

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591637

研究課題名（和文） 二分脊椎モデルの運動障害に関する基礎的研究

研究課題名（英文） Basic research about leg dysfunction in spina bifida.

研究代表者

松田 正司 (Matsuda Seiji)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：40173843

研究成果の概要（和文）：鶏胚脊髄に切開を入れ二分脊椎を作成した。(1)二分脊椎を持つヒヨコは下肢麻痺を発症した。(2)障害部位の運動ニューロン数には違いが無いが、インターニューロン数に大きな違いが有る。(3)正常で起こる脊髄前角運動ニューロンの過剰産生とそれに引き続く神経細胞死が、二分脊椎ではほとんど見られず、その結果、適正な運動神経と骨格筋の結合が出来ず、正常の神経支配が出来ない可能性が有る。(4)二分脊椎では後索が正常に比較して有意に小さくなった。さらに、感覚神経線維が同側の後索のみならず、対側の後索、側索、前索をも上行することが明らかになった。(5)二分脊椎において脊髄の発達が遅れ、シナプス数が減少し、細胞間隙の減少が遅れる。

研究成果の概要（英文）：We developed surgery-induced chick SBA. (1) SBA chicks exhibited leg muscle paralysis. (2) Histological analyses revealed fewer interneurons in SBA chicks than in normal chicks, but no difference was observed in the number of motor neurons. (3) a defect in the production and elimination of excess motor neurons during the early developmental stages in SBA chicks may be involved in the pathological mechanism of the motor complications of this disease. (4) The dorsal funiculus was smaller in hatched SBA chicks than in the normal controls. Degenerated sensory nerve fibers were observed in all funiculi of SBA chicks. (5) Delay in synaptogenesis and tissue maturation in SBA chicks was shown.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：二分脊椎、歩行異常、ニワトリ、インターニューロン、感覚神経、シナプス

## 1. 研究開始当初の背景

二分脊椎症は出産 1,000 に対し約 1 例の頻度で発生し、嚢胞性二分脊椎症では脊髄内にも傷害がおよび、運動、排尿障害、下肢の変形等が起こる整形外科、脳外科、小児科等の領域で重要な疾患である。しかし、これまで適切なモデル動物が開発されていなかった為に十分な病態説明がなされていなかった。申請者の研究室では、手術により脊髄を再開裂し、確実に二分脊椎モデル動物を作成することに成功した。さらに、本新規モデル動物では開裂部位の長さを調節することにより歩行障害の重篤度を変えることが可能である。申請者らは、本モデルを用い二分脊椎の歩行障害が、従来注目されていた運動神経に異常が有るのではなく、インターニューロンの減少と感覚神経回路網の異常(論文投稿中)にあることを初めて明らかにした。

## 2. 研究の目的

二分脊椎症は様々な症状を呈し、整形外科領域では運動障害が注目されてきた。本研究申請では、上記の新所見をさらに多面的に解析し、二分脊椎における歩行障害の病態を明らかにすることが目的であった。

## 3. 研究の方法

1) 手術と運動能力の観察：手術後、歩行状態を観察し障害の程度を把握するとともに、ビデオ撮影を行い、筋の痙縮、弛緩、下肢の変形部位を同定。

2) 感覚神経の走行：孵化 1 日後に後根を切断し、手術後 3 日目に固定してオスミウム染色。変成神経線維をトレース。

3) 電子顕微鏡により、脊髄各部位のシナプスの種類と数を検討。

## 4. 研究成果

鶏胚脊髄に微少ナイフで切開を入れ二分脊椎を手術的に作成することに成功した。(1)機能的には二分脊椎を持つヒヨコは障害部位に相当する下肢の共動筋、拮抗筋の不均衡による麻痺を発症した。(2)障害部位の運動ニューロン数には違いが認められないが、インターニューロン数に大きな違いが有ることを示した。(3)2011 年に二分脊椎の脊髄における Islet-1 陽性運動ニューロンの変化を解析し、J Vet Med Sci に発表した。この論文では、正常で起こる脊髄前角運動ニューロンの過剰産生とそれに引き続く神経

細胞死が、二分脊椎ではほとんど見られないことを免疫組織化学で証明し、その結果、適正な運動神経と骨格筋の結合が出来ず、正常の神経支配が出来ない可能性が有ることを報告した。

(4)同時に 2011 年に、変成法による感覚神経走行の解析を行った。卵内で脊髄再開裂手術により二分脊椎を作成し、孵卵直後の二分脊椎及び正常個体を麻酔した後根線維を切断し運動状態を観察。3 日間生かし、経心臓灌流固定を行い、脊髄を切り出し、オスミウム後固定、樹脂包埋し、ガラスナイフで脊髄の切片を作成、トルイジンブルー染色を行った。手術後の歩行状態を観察では後根線維切断により、正常ではほとんど変化が認められなかったが、二分脊椎では下肢の痙縮が著しくなり歩行困難が増強された。このことは感覚神経の伝達に異常が有ることを示唆した。変性法での感覚神経の追跡では、二分脊椎では後索を通過する線維が著しく減少し、後索が正常の後索に比較して有意に小さくなった。さらに、感覚神経線維が同側の後索のみならず、対側の後索や、さらに側索、前索をも上行することが明らかになった。このことは、二分脊椎において障害部位より上方へは感覚神経が上行しにくく、感覚情報が正常に上行できず異常な回路を形成することを示しており、このことが本疾患の歩行異常の原因の一つであると考えられた。(5)さらに、電子顕微鏡による観察により、二分脊椎において脊髄の発達が遅れ、シナプス数が減少し、細胞間隙の減少が遅れることも示した(未発表)。これらの結果から二分脊椎症における神経回路異常は発生初期から起こり、治療も早期に開始しなければならないことを示した。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 16 件) 全て査読有り

1) Prosaposin-derived peptide alleviates ischaemia-induced hearing loss. T Terashita, S Saito, H Nabeka, N Hato, H Wakisaka, T Shimokawa, N Kobayashi, K Gyo, S Matsuda, Acta Oto-laryngol, 2013 in press

2) Distribution of prosaposin in rat lymphatic tissues. T Shimokawa, H Nabeka, K Yamamiya, H Wakisaka, T Takeuchi, N Kobayashi, S Matsuda, Cell Tissue Res 2013, in press

- 3) Prosaposin expression in the regenerated muscles of mdx and cardiotoxin-treated mice, C Li, H Gao, T Shimokawa, H Nabeka, F Hamada, H Araki, Y Cao, N Kobayashi, S Matsuda, *Histology and Histopathology*, 2013, in press
  - 4) Attenuation of MPTP/MPP+ Toxicity in vivo and in vitro by an 18-mer Peptide Derived from Prosaposin. H Gao, C Li, H Nabeka, T Shimokawa, S Saito, ZY Wang, Y Cao, S Matsuda, *Neuroscience*, doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.01.007, 2013
  - 5) An inducer of heme oxygenase-1 cobalt protoporphyrin accelerates autophagy and suppresses oxidative damages during lipopolysaccharides treatment in rat liver. K Unumal, T Akil, S Matsuda, T Funakoshi, K Yoshida, K Uemura, *Hepato Res*, doi:10.1111/j.1872-034X.2012.01049.x, 2012
  - 6) Elimination and active extrusion of liver mitochondrial proteins during lipopolysaccharide administration in rat, K Unuma, T Aki, S Matsuda, T Funakoshi, K Yoshida, K Uemura, *Hepato Res* doi: 10.1111/j.1872-034X.2012.01084.x, 2012
  - 7) Divalent and monovalent autoantibodies cause dysfunction of MuSK by distinct mechanisms in a rabbit model of myasthenia gravis. S Mori, S Yamada, S Kubo, J Chen, M Shyto, S Matsuda, K Shigemoto, *J Neuro Immunol*, 244:1-7, 2012
  - 8) Lectin binding pattern of gastric mucosa of pacific white-sided dolphin, *Lagenorhynchus obliquidens*. T Shimokawa, T Doihara, M Makara, K Miyawaki, H Nabeka, H Wakisaka, N Kobayashi, S Matsuda *J Vet Med Sci* 74:155-160, 2012
  - 9) 鳥類神経系を用いた発生学研究、松田正司、鍋加浩明、王敏、下川哲哉、土居原拓也、山宮公子、脇坂浩之、小林直人、*愛媛医学*, 31(1):1-5, 2012
  - 10) Chronological changes in prosaposin in the developing rat brain. B Xue, J Chen, H Gao, S Saito, N Kobayashi, T Shimokawa, H Nabeka, A Sano, S Matsuda. *Neurosci Res*, 71:22-34, 2011
  - 11) Microstructures and mechanical properties in B4C-CeO2 ceramics. S. C. Sun, T. Sakamoto, K. Nakai, H. Kurishita, S. Kobayashi, J. Y. Xu, B. Gao, X. Bian, W. Y. Wu, G. F. Tu, S Matsuda. *J. Nuclear Materials*, 417:417:663-667, 2011
  - 12) Microstructural analysis of B4C-CeO2 and B4C-La2O3 ceramics. T. Sakamoto, S. C. Sun, K. Nakai, H. Kurishita, S. Kobayashi, W. Y. Wu, G. F. Tu, S Matsuda. *J. Nuclear Materials*, 417:659-662, 2011
  - 13) Sensory tract abnormality in the chick model of spina bifida, R Tsujimura, K Mominoki, M Kinutani, T Shimokawa, T Doihara, H Nabeka, H Wakisaka, N Kobayashi, S Matsuda. *Neurosci Res*, 71:85-91, 2011
  - 14) Developmental delay in Islet-1- positive motor neurons in chick spina bifida. M Wang, K Mominoki, M Kinutani, Z Wang, N Kobayashi, T Shimokawa, H Nabeka, T Fujiwara, S Matsuda. *J Vet Med Sci* 73: 447-452, 2011
  - 15) RHO kinase inhibitors stimulate the migration of human cultured osteoblastic cells by regulating actomyosin activity. X Zhang, C Li, H Gao, H Nabeka, T Shimokawa, H Wakisaka, S Matsuda, N Kobayashi, *Cellular & Molecular Biology Letters*. 16:279-295, 2011
  - 16) Morphological maturation level of the esophagus is associated with the number of circumesophageal muscle fibers during archenteron formation in the starfish *Patiria pectinifera*. Y Miguchi, H Takata, T Doihara, K Miyawaki, T Shimokawa, F Hamada, N Kobayashi, S Matsuda. *Biol Bull* 219: 12-16, 2010
  - 17) Zonisamide attenuates MPTP neurotoxicity in marmosets. ME Choudhury, T Moritoyo, H Yabe, N Nishikawa, M Nagai, M Kubo, S Matsuda, M Nomoto, *J Pharmacol Sci*, 114:298-303. 2010
- [学会発表] (計 23 件)
- 1) Developmental delay in neurons and synapse in chick spina bifida. 松田正司、鍋加 浩明、下川 哲哉、山宮公子、土居原

- 拓也, 小林 直人: (日本解剖学会第 118 回学術集会、高松、2013 年 3 月 28-30 日)
- 2) 手術的二分脊椎モデルにおける脊髄運動神経細胞及び介在神経細胞の変化、三好翔太、鍋加浩明、下川哲哉、土居原拓也、山宮公子、小林直人、松田正司 (日本解剖学会第 118 回学術集会、高松、2013 年 3 月 28-30 日)
  - 3) Prosaposin expression in the regenerated muscles of mdx and cardiotoxin-treated mice. 李成、高 慧玲、下川 哲哉、鍋加 浩明、濱田文彦、荒木博陽、曹雅明、小林 直人、松田正司: (日本解剖学会第 118 回学術集会、高松、2013 年 3 月 28-30 日)
  - 4) Differential expression of prosaposin in the central nervous system of juvenile and dystrophic mdx mice. 高 慧玲、李成、下川哲哉、鍋加浩明、土居原拓也、小林直人、松田正司 (日本解剖学会第 118 回学術集会、高松、2013 年 3 月 28-30 日)

[図書] (計 1 件)

- 1) Developmental delay in interneuron, motor neuron, sensory tract, and synapse formation in the chick spina bifida. S Matsuda, H Nabeka, T Shimokawa, In Neural Tube Defects: Prevalence, Pathogenesis and Prevention, NOVA Sci pub, 2012, 107-123

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松田 正司 (Matsuda Seiji)  
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 40173843

### (2) 研究分担者

下川 哲哉 (Simokawa Tetsuya)  
愛媛大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号: 40363337

### (3) 連携研究者

大分大学・医学系研究科・教授  
濱田 文彦  
研究者番号: 70252707