

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 28 日現在

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06593

研究課題名(和文)新規薬剤LOTUSと歩行訓練併用療法による霊長類脊髄損傷からの二足歩行再建

研究課題名(英文)Combining LOTUS and rehabilitation therapy after for restoration of locomotor function after spinal cord injury in primates.

研究代表者

近藤 崇弘(Kondo, Takahiro)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任助教

研究者番号：70759886

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)：今回の研究では、新規薬剤のLOTUSが皮質脊髄路を伸長させる可能性が示唆された。一方で、小型霊長類においては重度脊髄損傷後に歩行リハビリが四足歩行機能を再建させ、さらにリハビリ群では皮質・脊髄間の機能的な神経接続が示唆されたものの、リハビリ単独では二足歩行の再建までには至らなかったことがわかった。今後は両者の治療法を組み合わせることで、二足歩行を再建させることが重要であり、現在併用療法を遂行中である。

研究成果の概要(英文)：In this study, it was suggested that LOTUS, a novel drug, could extend the corticospinal tract. On the other hand, in small primates, locomotor rehabilitation reconstructed the quadrupedal locomotion function after severe spinal cord injury, and functional neural connections between the cortex and the spinal cord were suggested in the rehabilitation group. However, it was found that bipedal walking does not recover only with rehabilitation treatment. In the future it is important to reconstruct bipedal locomotion by combining the therapies of both, and is currently undergoing combination therapy.

研究分野：生理学

キーワード：リハビリテーション LOTUS マーモセット

1. 研究開始当初の背景

二足歩行は姿勢制御を必要とする極めて巧妙な身体運動であり、近年の脳活動イメージング法によりヒトやサルは二足歩行運動中に脳が活動していることが知られている。そのため、脊髄が損傷を受けて脳から損傷下部への指令が断たれてしまうと、歩行運動が再建できなくなってしまう。一方、げっ歯類やネコは二足歩行ができないが、完全脊髄切断後もトレッドミルによる歩行訓練で四足歩行が再建できることが知られている (Rossignol and Frigon, *Annu. Rev. Neurosci.* 2011)。これらの背景から、二足歩行再建の治療研究では霊長類を用いた損傷モデルで、大脳皮質から脊髄へ投射する皮質脊髄路神経線維を再生させることが必要と考えた。

中枢神経系は抹消神経系と異なり再生能が著しく低いが、その原因として脊髄損傷後、損傷部周囲に軸索伸長を阻害する因子が多数発現することが考えられている。その中でもNgR1は最も重要な軸索伸長阻害因子と考えられている (Fouad et al., *Eur J Neurosci.* 2004)。横浜市立大学の竹居らが同定したLOTUSは (Sato et al., *Science* 2011)、Nogo-A, MAG, OMgp, CSPG, BLysのNgR1に対する結合をほぼ完璧に阻害し (Kurihara et al., *Mol Cell Neurosci.* 2014)、新たな軸索伸長薬として期待されている。

一方で薬剤治療により軸索の再生が得られても、再生した軸索が正しく接続されない場合、その再生軸索は再度刈り込みを受けてしまい運動機能回復に寄与できなくなってしまうため、これを防ぐためにはリハビリテーション療法を併用し損傷下部において再生軸索の機能的な再接続を促す必要があることがわかっている (Garcua-alias et al., *Nat Neurosci.* 2009)。これらの知見から、霊長類において軸索伸長薬剤療法と歩行リハビリテーション療法を組み合わせると、二足歩行の再建が可能になるかもしれないと考えた。

2. 研究の目的

脊髄損傷による歩行障害は社会復帰を妨げる大きな要因となっている。これまで脊髄損傷患者の歩行機能が回復しない原因として、霊長類は歩行制御に関して大脳皮質からの入力を多く必要としていることが考えられる。これまでのげっ歯類の研究により、リハビリテーション療法は軸索伸長効果のある薬剤療法などと併用することで断絶した脳脊髄間の神経を再接続させ、運動機能を回復させることが知られている。申請者は小型霊長類であるコモンマーモセット脊髄損傷モデルに対する二足歩行訓練療法と新規軸索伸長薬剤であるLOTUSを併用することで、霊長類脊髄損傷モデルにおける二足歩行を再建させることを目指した。

3. 研究の方法

本研究では小型霊長類のマーモセット胸髄損傷モデルにおいて、LOTUS投与・歩行訓練併用療法による二足歩行再建を目指す。前段階として、LOTUSタンパクを脊髄損傷部に十分量投与できる系を確立し、ラット脊髄損傷モデルを用いて効果の検証を行った。さらにマーモセット脊髄損傷モデルに対して歩行訓練の効果の検証を行った。

4. 研究成果

1) 脊髄損傷ラットを用いた LOTUS の軸索伸長効果の検討：

損傷部に LOTUS タンパクを持続投与する手法として、申請者は LOTUS を過剰発現させるアデノ随伴ウイルス(AAV)を脊髄に注入する方法を確立した(図 1A)。この方法により LOTUS_AAV を脊髄注入し、LOTUS タンパクの発現上昇した 2 週間後に第 4 頸髄にて後索切断を行った。神経トレーサーである BDA (biotinylated dextran amine)を用いて皮質脊髄路を可視化したところ、損傷 4 週後に皮質脊髄路の伸長を確認した(図 1)。

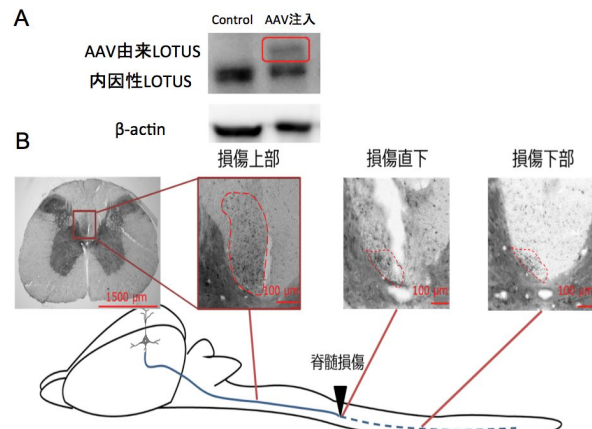


図1. 脊髄損傷ラットでの検証。A: LOTUSタンパク発現を確認。B: LOTUS投与個体で損傷尾側で皮質脊髄路繊維を確認。

2) 脊髄損傷マーモセットを用いた二足歩行訓練効果の検証：

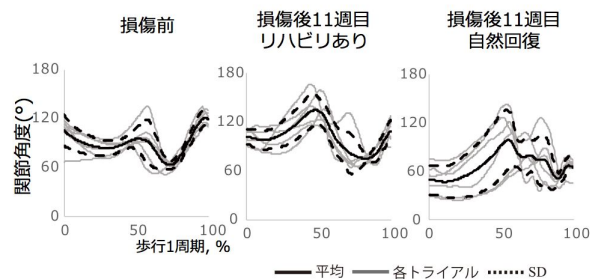


図2. 脊髄前後における股関節の角度変化
第 11 胸髄圧挫手術(250kdyn)を施行し、下

肢筋群の萎縮が顕著となる損傷後2週後から3週間、トレッドミル歩行訓練を実施した。運動機能回復の程度を詳細に検討するため、ハイスピードカメラを用いて歩行運動中の運動力学的解析を行った。後肢4関節の角度変化について、損傷前と損傷後の相関解析を行ったところ、リハビリ群 (n=2)では非リハビリ群 (n=2)に比べて歩容が損傷前に近づくことが明らかとなった (図2)。

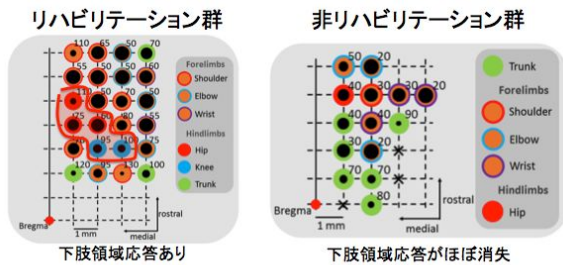


図3. 微小電気刺激による下肢領域の応答

また皮質-脊髄間の機能的接続の有無を調べる目的で運動野を針電極により微小電気刺激し、下肢筋群の活動を記録することで、損傷上下部において電気的な再接続が獲得されているか確認した。非リハビリ群では下肢運動野を刺激しても下肢筋群の筋収縮が認められなかったが、リハビリ群においては近位筋群の筋収縮が認められ、皮質-脊髄間が機能的に接続されていることが示唆された (図3)。

今回の研究ではこのように、新規薬剤の LOTUS が皮質脊髄路を伸長させる可能性が示唆された。一方で、小型霊長類においては重度脊髄損傷後に歩行リハビリが四足歩行機能を再建させ、さらにリハビリ群では皮質-脊髄間の機能的な神経接続が示唆されたものの、リハビリ単独では二足歩行の再建までには至らなかったことがわかった。今後は両者の治療法を組み合わせることで、二足歩行を再建させることが重要であり、現在併用療法を遂行中である。

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)

近藤崇弘, 篠崎宗久, 岡野栄之「脊髄損傷と再生医療」総合リハビリテーション, 2017,45,27-31, 査読無し

〔学会発表〕(計3件)

R. Saito, T.Kondo, K.Yoshino, Y. Sato, M. Tanaka, M. Nakamura, H. Okano, J Ushiba:

Treadmill locomotion training improves motor cortex functional map and range of motion in hindlimb joint in spinalized common marmosets.第40回日本神経科学

大会, 幕張メッセ(千葉県千葉市)(2017, 7.20-23)

齊藤璃紗, 近藤崇弘, 吉野紀美香, 佐藤裕太, 田中桃香, 中村雅也, 岡野栄之, 牛場潤一

マーモセット脊髄損傷モデルを用いた歩行リハビリテーションによる歩行機能回復メカニズムの解明, 第6回日本マーモセット研究会大会, 東京大学農学部弥生講堂(東京都文京区)(2016, 12,12-14)

中村堯史, 近藤崇弘, 吉野紀美香, 小杉亮人, 武見充晃, 入来篤史, 岡野栄之, 牛場潤一

脊髄損傷コモン・マーモセットにおける歩行訓練による皮質機能回復プロセスの検討, 第6回日本マーモセット研究会大会, 東京大学農学部弥生講堂(東京都文京区)(2016, 12,12-14)

〔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

慶應義塾大学・医学部・生理学教室・岡野研究室 <http://www.okano-lab.com>

6. 研究組織

(1)研究代表者

近藤 崇弘 (KONDO TAKAHIRO)

慶應義塾大学・医学部・特任助教
研究者番号: 70759886

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし