神経回路の構築・再構築が活発に起こるのは、発育期の他には中枢神経疾患発症後の亜急性期である。慢性期になり組織反応や炎症が沈静化する時期になると機能回復も著しく得にくくなることが知られている。したがって、神経回路に一定の組織反応や炎症が存在することと、新たな神経プログラムが定着していくこととの間には関連があることが示唆される。

以上を背景に本研究では中枢神経疾患の神経回路への可塑性誘導を組織学的な要素とプログラムの要素の両面のコンビネーションで考え、脊髄損傷においてはその可塑性は組織の炎症反応と密接な関係がある、という仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は中枢神経疾患の慢性期のリハビリテーションにおいて、運動訓練の効果が定着するメカニズムの解明を通じて、それを促進する治療介入方法を考案することである。研究期間の目標としては、脊髄損傷に特徴的な下肢筋の共収縮・痙縮を指標として実験動物とヒトをリンクさせ慢性期脊髄損傷への訓練効果の定着を評価するシステムを構築すること、を設定した。

具体的には歩行訓練系として部分免荷式トレッドミル訓練をヒト脊髄損傷例とラット脊髄損傷モデルに対して行う。そして双方の実験系で下位脊髄神経回路の評価として歩行中の下肢伸筋群と屈筋群との筋電図をモニタし、共収縮が生じる頻度を定量評価とする「共収縮モニタリング法」を確立する。

痙縮がつよい慢性期脊髄損傷のヒト症例あるいはラットに対し上記の歩行訓練を行い、その効果を下肢筋電図モニタによって時間経過とともに観察する。訓練効果の定着のメカニズムを解析することを考慮し、訓練のみでは効果が一過性となるプロトコールを作成する。

こうした実験系は、慢性期脊髄損傷の歩行回復の分野に留まらず、リハビリ訓練の効果の定着を促進する基礎技術開発に汎用できるモデルとして様々な研究に用いられることが期待される。

## 3. 研究の方法

【ラットにおける歩行運動中の下肢筋電図測定システムの構築】

ヒトと動物 (ラット) の下位脊髄回路の興奮性を評価するために、歩行動作中の足関節屈筋と伸筋 (前脛骨筋と腓腹筋) の筋電図モニタを行なう。正常時は両者は交互の周期的な収縮パターンを示すが、脊髄回路の興奮性が異常亢進している場合には共

収縮(屈筋と伸筋の同時収縮)が生じるようになる。

ラットにおいては筋内に電極を留置し、皮下に設置した無線システムによって計測することを試みる。これによって長期間の繰り返し測定が可能になる。

#### 【脊髄損傷ラットでの共収縮モニタリング評価】

ラットへの脊髄圧挫モデルは定量的損傷を加えられる IH インパクトによって作成する。上記の方法で歩行中の下肢筋電図を測定する。

トレッドミル上の歩行、あるいは水中遊泳モデルを行い、評価は共収縮・痙縮パターンの出現頻度、波形によって行った。

#### 【慢性期脊髄損傷ラットに対するステップング訓練とその共収縮モニタリング】

脊髄損傷ラットに対し、部分免荷式のトレッドミル訓練を行なう。訓練はまず一日1回を1週間行ない、訓練前後の共収縮モニタリングによってその効果を評価する。

#### 【ミクログリア刺激法の検討】

ミクログリアは脊髄組織の中で外からの刺激に対し鋭敏に反応し、液性因子を分泌することで組織反応を誘導する。今回はその活性を人為的に誘導するために炎症の主要経路である p38 シグナルをターゲットとして介入を行う。刺激はミクログリア単離培養系、組織切片培養系、そして脊髄への刺激と段階を踏んで検討し、組織傷害性反応が少なく、神経保護・可塑性誘導反応の強い刺激方法を選択する。

#### 【脊髄組織への弱炎症反応誘導】

前年度のミクログリアの刺激条件を参考に、ラット慢性期脊髄損傷モデルに対して薬剤の腹腔内投与あるいは髄腔内投与を行なう。

組織学的解析により上記の炎症反応誘導を意図している領域でミクログリアの活性化が得られているかを確認し、必要に応じて局所の脊髄実質部への注入も検討する。炎症の程度は組織破壊が生じない程度の弱炎症である必要があるため、組織学的検討を行なうことで投与量を調節し、誘導される炎症の強度を設定する。また、組織サンプルの定量 PCR 解析によって炎症反応が誘導されている時期を同定する。

#### 【炎症反応誘導後の歩行機能解析】

脊髄損傷ラットの機能回復は行動観察法として確立している BBB スコア (ラット) あるいは BMS スコア (マウス) と、回転するロード上で歩行を維持できる時間を測定するロータロードテストにて行った。

## 4. 研究成果

(1) ラットへの下肢筋電図持続測定系の確立

ラットの筋電図測定システムの構築として、まず有線式の筋電図を使用した。有線式の筋電図では、トレッドミル上歩行におけるラット下肢筋電図の測定が可能になるまでの成果を得ることができた。しかしながら、繰り返しの測定に必要となるコネクタの安定設置に問題が数多く生じたため、代案として準備していた無線式の筋電図測定へと移行した。

無線式の筋電図は測定可能な筋肉の数に制限があるものの、安定した測定が可能となった。

(2) ラット水中遊泳条件での筋電図計測  
本研究でヒトと実験動物の評価の共通項となる痙縮は、脊髄損傷ラットのトレッドミル上歩行では一定度以上の重症度の脊髄損傷モデルでは観察が困難であった。そこで、ラットに対し 100cm の水路を作成し、

その区間を遊泳させるモデルを作成した。この手法は海外文献で脊髄切断ラットの痙縮を観察する実験系として報告されているが、脊髄圧座損傷ラットによる利用は初めての試みとなった。

脊髄損傷作成後のラットの遊泳を観察さらに、無線式筋電図にて下肢の筋活動を観察したところ、図1に示すような屈筋と伸筋の交互の活動を示す正常パターンと、図2に示す、屈筋と伸筋が同時に収縮する以上収縮パターンが一定の頻度で観察されることが分かった。

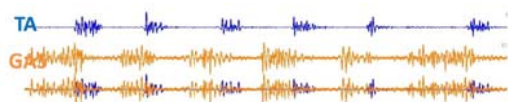


図1：脊髄損傷ラット遊泳中に観察される正常パターン of 下肢筋活動。上から前脛骨筋、腓腹筋、両者の重ね合わせ、を示す

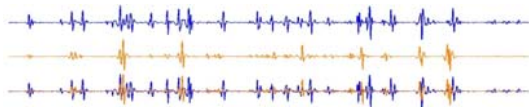


図2：脊髄損傷ラット遊泳中に観察される共収縮（異常）パターン of 下肢筋活動。上から前脛骨筋、腓腹筋、両者の重ね合わせ、を示す

本研究で行った圧座損傷は IH インパクターの設定値で 250kdyn で、一般的には重度の脊髄損傷モデルと考えられる。この重症度のラットはトレッドミル上では歩くことができず、痙縮の観察は困難だが、水中遊泳法によって痙縮を観察することができた。興味深いことにすべての脊髄損傷ラットで痙縮パターンが出現するわけではなく、約 6 割の個体で遊泳中の痙縮・共収縮パターンが観察された。

(3) 部分免荷式歩行訓練による下肢筋活動変化

250kdyn の圧座損傷ラットに対し、トレッドミル上の免荷式歩行訓練を実施した。2 週間の訓練期間で定期的に水中遊泳での評価を並行して行ったところ、訓練群（図3左）において遊泳中の異常筋活動の振幅が小さくなっていくことが観察された。一方、歩行訓練を施行しなかった群（図3右）においては振幅の変化は見られなかった。

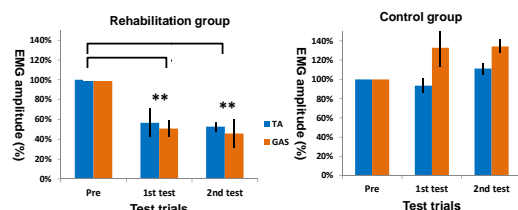


図3：脊髄損傷ラットへの歩行訓練期間における遊泳中筋活動の変化（左：訓練群、右：非訓練群）

また、こうしたラットの免荷歩行中の下肢筋活動を計測したところ、歩行に伴う目的な筋活動は訓練に伴って増大していくことが観察された（図4）

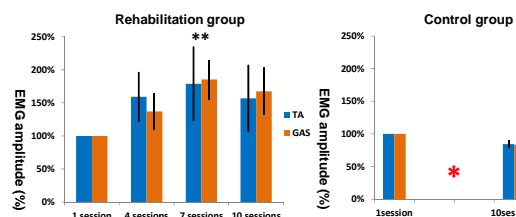


図4：脊髄損傷ラットへの歩行訓練期間における歩行中筋活動（左：訓練群、右：非訓練群）

以上の結果から、下肢筋活動モニタリングと水中遊泳モデルを組み合わせることで、重症度の高いラット脊髄損傷モデルにおいてもリハビリテーションの効果を鋭敏に捉えることが可能となった。

(4) 脊髄内ミクログリアの活性化の試み  
リハビリ効果の基礎となる可塑性を誘導

するため、脊髄内のミクログリアの活性化誘導を検討した。LPS 投与による方法と炎症反応の主要経路である p38 に対して活性化型 p38 蛋白を投与する方法を検討した。いずれの方法でも、脊髄内でミクログリア活性の指標である Iba1 の発現上昇とミクログリアの形態変化を確認することができた。

実験では、生体への負担が少ない活性化型 p38 たん白の投与を採択した。

ミクログリアの培養系を確立し、これに活性化型 p38 を投与したところ、培養液中に分泌される growth factor 群に変化が見られ、特に組織修復に寄与すると報告されている Glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) が上昇することが明らかとなった。

そこで、マウス脊髄損傷モデルに対し、活性化型 p38 の持続投与を行い、脊髄内のミクログリアを活性化させ、組織の再構築と可塑性の誘導を試みた。その結果、免疫組織学的解析では瘢痕組織の縮小が観察され、行動学的にはロータロッドテストとマウス BMS スコアの改善が得られた。

以上の結果からミクログリアの活性化によって機能回復が得られることが示された。

#### (5) 考察

一連の実験を通じて、損傷脊髄に炎症反応誘導をターゲットとした薬理介入を行い、機能回復が得られること、また、重症脊髄損傷におけるリハビリテーションの効果を下肢筋の痙縮の変化として捉える実験系がそれぞれ確立した。特に、痙縮のモニタリングでは脊髄損傷ラットの 6 割でのみ痙縮が観察されることが確認され、今後のリハビリテーションモデルの解析において、脊髄損傷ラットを痙縮の有無によって識別し

て扱う必要性が示唆された。

本研究の発展として、痙縮が観察されるラットあるいは、観察されないラットにそれぞれ活性化型 p38 投与による炎症誘導とリハビリテーション訓練を行い、その効果を痙縮を指標に捉える実験系が考えられる。本研究で示された方法により、脊髄損傷リハビリにおける薬剤併用、訓練前の適応症例選定、訓練効果の正確な判定、についての実験手法が整備されたと考えられる。

#### 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 1 件)

Tazoe T1, Endoh T2, Kitamura T3, Ogata T, Polarity specific effects of transcranial direct current stimulation on interhemispheric inhibition, PLoS One (査読有), 9(12), 2014, e114244, doi: 10.1371/journal.pone.0114244

[学会発表] (計 2 件)

① Hamanoue M, Morioka K, Hayakawa K, Nakajima K, Ogata T, Takamatsu K, Functional recovery from chronic spinal cord injury by the reactivation of endogenous microglia, Neuroscience 2015, 2015-10, USA (Washington, DC)

② Ryu YJ, Fujita N, Nishimura R, Ogata T, Rehabilitation reduces Spastic Muscular Hyperexcitability after Spinal Cord Injury, the 4<sup>th</sup> Annual Congress of AiSVS, 2014-6, 大阪国際交流センター (大阪府大阪市)

〔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：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

赤居 正美 (AKAI, Masami)

国立障害者リハビリテーションセンター

(研究所)・研究所・研究所顧問

研究者番号：80143452

### (2)研究分担者

浜之上 誠 (HAMANOUE, Makoto)

東邦大学・医学部・講師

研究者番号：00312025

緒方 徹 (OGATA, Toru)

国立障害者リハビリテーションセンター

(研究所)・病院(併任研究所) 障害者健康増進・スポーツ科学支援センター・センター長

研究者番号：00392192

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：