

令和 2 年 9 月 17 日現在

機関番号：82404

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H02127

研究課題名(和文) 神経損傷後の痙縮症状に対するリハビリ効果定着のための細胞機能制御に関する研究

研究課題名(英文) The long term effect of rehabilitation effects on spastic symptoms

研究代表者

緒方 徹(Ogata, Toru)

国立障害者リハビリテーションセンター(研究所)・病院 障害者健康増進・運動医科学支援センター(研究所併任)・障害者健康増進・運動医科学支援センター長

研究者番号：00392192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄損傷後の合併症の中で四肢に生じる痙縮は随意運動を阻害するため、その制御は臨床的な課題となっている。本研究ではラット脊髄損傷モデルを用い、痙縮症状の出現、増悪、さらに歩行訓練による改善を定量的にとらえ、さらに症状変化の背景には腰髄レベルのセロトニンシグナルの変容があることを明らかにした。セロトニンシグナルの調整薬であるSSRIを脊髄損傷の直後から投与を開始したところ、痙縮症状出現に伴って生じるセロトニン受容体の発現上昇が軽快し、それにともない痙縮症状の出現頻度も低下することが実験的に示された。SSRIは臨床でも用いられる薬剤であり、今後脊髄損傷臨床への応用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊髄損傷後に出現する痙性症状は四肢の筋肉の過度な緊張をもたらす動作の障害となる。こうした症状のメカニズムについては未だに不明な点が多い。本研究では動物実験モデルを用い、脊髄損傷後に生じる痙性症状には神経伝達物質であるセロトニンの働きが異常に関与していることを明らかにした。さらに、リハビリテーションや薬剤投与によってこのセロトニンの働きを正常化することで、痙性の症状も改善することを示した。こうした新しい治療アプローチは脊髄損傷患者の機能回復に寄与するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Spasticity is one of symptoms in spinal cord injury (SCI) patients. It interferes voluntary movement, which leads to disabilities of patients. In the current project, we attempted to reveal molecular mechanisms of spasticity. Using rat SCI model, we investigated changes in spasticity. We found that the changes in spastic symptoms are accompanied by changes in serotonin signal pathways within spinal motor neurons at lumbar level. To regulate spastic symptoms by drugs, we chose SSRI, and deliver the drug to SCI rats. When SSRI was administered to SCI rat starting immediately after injury, the emergence of spastic symptom was markedly reduced, together with the normalization in serotonin receptor expression in lumbar spinal cord. Taken together, we concluded that changes in serotonin signals in spinal motor neurons is critical component of spastic symptoms. Furthermore, pharmacological intervention targeting serotonin signals may have a clinical impact on spasticity among SCI patients.

研究分野：リハビリテーション医学

キーワード：運動学習 部分免荷歩行

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

痙縮は中枢神経における上位運動ニューロンの障害によって引き起こされる様々な症状の一つとして位置づけられ、脊髄損傷、脳卒中、多発性硬化症など様々な神経疾患の主要兆候として知られている。一般的には、脳に存在する一次運動ニューロンからの下降信号が減弱することにより、それによって制御を受けていた脊髄前角の二次運動ニューロンの興奮性が異常に亢進し、その結果支配領域の筋群に異常収縮が生じる。痙縮症状は不随意運動として患者の動きを妨げるだけでなく、疼痛の原因にもなり、脊髄損傷者や脳卒中の 60%の患者が痙縮による問題を感じているとの報告もある。また、神経疾患の回復期リハビリテーションにおいて痙縮は訓練動作の阻害因子となり、機能回復の妨げになっている。したがって、痙縮症状に対する治療法を確立することは多くの神経疾患患者の生活の質を向上させるためにも極めて重要な課題である。

現在、痙縮の治療薬として、主に二次運動ニューロンの過剰な興奮性を抑制するための抑制性神経伝達物質 (GABA) のアゴニストが使用されている。また神経筋接合部を遮断するボツリヌス毒素も普及している。しかし、こうした興奮性抑制を直接狙った治療は十分な効果を得るために投与量を増やすと筋収縮を過度に抑制し、そのために随意運動も阻害する、という課題が残されている。一方、近年痙縮の制御に運動学習の理論を応用する試みも進んでいる。ストレッチやリズムミミックな反復動作によって二次運動ニューロンの興奮性が減じることが知られ、リハビリでも応用が進んでいる (Adam MM, et al., J Spinal Cord Med. 2011)。こうした治療では随意運動が維持される利点がある一方、訓練を中断すると間もなく学習効果が薄れ、再び痙縮症状が出現するという問題がある。医療の場で、集中的リハビリによる反復運動によって痙縮症状が緩和されても、治療期間を終えると効果を維持し続けることができず症状が再燃し機能が低下するケースは珍しくない。こうした問題は神経科学的視点からは、反復訓練によって誘導された可塑性の定着プロセスの問題、と捉えることができる。

痙縮の原因となる二次運動ニューロンの過剰興奮性の分子メカニズムとして細胞膜上のセロトニン受容体やイオンチャネルの発現変化が重要であることが近年報告されている。したがって、可塑性定着の分子メカニズムにはこうした膜分子の発現制御が関与すると予想される。一方、神経発生分野では神経回路が構築されるプロセスにはニューロン同士の刺激の伝達だけでなく、周囲のグリア細胞 (アストロサイト、ミクログリア) からの作用も影響することが報告されている (Huberman AD, et al., Cell, 2007)。したがって、リハビリによって痙縮が改善し効果が定着するプロセスもニューロンとグリアの相互作用からとらえる必要がある。実際、歩行訓練の際に脊髄内のグリア細胞が活性化すると報告が散見されるが、その機能の詳細は明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は痙縮に対するリハビリ効果の分子メカニズムを明らかにし、その効果定着のための治療標的分子を同定することで、新たな治療法開発の基礎を築くことである。

3. 研究の方法

(1) 脊髄損傷ラットの痙縮モデル、訓練介入実験系の確立

すでに研究室で確立している脊髄損傷モデル (IH インパクトを用いた 250kdyn の胸髄圧座損傷 (自然回復では自重を支えられないレベルの予後) をラットに作成する。通常、ラットの脊髄圧座モデルは様々な程度の痙縮症状がでるため均一なサンプルでの実験が困難であったが、申請者らは脊髄損傷ラットを水中で泳がせた際に誘発される痙縮様症状の出現頻度によって痙縮症状が強い個体を選別する技術を有している (*Swimming test: Ryu Y, Ogata T, et al., PLoS One, 2017)。この方法によって効率よく痙縮を評価するとともに、痙縮症状を強く呈するラットを用意することが可能となる。

(2) 痙縮への訓練前後のニューロン・グリア細胞相互作用における遺伝子変化の網羅的解析

グリア細胞の単離解析のため、アストロサイトおよびミクログリアをそれぞれの細胞表面細胞表面マーカー (GLAST, CD11b を予定) によってセルソートする条件を設定する。二次運動ニューロンは細胞体が大いことから形態的特徴にてセルソート可能と予想している。各タイムポイントでサンプリングを行い、セル・ソーティングののちに網羅的な遺伝子解析を行う。得られた発現遺伝子リストから痙縮の変化と合致して変動する分子を候補分子として挙げる。

(3) 脊髄損傷ラットにおける痙縮への訓練効果維持を目指した介入実験

脊髄損傷後の痙縮ラットにおいて訓練実施をして痙縮を軽減させたのち、候補因子または候補因子の上流因子を投与し、その効果を検証する。

候補因子がリコンビナント蛋白としての投与が困難な場合はレンチウイルスベクターを用いて脊髄組織中に遺伝子導入することを試みる。また薬理的な介入が可能であれば該当薬剤を投与する。痙縮ラットへの訓練終了直後から 3 週間の投与群をコントロール群と比較し、組織学的、電気生理学的、行動学的解析において介入によって脊髄運動ニューロンの過剰な興奮性が軽減した状態で維持されているかを検証する。

4. 研究成果

(1) Swimming test による痙縮モデルラットの分類

脊髄損傷モデルとして成体ラット Th10 レベルに脊髄圧挫損傷を作成した。これまでの知見から損傷後 3 週目より痙縮が顕在化することを念頭に観察し、3 週目以降 Swimming Test を毎週実施して経過を観察した。Swimming test では水中を泳いで移動する際の後肢・体幹の痙直の出現回数をカウントする。10 回の施行で痙直症状が出現した施行の回数を記録したところ、経過時間とともに痙縮症状の出現頻度は上昇し、その後一定になる傾向を示した。

また、ラットの個体別に痙縮の出現頻度を分類すると、痙縮症状が強く出る個体と、出にくい個体に分かれる傾向が見られた。痙縮症状の解析をするうえで、症状が強く呈する個体 (10 回のテスト施行中 4 回以上痙縮が出現) を対象にすることでシグナル/ノイズ比が向上すると考え、両者を区別して解析することとした。痙縮を強く示す個体の出現頻度は約 6 割だった。

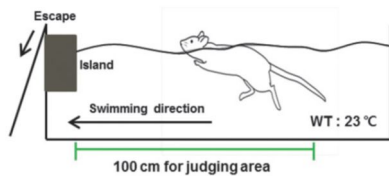
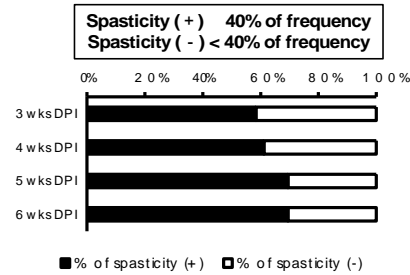


図 1: ラットの Swimming test 概要と、痙性症状を強く示す個体の割合の経時的変化 (N=10)

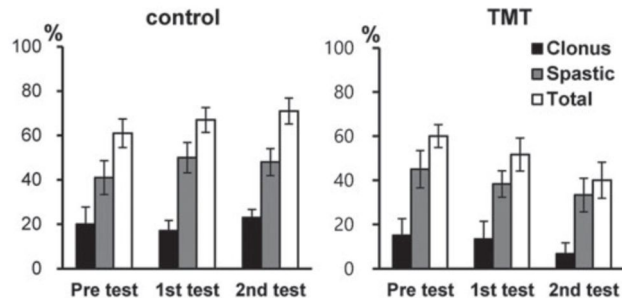


(2) 痙縮症状に対する歩行訓練効果

臨床的に免荷式の歩行訓練は痙縮を抑制する作用があることが報告されていることから、痙縮への介入のポジティブコントロールとして歩行訓練を実施した。脊髄損傷作成から 6 週間経過した個体の中で痙縮症状が強くみられる個体のみを対象に、2 週間の部分免荷式の歩行訓練を実施したところ図 2 に示すように訓練の時間経過とともに Swimming test で観察される痙縮症状が改善する傾向が見られた。

歩行訓練はこれまでの報告と同様に痙縮症状に対して改善効果を持つことが示された。

図 2: 痙性症状に対するトレッドミル訓練 (TMT) の効果
Swimming test における各種痙性症状の出現回数の平均を示す

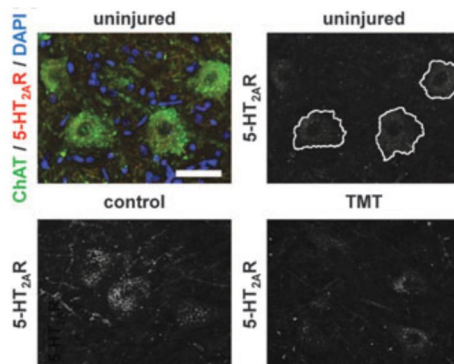


(3) 痙縮症状の変化とセロトニンシグナルの変化

歩行訓練によって痙縮症状が改善することを受け、その分子メカニズムの解析に進んだ。候補分子アプローチと網羅的アプローチを計画し、候補分子アプローチとしてこれまでに痙縮との関与が報告されているセロトニンシグナルの解析を免疫組織学的解析によって行った。セロトニンは脳からの随意指令経路の神経伝達物質として知られる。免疫組織染色ではセロトニンそのものの染色と、その受容体のひとつであるセロトニン受容体 5-HT_{2A}R の染色を行った。

免荷式歩行訓練介入によって痙性が減弱した個体と、非介入の個体の腰髄部分の組織切片を比較したところ図 3 に示すように、歩行訓練実施群では受容体の発現が減弱していることが観察された。これまでの知見とあわせると、脊髄損傷によって上位からのセロトニンシグナルの入力が腰髄レベルで減弱し、それに応じてセロトニン受容体の発現上昇が運動ニューロンに生じる。こうした状態はセロトニンの入力があった際には過剰な反応を引き起こす状態となっており、結果として運動ニューロンの興奮性が亢進した状態になっていると推察される。歩行訓練はこうした受容体の発現を正常化させる働きがあり、そのメカニズムは明確ではないが何らかの知覚刺激が変化をもたらしていることが予想される。

図 3: 腰髄運動ニューロン免疫染色
損傷によりセロトニン受容体 (5-HT_{2A}R) の発現は上昇するが、トレッドミル訓練により上昇が抑制される。



(4) アストロサイトのソーティングと解析

脊髄内での変化を網羅的に解析する目的で、細胞特異的な遺伝子発現解析を試みた。脊髄内の神経機能修飾に重要な働きを持つアストロサイトの単離・分析を計画し、まず幼弱な個体での単離を試みた。ここではアストロサイト特異的に発現し、その識別を可能とする *Aldh1l1* - GFP トランスジェニックマウスを利用した。新生児マウスの脊髄を採取し GFP の発現によりセルソーターによる分離を行ったところ、良好な分離が可能であった。

次に成体マウスからの分離を試みたところ、細胞デブリスの混入が多いことが明らかとなった。成体ラット脊髄においては細胞突起伸長が生じているほか細胞外基質も多く含まれることから組織中のグリア細胞にストレスを加えずに単離することが困難と予想された。

採取組織の処理方法を数種類検討したが、安定してアストロサイト成分を単離することは出来ず網羅的なアプローチによる発現遺伝子解析は困難と判断した。

(5) セロトニンシグナルへの介入：症状出現後のアプローチ

脊髄損傷後の痙縮症状に対し、歩行訓練がセロトニンシグナルのモジュレーションを介して効果を発揮していることを示唆するデータが得られていたため、これを薬理的な介入で代替することを次に目指した。痙性の増悪にセロトニンの枯渇とそれに呼応する受容体の発現上昇が関与しているとの本研究の知見に基づき、セロトニン作動薬を検討した。実際の臨床現場でも使用されている SSRI はセロトニンの再取り込みを阻害することで、その作用を高める働きがあることが知られている。

脊髄損傷作成後痙性が出現したラットに対して、SSRI の一つである Escitalopram の腹腔内投与を連日実施し、痙縮症状の変化を Swimming test にて観察した。その結果予想に反し、痙性症状は増悪傾向を示した。これは SSRI の投与初期においてはセロトニンの作用が強まり、発現上昇しているセロトニン受容体に反応して、むしろ運動ニューロンの興奮性が高まることが背景にあると推察した。より長期の投与を継続することで受容体の発現亢進が収まるとニューロンの興奮性も改善し、痙性症状の改善が得られることが予想された。

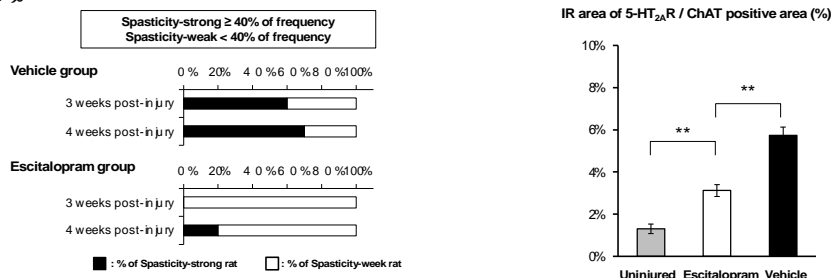
(6) セロトニンシグナルへの介入：症状出現前のアプローチ

当該研究期間の中での上記長期投与が困難と判断し、新たに SSRI の先行投与を試みた。上述のように脊髄損傷モデル作成後、痙性が強く出現するラットの割合は 6 割程度で、これは損傷後 3-4 週経過しないと顕在化しない。そこで、受傷直後から SSRI の投与を開始し、経過の中で痙縮症状を呈するラットの割合とその強さを非投与群と比較することとした。その結果、痙性症状を呈するラットの割合は SSRI 投与群において非投与群と比較して著明に減少し、その症状出現の強さも軽度となることが明らかとなった。この結果は継続的なセロトニンシグナルへの薬理介入が、痙性の背景にあるセロトニン受容体の発現バランスを定常状態に維持することで、セロトニン受容体の過剰反応と痙性症状を抑制したことを示唆している。

臨床場面において、痙性は脊髄損傷者の多くに出現する症状であることを考えると、その出現前から予防的に投与することによって、随意運動を阻害する痙性の出現を抑制する、という治療アプローチは理にかなっていると思われる。本研究の成果は痙性メカニズムのさらなる解明とともに、臨床での対処法へと発展していくものと期待される。

図 4：SSRI の投与による効果

SSRI (Escitalopram) 投与を早期から開始することにより痙性症状を強く示す個体の出現頻度は 70% から 20% に減少した(左)。同時に腰髄レベルのセロトニン受容体の発現も SSRI 投与により減弱している(右)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Youngjae Ryu, Toru Ogata, Motoshi Nagao, Yasuhiro Sawada, Ryohei Nishimura, Naoki Fujita	4. 巻 35
2. 論文標題 Effects of Treadmill Training Combined With Serotonergic Interventions on Spasticity After Contusive Spinal Cord Injury	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Neurotrauma	6. 最初と最後の頁 1358-1366
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 緒方 徹
2. 発表標題 脊髄損傷における再髄鞘化の治療標的としての可能性
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	長尾 元史 (Nagao Motoshi) (00359671)	国立障害者リハビリテーションセンター(研究所)・研究所 運動機能系障害研究部・研究部長 (82404)	
研究分担者	鶴田 文憲 (Tsuruta Fuminori) (30571450)	筑波大学・生命環境系・助教 (12102)	