

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11260

研究課題名(和文) 痙縮の軽減を目的としたIa線維受容器の抑制とその効果に関する研究

研究課題名(英文) Effects of Ia inhibition on spasticity after central nervous system injury

研究代表者

李 佐知子 (Lee, Sachiko)

名古屋大学・医学系研究科(保健)・准教授

研究者番号：80599316

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、痙縮に対してIa活動抑制の効果を確認した。脊髄損傷後の痙縮をH反射の刺激頻度依存性減弱(RDD)という現象が弱化することを指標に評価したところ、Ia活動を抑制する試薬を投与したマウスでは、試薬を投与しないマウスと比較して、H反射のRDDが確認された。つまり痙縮が軽減することを確認できた。次に痙縮病態の一つに、脊髄神経回路の不適切な変化が生じることが知られている。その一つにIa- α 運動神経細胞の過剰な接続がある。今回Ia活動を抑制したところ、この過剰な接続数が正常化することが確認された。これらの結果は、痙縮の新たな治療法の開発につながる成果と言える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在の痙縮治療は、慢性化した痙縮骨格筋の二次的障害である拘縮や痛みに対して、過剰な筋収縮を抑制することで治療する。筋収縮の抑制と行うため、痙縮骨格筋の筋機能、つまり運動機能を改善させることは治療目的に入っていない。本研究は痙縮発症早期に、これまで治療ターゲットとなっていなかったIa線維の活動を抑制することで痙縮の軽減を目指した。我々は早期に痙縮治療を行うことで、運動機能の改善をも目指した投薬とリハビリテーションの併用治療を目指している。本研究の成果は、新たな痙縮治療の開発につながる研究である。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we confirmed the effect of Ia activity inhibition on spasticity. Spasticity after spinal cord injury (SCI) was assessed using rate dependent depression (RDD) of H-reflex. The mice of drug administration were confirmed to improve the RDD of H-reflex compared to vehicle mice. In other words, it was confirmed that spasticity was reduced. Next, one of the pathologies of spasticity is known to result from maladaptive changes in spinal neuronal circuits. One of these is the excessive connection of Ia- α motor neurons. In this study, inhibition of Ia activity was observed to normalize this excessive number of connections. These results could lead to the development of new treatments for spasticity.

研究分野：神経リハビリテーション科学

キーワード：痙縮 Ia線維 PLD-mGluR

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷後の難治性後遺症の一つに脊髄伸張反射亢進を示し、不随意的筋活動をおこす痙縮がある。現在使用されている痙縮治療薬は、経口抗痙縮薬として脊髄運動神経細胞を抑制する薬剤が使用されているが、副反応があり効果は限られている。近年、神経筋接合部の神経伝達物質の分泌を阻害するボツリヌス毒素の注射が推奨され一定の痙縮軽減効果を上げているが、反復使用により筋萎縮や、骨格筋機能の低下が生じるうる副反応が報告された。また現状における痙縮治療は、慢性化した状態で治療を行い、痙縮の二次的障害である拘縮や痛み軽減を目指した治療であり、痙縮骨格筋の筋機能や運動機能改善を目指したものではない。そこで、我々は痙縮を抑制するために骨格筋収縮を抑制するのではなく、脊髄伸張反射を構成する Ia 感覚神経細胞をターゲットとした新たな治療コンセプトを考えた。

2. 研究の目的

痙縮は脊髄伸張反射の亢進を呈することから(図 1)、この反射を構成する Ia 線維の活動抑制により痙縮が軽減するか、また痙縮病態の脊髄神経回路における不適応な変化として知られている、Ia- α 運動神経細胞の過剰接続が軽減するかについて明らかにすることを本研究の目的とした。

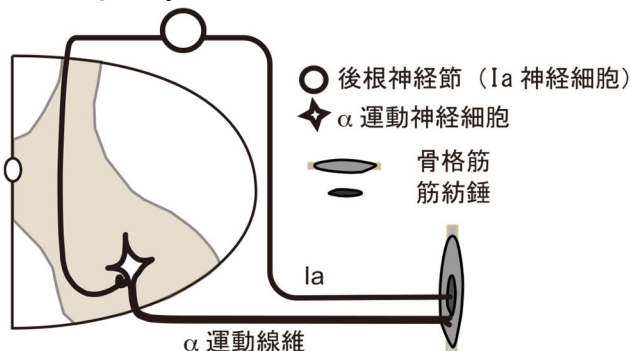


図 1 脊髄伸張反射の模式図

3. 研究の方法

脊髄損傷マウスモデルは第 6 頸髄の頸髄半切モデルを採用した。痙縮評価として、Hoffman 反射(H 反射)の Rate Dependent Depression(RDD)を用いた。Ia 線維の活動抑制として、Ia 固有感覚受容器終末部に存在する PLD 結合型代謝型グルタミン酸受容体(PLD-metabotropic glutamate receptors ; PLD-mGluR)の競合的アンタゴニストである(R,S)-3,5-dihydroxyphenylglycine (DHPG)を用いた。脊髄損傷 1 週間後に薬剤を注入した浸透圧ポンプをマウス背部に埋め込み、チューブを介して痙縮骨格筋に薬液を 2 週間持続浸透させた。対照群として薬剤の溶媒のみを投与した動物を vehicle 群とした。

痙縮評価は、モデル作成前、脊髄損傷後 1 週、2 週、4 週のタイミングで実施した。

薬剤投与終了後、脊髄組織をサンプリングし、以下の項目について解析を行った。

(1) 脊髄 Ia- α 接続数: Ia 線維軸索終末部を小胞グルタミン酸輸送体 1 (Vesicular Glutamate Transporter 1; VGluT1) で、 α 運動神経細胞をコリンアセチルトランスフェラーゼ(choline acetyltransferase ; ChAT)でそれぞれ標識し、シナプス接続数を数える。

(2) 脊髄 α 運動神経細胞の活動性を Ca^{2+} 依存的発現増加する c-Fos で確認: α 運動神経細胞を ChAT で標識し、c-Fos と二重標識した細胞数を数える。

4. 研究成果

【脊髄損傷後痙縮の確認、および投薬の効果】

脊髄損傷 1 週時点で H 反射 RDD を測定した。Sham 群と比較して脊髄損傷群(SCI 群)で有意な RDD の減弱を確認し、痙縮症状を確認した(図 2)。

続いて、脊髄損傷 1 週間後から 2 週間、Ia 活動抑制を目的とした薬剤である DHPG を投薬した。投薬後の痙縮症状を同様の方法で確認したところ、薬剤を投与した DHPG 群が溶媒のみを投与した vehicle 群と比較して、有意に RDD が確認された。つまり、正常に近づいた(図 3)。

DHPG のターゲット受容体である PLD-mGluR は Ia 感覚終末部に存在し、Ia の活動電位の持続および増幅に関与すると報告されている(Bewick et al. 2015)。骨格筋の伸長で生じる Ia 線維の活動電位は、DHPG の 1 回投与後に有意に低下することを確認している(Data not shown)。本実験で Ia 線維の持続的な活動抑制によって伸張反射の過剰な亢進が低下されることで痙縮症状の

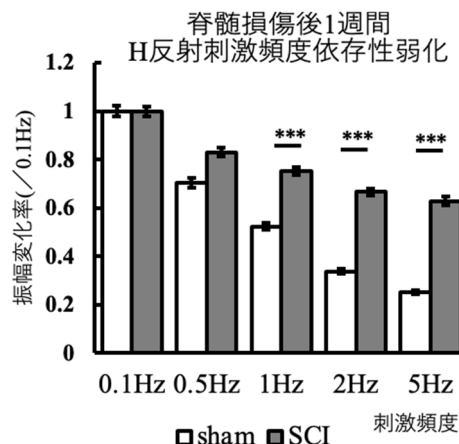


図 2 脊髄損傷 1 週後の H 反射 RDD

軽減が生じたと考えられる。

【Ia 軸索線維- α 運動神経細胞の過剰なシナプス接続の正常化】

痙縮の病態の一つとして考えられている、Ia 軸索線維と α 運動神経細胞の過剰なシナプス接続は、脊髄伸張反射亢進に関連すると考えられる。今回 H 反射の RDD の正常化に近づいた要因として、Ia- α の接続数が関与していると考え、痙縮骨格筋を支配している α 運動神経細胞が局在する頸髄組織で Ia 線維軸索終末部を小胞グルタミン酸輸送体 1 (Vesicular Glutamate Transporter 1; VGluT1)で、 α 運動神経細胞をコリンアセチルトランスフェラーゼ (choline acetyltransferase; ChAT)でそれぞれ標識し、シナプス接続数を数えた(図 4)。

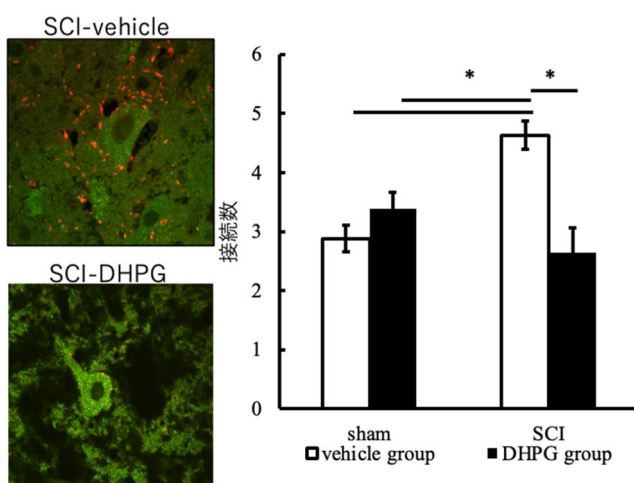


図4 Ia- α 運動神経細胞のシナプス接続

【神経活動依存的発現する c-Fos 発現細胞の定量化】

痙縮病態の一つとして、脊髄 α 運動神経細胞の活動性亢進がある。本実験では、Ia 線維活動抑制を行うことで、脊髄 α 運動神経細胞の活動性に変化が生じるかを確認するために、神経活動依存的に発現する c-Fos と、脊髄 α 運動神経細胞マーカーの ChAT で共染色を行ったところ、SCI-DHPG 群と SCI-vehicle 群で変化はなかった。脊髄 α 運動神経細胞は自発的な活動亢進を示す病態メカニズムがわかっており、Ia 線維の活動抑制だけでは脊髄 α 運動神経細胞の活動亢進を抑制はできなかった。

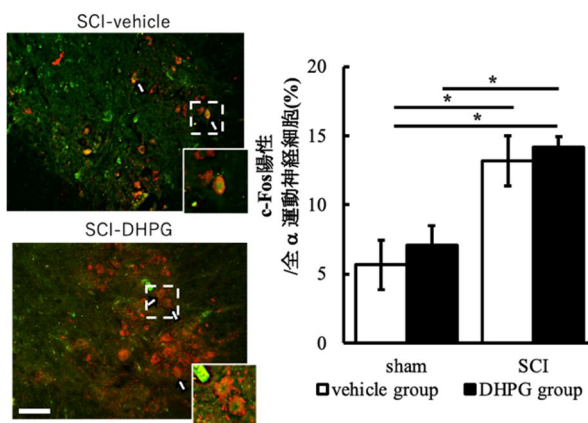


図5 c-Fos陽性 α 運動神経細胞数

投薬2週間後
H反射刺激頻度依存性弱化

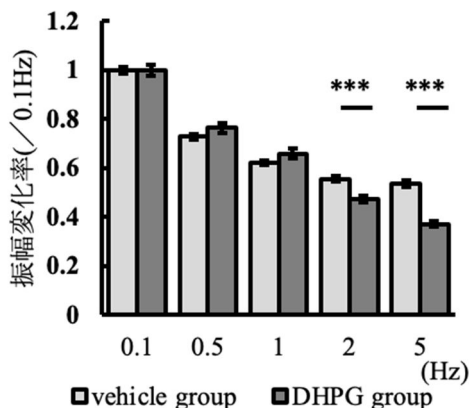


図3 投薬2週間後の H 反射 RDD

その結果、SCI-vehicle 群は sham 群と比較して有意に接続数が増加していたが、SCI-DHPG 群では sham 群と同程度の接続数であった。SCI-vehicle 群と比較しても有意に接続数が少なかった。

このことから、Ia 線維の活動低下によって、脊髄損傷によって過剰に発芽する軸索終末部の刈り込みが生じたか、発芽自体を抑制した可能性が考えられる。脊髄損傷1週後の Ia- α の接続数は脊髄損傷4週後と比較してそれほど接続数は増加していなかった(Data not shown)、両者のメカニズムが生じていると推測される。

参考文献

Bewick, G. S.Banks, R. W. Mechanotransduction in the muscle spindle. European journal of physiology. 2015 Jan;467(1):175-90.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 花崎拓人、李佐知子
2. 発表標題 脊髄損傷後早期におけるIa線維の持続的活動抑制による神経回路の可塑的变化と痙縮軽減効果の検討
3. 学会等名 第28回日本基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 花木奎太、李佐知子
2. 発表標題 脊髄損傷により生じる痙縮を軽減する目的で行うIa線維活動抑制は、運動機能回復を促すか。
3. 学会等名 第28回日本基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 花崎拓人、花木奎太、李佐知子
2. 発表標題 新たな痙縮治療法確立を目指した持続的なIa線維活動抑制による痙縮軽減効果と神経可塑的变化への影響の確認
3. 学会等名 文部科学省 学術変革領域研究 先端モデル動物視線プラットフォーム 2023年度若手技術支援講習会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 花木奎太、李佐知子
2. 発表標題 脊髄損傷により生じる痙縮を軽減する目的で行うIa線維活動抑制は、運動機能回復を促すか。
3. 学会等名 文部科学省 学術変革領域研究 先端モデル動物視線プラットフォーム 2024年度若手技術支援講習会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 花崎拓人、花木圭太、李佐知子
2. 発表標題 脊髄損傷後痙縮発症時におけるIa線維の持続的な活動抑制による痙縮軽減効果と脊髄神経回路の可塑的变化について
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮田正太郎、李佐知子
2. 発表標題 脳梗塞後痙縮発症マウスにおける脊髄抑制性神経回路の形態学的変化の確認
3. 学会等名 文部科学省 学術変革領域研究 先端モデル動物視線プラットフォーム 2025年度若手技術支援講習会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takuto Hanasaki, Keita Hanaki, Sachiko Lee
2. 発表標題 Reduction of spasticity and plastic changes in spinal neuronal circuits by suppression of neuronal activity of Ia fibers at the onset of spasticity after spinal cord injury
3. 学会等名 The 46th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Sachiko Lee, Shogo Isumi, Hirohito Kan, Makoto Osanai
2. 発表標題 Quantitative analysis of neuronal activity using activation induced manganese-enhanced MRI in ischemic stroke with spasticity
3. 学会等名 The 46th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 花崎拓人、李佐知子
2. 発表標題 第6頸髄半切マウスにおける、Ia線維の神経活動抑制による痙縮軽減および脊髄神経回路の可塑的变化について
3. 学会等名 Neur2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 花木奎太、李佐知子
2. 発表標題 脊髄損傷により生じる痙縮を軽減する目的で行うIa線維活動抑制は、運動機能回復を促すか。
3. 学会等名 若手支援技術講習会（先端モデル動物支援プラットフォーム総括支援活動）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takuto Hanasaki, Sachiko Lee-Hotta
2. 発表標題 Effects of Ia fiber activity inhibition on reduction of spasticity measured by Rate Dependent Depression of Hoffman's reflex
3. 学会等名 Yonsei-Nagoya University Research Exchange Meeting on Health Sciences (国際学会)
4. 発表年 2021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
---------	---------