

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09072

研究課題名（和文）脊損に対する骨髄幹細胞移植における介在ニューロンにより再構築される神経回路の解析

研究課題名（英文）Analysis of the neural circuits reconstructed by interneurons in mesenchymal stem cell transplantation for spinal cord injury

研究代表者

廣田 亮介（Hirota, Ryosuke）

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：10815434

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：これまでに脊髄損傷後に生じる脳内の神経回路の再構築が、MRI diffusion tensor imagingなどを用いて報告されているが、詳細な神経解剖学的手法を用いた報告は少ない。本研究の目的は順行性神経トレーサーとして知られるアデノ随伴ウイルス（AAV）を用いて、脊髄損傷後の脳内における神経回路の再構築を詳細に解析した。

CAGプロモーターを搭載したAAV-8は、脳内における形質導入効率、順行性追跡能、細胞選択的標識能が高いことが判明した。さらに、同ベクターを用いて、脊髄損傷後の脳を解析した結果、神経回路の再構築が生じていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

順行性 / 逆行性AAV神経トレーサーにより、再構築される神経回路の解析を行うことで髄損傷後の脳を解析した結果、神経回路の再構築が生じていることが示唆された。

今後、組織透明化技術を用いて組織中の屈折率を均一化することで組織を透明化し、光シート顕微鏡を用いて解析することで、経時的な神経回路の再構築の変化を解析することが可能となる。さらに、骨髄間葉系幹細胞投与を行ったモデルを対象にすることで幹細胞投与が神経回路再編に如何に影響を与えているかを評価し、細胞治療による運動機能の回復メカニズムの一つを明らかにすることで、次世代の治療法の展開につながることを期待できる。

研究成果の概要（英文）：The reorganization of neural circuits in the brain after spinal cord injury has been previously reported using MRI diffusion tensor imaging and other techniques, but there are few reports using detailed neuroanatomical methods. The purpose of this study was to analyze in detail the reorganization of neural circuits in the brain after spinal cord injury using adeno-associated virus (AAV), which is known as a progressive neural tracer.

AAV-8 carrying the CAG promoter was found to have high efficiency of transduction, adaptive tracking, and cell-selective labeling in the brain. Furthermore, analysis of the brain after spinal cord injury using the same vector suggested that neural circuit reconstruction had occurred.

研究分野：神経再生、整形外科

キーワード：脊髄損傷 神経トレーサー 神経回路再編

1. 研究開始当初の背景

我々は、これまで脊髄損傷モデルに対する骨髄間葉系幹細胞(MSC)移植が、運動機能の回復をもたらすことを報告してきた(Akiyama et al., 2002; Morita et al., 2016; Osaka et al., 2010; Sasaki et al., 2001; Sasaki et al., 2009)。さらに重症なモデルである脊髄全切断モデルに対しても、MSC を移植した結果、運動機能の回復を認めている(予備データ: 図1)。主な治療メカニズムとして、移植された MSC による血液脊髄関門の安定化、損傷局所における損傷軸索の sprouting や、損傷軸索自身の再生、脱髄軸索の再有髄化などが、協奏的に作用することにより、運動機能の回復に貢献すると明らかにしてきた(Morita et al., 2016; Sasaki et al., 2009; 予備データ図1)。さらに、最近の我々の研究から、損傷した神経組織に対する MSC の静脈内投与 (MSC 治療) によって神経の plasticity を賦活化させ、シナプス新生を起こすことが、機能回復に貢献し、治療メカニズムとなりうることを見出している(Sasaki et al., 2016)。

一方、脊髄損傷後の運動機能回復に関与する脊髄に存在する全ニューロンのうち、脊髄からの最終出力部であり、骨格筋の活動を直接コントロールする運動ニューロンは、実は数%程度であり、ほかの大部分のニューロンは、一般に“脊髄介在ニューロン(spinal interneuron)”と総称されるニューロン群である。“脊髄介在ニューロン”は、上行性ニューロン、脊髄固有ニューロン、髄節内介在ニューロンの3種のニューロンによって構成される。これらの“脊髄介在ニューロン”によって形成される神経回路ネットワークは、脊髄損傷後の自然史における機能回復に関与していると推察されている(Bareyre et al., 2004)。

投与された MSC は、これらの“脊髄介在ニューロン”が機能的に再構築する神経回路ネットワークを賦活化させることで、運動機能の回復に関与している可能性が高い。

従って、MSC 治療によって機能的に再構築された神経回路ネットワークを詳細に解明することにより、脊髄損傷後の機能回復に貢献する治療法の開発に展開できる可能性があると思われる。

近年の遺伝子工学技術の進歩により、ニューロンに特定のレポーター遺伝子を発現させて、特定のレポーター分子(例えば GFP)を産生させ、神経回路を可視化することが可能になってきた。我々の研究室では、既に、遺伝子導入の方法として、アデノ随伴ウイルス(AAV)の serotype の一つである AAV8 に GFP を導入した AAV8-CAG-GFP を用いて順行性に軸索をトレースし、神経回路を可視化することに成功し、軸索は言うまでもなく、突起のすみずみまで標識することが可能となった。

2. 研究の目的

脊髄損傷に対する MSC 治療において、“脊髄介在ニューロン”によって、いかに損傷された神経回路ネットワークが再構築され、どのように機能回復に貢献しているのか、を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

第1に、正常ラット(SD, 250-300g)を用いて、CAG プロモーターを搭載した GFP 発現 AAV ベクター(2型・5型・8型)をそれぞれ片側大脳半球に局所注入し、GFP の蛍光輝度を定量することで AAV の脳内における形質導入効率、順行性追跡能、細胞選択的標識能が高い血清型を確認した。第2に、IH インパクターを用いて脊髄損傷モデルラットを作成し、適切な AAV ベクターを大脳皮質や黒質周囲に局所注入し、脊髄損傷後に生じる脳内の神経回路の再構築を解析した。

4. 研究成果

本研究では損傷脊髄に加え、脳内における神経回路の賦活化を脊髄損傷モデルと標準モデルにて比較した。

(1) 3種の血清型では、局所注入部位において、各血清型での GFP の蛍光輝度に有意差を認めず、形質導入効率には差が無かった。

(2) 一方、GFP の蛍光輝度は、内包では各血清型での GFP の蛍光輝度に有意差を認められなかったが、大脳脚では 8 型 (AAV-8-CAG-GFP) を局所注入した群で有意に強い GFP の蛍光輝度を認めたことから、順行性追跡能は 8 型が最も高いことがわかった。

(3) AAV-8-CAG-GFP を右大脳皮質に局所注入した結果、AAV-8-CAG-GFP は脳梁を介して、左側の大脳皮質にまで到達し、GFP 陽性の神経細胞や神経線維を確認することが出来た。また、AAV-8-CAG-tdTomato を左大脳皮質に局所注入し、局所において tdTomato が形質導入された神経細胞や線維と、GFP 陽性の神経細胞や線維は共存しておらず、AAV-8-CAG ベクターの高い細胞選択的標識能を確認した。

(4) 脊髄損傷モデルを作成した後に、AAV-8-CAG-GFP を右大脳皮質に局所注入した結果、脳梁を介した左側皮質への線維連絡が強化されていた。

(5) 脊髄損傷モデルを作成した後に、AAV-8-CAG-GFP を右黒質周囲に局所注入した結果、右黒質-左視床下核間の線維連絡が強化されていた。

以上より、脊髄だけでなく、脳においても脊髄損傷に対して代償的に神経回路の賦活化が起きていることが示唆されていた。

本研究内容は査読付き雑誌に投稿し、受理された。また、国内学会にて計 5 回報告した。今後は、脊髄損傷部における神経回路の変化、また MSC 投与により神経回路再編がどのように変化するか調査していく。

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 Ryosuke Hirota	4. 巻 89
2. 論文標題 Enhancement of Dormant Pathways in the Brain following Rat Contusive Spinal Cord Injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sapporo Igaku Zasshi	6. 最初と最後の頁 31-40
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15114/smj.89.31	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5件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 廣田亮介
2. 発表標題 脊髄損傷後の脳における神経連絡の賦活化
3. 学会等名 日本整形外科基礎学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 廣田亮介
2. 発表標題 脊髄損傷後の脳における神経連絡の賦活化
3. 学会等名 日本運動器移植・再生医学研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 廣田亮介
2. 発表標題 脊髄損傷後の脳における神経連絡の賦活化
3. 学会等名 北海道整形災害外科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 廣田亮介
2. 発表標題 骨髄間葉系幹細胞の静脈内投与による脊髄損傷治療の現在地点
3. 学会等名 日本整形外科基礎学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 廣田亮介
2. 発表標題 骨髄間葉系幹細胞の静脈内投与による脊髄損傷治療の現状
3. 学会等名 東日本整形災害外科学会（招待講演）
4. 発表年 2020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	佐々木 祐典 (SASAKI Masanori) (20538136)	札幌医科大学・医学部・講師 (20101)	
研究分担者	押切 勉 (OSHIKIRI Tsutomu) (70754612)	札幌医科大学・医学部・助教 (20101)	
研究分担者	森田 智慶 (MORITA Tomonori) (60723343)	札幌医科大学・医学部・研究員 (20101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	寺島 嘉紀 (TERASHIMA Yoshinori) (20438005)	札幌医科大学・医学部・助教 (20101)	
研究分担者	中崎 公仁 (NAKAZAKI Kimihito) (70722461)	札幌医科大学・医学部・研究員 (20101)	
研究分担者	岡 真一 (OKA Shinichi) (70789453)	札幌医科大学・その他部局等・講師 (20101)	
研究分担者	佐々木 優子 (SASAKI Yuko) (80631142)	札幌医科大学・医学部・助教 (20101)	
研究分担者	山下 敏彦 (YAMASHITA Toshihiko) (70244366)	札幌医科大学・医学部・教授 (20101)	
研究分担者	本望 修 (HONMO Osamu) (90285007)	札幌医科大学・医学部・教授 (20101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------