

令和 5 年 6 月 11 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16931

研究課題名（和文）脱抑制によって活性化する興奮性脊髄介在ニューロンネットワークの解明

研究課題名（英文）Excitatory spinal interneuron networks activated by disinhibition

研究代表者

三上 貴弘（Mikami, Yoshihiro）

昭和大学・医学部・普通研究生

研究者番号：80834944

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：脊髄内にあるニューロンネットワークは通常抑制されており、脱抑制により不規則な発作様の自発バースト活動が全ての髄節の前根から記録される。本研究ではこの脱抑制により顕在化する神経回路網（バーストジェネレータ、BG）が各髄節に存在すること、後根からの感覚入力によってBGを駆動できることなどを明らかにした。さらに各髄節にあるBG間の興奮性結合は強く、下部頸髄のみの脱抑制により、脊髄全体にわたって存在する各BG全体が駆動された。しかしまれに各筋を個別に支配するBGの駆動も観察された。今後、各筋のBGを個別に制御する方法が確立されれば、脊髄損傷患者が自ら呼吸や歩行できるようになる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高位脊髄損傷では脳から脊髄への指令経路が遮断されるため、歩行運動などの随意運動や呼吸運動ができない。生命維持のために人工呼吸器が必要である。本研究から各髄節にBGが存在すると考えられた。また同一髄節内に運動ニューロンが存在する筋でも対応するBGが別個に存在することも示唆された。横隔膜を支配する運動ニューロンへのBGを個別に駆動できれば、陽圧人工換気を用いずに呼吸できる可能性がある。またBG出力の強弱を制御できれば歩行させることも可能だ。このようなBGの制御方法の解明は、脳から脊髄への下行路を再生させる研究においても不可欠な知識となる。

研究成果の概要（英文）：Neuronal networks in the spinal cord are normally inhibited, and disinhibition causes seizure-like spontaneous bursts in the ventral roots of all spinal segments. In this study, we found that a neuronal network (burst generator, BG) become apparent by this disinhibition exists in each spinal segment, and that the BG can be driven by sensory input from the dorsal root. Furthermore, excitatory coupling between BGs in each segment was strong, and disinhibition of the lower cervical spinal cord alone drove the entirety of each BG present throughout the spinal cord. However, in rare cases, driving of the BG innervating each muscle individually was also observed. In the future, if a method to control the BGs of each muscle individually is established, patients with spinal cord injury may be able to breathe and walk on their own.

研究分野：整形外科学

キーワード：脊髄 興奮性介在ニューロン 抑制性介在ニューロン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系の損傷、特に交通事故で頻繁に生じる脊髄損傷に対し、急性的な治療はできるが、その後の後遺症を治すことは現在の医療では不可能である。特に、高位脊髄損傷では、しばしば患者は一生、人工換気器でのコントロールが不可欠になってしまう。

脊髄内のグリシン受容体と GABA_A 受容体をストリキニーネで阻害すると、不規則な発作様の自発活動が全ての髄節の前根から記録できることは良く知られている。この活動は、開始から数秒間持続し、バースト活動と呼ばれる。バースト活動を作るニューロンネットワーク(バーストジェネレータ)が通常抑制された状態で存在していることを示しており、このバーストジェネレータが、損傷後のネットワーク再構築で使用されるプロトタイプであると私は考えた。

正常呼吸の際、横隔神経や外肋間筋神経は吸息相でバースト状の複合活動電位を生じ、横隔膜と外肋間筋を収縮させて肺の換気を行う(文献 1)。高位脊髄損傷では延髄呼吸中枢から脊髄への経路遮断によりこれらの筋の呼吸性収縮が停止するが(文献 2)筋自体とそれを支配する運動神経は無傷である。それゆえ延髄呼吸中枢からの指令によらない方法で呼吸筋の活動を操作し、呼吸機能を回復させる手法について盛んに研究が行われている(文献 3-5)。ラット新生児の脊髄摘出標本において GABA_A 受容体やグリシン受容体を阻害し脱抑制すると、自発性にバースト状の発射活動が各前根に出現することが報告された(文献 6,7)。この脱抑制により顕在化するバースト形成回路を利用することで、脊髄損傷後の横隔膜の呼吸機能を回復できる可能性がある(文献 8)。

2. 研究の目的

以上より本研究の目的は「通常抑制されている脊髄内ニューロンネットワークは、どのような回路であるのか？」を解明することである。

本研究ではまず 3 脊髄節からなるブロック標本を作成し、脱抑制により顕在化するバースト形成回路が各脊髄節内にあるのかを検証した(実験)。そして横隔神経が出る第 3 頸髄から第 5 頸髄の局所的脱抑制は第 4 頸髄前根に自発性バースト活動を誘発するが、尾側に位置する他の脊髄節の前根には誘発しないという仮説を検証した(実験)。さらに脱抑制下において横隔神経の感覚刺激は横隔神経のバースト状運動性活動を特異的に誘発しやすいという仮説を検証した(実験)。

3. 研究の方法

本研究は、日本政府の動物の愛護及び管理に関する法律(昭和 48 年法律第 105 号)に基づき運営されている昭和大学動物実験委員会の承認のもと、「昭和大学実験動物実施指針」に基づき倫理的に行われた(承認番号 09051, 02024, 03064)。実験には生後 0 日から 4 日齢の Wistar ラットを用いた。イソフルラン深麻酔下で断頭し、修正クレブス液を満たした解剖用チャンバーに入れ、脳幹から脊髄を摘出した。実験 では第 3 頸髄から第 5 頸髄(C3-C5)、第 6 胸髄から第 8 胸髄、第 2 腰髄から第 4 腰髄、第 6 腰髄から第 2 仙髄の 3 髄節になるように剪刀で切断し、ブロック標本を作成した。それぞれ第 4 頸髄前根、第 7 胸髄前根、第 3 腰髄前根、第 1 仙髄前根から運動性発射活動を記録し、グリシンおよび GABA_A 受容体の広範な阻害薬であるストリキニーネ(10 μM)を灌流投与した。実験 では、第 3 頸髄以下の

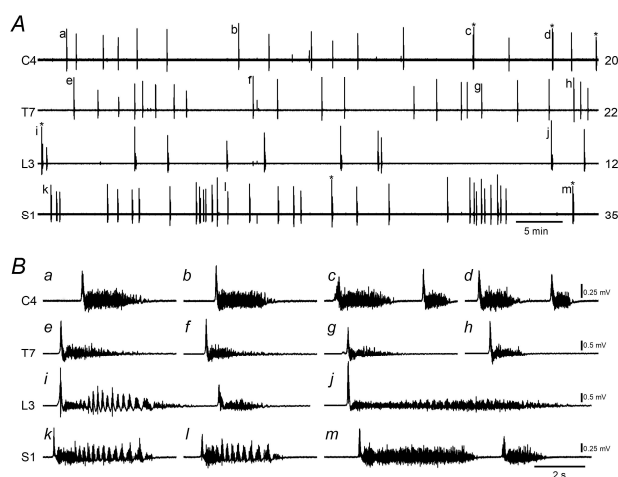


図 1 10 μM ストリキニーネ投与下における自発性バースト活動の例。A, 第 3 頸髄から第 5 頸髄、第 6 胸髄から第 8 胸髄、第 2 腰髄から第 4 腰髄、第 6 腰髄から第 2 仙髄の 3 髄節ブロック標本に 10 μM ストリキニーネを投与して 30 分以上経過後の 1 時間の記録。上から第 4 頸髄前根(C4VR)、第 7 胸髄前根(T7VR)、第 3 腰髄前根(L3VR)、第 1 仙髄前根(S1VR)から得た神経発射活動を示す。* は短い間隔でバースト活動が 2 回続いた記録部位を、横の数字は 1 時間で観察されたバースト活動の回数を示す。小文字 a から m で示した記録の時間軸を引き延ばした記録が Ba-m である。

脊髄摘出標本を用い、チャンバーを第5頸髄から第7頸髄間で2つの区画に分割し、ストリキニーネを吻側区画に投与した。

4. 研究成果

実験 : コントロール条件下では、ブロック標本から記録したすべての前根で自発性の活動はほとんど見られなかった。ストリキニーネを投与するとすべての前根で自発性のバースト活動が観察された(図1A)。この結果はバースト形成回路が各髄節に存在することを示唆している。

実験 : 脊髄摘出標本のC3-C5領域にストリキニーネを局所投与すると、第4頸髄前根だけでなく他のすべての前根に同期した自発性バースト活動が誘発された(図2)。この結果から、脊髄の局所的脱抑制により脱抑制した髄節の運動ニューロン群のみに自発性バースト活動を誘発することはできないことが分かった。

実験 : 続いて脊髄摘出標本を用い、脱抑制下で横隔神経の感覚線維に電気刺激を与える実験を行った。横隔神経の感覚刺激は第4頸髄前根に自発性バースト活動と同様の振幅のバースト活動が誘発したことから、横隔神経のみならず他の第4頸髄の脊髄神経から分岐する神経にもバースト活動を誘発していると考えられた(図3)。最後にC3-C5ブロック標本を用い、脱抑制下で横隔神経に感覚刺激を与えたが、横隔神経にバースト状運動性活動は誘発されなかった。

<引用文献>

- Butler, J.E., A.L. Hudson, and S.C. Gandevia, The neural control of human inspiratory muscles. *Prog Brain Res*, 2014. 209: p. 295-308.
- McKim, D.A., et al., Home mechanical ventilation: a Canadian Thoracic Society clinical practice guideline. *Can Respir J*, 2011. 18(4): p. 197-215.
- Zholudeva, L.V., et al., The Neuroplastic and Therapeutic Potential of Spinal Interneurons in the Injured Spinal Cord. *Trends Neurosci*, 2018. 41(9): p. 625-639.
- Wijkstra, P.J., et al., Diaphragm Pacing in Patients with Spinal Cord Injury: A European Experience. *Respiration*, 2022. 101(1): p. 18-24.
- DiMarco, A.F. and K.E. Kowalski, High-frequency spinal cord stimulation in a subacute animal model of spinal cord injury. *J Appl Physiol* (1985), 2019. 127(1): p. 98-102.

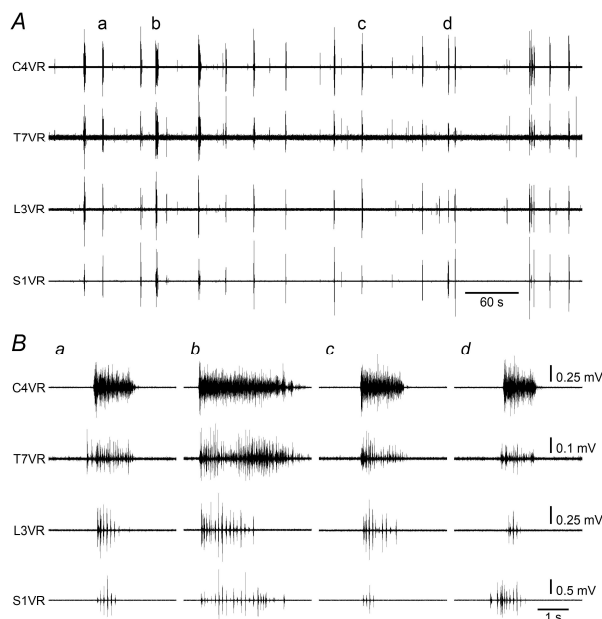


図2 脊髄摘出標本の吻側領域(第3頸髄から第5頸髄領域)に10 μ Mストリキニーネを投与した時の代表的記録。A, 10 μ Mストリキニーネを投与して30分以上経過後の1時間の記録。上から第4頸髄前根(C4VR)、第7胸髄前根(T7VR)、第3腰髄前根(L3VR)、第1仙髄前根(S1VR)から得た神経発射活動を示す。どの自発性バースト活動も記録部位間で同期していることに注目せよ。小文字aからdで示した記録の時間軸を引き延ばした記録をBa-dに示す。BaではT7VR、BdではS1VRのバースト活動が先行していた。この時間軸では判別できないがBb、BcではC4VRのバースト活動が先行していた。

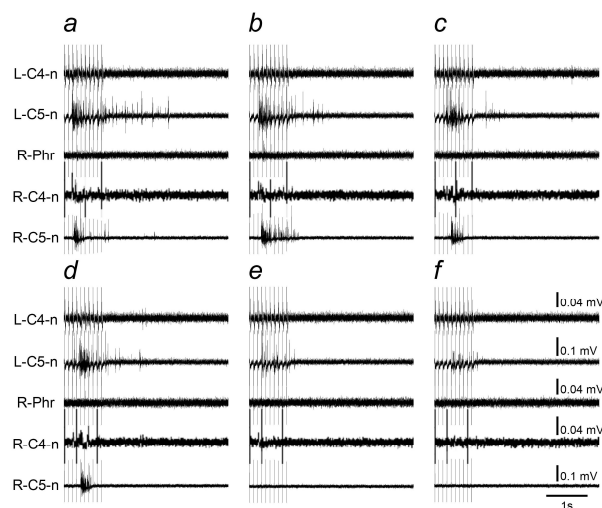


図3 横隔神経刺激の効果。a-f, それぞれaからfの順番で横隔神経に20秒間隔、10Hz、10回の連続電気刺激を与えた時に得られた記録。上から左の第4頸髄神経のうち横隔神経を含む神経が分岐後の脊髄神経(L-C4-n)、左の第5頸髄神経のうち横隔神経を含む神経が分岐後の脊髄神経(L-C5-n)、右横隔神経(R-Phr)、右の第4・5頸髄神経のうち横隔神経を含む神経が分岐後の脊髄神経(R-C4-n、R-C5-n)の記録を示す。L-C5-n、R-C4-n、R-C5-nには明白なバースト活動が誘発されたが、R-Phrには誘発されなかった。

6. Bracci, E., L. Ballerini, and A. Nistri, Spontaneous rhythmic bursts induced by pharmacological block of inhibition in lumbar motoneurons of the neonatal rat spinal cord. *J Neurophysiol*, 1996. 75(2): p. 640-7.
7. Cazalets, J.R., Metachronal propagation of motoneurone burst activation in isolated spinal cord of newborn rat. *J Physiol*, 2005. 568(Pt 2): p. 583-97.
8. Cregg, J.M., et al., A Latent Propriospinal Network Can Restore Diaphragm Function after High Cervical Spinal Cord Injury. *Cell Rep*, 2017. 21(3): p. 654-665.

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 2件）

1. 著者名 Mikami Yoshihiro, Iizuka Makito, Onimaru Hiroshi, Izumizaki Masahiko	4. 巻 72
2. 論文標題 Glycine and GABAA receptors suppressively regulate the inspiratory-related calcium rise in the thoracic inspiratory cells of the neonatal rat	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Physiological Sciences	6. 最初と最後の頁 24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12576-022-00850-4	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 -

1. 著者名 LIN Shih Tien, IIZUKA Makito, MIKAMI Yoshihiro, YODA Shunya, ONIMARU Hiroshi, IZUMIZAKI Masahiko	4. 巻 44
2. 論文標題 Cannabinoid receptors involved in descending inhibition on spinal seizure-like activity in the phrenic output	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomedical Research	6. 最初と最後の頁 41～49
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2220/biomedres.44.41	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 Takahashi S, Mikami Y, Iizuka M, Izumizaki M.
2. 発表標題 Characteristics of the burst generating networks released by disinhibition in the spinal cord of the neonatal rat
3. 学会等名 The 97th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan
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
---------------------------	-----------------------	----

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