

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20005

研究課題名(和文)二分脊椎神経回路における抑制神経の変化

研究課題名(英文)Change of inhibitory input to the spinal neurons in spina bifida

研究代表者

カーン モハメドシャキル(Khan, MD.Sakirul)

愛媛大学・医学系研究科・助教(特定教員)

研究者番号：70746867

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):平成27年度はモデル動物手術修練に集中した。平成28年度は抑制ニューロンの変化の指標としてGABAとカスパーゼの免疫染色により二分脊椎ヒヨコの脊髄に生直前から神経障害が起こり始めていることを確認した。同時に運動障害の程度をデジタルカメラで記録した。
平成29年度には本モデルを用い、特に興奮性のグルタミン酸、アセチルコリンと、抑制性のGABAの増減に注目して解析し、孵化後に運動機能が急激に悪化すること、それが孵化後の抑制神経系障害が原因であることを明らかにし、Disease Models & Mechanisms 10, 1421-1432, 2017(IF=4.7)に発表した。

研究成果の概要(英文):We investigated the neuropathological mechanisms of progression of SBA-like motor dysfunctions in a neural tube surgery-induced chicken model of SBA at different pathogenesis points ranging from embryonic to posthatch ages. We found that chicks with SBA-like features lose voluntary leg movements and subsequently exhibit lower-limb paralysis within the first 2 weeks after hatching, coinciding with the synaptic change-induced disruption of spinal motor networks at the site of the SBA lesion in the lumbosacral region. Such synaptic changes reduced the ratio of inhibitory-to-excitatory inputs to motor neurons and were associated with a drastic loss of -aminobutyric acid (GABA)ergic inputs and upregulation of the cholinergic activities of motor neurons. Furthermore, most of the neurons in ventral horns, which appeared to be suffering from excitotoxicity during the early postnatal days, underwent apoptosis. (Disease Models & Mechanisms 10, 1421-1432, 2017)

研究分野: neuroscience

キーワード: spina bifida chick inhibitory input GABA

1. 研究開始当初の背景

二分脊椎症は出産 1,000 に対し約 1 例の頻度で発生し、嚢胞性二分脊椎症では脊髄内にも傷害がおよび、運動、排尿障害、下肢の変形等が起こる整形外科、脳外科、小児科等の領域で重要な疾患である。しかし、これまで適切なモデル動物が開発されていなかった為に十分な病態解明がなされていない。二分脊椎症は人間では自然発症し、葉酸の投与で発症が抑制されることが判明しているが、原因は不明である。現象としては脊髄背部の再開裂を第一段階の異常とし、開裂部の羊水暴露障害による神経回路の形成不全等を第二段階の異常とする説が有力である (Stiefel らの two hit theory, J Neurosurg, 2007)。

申請者の研究室では、手術により脊髄を再開裂し、確実に二分脊椎モデル動物を作成することに成功し (Mominoki et al., Exp. Neurol 197, 2006) その病態を報告した。さらに、本新規モデル動物では開裂部位の長さを調節することにより歩行障害の重篤度を変えることが可能である。申請者の講座では、本モデルを用い二分脊椎の歩行障害が、運動ニューロン数に異常が有るのではなく、インターニューロン数の減少 (Mominoki et al., Exp. Neurol 197, 2006)、運動ニューロンの発生遅延による運動神経回路の異常 (Wang et al., J Vet Med Sci, 73, 2011)、および感覚神経回路の異常 (Tsujiura et al., Neurosci Res 71, 2011) にあることを初めて明らかにした。

2. 研究の目的

二分脊椎における脊髄内神経回路に関しては、ほとんど解析がされていない。近年、妊娠後期 (出産の直前) に開裂部位を外科的に閉鎖しても病態が改善しないことが明らかになってきており、脊髄内の神経回路に不可逆的な変化が起きていることが示唆されている。我々は、主として抑制神経系であるインターニューロンを、そのマーカーである GABA, GAD, parvalbumin, carbindin, calretinin 等に対する抗体により免疫染色し、その変化を明らかにしようとして着想した。

本計画では、運動ニューロンと筋との関係に異常が認められないことから、現在異常が有ることが報告されているインターニューロンに焦点を当て、インターニューロンの多くが GABA 作動性抑制神経であることを利用して、そのマーカーである GABA, GAD, parvalbumin, carbindin, calretinin 等に対する抗体により免疫染色し、その変化を明らかにしようと考えた。

3. 研究の方法

本研究は二分脊椎症における歩行異常と運動・感覚神経系異常の関係を明らかにするために、手術により作製したヒヨコ二分

脊椎モデルの脊髄を各種の抗体を用いて免疫組織学的に観察、検討するものである。

その概要は 1) モデル動物作製 2) 運動障害のビデオ撮影 3) 脊髄の免疫組織化学的解析である。

受精卵を孵卵器にいれ、孵卵 3 日目に卵殻を切り取り羊水を一部取り除いて、鶏胚の脊髄背側を微量メスにより切開する。開いた卵殻はテープで閉じる。

【運動障害の確認】

本モデルでは、脊髄背側の切開の長さにより程度の異なる運動障害と下肢の変形が認められる。特に下肢の姿勢や関連する筋肉の萎縮等について詳細に記録する。動画データとしての投稿できるようデジタルビデオカメラで記録した。

【GABA, GAD に対する抗体による抑制神経の免疫組織化学的解析】

従来から二分脊椎では運動ニューロン障害が注目されてきた。申請者らは、抑制ニューロンに注目し、そのマーカーである GABA や GAD に対する抗体を用いて、二分脊椎では反応が強くなることをつきとめた。以前の神経細胞の形態学的解析では小型の神経細胞が減少していることから、抑制神経の減少であろうと考えていたが、逆に GABA 免疫反応は二分脊椎で増加していたことは意外である。GABA 作動性ニューロン数と組織内 GABA 含有量は必ずしも一致するものではないので、両者について今後検討したい。

【抑制ニューロン分類マーカーによる抑制神経の免疫組織化学的解析】

抑制ニューロンは、分類マーカーである parvalbumin, carbindin, calretinin 等に対する抗体によりサブクラスに分類される。抑制ニューロンに変化がある場合は、どのサブクラスが変化しているのかを報告した論文が多いので、これらのサブクラスによる変化について検討した。

【運動神経細胞体に終わる抑制神経終末の免疫組織化学的解析 (二重免疫染色)】

脊髄前角の運動ニューロンの細胞体と樹状突起には多くの抑制ニューロン終末が終わっている。運動ニューロンと抑制ニューロン終末を ChAT や GABA 等に対する抗体で二重染色して、運動ニューロンを制御する抑制ニューロン終末の数を正常と二分脊椎で比較した。

4. 研究成果

平成 27 年度はモデル動物の作成の為に手術修練に集中した。受精卵を孵卵器に入れ、孵卵 3 日目に卵殻を切り取り羊水を一部取り除いて、鶏胚の脊髄背側を微量メス

により切開した。本手術は極めて繊細であるので、適当な指導者の下で訓練し習熟しなければ安定した結果は得ることが難しい。本手術を開発した研究者に手術手技の指導を受け、すでに 60 例の二分脊椎ヒヨコの作製に成功している。

平成 28 年度は抑制ニューロンの変化の指標として GABA 免疫染色を行い、抑制系の減少を確認した。さらにカスパーゼの免疫染色により二分脊椎ヒヨコの脊髄に生直前から神経障害が起こり始めていることを確認した。同時に運動障害の程度を動画データとして投稿ができるようデジタルカメラで記録した。

平成 29 年度には本モデルを用い、特に興奮性のグルタミン酸、アセチルコリンと、抑制性の GABA の増減に注目して解析し、孵化後に運動機能が急激に悪化すること、それが孵化後の抑制神経系障害が原因であることを明らかにし、動物モデル分野では世界的に評価の高い **Disease Models & Mechanisms** 10, 1421-1432, 2017(IF=4.7)に **Khan の第一著者論文として発表した**。一方、トレーサーを用いた二光子顕微鏡による解析を共同研究者との基礎実験を開始した。

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 18 件)

2017

1, Khan MSI, Nabeka H, Islam F, Shimokawa T, Saito S, Li X, Kawabe S, Hamada F, Tachibana T, Matsuda S. Early neonatal loss of inhibitory synaptic input to the spinal motor neurons confers spina bifida-like leg dysfunction in a chicken mode. *Disease Models Mechanisms* 2017, 12: 1421-1432. DOI: 10.1242/dmm.031054 (査読有)

2. Nabeka H, Saito S, Shimokawa T, **Khan MSI**, Yamamiya K, Shan F, Gao H, Li C, Matsuda S. Interneurons secrete prosaposin, a neurotrophic factor, to attenuate kainic acid-induced neurotoxicity. *IBRO Reports*. 3:17-32:2017. DOI: org.10.1016/j.ibror.2017.07.001 (査読有)

3. Tachibana T, Nakai Y, Makino R, **Khan MSI**, Cline MA. Effect of central and peripheral injection of prostaglandin E2 and F2 α on feeding and the crop-emptying rate in chicks. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*. 2017; 130: 30-37. DOI: 10.1016/j.prostaglandins.2017.03.005. (査読有)

4. Li X, Nabeka H, Saito S, Shimokawa T, **Khan MSI**, Yamamiya K, Shan F, Gao H, Li C, Matsuda S. Expression of prosaposin and its receptors in the rat cerebellum after kainic acid injection. *IBRO Reports*. 2017; 2: 31-40. DOI: 10.1016/j.ibror.2017.02.002 (査読有)

5. Tachibana T, Kodama T, Yamane S, Makino R, **Khan MSI**, Cline MA. Possible role of central interleukins on the anorexigenic effect of lipopolysaccharide in chicks. *British Poultry Science*. 2017, 58:305-311. DOI: 10.1080/00071668.2017.1280774 (査読有)

6. Okuyama H, **Khan MSI**, Tsukada A, Tachibana T. Heat exposure alters the mRNA expression of growth-and stress-related genes in chicks. *Livestock Science*. 2017, 198: 97-103. DOI: 10.1016/j.livsci.2017.02.010 (査読有)

7. Tachibana T, Ogino M, Makino R, **Khan MSI**, Cline MA. Lipopolysaccharide reduces food passage rate from the crop by a prostaglandin-independent mechanism in chicks. *British Poultry Science*. 2017; 58: 100-106. DOI: 10.1080/00071668.2016.1237768 (査読有)

8. Al-Mahtab M, Akhter S, Mollick KU,

Uddin MH, **Khan MSI**, Akbar SMF. Prevalence of Hepatitis B Virus and Hepatitis C Virus in a Tea Garden of Bangladesh. *Euroasian J Hepato gastroenterol.* 2017; 7(1): 107-110. DOI: 10.5005/jp-journals-10018-1227 (査読有)

2016

9. Akbar SMF, Al-Mahtab M, **Khan MSI**, Noor-E-Alam SM, Moben AL, Alam MA. Pathogenic immunity and protective immunity in chronic hepatitis B. *Medical Research Archives.* 2016; 4 (6). DOI: <http://dx.doi.org/10.18103/mra.v4i6.673> (査読有)

10. M Ogino, **Khan MSI**, MA Cline, Tachibana T. Acute injections of corticosterone, norepinephrine and epinephrine retards food passage in the crop of chicks. *General and Comparative Endocrinology.* 2016; 225:155-161. DOI: 10.1016/j.ygcen.2015.10.015 (査読有)

11. Akbar SMF, Al-Mahtab M, **Khan MSI**, Shrestha A, Tabassum S, Hiasa Y. Current trends in hepatitis B vaccination. *Future Virology.* 2016; 11: 369-378. DOI: 10.2217/fvl-2016-0025 (査読有)

12. Akbar SMF, Al-Mahtab M, **Khan MSI**, Raihan R, Shrestha A. Immune therapy for hepatitis B. *Annals of Translational Medicine.* 2016; 4(18):335. DOI: 10.21037/atm.2016.08.48 (査読有)

13. K Masunari, MA Cline, **Khan MSI**, Tachibana T. Feeding response following central administration of mesotocin and arginine-vasotocin receptor agonists in chicks (*Gallus gallus*). *Physiology and Behavior.* 2016; 153:149-154. DOI:

10.1016/j.physbeh.2015.11.001 (査読有)

14. Tachibana T, Kubo S, **Khan MSI**, Masuda K, Ukena K, Wang Y. Peripheral Injection of Chicken Growth Hormone-Releasing Hormone Inhibits Feeding Behavior in Chicks. *Journal of Poultry Science.* 2016; 53:29-33. DOI: 10.2141/jpsa.0150087 (査読有)

2015

15. Al-Mahtab M, Akbar SM, Rahman S, **Khan MSI**. Increased survival of patients with end-stage hepatocellular carcinoma due to intake of ONCOXIN®, a dietary supplement. *Indian Journal of Cancer.* 2015; 52:443-446. DOI: 10.4103/0019-509X.176699 (査読有)

16. **Khan MSI**, Shigeoka C, Takahara Y, Matsuda S, Tachibana T. Ontogeny of the corticotrophin-releasing hormone system in slow- and fast-growing chicks (*Gallus gallus*). *Physiology and Behavior.* 2015; 151:38-45. DOI: 10.1016/j.physbeh.2015.06.033 (査読有)

17. Jahan R, Hossain MM, Rashid MH, Akhter S, **Khan MSI**. Effect of post-slaughter time and storage conditions on chemical and microbial changes in locally marketed beef. *Bang J Ani Sci.* 2015;44: 52-58. DOI: [dx.doi.org/10.3329 /bjas.v44i1.23143](http://dx.doi.org/10.3329/bjas.v44i1.23143) (査読有)

18. Tachibana T, Sugimoto I, Ogino M, **Khan MSI**, Masuda K, Ukena K, Wang Y. Central administration of chicken growth hormone-releasing hormone decreases food intake in chicks. *Physiology and*

Behavior. 2015; 139:195-201. DOI: 10.1016/j.physbeh.2014.11.043 (査読有)

〔学会発表〕(計5件)

1.Khan MSI, 鍋加浩明、Islam F, 下川哲哉、Xuan L, 山宮公子、土居原拓也、松田正司、Reduction in the lumbar cord motor neuron inhibitory to excitatory synaptic ratio confers spina bifida-like motor dysfunction in a chick model. 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会

2.Khan MSI, Nabeka H, Islam F, Shimokawa T, Xuan L, Yamamiya K, Doihara T, Matsuda S. Early postnatal ablation of inhibitory neurons in the spinal cord confers spina bifida-like motor dysfunction in a chick model. *The Third World Congress on Spina Bifida Research and Care*, 2017.

3.Khan MSI, 鍋加浩明、Islam F, 下川哲哉、Xuan L, 山宮公子、土居原拓也、松田正司、Characterization of pathological mechanism underlying motor dysfunctions in a chick model of spina bifida aperta. 日本解剖学会第71回中国・四国支部学術集会、2016.

4.Khan MSI, Islam F, Xuan L, 下川哲哉、鍋加浩明、土居原拓也、山宮公子、松田正司、Loss of GABAergic neurons coincide with motor dysfunctions in a chick model of spina bifida aperta. 第121回日本解剖学会総会・全国学術集会、2016.

5.Khan MSI, Shimokawa T, Islam F, Nabeka H, Yamamiya K, Hamada F, Kobayashi N, Matsuda S. GABAergic interneurons in the spinal cord are

increased in a chick model of spina bifida aperta. *The 120th Annual Meeting of the Japanese Association of Anatomists*, 2015.

〔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
www.m.ehime-u.ac.jp/school/anatomy1/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

カーン モハメドシャキル (Khan, MD.Sakirui)

愛媛大学・大学院医学系研究科・助教(特定教員)

研究者番号：70746867

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし