

機関番号：25406

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20500457

研究課題名 (和文) 脊髄半切後の運動回復に軸索が切断されなかった錐体路ニューロンはいかに関わるのか？

研究課題名 (英文) Cortical neurons whose axons spared from a spinal cord hemisection: how do they concern motor recovery?

研究代表者

武本 秀徳 (TAKEMOTO HIDENORI)

県立広島大学・保健福祉学部・助教

研究者番号：10453218

研究成果の概要 (和文)：本研究の目的は、脊髄半切後に脱神経領域で側芽を形成させた錐体路ニューロンが神経棘をどのように変化させるのか調べることであった。目的のニューロンを検出するには、逆行性トレーサーを半切直後に脱神経領域に注入し、また神経突起より特異的経路を経て軸索に取り込まれるトレーサーを用いるべきだと分かった。脊髄半切後に側芽を形成した錐体路ニューロンの神経棘が示す変化については分析中であり、実験を継続している。

研究成果の概要 (英文)：The aim of this study was to clarify changes in dendritic spines of cortical neurons which form sprouting in denervated area following a spinal cord hemisection. To detect neurons which form sprouting, it turned out that retrograde tracer should be injected into denervated area immediately after hemisection, and that tracers which are transported within neurites via specific membrane molecules should be used. On the other hand, analyses for changes in dendritic spines of cortical neurons which form sprouting after a spinal cord hemisection are under continuation now.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合分野

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学

キーワード：脊髄半切，運動回復，錐体路ニューロン，軸索の可塑性，神経棘の可塑性

1. 研究開始当初の背景

最近の細胞療法や分子生物学的手法の進歩により、損傷された脊髄の神経回路が修復可能となってきた (Barnett and Riddell, 2007; GrandPré et al., 2002)。しかし、現時点では、神経回路を完全には修復できず運動機能の回復は部分的に促進されるに止まる。ヒトの脊髄損傷は、機能的に完全損傷でも脊髄が切断されていることはまれで、多く

が不全損傷である。脊髄不全損傷では、ヒト、動物モデルとも運動機能に自然回復がみられる。この回復は、損傷されずに残された神経回路の可塑性変化に基づくと考えられる (Raineteau and Schwab, 2001)。リハビリテーション医学的な治療介入は、残された神経回路を賦活化することで運動回復を促す。損傷された神経回路を修復する療法と残された神経回路を賦活化するリハビリテーシ

オン介入との連携は、運動回復をより促進すると期待される。しかしながら、リハビリテーション戦略についてその効果の検証や開発を行う上で基礎となる、残された神経回路の可塑性についての情報は不十分な状態にある。

脊髄不全損傷は、脊髄の下行性伝導路軸索を減少させる。一方、軸索が保存された下行性伝導路のニューロンは、その軸索から側芽を発達させ、脱神経となった脊髄の運動ニューロンを再支配する (Kapfhammer, 1997)。従って、脱神経領域への下行性伝導路ニューロンの側芽の発達過程、あるいは脱神経領域へ側芽を送った下行性伝導路ニューロン数の変化を調べることは運動回復を理解する一助となる。他方、これまで支配関係になかった脊髄運動ニューロンと接続した下行性伝導路ニューロンは、以前にない能力を身につけなければ新しい標的を機能させることはできないだろう。シナプスの可塑性はニューロンの興奮性を変える。下行性伝導路の一つである錐体路の軸索を切断すると、ニューロンの樹状突起上にありシナプス前細胞との接続部を作る、神経棘と呼ばれる小突起が減少する (Kim et al., 2006)。しかし、運動回復を担う、脱神経領域に側芽を送った下行性伝導路ニューロンの神経棘やそのシナプス構造にどのような変化が生じるかはどの下行性伝導路についても分かっておらず、運動回復との関連も不明である。

2. 研究の目的

本研究計画の目的は、①脊髄半切後における運動回復と脱神経領域へ側芽を送った錐体路ニューロンの数的変化との関係を明らかにすること、②脊髄半切後における運動回復と脱神経領域へ側芽を送った錐体路ニューロンのシナプス構造の変化との関係を明らかにすることである。研究の第一段階として、錐体路ニューロンを迅速に可視化する手法を確立することを目的に実験を行った。この予備的な調査を終えた後に、脊髄半切後に側芽を形成した錐体路ニューロンの動態を実際に分析することとした。

3. 研究の方法

(1) 概要

脊髄半切による脱神経領域に側芽形成した錐体路ニューロンを、半切側腰髄に逆行性トレーサーを注入することで可視化することとした。さらにこの逆行性トレーサーにて標識された錐体路ニューロンの神経棘を、脳の切片にインドカルボシアニン (DiI) トレーシングを追加することによって可視化し、その形態変化を分析することとした。

研究はまず、錐体路ニューロンを迅速に可視化する手法、そして逆行性トレーシングと

DiI トレーシングによる二重標識の手法を確立することを目的に実験を行った。そのため、逆行性トレーサーによって錐体路ニューロンが可視化されるのに要する日数、そしてトレーサーの注入が錐体路ニューロン神経棘の形態に与える影響を、2つのトレーサーを用いて調べた。

なお、本実験計画は、県立広島大学研究倫理委員会の承認のもと実施された。

(2) 実験動物

Wistar 系雌性ラット (体重, 215-275 g) 14 匹を用いた。ラットを、チップを敷いたポリカーボネイト製のラット用ケージに収容し、12 時間昼・12 時間夜サイクル、温度 23 °C に設定された環境にて飼育した。実験期間を通じ、飼料と水の摂取は自由に行わせ、全ての行動に制限を設けなかった。

(3) 逆行性トレーシング

ラットに抱水クロラル (400 mg/kg) を腹腔内投与し麻酔した。ラットに麻酔が得られた後、第 1 腰椎の椎弓を切除し腰髄を露出させた。露出された腰髄の一侧に、1.0%小麦胚凝集素アグルチニン-Alexa488 (WGA-Alexa488, Molecular Probes) (n = 4)、または 0.5%コレラトキシン・サブユニット B-Alexa488 (CTB-Alexa488, Molecular Probes) (n = 8) を注入した。これらの逆行性トレーサーはいずれもガラスピペットを通じて、300 nL を 3 カ所 (1 カ所あたり 100 nL) に分け圧注した。注入は 1 カ所あたり 2~4 分かけて行った。注入の後、トレーサーの漏出を防ぐため、ガラスピペットの先端は腰髄に 2~4 分間とどめた後、ゆっくりと引き抜いた。

対照として、第 1 腰椎の椎弓切除のみが行われトレーサーの注入を受けないラットを 2 匹準備した。

(4) 組織標本作成

WGA-Alexa488 が注入されたラットは 2、または 4 日、CTB-Alexa488 が注入されたラットは 2、7、または 14 日が経過した時点で、各 2 匹を 4.0%パラフォルムアルデヒド含 0.01M リン酸緩衝生理的食塩水 (PFA-PBS) にて灌流固定した。また、CTB-Alexa488 が注入されて 2 日間経過したラット、および第 1 腰椎レベルにおける椎弓切除のみを受けたラットの各 2 匹を 1.5%PFA-PBS (Kim et al., 2006) にて灌流固定した。灌流固定後のラットから、脳およびトレーサーが注入されたレベルの腰髄を摘出した。4.0%PFA-PBS にて固定されたラットの脳と腰髄は、同じ固定液に一晩に浸漬した後、10、15、および 20%スロース含 PBS にて洗浄し、-80°C にて凍結した。凍

結された脳と脊髄はクリオスタット中で 50 μm (脳) あるいは 40 μm (脊髄) の厚さで薄切した。1.5%PFA-PBS にて固定されたラットの脳はスライサーにて 300–500 μm の厚さで薄切した。

(5) 組織観察

クリオスタットにて作製された脳および腰髄の切片を蛍光顕微鏡 (Nikon TE300) にて観察した。脳における観察では、標識されたニューロンの有無、標識されたニューロンの位置について、腰髄における観察では、注入されたトレーサーの分布について調べた。

(6) DiI トレーシング

DiI トレーシングを、1.5%PFA-PBS にて固定された後にスライサーにて薄切された脳の切片に対して行った。蛍光実体顕微鏡 (Nikon SMZ1500) による観察下に、腰髄に逆行性トレーサーが注入された側とは対側の脳の大脳皮質の一次運動野に DiI の結晶をのせた。DiI の結晶が載せられた脳の切片は 4–6 時間、湿箱中で室温にてインキュベートした。その後、切片を共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus FV1000D) にて観察した。

4. 研究成果

(1) 錐体路ニューロンの逆行性トレーシング

第 1 腰椎レベルの腰髄から注入された WGA-Alexa488, CTB-Alexa488 が錐体路ニューロンを標識するのに要した日数は、それぞれ 4 日、および 7 日であった。それ以前の日数において、大脳皮質に標識されたニューロンは観察されなかった。標識されたニューロンは、腰髄で逆行性トレーサー注入された側とは対側の一次運動野の第 V 層に集中していた (図 1, 矢印)。しかし、逆行性トレーサーが注入された側と同側の一次運動野にも、わずかな数だが標識されたニューロンが認められた。

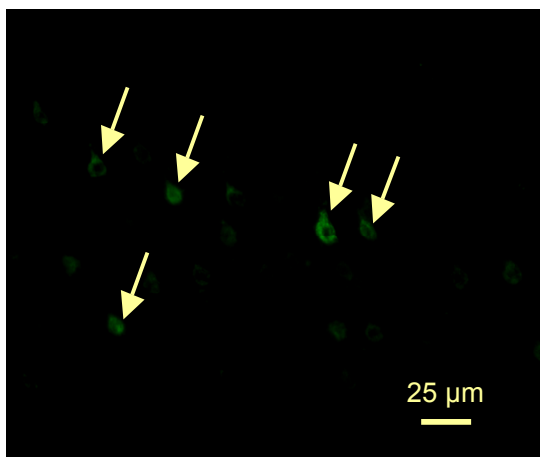


図 1 可視化された錐体路ニューロン

(2) 腰髄における逆行性トレーサーの分布

WGA-Alexa488, CTB-Alexa488 とともに、腰髄の注入された側の後角および前角に行き渡っていた。WGA-Alexa488 は CTB-Alexa488 に比べ、注入されたがわの灰白質周囲の白質そして対側の灰白質にも一部漏れ出していた (図 2)。

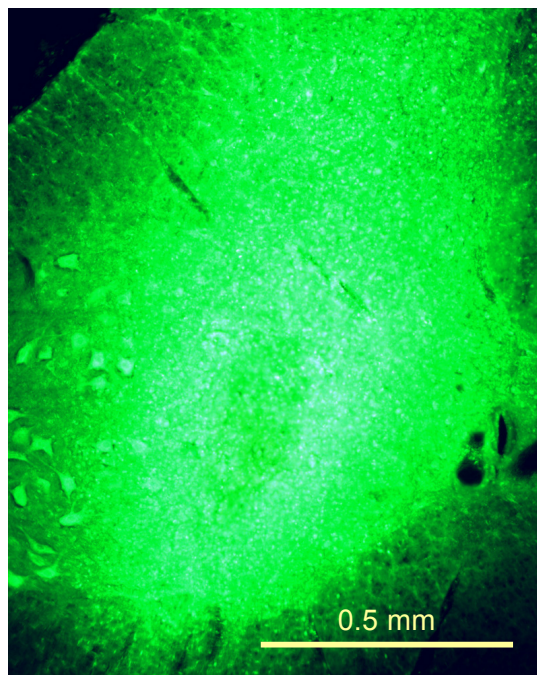


図 2 注入された逆行性トレーサーの分布

(3) DiI トレーシング

第 1 腰椎に椎弓切除は受けても逆行性トレーサーの注入を受けなかったラットの錐体路ニューロンの神経棘は、正常な形態を示していた：神経棘は長さ 2 μm 、直径 1 μm 程の大きさを持ち、かつ一定の間隔で樹状突起上に並んでいた (図 3)。一方、逆行性トレーサー (CTB-Alexa488) の注入を受けたラットの錐体路ニューロンは、逆行性トレーサーが自身に到達する以前の 2 日の段階で病的な形態を持つ樹状突起および神経棘を持つものが現れた。こうした樹状突起では、神経棘はまばらとなっていた。また神経棘は、糸状仮足様の延長された長さを持つものが出現していた (図 4, 矢印)。糸状仮足様の延長された長さを持つ神経棘は、シナプス構造を持つには至っていない神経棘であるとされる (Dailey and Smith, 1996)。

(4) 逆行性トレーサーが錐体路ニューロンを標識するのに要した日数

これまで WGA-Alexa488, および CTB-Alexa488 を用いて、腰髄からの逆行性トレーシングにてラットの錐体路ニューロンを標識するために必要な生存期間は示されていなかった。今回、少なくとも前者は

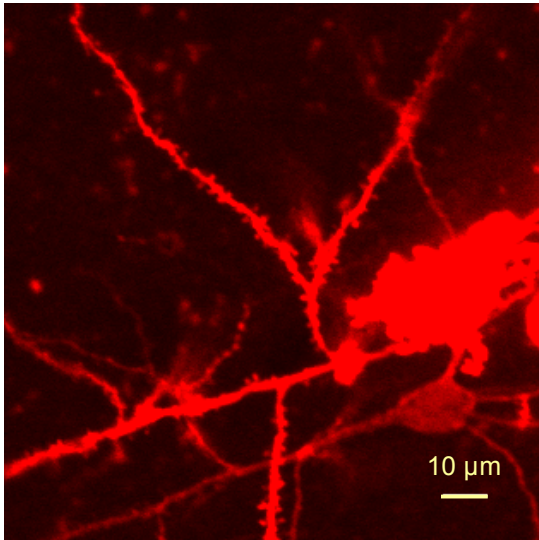


図 3 トレーサーが注入されなかったラットの錐体路ニューロン神経棘

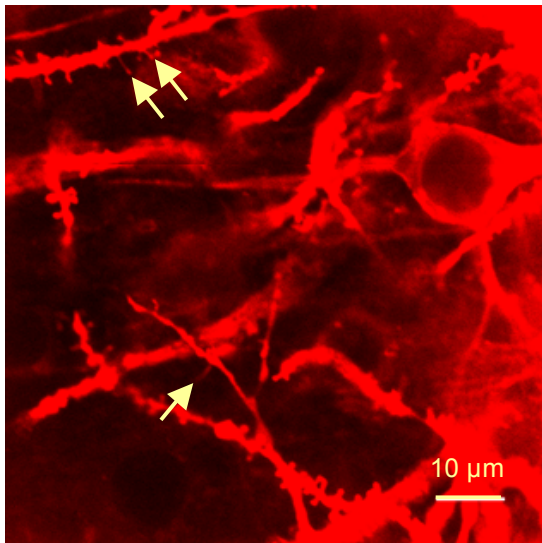


図 4 トレーサーが注入されたラットの錐体路ニューロン神経棘

4日、後者は7日を要することが明らかとなった。これらの結果は西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) と結合した WGA (Hardy et al., 1998) あるいは CTB (Lefler et al., 2008) を用いて延髄の下行性ニューロンの標識がされた場合と同等、あるいはやや遅い。逆行性トレーサーとして、これまで数多くの物質が発見、開発されている。物質ごとに、ニューロン細胞体へ輸送される速度には差がある (Koë bbert et al., 2000)。輸送される速度についての情報は、脊髄半切の急性期において、脱神経領域に側芽を形成した錐体路ニューロンを検出する上で重要な意味を持つ。またこの情報は、急性期以降においても、実験期間が終了するいかに前逆行性ト

レーサーを注入すべきかその時期を検討する上でも役立つと考えられた。

(5) 逆行性トレーサー注入による錐体路ニューロン神経棘の形態への影響

DiI トレーシングによる結果は、逆行性トレーサー注入のためのガラスピペットの腰髄への刺入は、後肢を支配する領域の一次運動野における錐体路ニューロンの神経棘に病的変化を引き起こすことを示唆している。この病的変化には、樹状突起上における神経棘の減少、および神経棘の糸状仮足様の変化が含まれた。これらの変化は、逆行性トレーサーがニューロン細胞体へ到達する以前に生じたことから、トレーサーによって引き起こされたと言うより、腰髄へのガラスピペットの刺入に基づくと考えることが適当だろう。この考えは、これらの変化が軸索を切断された錐体路ニューロンの神経棘が来す変化と一致している (Kim et al., 2006) ことから支持される。腰髄へのガラスピペットの刺入は、一部の錐体路ニューロンの軸索を損傷させたと考えられる。この軸索に損傷を受けたニューロンで、先に述べた神経棘の病的変化が生じたのだと予想される。

(6) 逆行性トレーサーの選択

ガラスピペットの腰髄への刺入が錐体路ニューロン神経棘の形態に影響を与えたという可能性は、逆行性トレーサーは脊髄半切直後に注入されるべきで、側芽が形成された後に注入されるべきではないという結論を導く。なぜならば、逆行性トレーサー注入の操作が側芽を傷つけてしまうことで、側芽を形成した錐体路ニューロンの神経棘の形態に影響を与える可能性が高いためである。また、逆行性トレーサーは、側芽が形成される前の脱神経領域に、本研究にて用いた WGA-Alexa488 や CTB-Alexa488 のように神経終末より特異的な経路を経て軸索に取り込まれるトレーサー (Koë bbert et al., 2000) を注入しておく方法が適切であることを示唆している。一方、HRP、フルオロ・ゴールド、またはファスト・ブルーのような注入に伴って生じた軸索の損傷部分から受動的に取り込まれる性格のトレーサー (Koë bbert et al., 2000) の使用は適切でないと結論される。

(7) まとめ

- ① 本研究の目的は、脊髄側半切後において、脱神経領域に側芽を形成させたニューロンが神経棘を質的・量的にどのように変化させるのか、錐体路ニューロンを対象に調べることであった。
- ② 研究はまず、錐体路ニューロンを迅速に可視化する手法、そして逆行性トレーシング

とDiIトレーシングによる二重標識の手法を確立することを目的に実験を行った。

- ③逆行性トレーサーは脊髄半切後における脱神経領域に側芽が形成される前に注入されるべきである、そしてWGA-Alexa488やCTB-Alexa488のように神経突起より特異的経路を経て軸索に取り込まれるトレーサーを用いるべきであるという結論が得られた。
- ④脊髄側半切後において、側芽を形成した錐体路ニューロンの神経棘がどのような変化を示すのかについては分析中であり、実験を継続している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武本 秀徳 (TAKEMOTO HIDENORI)

県立広島大学・保健福祉学部・助教

研究者番号: 10453218

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

金村 尚彦 (KANEMURA NAOHIKO)

埼玉県立大学・保健医療福祉学部・講師

研究者番号: 20379895

飛松 好子 (TOBIMATSU YOSHIKO)

国立障害者リハビリテーションセンター

(研究所)・義肢装具技術研究部・部長

研究者番号: 20172174