

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06927

研究課題名(和文)コンドロイチン硫酸分解酵素投与による脊髄損傷ラットの運動機能回復メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanism of recovery of locomotor function in rats with spinal cord injury by administration of chondroitin sulfate-degrading enzyme

研究代表者

船越 健悟 (FUNAKOSHI, Kengo)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：60291572

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)：ラット胸髄完全切断モデルで、損傷部を含む領域にコンドロイチン硫酸分解酵素(ChABC)を投与すると、セロトニン線維が損傷部を越えて切断部より尾側の脊髄運動領域に伸長し、体性運動ニューロンにシナプス性の終末を形成することを明らかにした。一方、生理食塩水を投与した対照群では、セロトニン線維の再生は認められず、その後の下肢運動機能回復はChABC投与群で有意に高い値を示した。このことから、ChABCはセロトニン線維の再生をもたらすことで、運動機能の回復を促進する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コンドロイチン硫酸分解酵素は、脊髄損傷の治療に効果が期待される物質である。本研究では、胸髄を完全切断したモデルにおいても、投与法を工夫することにより、下肢の運動機能を著しく改善する効果があることを確認した。また、機能回復には、下行性投射路の損傷部位を超える再生と、下肢運動領域のニューロン群への投射が関わっていることが明らかになった。本研究は、脊髄損傷におけるコンドロイチン硫酸分解酵素による運動機能回復メカニズムを明らかにしたものであり、コンドロイチン硫酸分解酵素を用いた治療法の開発に向けて重要な示唆を与えるものである。

研究成果の概要(英文)：In a rat model of complete thoracic spinal cord transection, administration of chondroitin sulfate-degrading enzyme (ChABC) to the region containing the injury site caused serotonin fibers to extend beyond the injury site into the spinal motor area caudal to the transection and terminate on somatic motor neurons with synapse formation. In contrast, serotonin fiber regeneration was not observed in the saline-treated control group. Subsequent recovery of hind limb motor function was significantly higher in the ChABC-treated group. These findings suggest that ChABC might enhance the recovery of motor function by inducing the regeneration of serotonin fibers.

研究分野：神経解剖学

キーワード：脊髄損傷 ペリニューロナルネット コンドロイチン硫酸 運動ニューロン セロトニン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷モデルにコンドロイチン硫酸分解酵素(ChABC)を投与することで、損傷レベルを越える軸索伸長が誘導され、運動機能が回復することが20年前に報告された。その後、ChABCによる軸索再伸長メカニズムについて多くの研究がなされてきたが、その多くは齧歯類の皮質脊髄路が通る後索を選択的に切断するモデルを用いたものであり、このモデルでは損傷を免れた軸索による機能回復に焦点が当てられており、損傷レベルを越えて伸長した軸索が運動領域に達した時にどのようなニューロンと連絡したのかといった点についてほとんど注目されていなかった。

胸髄完全切断モデルでもChABC投与によって再生軸索が損傷部を貫通し、尾側の脊髄に到達することが報告されている。しかし、ChABCを損傷部位に大量に注入したモデルでは、後肢の運動機能を評価するBasso, Beattie, and Bresnahan (BBB)スコアは切断後3週目で3点にとどまり、運動機能の十分な回復が認められたとは言い難い。おそらく、ChABCの不適切な投与により、損傷部を通過した再生軸索が、尾側の脊髄において運動機能の回復につながる十分な神経回路を形成することができなかつたと考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ラット胸髄完全切断モデルで確認されたChABCによる運動機能回復が、どのような神経回路によってもたらされているのかを明らかにすることである。運動領域には、運動ニューロン、運動ニューロン、介在ニューロンなどが存在しており、それらが協調してさまざまな運動機能を発現している。本研究では、ChABC投与後に損傷部位を越えて伸長する再生軸索が、損傷部より尾側の腰髄運動領域のニューロン群にシナプス性の終末を形成するのかを観察する。

また本研究では、腰髄運動領域のニューロン群と再生軸索の連絡がどのようなメカニズムによってもたらされているのか探るために、運動ニューロン、介在ニューロンにおいて、ChABC投与後のペリニューロナルネット(PNN)を対照群と比較することで、ChABCによってPNNがどのような影響を受けるのか、またPNNの変化が神経入力とどのような関連があるのかを解析する。

3. 研究の方法

本研究における具体的な課題は、ラット胸髄完全切断モデルにChABCを投与した場合に、脊髄下行路が損傷部を越えて伸長しているかを確認する、損傷部より尾側の腰髄運動領域のニューロン群に発現しているPNNが、ChABC投与によってどのように変化するかを解析する、損傷部より尾側の腰髄運動領域のニューロン群への脊髄下行路の軸索終末を解析し、PNNとの関係を明らかにする、ChABC投与が運動機能の回復をもたらすかを評価する、の四項目である。上記課題を達成するための具体的な実験方法を以下に記す。

(1)モデル動物の作成：8週齢のWistarラットの第10胸髄(T10)を麻酔下で完全切断し、直ちにChABCを染み込ませたスポンゼルを損傷部に埋め込み、モデル動物を作成する。ChABC投与後、2, 3, 8週間の生存期間を設ける、動物を灌流固定し組織を取り出し、以下の項目を調べる。また、対照群として、ChABCの代わりに生理食塩水を投与した群を用意する。

(2)脊髄下行路再生の確認：逆行性トレーサーを損傷部尾側の腰髄に注入し、脳幹や大脳皮質に標識されるニューロンを確認する。このことにより、どの脊髄下行路からの軸索が伸長したのか確かめる。つづいて、順行性トレーサーを適当な脳部位に注入し、損傷部尾側の腰髄の運動領域において、損傷部位を越えて投射してくる軸索を確認する。セロトニン性下行性投射については、免疫組織化学法によって明らかにする。また、脊髄下行路軸索と運動ニューロンや介在ニューロンとの連絡を免疫組織化学的に観察する。

(3)腰髄運動領域のPNNの経時的変化：腰髄において、運動ニューロンと介在ニューロンはコリンアセチルトランスフェラーゼの有無により免疫組織化学的に区別する。各ニューロン群のPNNは、CSPGsのパンマーカーであるWisteria floribunda agglutinin(WFA)染色や抗CS抗体などを用いた免疫組織化学法で標識し、陽性率を比較する。抗CS抗体としては、抗CS-A抗体を試す。

(4)運動機能評価：切断2, 3, 8週後に、ChABC投与群と対照群のラットにおいて、下肢の運動機能をBBBスコアによって評価する。

4. 研究成果

(1) 脊髄下行路再生の確認： 下行性軸索が損傷部を通過し、腰髄運動ニューロンに神経支配を及ぼすかどうかを検討したところ、胸髄完全切断後3週目で、ChABC投与ラットにおいてセロトニン線維が損傷部に入り込んでいるのが観察されたが、対照群である生理食塩水投与ラットでは観察されなかった。セロトニン線維以外の下行性投射は評価できなかった。胸髄完全切断後8週目では、ChABC投与ラットにおいて第5腰髄(L5)前角の運動領域に多数のセロトニン線維が観察され、体性運動ニューロンや介在ニューロンにシナプス終末していたが、生理食塩水投与ラットでは終末は認められなかった。

(2) 腰髄運動領域の PNN の経時的変化： 胸髄完全切断後3週目では、L5前角の体性運動ニューロンのうち、生理食塩水投与ラットでは92%、ChABC投与ラットでは38%がCS-A陽性構造で囲まれており、有意差が認められた。胸髄完全切断後8週目では、L5前角の運動ニューロンのうち、生理食塩水投与ラットでは54%、ChABC投与ラットでは39%がCS-A陽性構造に囲まれており、有意差を認めなかった。一方、胸髄完全切断後3週目では、L5前角の運動ニューロンのうち、生理食塩水投与ラットでは76%、ChABC投与ラットでは85%がWFA陽性構造で囲まれていた。胸髄完全切断後8週目では、L5前角の運動ニューロンのうち、生理食塩水投与ラットでは72%、ChABC投与ラットでは67%がWFA陽性構造に囲まれており、共に有意差を認めなかった。

(3) 運動機能評価： ChABC投与ラットのBBBスコアは、胸髄完全切断後2週目で3.8、3週目で7.1、8週目で10.3であった。一方、対照群である生理食塩水投与ラットのBBBスコアは、胸髄完全切断後2週目で1.3、3週目で1.9、8週目で2.8と、それぞれ有意に低かった。

これらのことから、脊髄完全切断直後の損傷部位へのChABCの徐放的投与は、損傷部位を通過する下行性セロトニン軸索の再生と、損傷部位より尾側レベルの運動ニューロンへの投射を促進することが示唆された。ChABCの投与は、運動ニューロン周囲のCS-GAGを分解することにより、セロトニン線維のシナプス再形成を促進している可能性がある。一方、ChABC投与ラットでは、セロトニン軸索が運動ニューロンに終末する以前から下肢の運動機能が有意に改善されていることから、他のメカニズムも運動機能回復に寄与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Masahito Takiguchi, Takashi Akaike, Kaoru Shindo, Risa Sakuyama, Ran Koganemaru, Kengo Funakoshi	4. 巻 766
2. 論文標題 Chondroitin sulfate expression around motoneurons changes after complete spinal transection of neonatal rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 136324
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neulet.2021.136324.	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 Takiguchi Masahito, Miyashita Kanae, Yamazaki Kohei, Funakoshi Kengo	4. 巻 16
2. 論文標題 Chondroitinase ABC Administration Facilitates Serotonergic Innervation of Motoneurons in Rats With Complete Spinal Cord Transection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Integrative Neuroscience	6. 最初と最後の頁 881632
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnint.2022.881632	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	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 滝口雅人
2. 発表標題 胸髄全切断ラットへのコンドロイチナーゼABC投与によるセロトニン作動性再生軸索の腰髄への投射とペリニューロナルネットの解析
3. 学会等名 第127回日本解剖学会全国学術集会
4. 発表年 2022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
研究協力者	滝口 雅人 (Takiguchi Masahito)		

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
---------	---------