

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26750178

研究課題名(和文) 光遺伝学的手法を用いた脊髄損傷後の光リハビリテーション治療の開発

研究課題名(英文) Development of Light-Rehabilitation after spinal cord injury using optogenetics techniques

研究代表者

高島 健太 (Takashima, Kenta)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・特任研究員

研究者番号：80722751

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：オプトジェネティクスは特定の神経細胞の活動や行動を光で制御することが可能な手法であり、近年、標的神経回路の同定することで臨床の治療への応用が進んでいる。しかしながら、現在まで、オプトジェネティクスを用いて重症脊髄損傷後の歩行機能再建に成功した報告はない。我々はオプトジェネティクスと薬剤を用いて、完全麻痺後のchannelrhodopsin2-Venusトランスジェニックラットの2足歩行機能再建に成功した。これらの手法は重度の脊髄損傷後の後遺症のある患者の運動機能を改善する新たな手法として期待される。

研究成果の概要(英文)：Optogenetic techniques enable light-mediated control of specific neural activity or behavior. Recently, optogenetic techniques have been applied into therapeutic treatments through the identification of neural circuit targets. Until now, no therapeutic approach yet permits the restoration of locomotion after severe spinal cord injury (SCI) using optogenetic techniques. Here, we present that after complete paralysis of channelrhodopsin2-Venus transgenic (Chr2V+) rats, bipedal locomotion was restored by using a combination of optogenetic and pharmacological therapies. These techniques offer a potential method to improve the motor function of patients who have suffered severe spinal cord injuries.

研究分野：リハビリテーション、神経科学

キーワード：オプトジェネティクス 脊髄損傷 歩行機能再建

科学研究費助成事業 研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷は、様々な神経伝達路が障害されることによって、運動障害、感覚障害、自律神経障害などの多岐に渡る神経障害をきたし、患者の生活の質を著しく障害することが知られているが、現在まで対処療法以外の有効な治療法は確立されていない。これまで我々は、脊髄損傷モデルラットに対してマイクロ構造化した生体材料と神経細胞移植とを組み合わせた治療法を開発し、生着細胞の増加と神経線維の方向性を持たせることに成功したが、歩行機能回復への影響は限定的であった。さらに脊髄損傷後の歩行機能回復を促進させるためには、腰髄にある Central pattern generator (CPG) という脊髄介在神経細胞群の回路と CPG に投射する上脊髄性入力との神経回路を再構築する必要があるが、それには運動学習などのリハビリテーションで使用依存的な神経回路強化を行う必要がある。しかしながら、臨床的に通常のリハビリテーションでは効果は限られており、より運動機能回復効果の高いリハビリテーションが不可欠である。

近年、脊髄損傷の効果的なリハビリテーション治療法として腰髄硬膜下電気刺激リハビリテーションが注目されており、驚くことに完全運動麻痺患者が腰髄硬膜下電気刺激しながらリハビリテーションを行うことで、電気刺激中のみ課題依存的な下肢随意運動の部分回復が認められたと報告されている [Harkema S et al., Lancet 2011]。このリハビリテーション治療メカニズムは不明な点が多いが、Courtine G らは、腰髄硬膜下電気刺激が一過性に脊髄介在神経細胞を賦活化させることで、電気刺激中のみリハビリテーションの回復効果がみられたと考察している [Courtine G et al., Lancet 2011]。その脊髄介在神経細胞の中でも興奮性（グルタミン酸作動性）神経細胞が歩行様の電気活動を誘発すると報告されていることから [Häglund M et al., Proc Natl Acad Sci USA 2013]、興奮性脊髄介在神経細胞の賦活化が運動機能回復に寄与していると考えられる。一方で、臨床的にはバクロフェン（GABAB receptor agonist）投与が脊髄疾患の痙性を軽減し運動機能回復に寄与する報告もあることから [Penn RD et al., N Engl J Med 1989]、抑制性脊髄介在神経細胞の賦活化が運動機能回復に寄与しているとも考えられる。このように現在においても見解は一致していないが、病態に応じていずれかの脊髄介在神経細胞を刺激する方が治療効果上がる可能性は高い。しかし、腰髄硬膜下電気刺激では不特定の脊髄介在神経細胞（興奮性と抑制性神経細胞の両方）を刺激してしまうので、腰髄 CPG の脊髄介在神経細胞を賦活化する方法としては非効率であることが問題点として

挙げられる。つまり、ある特定の脊髄介在神経細胞群のみ（例えば興奮性神経細胞あるいは抑制性神経細胞）を刺激しながらリハビリテーションを行なえば、さらなる治療効果が得られる可能性がある。

近年、オプトジェネティクスとよばれる光遺伝学的手法を用いることで、光刺激によって特定の神経のみを刺激する手法が開発されている。現在の共同研究者である八尾寛教授らの研究室では、クラミドモナス由来の光感受性イオンチャネル（チャネルロドプシン）を遺伝子工学的に神経細胞膜に発現させることで、青色光照射で神経細胞だけを選択的に刺激する技術を世界に先駆けて報告している [Ishizuka T et al., Neurosci Res 2006]。八尾らが開発した Channelrhodopsin-2 (ChR2) は、青色光照射によって $H^+ \cdot K^+ \cdot Na^+ \cdot Ca^{2+}$ といった陽イオンを非選択的に通過させ、神経細胞が脱分極する一方で、光照射を止めるとすぐにチャネルが閉じる性質をもつ。この ChR2 以外にも、現在まで光活性化の波長や光電流キネティクス、発現効率などが改良されたキメラや変異体のチャネルロドプシンが多数開発されている [Yizhar O et al., Neuron 2011]。つまり、これらの光遺伝学的手法をリハビリテーション分野に応用できれば、電気刺激では不可能であった特定の神経細胞の活動制御が可能になり、光刺激によって活動を制御された脊髄介在神経細胞がどのように歩行機能に影響しているかが直接的に評価可能となる。そこで、本研究では光遺伝学的手法を用いた脊髄損傷後の新たなリハビリテーション治療いわば光リハビリテーションの開発を目指す。

2. 研究の目的

近年、脊髄損傷後の完全運動麻痺患者のリハビリテーション治療として脊髄硬膜下電気刺激下でリハビリテーションを行う治療法が注目されているが、電気刺激は特定の神経細胞を刺激することができないために神経機能への効果が限定されてしまう。しかしながら、分子生物学と遺伝子工学の発展により、特定の神経細胞のみを光刺激で制御することができる光遺伝学的手法が開発され、電気刺激に代わる神経細胞を制御する強力な手法となっている。そこで、本研究では光遺伝学的手法を用いた脊髄損傷後の新たなリハビリテーション治療いわば光リハビリテーションの開発を目指す。

3. 研究の方法

実験動物は Thy-1 プロモーター下でチャネルロドプシン-2 が遺伝子導入されたラット（Chop-2 Tg ラット）を用いた。ラットは脊髄を完全離断され、損傷 5-6 週間後に、青

色光を脊髄に安定的に照射するために脊髄窓を移植した。多光子顕微鏡で用いられる方法を修正し、脊髄窓はCPGが存在すると想定される部位を含む椎体 T12 部 ~ L2 部 (L1-S1) までの脊髄を可視化した。脊髄窓移植した翌日に、脊髄損傷ラットは完全免荷した状態で 2.54mm ピッチで7か所の脊髄部位を青色刺激 (1Hz, 500ms pulse width, 4 mW) し、運動解析を行った。また、次に、脊髄損傷ラットを 90%免荷し、トレッドミル 2 足歩行中の様々な光刺激条件下での運動解析を行った。青色光刺激は光強度 1mW/mm² のマイクロ LED チップを使用し、パルス幅 5ms, 頻度 10, 20, 40, 80Hz とパルス幅 500ms, 1Hz を検証した。

4. 研究成果

光遺伝学的治療を用いて脊髄損傷後の歩行再獲得を可能にするために、まず歩行運動を引き起こす最適な腰仙髄の光刺激部位を検証した。Chop-2 Tg ラットの T8 を完全離断し、脊髄損傷モデルラットを作製した。脊髄損傷 5-6 週間後に、青色光を腰仙髄に安定的に照射するために脊髄窓を移植した。脊髄窓を移植することによって、我々は歩行中枢神経回路 (CPG) が存在すると想定される椎体 T12 部 ~ L2 部の腰仙髄を可視化させることができた。脊髄窓を移植した翌日に、脊髄損傷ラットは完全免荷した状態で 2.54mm 間隔の 7 か所 (部位 1-7) の腰仙髄部位を青色刺激 (1Hz, 500ms pulse width, 4 mW) し、麻痺下肢の動作解析を行った (n=3)。部位 2-5 (L2-L5 segment) では他の部位と比べて大きな関節角度運動と左右交互運動の動作が光刺激中と後に観察された。特に部位 5 (L4-L5 segment) では、股関節、膝関節、足関節の関節運動が他の場所よりも有意に増加していた。これらの結果から、我々は脊髄損傷ラットに対するトレッドミル 2 足歩行中の光刺激部位として部位 4-5 (L3-L5 segment) を採用した。

我々は歩行運動を引き起こす最適な光刺激頻度とパルス幅を検証するために、脊髄損傷ラットを 90% 体重免荷した状態で、5 条件の青色光刺激下 (パルス幅 5ms, 頻度 10, 20, 40, 80Hz とパルス幅 500ms, 1Hz) でのトレッドミル 2 足歩行の動作解析を行った (n=6)。青色光刺激は光強度 1mW/mm² の LED チップを使用した。青色光刺激を行わない完全麻痺の脊髄損傷ラットではトレッドミル動作中のステップや動作は観察できないが、500ms, 1Hz の刺激条件下では、ステップ動作と関節運動がはっきりと観察された。青色光刺激 10 秒間の総関節角度変化量をそれぞれの青色光刺激条件で定量すると、特に 500ms, 1Hz の青色光刺激はトレッドミル動作中の膝関節、足関節の関節角度変化を有意に増加させた。さらに、この青色光刺激条件下では、ステップ時において左右交互運動も観察された。これらの結果から、完全麻痺の脊髄損傷ラットに対して、500ms, 1Hz, 1mW/mm² の青色

光刺激がトレッドミル動作中の光応答性歩行様動作を引き起こすことが示された。

この青色光刺激が引き起こす 2 足歩行動作をさらに促進させるために、セロトニンアゴニストと青色光刺激の併用効果を検証した。セロトニンアゴニストは動作解析の 10 分前に腹腔内投与し、脊髄損傷ラットを体重免荷 70% にした状態で、青色光刺激有り無しとのトレッドミル 2 足歩行解析を行った。セロトニンアゴニストと光刺激の併用治療した場合、2 足トレッドミル歩行中の股関節、膝関節、足関節の関節角度変化が改善し、足趾軌跡も大きく改善した。セロトニンアゴニストと光刺激の併用治療はステップ併用治療の関節角度変化量は有意に最も高かった。これらの結果から、セロトニンアゴニストと青色光刺激は、完全麻痺の脊髄損傷ラットの歩行再獲得を可能にさせた。光遺伝学的手法を用いた脊髄損傷後の歩行機能再建は有用であることが示唆された。

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)

Shih-Yin Chang, Takashima K, Nishikawa S, Niiyama R, Someya T, Onodera H, Kuniyoshi Y.

Design of small-size pouch motors for rat gait rehabilitation device. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2015:4578-81. doi:10.1109/EMBC.2015.7319413. 査読有

[学会発表](計 4 件)

高島健太、松久直司、ザラーピーター、嶋田啓、横田知之、関野正樹、八尾寛、染谷隆夫、小野寺宏

Optogenetics therapy for restoring locomotion after severe spinal cord injury, 第 39 回日本神経科学大会、2016 年 7 月 21 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

高島健太、松久直司、ザラーピーター、嶋田啓、李元領、横田知之、関野正樹、関谷毅、八尾寛、染谷隆夫、小野寺宏

オプトジェネティクスを用いた脊髄損傷後の歩行リハビリテーション治療の開発、第 51 回日本理学療法学会大会、2016 年 5 月 29 日、札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

高島健太、松久直司、ザラーピーター、嶋田啓、横田知之、関野正樹、八尾寛、染谷隆夫、小野寺宏

オプトジェネティクスを用いた中枢疾患治療 ~ 脊髄離断動物における歩行パターン回復、第 5 回東北脳科学ウィンタ

ースクール、2016年2月21日、小原温泉旅館かつらや会議室（宮城県白石市）

高島健太、松久直司、ザーラーピーター、嶋田啓、横田知之、関野正樹、八尾寛、染谷隆夫、小野寺宏

Optogenetic therapy for restoring locomotion after severe spinal cord injury、第7回光操作研究会、2015年12月4日、東京医科歯科大学（東京）

〔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：平成 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：平成 年 月 日

取得年月日：平成 年 月 日

国内外の別：

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高島 健太 (Takashima Kenta)

東京大学・大学院工学系研究科・特任研究員

研究者番号：80722751

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：