

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591979

研究課題名(和文) 歩行障害を示す二分脊椎モデル動物における神経機能障害の病態に関する基礎的研究

研究課題名(英文) Basic research on the pathophysiological sequences of neural development on the affected spinal cord using the animal model of spina bifida aperta

研究代表者

縦木 勝巳(MOMINOKI KATSUMI)

岡山大学・自然生命科学研究支援センター・准教授

研究者番号：70304615

研究成果の概要(和文)：脊髄先天性奇形の一つである二分脊椎症における奇形脊髄領域での神経細胞発生異常の有無に注目し，歩行障害を再現できる二分脊椎モデルの病態を調べた．その結果，脊髄が見かけ上正常例と区別できない状態であったとしても神経回路網の形成は正常例とは異なる可能性が示唆された．これらの結果から二分脊椎症患者の歩行障害発生を引き起こす病態についてはさらなる検討が必要であると結論できる．

研究成果の概要(英文)：This research was carried out to determine whether the neural disruption in spina bifida model animals with the leg dysfunction was occurred or not. the research suggested that the affected spinal cord to create spina bifida in the model lead to the neural disruption, regardless of the normal appearance of the developed spinal cord on the surface.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小児外科学

キーワード：二分脊椎症・疾患モデル動物・歩行障害・神経発生異常・運動神経・神経伝導路

## 1. 研究開始当初の背景

これまでの二分脊椎症の研究，特に，本症への胎児手術適応に関する研究では，

(1)二分脊椎症の胎児でも脊髄神経組織は正常に発生し，当初，組織学的異常が認められない．

(2)第三四半期以降の胎児や新生児では脊髄神経組織の欠損が見られる．

(3)妊娠中期(75日目)までにヒツジ胎仔を外科的に処置し，脊髄を羊水環境に暴露させ

ると前項目を再現し，出産後(妊娠150日目)，後肢骨格筋は機能障害を示す．

(4)上記のヒツジ胎仔の開放脊髄を，開放処置25日後に再閉鎖すると，脊髄組織が保存され，脳奇形や後肢骨格筋機能障害が起こらないことが報告されている．

以上から，ヒト二分脊椎症患者で顕在化する身体障害等の併発症は，「羊水環境へ長期暴露による脊髄組織の単純な損傷」が引き起こし，「暴露時間の短期化によって脊髄組織

の保存と併発症の発症抑制が期待できる」との学説が提示された。この学説を基に、米国を中心として二分脊椎症の胎児に対しての子宮内手術が実施されている。しかし、この手術を施しても脳奇形や身体障害を抑制しないというレポートが複数の臨床研究グループから発表されている等この奇形の病態について議論が錯綜している。この病態を明らかにするには動物モデルを用いた実験的な解析が必要である。

## 2. 研究の目的

脊髄先天性奇形の一つである二分脊椎症の患者では、脊髄の奇形以外にも水頭症やアーノルド・キアリ奇形といった脳奇形や歩行障害等が併発することが知られている。胎児手術を本症に適用するには、患者の体で起こっているのか具体的な病態の把握が、その効果とリスクの判定に不可欠であるが、その病態は未だ不明な点が数多く残されている。本申請研究は、研究代表者らが開発した歩行障害を示す二分脊椎ニワトリモデル(図1)を用い、前述の学説の出発点となっている(1)の事実が正しいのか否かを明らかにすることである。すなわち、歩行障害を示す二分脊椎症モデル動物での、歩行障害の病態を明らかにし、二分脊椎症の胎児手術適用の判定となる基礎的なデータを得ることを目的に実施する。



図1. 2日齢正常発生例(a)と腰椎(b)、胸椎(c)二分脊椎ヒヨコ。

## 3. 研究の方法

すべての動物実験は岡山大学動物実験委員会の承認を得た後、実施した。麻酔が必要な場合は、ジエチルエーテルの吸入あるいはペントバルビタール(40mg/kg)の腹腔内投与を行った。

### (1) 二分脊椎胚の作成

白色レグホンの有精卵を39.5°Cで約72時間インキュベートして得た Hamburger and Hamilton stage 18-19 に相当するニワトリ胚の第26体節位(第6胸椎後部及び第7胸椎前に相当)から尾側に向かい7体節分切開し、二分脊椎胚を作成した。手術後、卵殻の穴を透明なテープで覆い孵卵器に戻した。対照群においては蓋板の切開以外は二分脊椎例と同様の処理を行った。

### (2) モノクローナル抗体の作製

モノクローナル抗体は DSHB(アイオワ州立大学運営)からハイブリドーマ(clone: 39.4D5 [Islet-1 及び Islet-2 を認識], 40.2D6[Islet-1 のみを認識])を入手し、10% FCS を含む D-MEM 培地で約10日間培養した培養上清からプロテイン G カラムを用い、モノクローナル抗体を精製した。その後、回収した画分をゲル濾過クロマトグラフィーカラムにアプライし、約150 kDa に相当する画分を集め、実験に使用した。

### (3) 二分脊椎例における運動神経細胞の分化異常の追跡

適当なステージに達したニワトリ胚を心還流法で固定し、固定後第2-4腰椎位に相当する領域を切り出した。切り出した材料を用い、15 $\mu$ mの凍結切片を作成し、免疫染色を行った。1次抗体には前述のモノクローナル抗体を用い、2次抗体にはビオチン化あるいは蛍光化抗マウス抗体を用いた。陽性細胞数を第3腰椎節相当の領域の切片3枚毎に数えた。データは平均値±標準誤差で示し、群間差は分散分析の後にBonferroniの多重比較法を用いた。

### (4) 二分脊椎例における後肢内転筋群を支配する運動神経細胞の比較

二分脊椎処置を行った胚を孵化させ、孵化24時間後にcockroach様歩行する個体(内転筋機能障害ひよこ)を選別した。その後、5% wheal germ agglutinin (WGA) - horseradish peroxidase (HRP) を含むタイロド液を右内転筋に注入した。注入24時間後、心還流固定し、第5胸椎部から第3腰椎部分を採取した。これから15 $\mu$ mの凍結切片を作成し、神経細胞体に逆行性に取り込まれたWGA-HRPを検出した。細胞数をカウントするために、標本の脊髄前角領域の200倍の顕微鏡画像から、内転筋支配運動神経細胞をカウントした。すなわち、逆行性標識によりトレーサーが顆粒状に運動神経細胞上で認められ、かつ細胞に核が含まれているものをカウントした。データは連続した5枚の合計(750 $\mu$ m相当)をグループにまとめ平均値±標準偏差で表記した。

### (5) 二分脊椎例における知覚伝導路の病態解析

二分脊椎の奇形領域を通過する知覚伝導路の走行を把握するために、二分脊椎例の1日齢ヒヨコの奇形領域左側後根神経節中枢繊維を切断、創口を閉鎖する。3日後、深麻酔下で生理食塩水を心臓から注入、瀉血安楽死させ、その後、灌流固定した。固定した屠体から脊髄を切り出し、電子顕微鏡切片を作成、これを透過型電子顕微鏡で観察、変性した知覚神経伝導路を抽出、正常例と比較した。

## 4. 研究成果

(1) 二分脊椎例における運動神経細胞の分化異常の追跡 (図2及び図3)

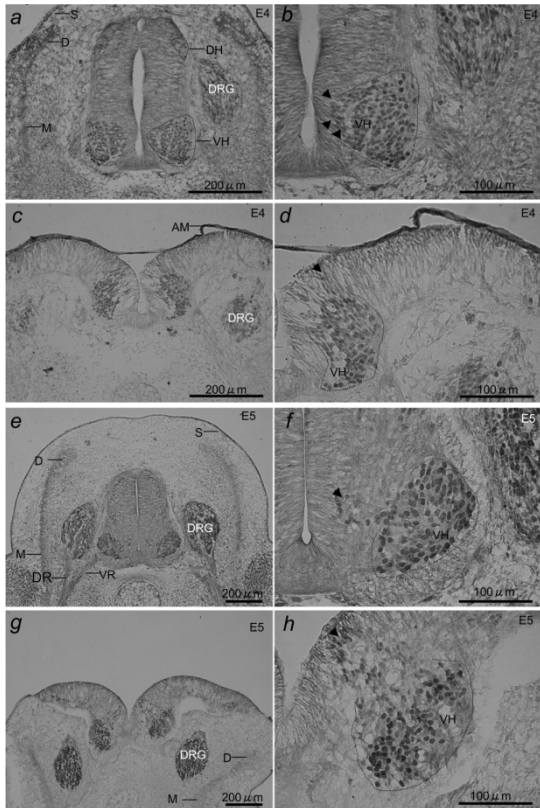


図2 4, 5日齢胚における第3腰髄領域のIslet-1陽性細胞の分布.

a:正常発生例4日胚, b:aの前角領域, c:二分脊椎例4日胚, d:cの前角領域, e:正常発生例5日胚, f:eの前角領域, g:二分脊椎例5日胚, h:gの前角領域

二分脊椎処置の時期から24時間の間, 正常群の脊髄では上衣層と外套層の境界が明瞭となり, 両層とも紡錘形をした細胞が密となって存在する. 一方, 二分脊椎群では, 上衣層と外套層の境界は正常群と同様, 明瞭であり, 両層には紡錘形の細胞が多数存在するが, 外套層では細胞間隙が大きく脊髄全体が比較的幼弱な印象を受ける. 後根神経節は二分脊椎群でも正常群のそれと遜色なく発生するが脊髄の変形に伴って脊髄前角よりもさらに腹側に位置している. 両群ともに前角と後根神経節にはIslet-1陽性細胞が多く見られるが, 後角や中間帯には陽性反応が無い. 前角の位置は両群とも腹外側部にあるが正常群の前角は境界が明瞭であるが, 二分脊椎群では変形し, その境界も明瞭でない. 上衣層から前角領域に移動中のIslet-1陽性細胞は4日齢胚で両群とも神経管側に多数認められる. 5日になると正常群の上衣層と前角領域間の陽性細胞数は減少するが, 二分脊椎群では神経管付近からの遊走が続く. その結果, 正常では前角領域のIslet-1陽性細胞

は比較的均一な染色像を示し整然と並んでいるが二分脊椎群では前角領域の細胞シグナルの濃さも不均一で細胞の方向も不規則な状態を示すことになる.

二分脊椎処置24時間を過ぎるステージでは正常群では上衣層と前角間の移動細胞はかなり少数となるが二分脊椎ではより多くの細胞移動が続く. この時期二分脊椎では個体により像が多少異なるが, 前角は二種類の細胞集団に区分されることが多い. すなわち外側に強いシグナルを示すIslet-1陽性細胞が, 内側には比較的弱いシグナルを示す細胞が位置している. その後, 両群ともに移動細胞は少なくなり, 同じような像を呈する. そして両群とも前角の運動神経は外側のIslet-1陰性ニューロンと内側のIslet-1陽性ニューロンとに分かれ, その境界は明瞭である.

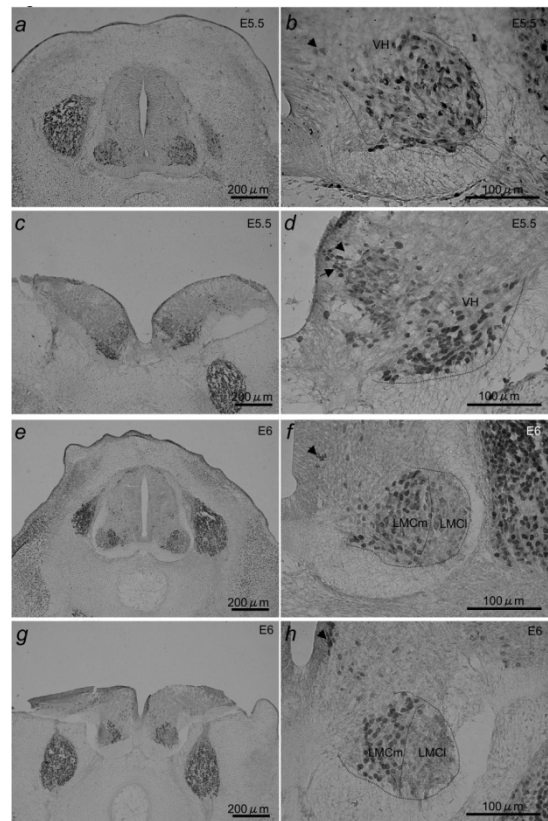


図3 5.5, 6日齢胚における第3腰髄領域のIslet-1陽性細胞の分布. a:正常発生例5.5日胚, b:aの前角領域, c:二分脊椎例5.5日胚, d:cの前角領域, e:正常発生例6日胚, f:eの前角領域, g:二分脊椎例6日胚, h:gの前角領域

(2) 二分脊椎例における後肢内転筋群を支配する運動神経細胞の比較

第1腰椎から第3腰椎の間の内転筋を支配する運動神経細胞数は, 正常発生例で457±108個であった. , 二分脊椎例のそれは653±



95個で、正常発生例よりも多い傾向を示したが、統計的に有意な差ではなかった( $P < 0.07$ )。なお、正常発生例における内転筋を支配する運動神経細胞数は第2-3腰椎を中心とした凸型をなしており、この結果はLandmesserのデータとほぼ一致する。また、正常発生例における内転筋を支配する運動神経細胞の前角領域における配置も、Landmesserの報告と一致して、前角のやや内側に塊状に分布していた。それに対して、二分脊椎例の場合、第1腰椎-第3腰椎の運動神経細胞は平板な、やや広がった分布となっていたばかりか、正常発生例と異なり、内転筋を支配する運動神経細胞の配置が特定の領域に集中せず、前角領域の広範に分布していた。

### (3) 二分脊椎例における知覚伝導路の病態解析 (図4)

これまでのモデル動物では二分脊椎例において後根神経節細胞数の変化や外見上の違いは見られなかった。しかし、知覚障害と思われる症状は二分脊椎症のそれと同様にみられることから上行性知覚伝導路の走行部位を二分脊椎例と正常例で比較した。

正常例では、上行性知覚伝導路は同側性の脊髄後索に集中して走行、2から3の伝導路が他の領域にも確認できるにすぎないが、二分脊椎例では奇形領域の尾側、奇形領域、奇形領域の頭側のいずれの領域においても、側索や前索にも伝導路が走行していることが確認できた。一方、この伝導路の走行異常は潜在性二分脊椎状態の個体では、奇形領域近傍は正常例に近い結果であったが、奇形領域から離れるにしたがって走行異常伝導路数が増加する傾向が見られたが、正常例に比べて明確な違いは見られなかった。これは潜在性二分脊椎症患者のほとんどが生涯無症状であるという事実との一致したものと考えられる。

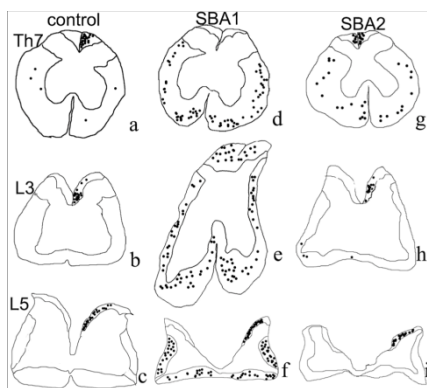


図4 4日齢のヒヨコにおける神経切断術による変性伝導路の分布。  
a:正常発生例第7胸髄位(Th7), b:正常発

生例第3腰椎位(L3), c:正常発生例第5腰椎位L5, d:二分脊椎例Th7, e:二分脊椎例L3(奇形領域), f:二分脊椎例L5, g:潜在性二分脊椎例Th7, h:潜在性二分脊椎例L3(椎弓欠損領域) i:潜在性二分脊椎例L3

### (4) 結果のまとめ

本研究において二分脊椎例では発生がちょうど24時間ほど遅れて進行していることを示唆される。通常、正常に発生した胚の神経系の発生では細胞の過剰増殖とそれに続くアポトーシスによって標的を支配できない細胞が排除されることが知られている。このような発生過程がどの程度神経回路網の構築に寄与しているかは、不明な点が多いが、本研究で明らかになった正常発生例と二分脊椎例との間でみられた神経細胞動態の違いは、研究代表者の研究グループが2006年及び2008年に発表した論文で提示している二分脊椎症状態を呈する脊髄領域において神経細胞の初期発生異常が起こり、これが歩行障害の原因となるという仮説を支持していると思われる。

興味深いことに、このような発生の遅れは運動神経細胞数や後根神経節細胞数の減少には繋がっていなかったが、正常発生例と二分脊椎例では内転筋を支配する運動神経細胞の脊髄配置の違い及び後根神経節細胞から出る上行性知覚伝導路にも違いが見られた。すなわち、本モデルでは、奇形領域において、見かけ上、正常であっても神経細胞の分化や神経線維網形成が正しく推移しないことを強く示唆している。

本研究では、歩行障害を起こす二分脊椎モデル動物において、二分脊椎様状態の脊髄では、見かけ上異常がなくとも神経回路網に異常が起こっている可能性を示している。したがって、十分な病態が解明されていない現状に置いて、母胎と胎児を危険にさらす可能性のある胎児手術を本奇形に適応することには効果に較べて、リスクが大きいのではないかとと思われる。しかしながら、二分脊椎症の病態は不明点が数多くあり、より詳細な解析を実施することによって胎児手術のメリットが再発見される可能性も否定できない。よって、当初の計画したように、数種類の抗体を組み合わせたさらなる実験を行う必要があると考えている。

### 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)

(1) Tsujimura, R., Mominoki, K., Kinutani, M., Shimokawa, T., Doihara, T., Nabeka,

H., Wakisaka, H., Kobayashi, N., Matsuda, S. Sensory tract abnormality in the chick model of spina bifida., Neurosci. Res., 査読有, Vol. 71, 2011, 85-91

6. 研究組織

(1) 研究代表者

樺木 勝巳 (MOMINOKI KATSUMI)

岡山大学・自然生命科学研究支援センター・  
准教授

研究者番号：70304615

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

松田 正司 (MATSUDA SEIJI)

愛媛大学・医学系研究科・教授

研究者番号：40173843

(4) 研究協力者

藤原 隆 (FUJIWARA TAKASHI)

愛媛大学・総合科学研究支援センター・  
研究支援者