

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：35303
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2018～2020
 課題番号：18K10804
 研究課題名(和文) 脊髄損傷に対する運動療法のメカニズム研究：筋の収縮弛緩による脊髄再生の可能性

 研究課題名(英文) Mechanisms in motor recovery after spinal cord injury by electrical stimulation induced muscle contraction

 研究代表者
 宮本 修 (MIYAMOTO, OSAMU)

 川崎医科大学・医学部・教授

 研究者番号：00253287
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄後の運動リハビリが中枢神経の再生を促進し運動機能を改善したという報告がなされているが、そのメカニズムは明らかではない。本研究では運動時の筋収縮そのものが脊髄でのBDNF産生を誘発することを予想し、それが運動機能の回復に関与する可能性について検討した。ラットの脊髄直後から両側下腿骨格筋を4～6週間電気刺激し筋収縮をさせることで運動機能の回復が見られた。この際、筋及び脊髄のBDNF産生が亢進した。一方、BDNF受容体阻害薬を投与すると筋収縮による運動機能回復は抑制された。以上のことから、脊髄後の骨格筋の収縮による運動機能改善にはBDNFが関与し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

現在、脊髄患者に対しては運動療法を中心とするリハビリが行われているが中枢神経の再生能力は極めて低く、脊髄患者の大部分に四肢麻痺や感覚障害などの永続的な後遺症が残る。一方、脊髄後の運動が脊髄の再生を誘導し、これが運動機能の回復に寄与するという報告がなされているがそのメカニズムは明らかではない。本研究では、「脊髄患者に対する運動リハビリ時の筋活動が逆行性に脊髄にシグナルを伝えて損傷部位の軸索再生や細胞新生を促進する」という仮説を立てこれを検証し、その分子メカニズムの一端を明らかにした。本研究結果により、BDNF-TrkB経路の活性化をターゲットとした新たな治療法の開発が大いに期待される。

研究成果の概要(英文)：The involvement of neurotrophic factors such as brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in functional recovery after spinal cord injury (SCI) by treadmill training has been suggested. However, the precise mechanism is poorly understood. To investigate the role of muscle contraction in motor function recovery after SCI, with a focus on BDNF. Percutaneous electrical muscle stimulation (ES) was applied to both hindlimbs of the SCI model rats. Motor function was assessed using BBB score, inclined plane test, and rotarod test. Significant improved motor function, axonal regeneration of corticospinal tract, and BDNF production in both muscle and spinal cord were observed by ES. While, these effects were suppressed by administration of the TrkB blocker. These results indicate that the increase of muscle activity induces motor recovery after SCI via BDNF-TrkB pathway.

研究分野：神経病理学

キーワード：脊髄損傷 骨格筋収縮 電気刺激 皮質脊髄路 軸索再生 BDNF TrkB ANA-12

1. 研究開始当初の背景

わが国における外傷性脊髄損傷(脊損)患者の発生率は、年間100万人あたり30-40人であり、毎年5000人程度の患者が新たに発生している¹⁾。急性期管理の進歩によってその死亡率は減少したものの、中枢神経の再生能力は極めて低く、脊損患者の大部分に四肢麻痺や感覚障害などの永続的な後遺症が残る。現在、脊損患者に対しては日常動作訓練を中心とした運動療法や末梢運動ニューロン・筋肉への電気刺激による筋収縮誘発(機能的電気刺激(FES)や治療的電気刺激(TESS))などのリハビリテーションが唯一の治療法として行われている。しかしながら、その目的は残存機能の維持や関節の拘縮予防であり、脊髄自体の再生を目的としたものではない²⁾。最近、脊損後の運動が脊髄の再生を誘導し、これが運動機能の回復に寄与するという報告がなされているがそのメカニズムは明らかではない³⁾。一方、骨格筋は運動器であると同時に多くの生理活性因子を産生する分泌器官でもあり、この中には脳由来神経栄養因子(BDNF)やインスリン様成長因子(IGF-1)などの神経細胞の保護や再生を促進する因子が含まれている⁴⁾。さらに、筋紡錘や腱器官から神経性に筋の収縮弛緩の情報が脊髄に伝えられている。この液性あるいは神経性の伝達経路を介した筋からのシグナルが脊髄神経の再生に直接関与する可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「脊損患者に対する運動リハビリテーション時の筋活動が逆行性に脊髄にシグナルを伝えて損傷部位の軸索再生や細胞新生を促進する」という仮説を立てこれを検証し、その分子メカニズムを解明することである。運動時に筋肉は種々の生理活性因子を分泌し脂質や糖の代謝などに影響を与える。同様に脳にも影響を与えることはすでに知られており、運動によって脳が活性化して学習能力が増強することが報告されている⁵⁾。しかしながら、筋の収縮弛緩自体が脊髄に直接影響を与えて脊損後の神経再生と機能回復に関与することを証明した報告はこれまでなく、本研究が最初の試みである。

3. 研究の方法

(1)脊損モデルラットの作製と運動機能の測定

麻酔下にラット(、8週齢)の脊髄を露出し、25mmの高さから錘(20g)を落下させて胸髄(T9)レベルを損傷して脊損モデルを作製した。このモデルは受傷直後から両下肢完全麻痺、感覚障害、排尿障害などを示し、自然回復はしない(予備実験で確認済み)。損傷直後から両側前脛骨筋を経皮的に電気刺激(ES)(2Hz x 10mA)することで単収縮を起こさせる(10分/日 x 4~6週間)。実験群は脊損群(SCI)、脊損+電気刺激群(SCI+ES)、シャムコントロール群(Sham)の3群について比較した。なお、筋の収縮弛緩が機能回復に必要であることを示すために、SCI+ES群についてはあらかじめダントロレンなどの筋弛緩薬の投与によって筋収縮を抑制した状態で電気刺激を与える群も作製した。脊損後、Basso-Beattie-Bresnahan(BBB)スコア、傾斜台試験、ロータロッド試験などにて運動機能を経時的に測定した。

(2)組織傷害の測定

脊損7日後にTUNEL染色によるアポトーシス評価と脊損4~6週間後に損傷中心部および口・尾側それぞれ5、10mmの脊髄切片を作製し、ヘマトキシリン・エオシン染色による空洞体積測定などを行い、細胞傷害の程度を定量解析した。

(3)脳由来神経栄養因子(BDNF)の関与

神経再生に影響するマイオカインとしてBDNFに焦点を当て、脊損1週間後の骨格筋及び脊髄のBDNFの免疫染色とELISAを行った。さらに、BDNF受容体(TrkB)の阻害薬(ANA-12)投与群を作製して、運動機能の回復と神経再生について検討した。

(4)神経再生の検討

再生軸索のマーカーであるGAP-43による脊髄切片の免疫染色とウェスタンブロッティング、皮質脊髄路のマーカーであるセロトニン免疫染色を行った。また、逆行性トレーサーであるフルオロゴールドを坐骨神経に注入し、脊髄前角のフルオロゴールド(+)/シナプトフィジン(+)の運動ニューロン数をカウントした。

4. 研究成果

(1)下腿筋への電気刺激による運動機能の回復(図1)

脊損直後から両側下腿筋へ電気刺激を毎日行うことで、BBBスコアについては2週間後から、その他の運動試験についても4週間後には有意に回復した。

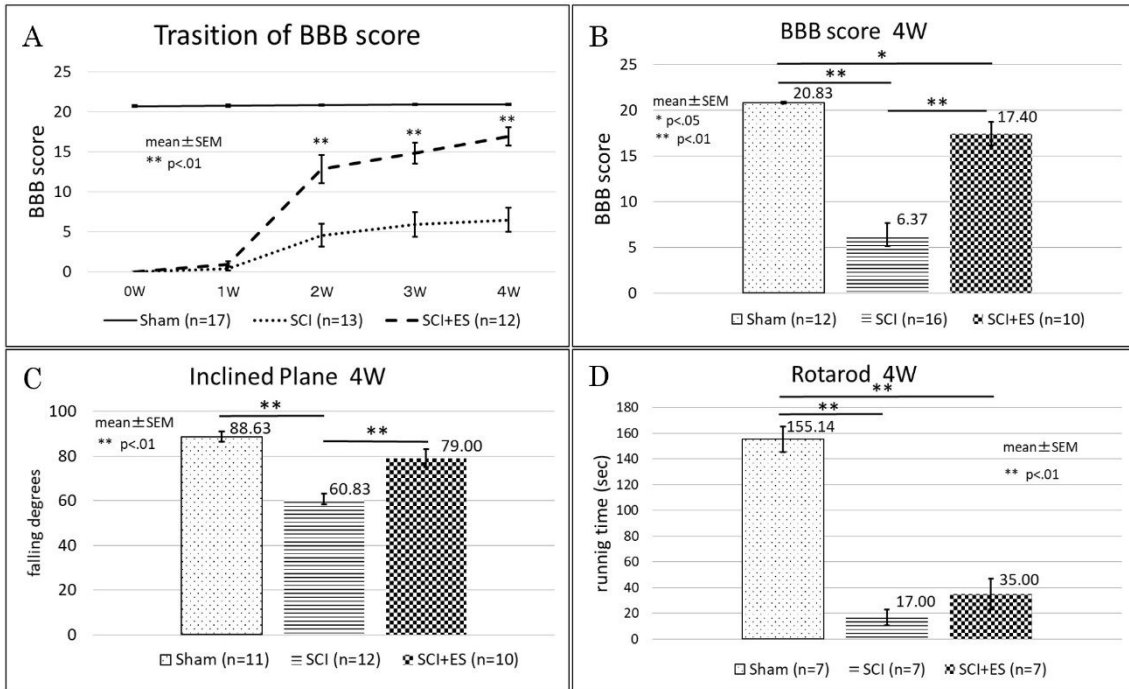


図1 脊損後の運動機能の経時変化

(2)組織傷害の測定 (図2, 3)

脊損1週間後に脊損中心部の TUNEL 染色を行ったところ、陽性細胞数は電気刺激群で有意に減少した。また、脊損4週間後の空洞体積についても電気刺激群で有意に小さくなっていった

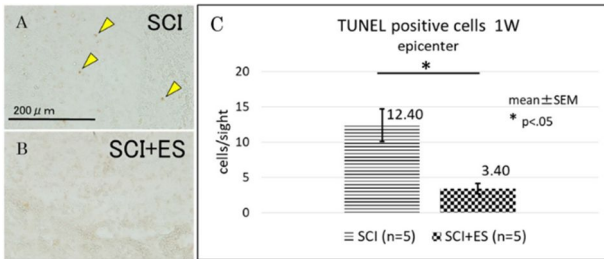


図2 TUNEL 陽性細胞

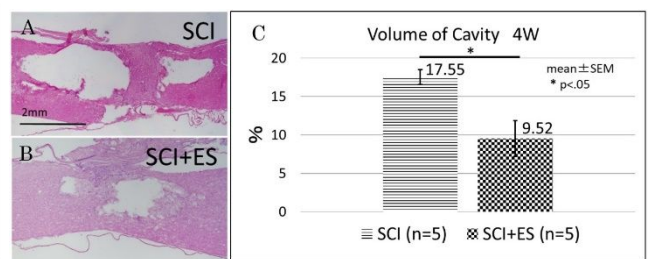


図3 空洞体積

(3)BDNF の関与 (図4, 5)

脊損1週間後に脊髄の BDNF 免疫組織及び ELISA を行った結果、電気刺激群では有意に脊髄と下腿骨格筋で BDNF 産生が増加していた (図4)。また、脊髄における BDNF 陽性細胞は主に前角に存在し、この細胞は NeuN にも陽性を示したことから、BDNF 産生細胞は前角のニューロンが主体であると思われた (図5)。

なお、電気刺激群に対して筋弛緩薬であるダントロレンを刺激前に投与しておくこと、この BDNF 産生増加は消失した。

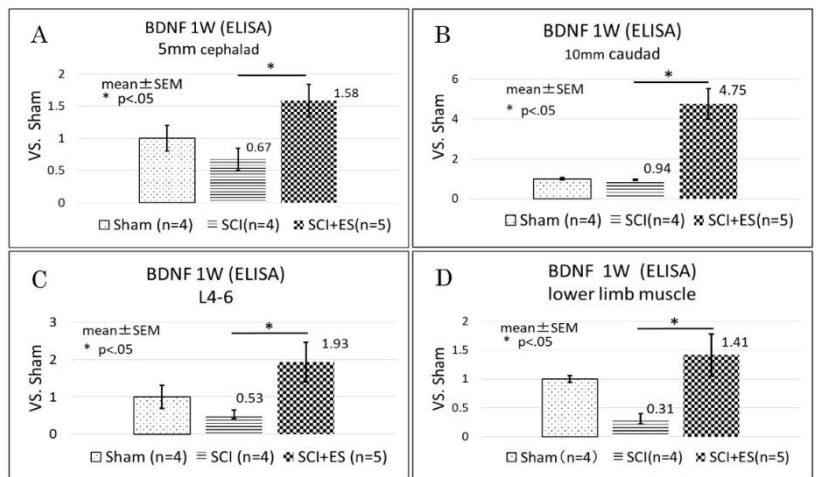


図4 脊髄及び骨格筋の BDNF

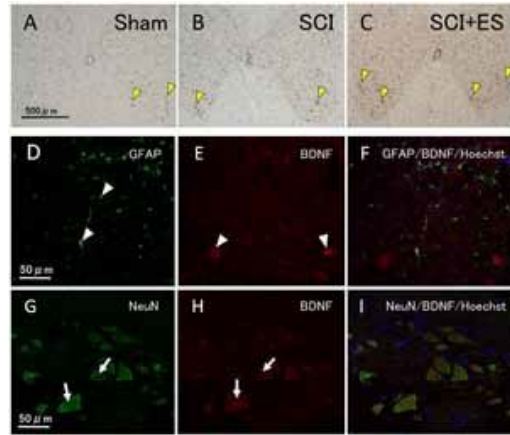


図5 脊髄のBDNF陽性細胞(A~C)、BDNF/GFAP(D~F)、BDNF/NeuN(G~I)の二重染色

(4)BDNF受容体(TrkB)阻害薬の投与(図6)電気刺激群にTrkBの阻害薬であるANA-12を投与(0.5mg/kg)した場合の運動機能の回復について検討した。ANA-12の前投与によって電気刺激の効果が完全に消失した(図6)

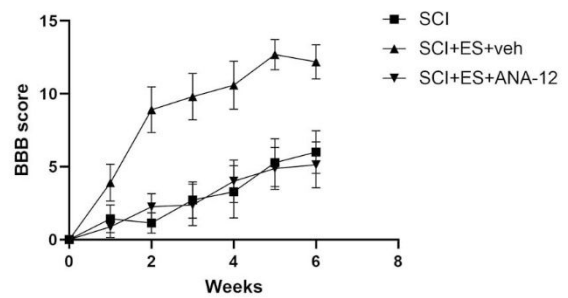


図6 TrkB阻害薬の投与効果

(5)皮質脊髄路の再生(図7,8)再生軸索のマーカであるGAP-43による脊髄の免疫染色では電気刺激群で有意に陽性線維が増えていた。一方、皮質脊髄路の軸索のマーカであるセロトニン陽性線維を脊損中心部から頭尾側各1cmについて測定したところ、同じく電気刺激群で有意に増加したが、この効果はANA-12投与によって消失した(図7)。また、脊損中心部から尾側における脊髄前角のシナプトフィジン(synaptophysin、シナプスのマーカ)とフルオロゴールド(FG)両陽性細胞を測定したところ、電気刺激によって増加するが、この効果もANA-12投与によって消失した(図8)。

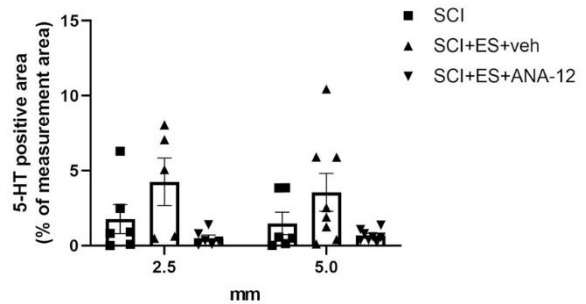


図7 セロトニン(5-HT)陽性線維

以上の結果から、脊損後骨格筋を電気刺激して他動的に収縮弛緩させることによって、筋や脊髄でBDNFが産生され、運動機能が回復する。この機能回復は、筋への電気刺激によって生じる急性期での細胞保護効果及び慢性期での皮質脊髄路の軸索と運動ニューロンとのシナプス結合の再生によるものと考えられる。これらのいずれにおいてもその分子メカニズムとして、BDNF/TrkB経路の活性化が関与している可能性が示唆された。

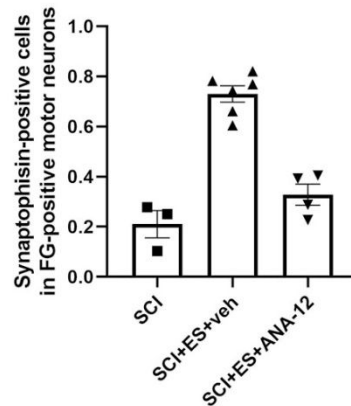


図8 synaptophysin/FG陽性細胞

引用文献

- 1) 坂井宏旭、疫学調査、総合リハビリテーション、36 巻、2008
- 2) 渡部幸司、リハビリテーションにおける電気刺激療法の展望、順天堂医学、56 巻、2010
- 3) Fu J et al., Exercise training promotes functional recovery after spinal cord injury, Neural Plasticity, doi:10.1152/2016/4039580
- 4) Fiuza-Luces C et al., Exercise is the real polypill, Physiology, doi:10.1152/physiol.00019.2013
- 5) 征矢英昭ら、軽運動による脳の活性化と記憶の増強、Brain Nerve、70 巻、2018

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3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 Hayashi N, Himi N, Nakamura-Maruyama E, Okabe N, Sakamoto I, Hasegawa T, Miyamoto O	4. 巻 19
2. 論文標題 Improvement of motor function induced by skeletal muscle contraction in spinal cord-injured rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Spine J	6. 最初と最後の頁 1094-1105
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.spinee.2018.12.012.	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 -
1. 著者名 Okabe N, Himi N, Nakamura-Maruyama E, Hayashi N, Sakamoto I, Narita K, Hasegawa T, Miyamoto O	4. 巻 305
2. 論文標題 Constraint-induced movement therapy improves efficacy of task-specific training after severe cortical stroke depending on the ipsilesional corticospinal projections	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Exp Neurol	6. 最初と最後の頁 108-120
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.expneurol.2018.04.006.	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 -
1. 著者名 Sakamoto I, Himi N, Hayashi N, Okabe N, Nakamura-Maruyama E, Tsukamoto I, Hasegawa T, Miyamoto O	4. 巻 in press
2. 論文標題 The protective effect and mechanism of COA-CI in acute phase after spinal cord injury	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurosci Res	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2020.10.003.	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 -
1. 著者名 坂本一晴、氷見直之、中村 丸山恵美、萩原喜美子、林範人、長谷川徹、宮本修	4. 巻 46
2. 論文標題 新規核酸アナログCOA-CIによる脊髄損傷後の血管新生および機能回復効果	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 川崎医学会誌	6. 最初と最後の頁 65-72
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 無
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6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 林範人、氷見直之、長谷川徹、宮本修
2. 発表標題 脊髄損傷後の下腿骨格筋電気刺激による運動機能改善と再生脊髄の組織学的評価
3. 学会等名 第10回日本ニューロリハビリテーション学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮本修
2. 発表標題 ニューロリハビリテーションの神経科学的基礎
3. 学会等名 第56回日本リハビリテーション医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hayashi N, Himi N, Maruyama E, Okabe N, Sakamoto I, Hasegawa T, Miyamoto O
2. 発表標題 Improvement of motor function induced by muscle contraction in spinal cord injury rats
3. 学会等名 NASS（北米脊椎学会）2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hayashi N, Himi N, Nakamura-Maruyama E, Okabe N, Sakamoto I, Hasegawa T, Miyamoto O
2. 発表標題 Improvement of motor function induced by skeletal muscle contraction in spinal cord injury rats
3. 学会等名 9th Federation of the Asian Oceanian Physiological Societies Congress（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Okabe N, Himi N, Nakamura-Maruyama E, Miyamoto O
2. 発表標題 Constraint-induced movement therapy improves efficacy of task-specific training after severe cortical stroke depending on the ipsilesional corticospinal projections
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林範人、氷見直之、長谷川徹、宮本修
2. 発表標題 脊髄損傷後の下腿骨格筋電気刺激による運動機能改善と脊髄求心路の関与
3. 学会等名 第11回ニューロリハビリテーション学会学術集会
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	丸山 恵美 (Maruyama Emi) (30792072)	川崎医科大学・医学部・助教 (35303)	
研究分担者	氷見 直之 (Himi Naoyuki) (70412161)	川崎医科大学・医学部・講師 (35303)	

	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
研究協力者	甲斐 里沙 (Kai Risa)	川崎医科大学・医学部・研究補助員 (35303)	

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
研究協力者	林 範人 (Hayashi Norito)	川崎医科大学・医学部・大学院生 (35303)	
研究協力者	坂本 一晴 (Sakamoto Issei)	川崎医科大学・医学部・大学院生 (35303)	

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