

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 8 月 2 日現在

機関番号：82660

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24500634

研究課題名(和文) リハビリテーションが脊髄損傷治療後の皮質脊髄路の可塑性に与える影響

研究課題名(英文) Effect of rehabilitation on the plasticity of cortico-spinal tract after the spinal cord injury

研究代表者

植村 修 (Uemura, Osamu)

独立行政法人国立病院機構村山医療センター(臨床研究部)・その他部局等・その他

研究者番号：90365396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：リハビリテーションが損傷を受けた皮質脊髄路の可塑性に与える影響について明らかにするために、また、将来的には損傷後の可塑的な変化を外的に誘導することを目的とし、ナトリウム結合型光受容体であるチャネルロドプシンと緑色蛍光色素(GFP)の融合タンパクを皮質脊髄路に特異的に発現するトランスジェニックラットを作製した。

現在までにトランスジェニック陽性個体が一系統得られており、チャネルロドプシンとGFPの融合タンパクの発現を解析しているところである。

研究成果の概要(英文)：To reveal the plastic changes of the cortico-spinal tract induced by rehabilitation after the spinal cord injury and to enhance the recovery with external stimulation, we attempted to generate transgenic rats that express channelrhodopsin-GFP fusion protein specifically in the cortico-spinal tract.

We have successfully obtained one transgenic-positive founder. We are currently examining the expression of the transgene.

研究分野：リハビリテーション医学

キーワード：脊髄損傷 可塑性 リハビリテーション

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷において、皮質脊髄路 (CST) と損傷部以下の脊髄との機能的な再連結は、その後の機能回復に重要であることが知られている。我々は、脊髄損傷に対する非常にユニークな治療法である肋間神経バイパス術を考案した (Campos et al., J Neurosci, 2004, J Comp Neuro, 2008)。本治療法により、皮質運動野と損傷部以下の脊髄が、バイパスとして用いた肋間神経を経由して機能的に再連結することを我々は見いだした (図 A-C)。

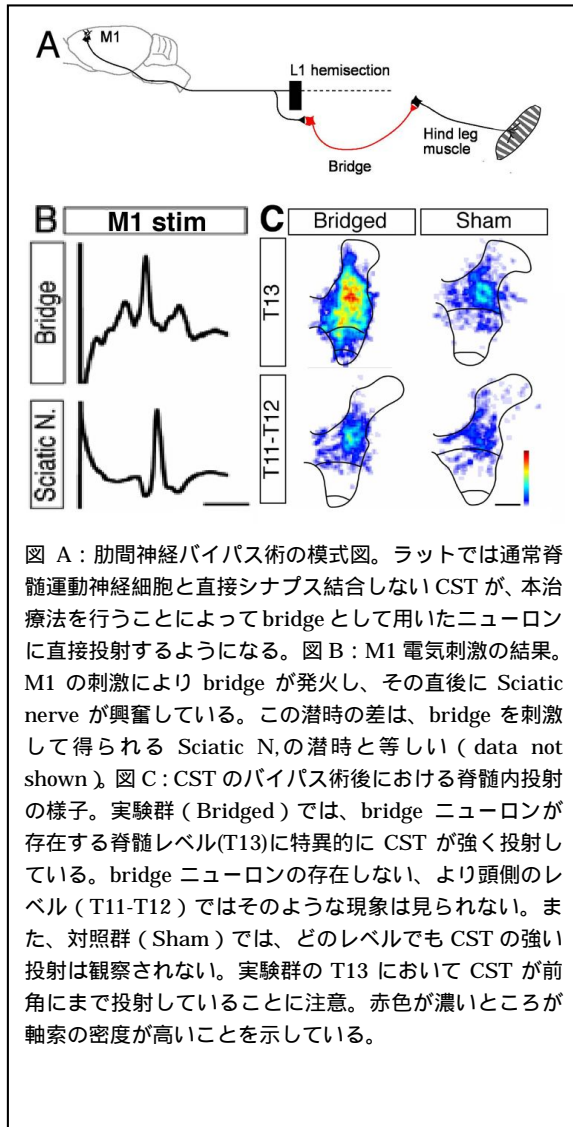


図 A: 肋間神経バイパス術の模式図。ラットでは通常脊髄運動神経細胞と直接シナプス結合しない CST が、本治療法を行うことによって bridge として用いたニューロンに直接投射するようになる。図 B: M1 電気刺激の結果。M1 の刺激により bridge が発火し、その直後に Sciatic nerve が興奮している。この潜時の差は、bridge を刺激して得られる Sciatic N. の潜時と等しい (data not shown)。図 C: CST のバイパス術後における脊髄内投射の様子。実験群 (Bridged) では、bridge ニューロンが存在する脊髄レベル (T13) に特異的に CST が強く投射している。bridge ニューロンの存在しない、より頭側のレベル (T11-T12) ではそのような現象は見られない。また、対照群 (Sham) では、どのレベルでも CST の強い投射は観察されない。実験群の T13 において CST が前角にまで投射していることに注意。赤色が濃いところが軸索の密度が高いことを示している。

2. 研究の目的

本研究では、肋間神経バイパス術後にどのようなリハビリテーション (リハ) がより効率的な機能回復を得ることができるかだけでなく、どのような神経解剖学的変化がその回復を支えているかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

1) トランスジェニックラット作製

可塑的な変化を解剖学的に明らかにするために CST を標識し、かつ将来的には損傷された CST を外的に刺激する目的で、ナトリウムチャンネル結合型光受容体であるチャネル

ロドプシンと緑色蛍光色素である GFP の融合タンパク (ChR2-GFP) を、CST に特異的に発現するトランスジェニックラットを作製した。

ChR2-GFP を、CST に特異的に発現する crym 遺伝子座を含むマウスゲノム BAC クローンの crym 遺伝子座に挿入し、それをラット受精卵に顕微注入する。産仔のゲノムを抽出し、GFP をプローブとしてサザンプロットを行い陽性個体を選別した。

2) 脊髄損傷作製ならびに肋間神経バイパス術

手術は十分な麻酔下で行う。麻酔にはケタミン・ザイラジンカクテル (各 80mg/kg、10mg/kg) を用いる。若成年メスラット (10 週齢) の胸腰椎を露出し、第 1 胸椎から第 3 腰椎まで椎弓切除を行い、脊髄を第 11 / 12 胸椎レベル (第 1 腰髄に相当する) で 27 ゲージ針を用いて半切する。その後同側の腹筋を剥離し第 13 番肋間神経 (T13bridge) を露出させ、腹筋への入口部から切離し、後の操作を可能とするためにシリコンチューブに通した後、その遠位端を第 3 / 4 腰髄 (第 2 腰椎に相当) の脊髄灰白質内に挿入する。挿入した後はフィブリン糊で固定する。なお、シャム群は、固定以外の一連の操作を行った後、T13bridge を背筋に挿入し、そこでフィブリン糊で固定する。

3) 行動解析

リハビリは当センターにあるラット用トレッドミルで行う。脊髄半切モデルラットは多くの場合、脊髄ショックから抜け出した時点で下肢運動が可能となる。そのためトレッドミル上での歩行も行うことができる。ただし、そうならなかった場合には体幹を保持するハーネスを用いたうえでの歩行訓練を行う。歩行訓練は術後 1 週間から開始し、1 日 20 分、週に 5 日間行い、これを 8 週間継続する。また、疲労等によりセッションを完遂できなかった場合はその時点で終了とする。

行動解析は BBB スコアで行う (Basso et al., J Neurotrauma, 1996)。また、脊髄損傷モデルネコは、トレッドミル訓練を行わなかった群においても歩行することができるが、それらのネコは訓練群と比較して躓きやすいという報告がある (Maier and Schwab, Phil Trans R Soc B, 2006)。ラットでも同様のことが観察されることが期待されるため、訓練開始時と終了時のトレッドミル歩行の記録を取り、躓く回数を記録することで行動評価の一つとする。なお、行動は全てビデオで記録する。

4) 電気生理学的評価

これまでの研究では、電気生理学的評価は実際に M1 ならびに bridge を電極で直接刺激していた。しかし、これはラットへの負担が大きく、ほとんどの場合その後の行動解析ができなかった。M1 の電気刺激には頭蓋をド

ドリルで穿孔し、硬膜を除去したうえでボール型の電極を脳表に設置するため出血等の合併なども起こりうるからである。今回の研究では一連の解析が終了した後に bridge を切断し、それまで得られた機能回復が消失するかも検討するため、同様の手法は使えない。そこで ChR2 トランスジェニックラットを用いる。このトランスジェニックラットは M1 と脊髄運動神経に ChR2 を強く発現しているため、青色光を照射することで簡単にこれらの細胞を刺激することができるようになる。M1 刺激は Iwai らの報告に準じる (Iwai et al., Neurosci Res, 2011)。すなわち、十分麻酔のうえ、ラットの頭蓋をドリルで被薄化し、そこに青色発光ダイオードを設置する。bridge 刺激も同様に光刺激で行う。bridge は手術の項で述べたようにシリコンチューブで覆っているため、簡単に剥離・分離できる。分離した bridge に発光ダイオードを近づけて刺激を行う。筋電は下肢筋である前脛骨筋、ヒラメ筋より記録する。筋電の記録は 2 本のワイヤー電極をそれぞれ筋腹に挿入し、アンプとして power lab (AD instruments) を用いることで行う。青色発光ダイオードの回路作製は研究分担者である武田湖太郎博士と行う。基本的な回路の設計は Iwai らに準じている。また、筋電の記録に関しても武田博士と共同で行う。なお、上記の操作は、動きに伴うアーティファクトを可能な限り排除するために、ステレオタキシクフレーム上にラットを固定して行う。

5) bridge 切断とその後の行動解析

術後 8 週経過し、以上の解析を終えた時点で bridge の切断を行う。Bridge の切断は、メスで鋭的に行う。切断した bridge の中枢側の断端に逆行性色素であるローダミンデキストランを空気圧注する (6 の手順が必要)。その後閉創し、十分ラットが回復した状態で行動解析を行う。行動解析は 2) で行ったように BBB スコアと、トレッドミル歩行時の歩く頻度の計測で行う。

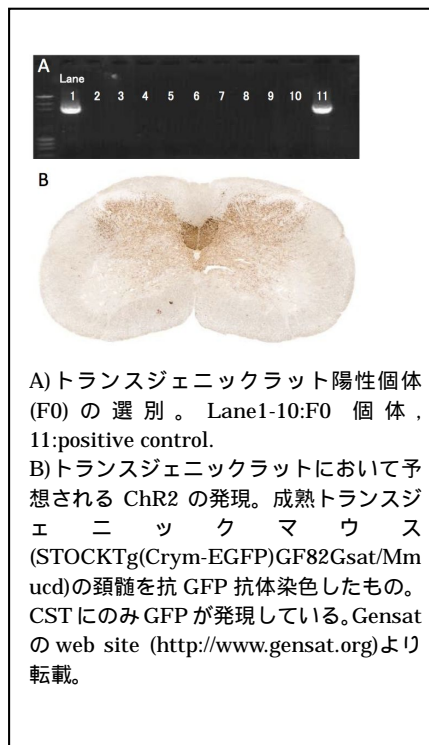
6) 解剖学的解析

bridge 切断後の行動解析を終了後、解剖学的解析を行う。ラットを還流固定し、脊髄を取り出し、後固定を行う。後固定の後 30% スクロースでクライオプロテクションを行い、クライオスタットで切片化する。解剖学的解析は CST の bridge 細胞体がある胸髄、すなわち第 13 番胸髄への投射を観察することで行う。ここで用いるトランスジェニックラットは ChR2 と緑色蛍光色素の変異体である YFP を共に発現しているため、CST の軸索を YFP の蛍光を用いることで観察することができる。しかし、組織の固定などに伴う蛍光強度の劣化などが起こりうるため、ここでは抗体染色を行う。YFP は GFP の誘導体であり抗原性はほぼ同一なため、市販の抗 GFP 抗体が使用できる。発色には DAB もしくは蛍光抗体法を用いる。CST 軸索と

T13bridge 細胞体が存在する脊髄レベルに特異的に軸索投射を行っていることの確認と、両者の直接のシナプス結合を確認するため、手順 5) で逆行性に標識した T13bridge 細胞体と CST の二重蛍光抗体染色を行う。染色した切片を NeuroLucida (MBF Bioscience) で観察し、軸索の長さや varicosity と呼ばれる軸索の膨大部の数を計測する。計測したデータはそれぞれの群間で統計処理を行う。

4. 研究成果

1) トランスジェニック陽性個体の獲得



A) トランスジェニックラット陽性個体 (F0) の選別。Lane1-10:F0 個体, 11:positive control.

B) トランスジェニックラットにおいて予想される ChR2 の発現。成熟トランスジェニックマウス (STOCKTg(Crym-EGFP)GF82Gsat/Mmucd) の頸髄を抗 GFP 抗体染色したものを。CST にのみ GFP が発現している。Gensat の web site (<http://www.gensat.org>) より転載。

F0 陽性個体を 1 系統得ることが出来た。現在は、同系統の樹立と、ChR2 の発現解析を行っているところである。今後は、系統が樹立され次第、上記の実験を遂行していく予定である。

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 1 件)

Kiuchi K., Inayama T., Muraoka Y., Ikemoto S., Uemura O., Mizuno K. Preliminary study for the assessment of physical activity using a triaxial accelerometer with a gyro sensor on the upper limbs of subjects with paraplegia driving a wheelchair on a treadmill. Spinal Cord. 2014 Jul;52(7):556-63.

〔学会発表〕(計 8 件)

宇内景、植村修、沖塩尚孝、森俊樹、里宇明元、末梢性多発神経障害により嚙下障害を来した一例、2013.日本リハビリテーション医学会

町田正文、竹光正和、宇内景、植村修、頸椎OPLL術後に嚙下障害を来した一例、2014、日本リハビリテーション医学会

町田正文、竹光正和、宇内景、植村修、脊柱変形における脊柱矢状面アライメントの解析、2014.日本リハビリテーション医学会

宇内景、植村修、南部真紀子、相賀礼子、里宇明元、脊髄損傷患者のADLの推移から診た退院支援の指標 SCIM を用いた検討、2014.日本リハビリテーション医学会

宇内景、植村修、町田正文、里宇明元、頸髄損傷患者における徒手の咳嗽訓練の効果、2013.日本脊髄障害医学会

竹光正和、町田正文、朝妻孝仁、植村修、宇内景、バクロフェン髄注療法において薬剤耐性を呈した1症例、2013.日本脊髄障害医学会

竹光正和、町田正文、朝妻孝仁、宇内景、植村修、遺伝性痙性対麻痺患者に対するバクロフェン治療の効果、2014.日本脊髄障害医学会

古田寛和、植村修、小林茂俊、Pusher 症候群が著明な患者に臥位時感覚入力および趣味活動を提供し活動中の端座位保持が可能になった一例、2014.国立病院総合医学会

〔図書〕(計 3件)
植村修、Monthly Book Medical Rehabilitation. 2013, 163, pp167-171 全日本病院出版会

正門由久、武田湖太郎、植村修ほか、リハビリテーションのための臨床神経生理学、2015. 中外医学社

花山 耕三、石川悠加、植村修、笠井史人、新藤恵一郎、土岐明子、脊髄損傷・神経筋疾患の呼吸リハビリテーションガイドライン、2014. 金原出版

〔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 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植村修 (UEMURA, Osamu)
村山医療センター臨床研究センター
研究者番号：90365396

(2) 研究分担者

武田湖太郎 (TAKEDA, Kotaro)
藤田保健衛生大学藤田記念七栗研究所
准教授
研究者番号：50618733

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()