

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26882025

研究課題名(和文)サル脊髄損傷モデルにおける運動ニューロンの可塑的变化による機能回復機序の解明

研究課題名(英文)Functional recovery through plastic changes after spinal cord injury in primates

研究代表者

中川 浩(NAKAGAWA, HIROSHI)

京都大学・霊長類研究所・研究員

研究者番号：10732901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経損傷後、経過とともに一定の運動機能回復を示すことがある。これには、生体に本来備わっている神経可塑性変化が関与していることが知られている。本研究では、運動を司る神経回路および脊髄運動ニューロンの神経可塑性変化が寄与する可能性について検証した。その結果、自然経過とともに運動機能は回復し、運動を司る神経回路においては神経可塑性変化が認められた。本研究から、中枢神経損傷後の神経症状改善に関わる代償機構の一端が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：After the central nervous system (CNS) injury, motor functions are often recovered with natural course. It is known as to contribute to neuroplasticity. In this study, we investigated the relationship between recovery of motor functions and neural plasticity (neural circuits and spine of motoneuron). We found that motor functions were gradually recovered in conjunction with remodeling of neural circuits with natural course after spinal cord injury. This finding may contribute to develop therapy of CNS injury.

研究分野：リハビリテーション医学、神経科学

キーワード：脊髄損傷 運動ニューロン 神経可塑性

1. 研究開始当初の背景

四肢の随意運動を制御する主要な神経回路として、大脳皮質運動関連領野 皮質脊髄路 (脊髄介在ニューロン; げっ歯類の場合) 運動ニューロン 筋という下行性神経路が知られている。脳損傷や脊髄損傷などの中枢神経損傷により、神経細胞の死・変性、神経軸索の損傷が生じれば、この神経回路が破綻し運動機能は失われる。その失われた機能は傷害後、一定の自然回復を示すことがある。この自然回復には、神経ネットワークの可塑的・代償的变化が寄与していることが推定されるが、そのメカニズムには未解明な部分が多い。脊髄損傷のような神経軸索の損傷では、皮質脊髄路 (脊髄介在ニューロン; げっ歯類の場合) 運動ニューロン間の神経伝達が物理的に遮断されることにより運動機能が失われる。つまり、これら神経回路網の神経可塑性変化が運動機能回復において重要な役割を担うと考えられる。皮質脊髄路においては、げっ歯類、霊長類ともに代償性に神経回路網を再形成させることにより、運動機能回復の一旦を担っていることが報告されている。しかし、再形成された神経回路がどのように分布しているかという解剖学的なメカニズムについては未だ不明である。また、四肢の随意運動を制御する神経回路のうち、運動の入力部位である運動ニューロンについても不明な部分が多い。

2. 研究の目的

本研究では、霊長類モデルを用いて脊髄損傷後の運動機能回復と神経回路網の可塑性変化について、特に皮質脊髄路および運動ニューロンに着目して、行動学、解剖学的に明らかにすることを目的とする。具体的には、皮質脊髄路の神経再分布変化について順行性トレーサーを用いて変化様式を解析する。運動ニューロンについては、そのスパインを可視化し、シナプス様構造変化を解剖学的に明らかにする。運動機能回復とともに起こる神経可塑性変化を解析することにより、脊髄損傷後の代償性変化機構の神経基盤の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 脊髄損傷モデルの確立 (図1)

本研究では、運動を司る神経回路のひとつである皮質脊髄路に着目する。皮質脊髄路は、霊長類 (ヒトを含む) の手指巧緻動作と極めて密接な関係があるといわれている。手指の巧緻動作が発達している霊長類では、皮質脊髄路の一部が直接運動ニューロンに結合する直接回路を有するが、手指の巧緻動作が不十分なげっ歯類では、このように直接結合する神経回路は有していない。この霊長類特異的な神経回路に焦点をあてるには、手指に運動障害が出現し、かつその運動機能が回復するモデルを確立する必要がある。そこで、手

首および指の運動が障害される頸髄7/8損傷モデルの作製を行った。損傷範囲は、神経軸索枝が伸長するルートを確認するため外側2/3が損傷されるモデルを用いた。

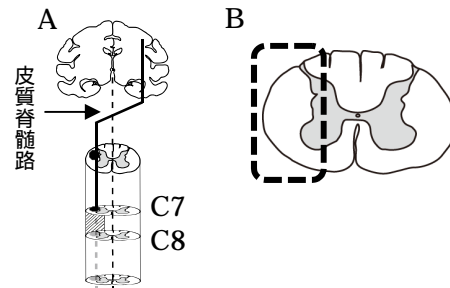


図1. 脊髄損傷モデル。(A) 頸髄領域において、皮質脊髄路が損傷される。斜線部分は損傷領域を示す。(B) 皮質脊髄路領域を含む外側2/3が損傷される。点線部分は損傷範囲を示す。

(2) 脊髄損傷後の運動機能解析 (図2)

本脊髄損傷モデルにおいて、自然経過に伴い運動機能の回復が見られるか否かについて、手指の運動機能評価である Reaching/Grasping task (腕を伸ばし指を使って小さい餌をとる能力を測定) を用いて解析を行った。運動機能解析は、損傷後、3、5、7、10日目に行い、その後1週間に2回の頻度で14週間にわたり続した。

A



図2. 行動課題 (Reaching/grasping task). (A) 通常、第1指と第2指の指腹でエサを正確に把持する。

(3) 皮質脊髄路の可塑性変化の解析

脊髄損傷後、全ての運動機能解析を行った後、麻痺側を主に制御している対側大脳皮質一次運動野に順行性トレーサー (BDA) を注入し、損傷部位以下で皮質脊髄路の軸索枝がどのように再形成しているのかを解析した。Rexed 分類を用いて脊髄を各領野にわけ、領域毎の軸索投射パターンを解析した。また、BDA ラベルされた皮質脊髄路のシナプス様構造の有無についても同様に解析を行った。皮質脊髄路の可塑性変化を解析するにあたり、脊髄損傷を施していないノーマルコントロールについても、同様の方法を用いて検討を行った。

(4) 脊髄運動ニューロンの可視化

脊髄損傷後、運動機能の回復に伴う運動ニューロンの可塑性変化を解析するためには、運動ニューロンを解剖学的に詳細に解析する必要がある。そのため、指を動かす筋肉に逆行性レンチウイルスベクター（GFP を発現させている）を注入し、運動ニューロンを逆行性に標識した。指の筋を同定するため、事前に刺激装置を用いて直接筋に電気刺激を加え指の動きが惹起されるのを確認した。約1か月後脊髄を取り出し、免疫染色（GFP）を行い可視化した。

別法として、ゴルジ染色法を用いた。未固定状態の脊髄をゴルジ染色用の各染色液に浸した。その後、ピラトームを用いて各領域200 μ m ずつの切片を作製した。

4. 研究成果

(1) 脊髄損傷モデル

手指機能の回復過程を詳細に調べるため手指機能を支配する領域である頸髄7/8領域において外側部位（皮質脊髄路が位置する部位）が傷害されるモデルを作製した。皮質脊髄路が実際に傷害されているか否か BDA を用いて確認した。その結果、損傷部より上位の領域においては、脊髄側索部に BDA 陽性神経軸索が観察されたが、傷害部位以下では、その神経軸索を確認することはできなかった。一方、本脊髄損傷モデルでは、脊髄内側の1/3は損傷を免れている。その領域には、損傷部位を越えようとする神経軸索枝が観察された。運動機能については、手指領域特異的に運動障害がみられた。これらの結果、手指の運動障害が起こる皮質脊髄路損傷モデルを確立することができた。

(2) サル脊髄損傷後の運動機能回復

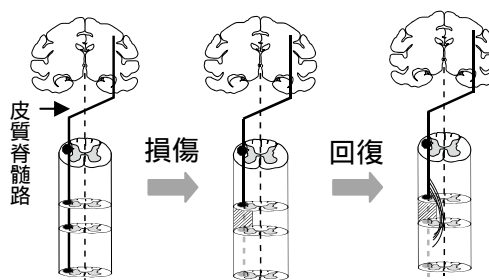
脊髄損傷後より約3ヶ月間の運動機能変化（Reaching/grasping task）を解析した結果、脊髄損傷直後は神経回路網の破綻に伴い手指の運動機能は著しく低下したが、時間経過に伴い徐々に回復することが分かった。また、横のスロットに比べ縦のスロットの方がより改善する傾向にあることが示された。機能回復は、個体間にバラツキがみられたが、全ての個体において観察された。これらの結果は、成熟した中枢神経においても、運動機能を回復させるための可塑性変化が備わっていることを示唆している。

(3) 皮質脊髄路の再編成メカニズム(図3)

運動機能の回復が見られた後の皮質脊髄路の解析において、軸索の一部は損傷部位を越えて脊髄内に分布していた。脊髄損傷を施していないノーマルコントロールについては、BDA ラベルされた皮質脊髄路全体の約10 - 20%が運動ニューロンが位置する IX 層に投射していた。脊髄損傷後、運動機能の回復とともに、その投射パターンがどのように変化するのかについて詳細に解析した結果、運動に直接寄与する神経細胞が少ない領野（脊髄背側部）への軸索投射は減少していたが、逆に運動に直接寄与する運動ニューロン

が豊富に存在する IX 層により多くの軸索が投射していることが明らかとなった。その他の領野については、顕著な変化は観察されなかった。シナプス様構造の形成についても、軸索投射している割合と同様に脊髄背側部の形成割合は低下しており、逆に IX 層には多くのシナプス様構造が観察された。これらの結果は、サル脊髄損傷後において、少ない神経軸索枝を効率的に IX 層に投射させることにより、効果的に運動機能を代償しようとするメカニズムが働いている可能性を示唆している。

A



B

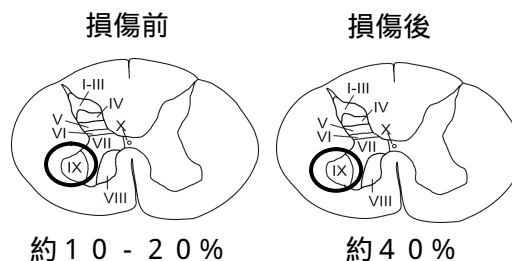


図3. 皮質脊髄路再編メカニズム。(A) 脊髄損傷後の機能回復過程を示す。脊髄損傷により、皮質脊髄路が外傷性に損傷される。それに伴い手指機能の障害が出現するが、時間経過とともに一部の機能は回復する。機能回復とともに損傷された皮質脊髄路の一部は損傷範囲を越えて、新たな神経回路を形成する。(B) Rexed 分類による脊髄領野を示す。脊髄損傷前では、皮質脊髄路全体の約10 - 20%が Lamina IX(黒部分)に分布するが、脊髄損傷後、新たに形成された神経回路では、約40%までその割合は増加する。

(4) 運動ニューロンスパインの可視化および可塑性変化

はじめに、ノーマルコントロール個体を用いて、運動ニューロン分布およびその形態について解析を行った。当初予定していた逆行性ウイルスベクターを用いた結果では、指の筋肉を直接制御している運動ニューロンを逆行性に可視化することはできた。しかし、運動ニューロンのスパインについては、その形態、数等を詳細に解析するまでの明瞭さを得ることは困難であった。そこで、ゴルジ染

色法に変更してスパインの可視化について再検討を行っている。

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 1 件)

Nakagawa, H., Ninomiya, T., Yamashita, T. and Takada, M. (2015) Reorganization of corticospinal tract fibers after spinal cord injury in adult macaques. Sci Rep 5: 11986. 査読有
DOI: 10. 1038/srep11986

〔学会発表〕(計 6 件)

Nakagawa, H., Ninomiya, T., Yamashita, T. and Takada, M. The pattern of reinnervation of sprouting corticospinal tract fibers after spinal cord injury in macaques. Society for Neuroscience 2015, Chicago (10. 17-21, 2015)

Nakagawa, H., Ninomiya, T., Yamashita, T. and Takada, M. Reinnervation of corticospinal tract fibers after spinal cord injury in macaques. 第 38 日本神経科学大会, 神戸 (2015, 7, 28-31)

Nakagawa, H., Ninomiya, T., Yamashita, T. and Takada, M. Reorganization of corticospinal tract fibers after spinal cord injury in macaques. The 50th Japanese Physical Therapy Association, Tokyo (2015.6.5-7)

Nakagawa, H., Ninomiya, T., Yamashita, T. and Takada, M. Role of RGMa in recovery of motor functions after spinal cord injury in macaques. 11th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society, Göttingen, Germany (2015.3.19)

Nakagawa, H., Ninomiya, T., Takada, M and Yamashita, T. Role of RGMa inhibition in recovery of motor functions and axonal regeneration after spinal cord injury in macaques. Neuroscience 2014 Kanagawa (2014.9.11-13)

中川浩, 二宮太平, 高田昌彦, 山下俊英手指屈筋由来の運動ニューロン分布とサル脊髄損傷後の手指機能回復について. 第 49 回日本理学療法学会学術大会, 神奈川 (2014.5.30-6.1)

〔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:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等
京都大学霊長類研究所統合脳システム分野
http://www.pri.kyoto-u.ac.jp/sections/systems_neuroscience/index.html

6. 研究組織
(1) 研究代表者
中川 浩 (NAKAGAWA HIROSHI)
京都大学・霊長類研究所・研究員
研究者番号: 10732901
(2) 研究分担者
なし
(3) 連携研究者
なし