

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 24 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462295

研究課題名(和文)多光子顕微鏡による二分脊椎神経回路の可視化

研究課題名(英文)Evaluation of neuronal tract in SBA using two-photon excited microscopy

研究代表者

松田 正司(Matsuda, Seiji)

愛媛大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40173843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：二分脊椎は脊髄の複雑な先天奇形である。GABAニューロンは脊椎神経障害において重要な役割を果たすと考えられる。1)胎生14日と18日において、正常に比較し二分脊椎に多くのGABAニューロンを観察したが、孵化後4日で顕著な減少を観察した。GABAニューロンの減少は二分脊椎における神経学的な機能不全、下肢運動障害、疼痛と符合した。2)アポトーシスのマーカーであるカスパーゼ3は二分脊椎の腰髄で増加した。総合的に考えると、神経学的機能不全、GABAニューロンの減少、カスパーゼ3の活性増加はこれらが互いに関係が深いことを示唆した。3)さらに、二光子顕微鏡を用いて、障害後の後索内軸索の可視化に成功した。

研究成果の概要(英文)：Spina bifida aperta (SBA) is a complex congenital malformation of spinal cord. Since GABA neurons play vital roles in spinal injury-induced neurological disorders, their roles are postulated in the pathogenesis of SBA. 1) We found higher levels of GABA neurons in the lumbar cord of SBA chicks than normal chicks at embryonic days 14 and 18, while drastic reduction of them especially around motor neurons were observed in SBA chicks at post-hatch day 4. Reduction of GABA neurons was coincided with severe neurological dysfunctions, leg movement disorders and painful states of SBA chicks. 2) An increased activation of caspase 3, a marker of apoptosis, was also observed in lumbar cord of SBA chicks. Taken together, it seems that increased neurological dysfunctions, loss of GABA neurons, and increased activity of caspase 3 strongly suggests a causal link among these processes. 3) Injured axons were evaluated using two-photon excited fluorescence microscopy after spinal cord contusion injury.

研究分野：神経科学

キーワード：二分脊椎 ヒヨコ 神経障害 GABA カスパーゼ 神経伝導路

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解明がなされていない。申請者の研究室では、手術により脊髄を再開裂し、世界で唯一の歩行異常を示す二分脊椎モデル動物を効率良く作成することに成功し(Mominoki et al., Exp. Neurol 197, 2006)その病態を報告した。

2. 研究の目的

二分脊椎症は人間では自然発症し、葉酸の投与で発症が抑制されることが判明しているが、原因は不明である。現象としては脊髄背部の再開裂を第一段階の異常とし、開裂部の羊水暴露障害による神経回路の形成不全等を第二段階の異常とする説が有力である(Stiefel らの two hit theory, J Neurosurg, 2007)。本モデルでは第一異常を手術により再現し、第二異常はヒトの二分脊椎疾患と同様の障害により起こることを報告した(Tsujimura et al., Neurosci Res 71, 2011)。

申請者らは、本モデルを用い二分脊椎の歩行障害が、運動ニューロン数に異常が有るのではなく、インターニューロンの減少(Mominoki et al., Exp. Neurol 197, 2006)、運動ニューロンの発生遅延による運動神経回路の異常(Wang et al., J Vet Med Sci, 73, 2011)、および感覚神経回路の異常(Tsujimura et al., Neurosci Res 71, 2011)にあることを初めて明らかにした。これらの論文内容が評価され、二分脊椎に関する単行本の一章の執筆依頼が有り、本モデルにおける神経回路異常について、まとめて報告した。さらに上記異常の他に、申請者がライフワークとしてきた脊髄のシ

ナプス発生について言及し、二分脊椎でシナプス発生が遅延していることを報告した。従来、脊髄全体に分散する神経回路を可視化することは、ほとんど不可能であった。しかし、連携研究者今村健志教授が当医学部に導入した多光子顕微鏡により、これらの神経回路全体を可視化できることが判明した。本研究により二分脊椎の神経回路異常が明らかになれば、これまでの研究を格段に発展させることが可能で、本疾患の病態解明に有意義な貢献をすることが目的である。

3. 研究の方法

1) モデル動物の作成 受精卵を孵卵器にいれ、孵卵 3 日目に卵殻を切り取り、羊水を一部取り除いて、鶏胚の脊髄背側を微量メスにより切開する。開いた卵殻はテープで閉じる。本手術は極めて繊細で、適当な指導者の下で訓練し習熟しなければ安定した結果は得ることが難しい。

具体的な工夫として、通常の孵化率は 90% 以上であるが、手術後の卵を動かすことが出来ないため孵化率が 10% 程度と極めて低くなる。申請者らは、卵の開口部のテープをマニキュアでシールドし、孵卵器の転卵角度を小さくすることにより孵化率を大幅に改善した。

2) 運動障害の確認 本モデルでは、脊髄背側の切開の長さにより程度の異なる運動障害と下肢の変形が認められる。特に下肢の姿勢や関連する筋肉の萎縮等について詳細に記録する。動画データとしての投稿ができるようデジタルカメラで記録する。

3) トレーサーによる感覚神経支配様式の解析 逆行性変性法を用いて、正常と二分脊椎の感覚神経線維の追跡を行い、二分脊椎では同側後索のみを上行すべき感覚神経が対側の側索や前索にまでも分散していた

(Tsuji-mura et al.2011)。このことを踏まえ、順行性トレーサーであるコムギ胚芽凝集素HRP (WGA-HRP) を脊髄神経節に注入。3日後に灌流固定し、脊髄を取り出し、蛍光色素結合抗HRP抗体の溶液で2日インキュベート、脊髄を多光子顕微鏡で観察、蛍光標識された感覚神経の三次元的な分散様式を画像化する。今回は、脊髄後索内の軸索の走行を二光子顕微鏡で捉えることを目指した。

4) 二分脊椎の神経障害の解析 二分脊椎における神経障害を免疫組織化学により検討した。特に抑制ニューロンのマーカーであるGABA、興奮運動ニューロンのマーカーであるCHAT、細胞障害のマーカーであるカスパーゼに対する抗体で免疫組織化学を行った。

4. 研究成果

免疫組織化学の結果、胎生14日と18日において、正常に比較し二分脊椎に多くのGABAニューロンを観察したが、孵化後4日で顕著な減少を観察した。GABAニューロンの減少は二分脊椎における神経学的な機能不全、下肢の運動障害、疼痛と符合した。2) アポトーシスのマーカーであるカスパーゼ3は二分脊椎の腰髄で増加した。総合的に考えると、神経学的機能不全、GABAニューロンの減少、カスパーゼ3の活性増加はこれらが互いに関係が深いことが示唆された。3) さらに、二光子顕微鏡を用いて、障害後の後索内軸索の可視化に成功し、論文報告を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計21件)

1. Gao HL, Li C, Nabeka H, Shimokawa T, Wang ZY, Cao YM, Matsuda S, 18-mer Peptide Derived from Prosaposin ameliorates the effect of A 1-42 neurotoxicity on hippocampal neurogenesis and memory deficit, J Alzheimer disease, 2016in press 査読有り
2. Horiuchi H, Oshima Y, Ogata T, Morino T, Matsuda S, Miura H, Imamura T, Evaluation of injured axons using two-photon excited fluorescence microscopy after spinal cord contusion injury in YFP-H line mice. IJMS, doi:10.3390/ijms16071578520, 2015 査読有り
3. Khan MD SK, Shigeoka C, Takahara Y, Matsuda S, Tachibana T. Ontogeny of corticotrophin-releasing hormone system in slow- and fast-growing chicks (*Gallus gallus*), Physiology and Behavior, 151:38-45. 2015 査読有り
4. Kawabe S,Matsuda S, Tsunekaw Na, Endo H. Ontogenetic shape change in the chicken brain: implications for paleontology. PLOS ONE. 2015 査読有り
5. Nabeka H, Shiomokawa T, Doihara T, Saito S, Wakisaka H, Hamada F, Kobayashi N, Matsuda S, A prosaposin-derived peptide alleviates kainic acid-induced brain injury, PLOS ONE, DOI:10.1371/journal.pone.0126856, 2015 査読有り
6. H Nabeka, K Uematsu, H Takechi, T Shimokawa, K Yamamiya, C Li, T Doihara, S Saito, N Kobayashi, S Matsuda. Prosaposin overexpression following kainic acid-induced neurotoxicity. PLOS ONE DOI:10.1371/ journal.pone.0110534, 2014 査読有り
7. S Saito, K Saito, H Nabeka, T Shimokawa, N Kobayashi, S Matsuda, Differential expression of the alternatively spliced forms of prosaposin mRNAs in the rat choroid plexus. Cell Tissue Res356:231-242, 2014 査読有り
8. M Morishita, H Nabeka, T Shimokawa, K Miyawaki, T Doihara, S Saito, N

- Kobayashi, S Matsuda. Temporal Changes in Prosaposin Expression in the Rat Dentate Gyrus after Birth. PLOS ONE 9(5): e95883, 2014 査読有り
9. Ohkubo N, Matsubara E, Yamanouchi J, Akazawa R, Aoto M, Suzuki Y, Sakai I, Abe T, Kiyonari H, Matsuda S, Yasukawa M, Mitsuda N. Abnormal Behaviors and Developmental Disorder of Hippocampus in Zinc Finger Protein 521 (ZFP521) Mutant Mice. PLOS ONE 9(3): e92848. 2014 査読有り
 10. Ochi S, Abe M, Li C, MORI Y, Ishimaru T, Yoshino T, Yamazaki K, Mori T, Fukuhara R, Tanimukai S, Matuda S, Yoshida K, Ueno S. The nicotinic cholinergic system is affected in rats with delayed carbon monoxide encephalopathy. Neurosci Letter 569 :33-37,2014 査読有り
 11. Abe M, Ochi S, Mori Y, Yamazaki K, Ishimaru T, Yoshino Y, Fukuhara R, Tanimukai S, Matsuda S ,Ueno S. Distribution of D-3-amino isobutyrate- pyruvate amino transferase in the rat brain. BMC Neurosci. 15:53. doi: 10.1186/1471-2202-15-53. 2014 査読有り
 12. Shimokawa T, Nabeka H, Yamamiya K, Wakisaka H, Takeuchi T, Kobayashi N, Matsuda S. Distribution of prosaposin in rat lymphatic tissues. Cell and Tissue Research, 352:685-693, 2013. 査読有り
 13. Li C, Gao HL, Shimokawa T, Nabeka H, Hamada F, Araki H, Cao YM, Kobayashi N, Matsuda S. Prosaposin expression in the regenerated muscles of mdx and cardiotoxin-treated mice. Histology Histopathology, 28:875-892, 2013. 査読有り
 14. Terashita T, Saito S, Nabeka H, Hato N, Wakisaka H, Shimokawa T, Kobayashi N, Gyo K, Matsuda S. Prosaposin-derived peptide alleviates ischaemia-induced hearing loss. Acta Otolaryngol, 133:462-468, 2013. 査読有り
 15. Unuma K, Aki T, Matsuda S, Funakoshi T, Yoshida K, Uemura K. Inducer of heme oxygenase-1 cobalt protoporphyrin accelerates autophagy and suppresses oxidative damages during lipopolysaccharide treatment in rat liver. Hepatology Research, 43:91-96, 2013 査読有り
 16. Unuma K, Aki T, Matsuda S, Funakoshi T, Yoshida K, Uemura K. Elimination and active extrusion of liver mitochondrial proteins during lipopolysaccharide administration in rat. Hepatology Research, 43:526-534, 2013 査読有り
 17. Gao HL, Li C, Nabeka H, Shimokawa T, Saito S, Wang ZY, Cao YM, Matsuda S. Attenuation of MPTP/MPP+ toxicity in vivo and in vitro by 1 an 18-mer peptide derived from Prosaposin, Neuroscience, 236:373-393, 2013 査読有り
 18. Gao HL, Li C, Nabeka H, Shimokawa T, Kobayashi N, Saito S, Wang ZY, Cao YM, Matsuda S. Decrease in prosaposin in the dystrophic mdx mouse brain. PLoS One, 10.1371/journal.pone.0080032 2013. 査読有り
 19. Kawabe S, Shimokawa T, Miki H, Matsuda S, Endo H. Variation in avian brain shape: relationship with size and orbital shape. J Anat, 223:495-508, 2013. 査読有り

20. Kawabe S, Shimokawa T, Miki H, Okamoto T, Matsuda S, Itou T, Koie H, Kitagawa M, Sakai T, Hosojima M, Endo H. Relationship between brain volume and brain width in mammals and birds. Paleontological Research 17: 282-293, 2013 査読有り
21. Matsuda S, Nabeka H, Shimokawa T. Developmental delay in interneuron, motor neuron, sensory tract, and synapse formation in the chick spina bifida. Neural Tube Defects: Prevalence, Pathogenesis and Prevention, 107-123 NOVA Science publisher, 2013. 査読有り

〔学会発表〕(計 5 件)

1. GABAergic interneurons in the spinal cord are increased in a chick model of spina bifida aperta. Khan MSI, Shimokawa T, Islam F, Nabeka H, Yamamiya K, Hamada F, Kobayashi N, Matsuda S, 120th Annual Meeting of the JAA, March 21-23, 2015, Kobe, Hyogo, Kobe International Conference Center
2. Changes in the neurons of the spinal cord in a chick model of spina bifida aperta. Miyoshi S, Khan MSI, Nabeka H, Shimokawa T, Yamamiya K, Hamada F, Kobayashi N, Matsuda S, 120th Annual Meeting of the JAA, March 21-23, 2015, Kobe, Hyogo, Kobe International Conference Center
3. 手術的二分脊椎モデルにおける脊髄前角細胞の解析及び運動機能の異常について 三好翔太 鍋加浩明 下川哲哉 土居原拓也 小林直人 松田正司 (日本解剖学会第 119 回学術集会、栃木県、下野市、自治医科大学キャンパス 2014 年 3 月 27-29 日)

4. 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、香川県、高松市、かがわ国際会議場 2013 年 3 月 28-30 日)
5. 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、香川県、高松市、かがわ国際会議場 2013 年 3 月 28-30 日)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕ホームページ等

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

(3) 連携研究者

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