研究テーマ

脊髄損傷後の脊髄介在ニューロンを介した代償性神経回路再 編機構の解明

研究代表者

施設名 : 島根大学医学部 解剖学講座

氏 名 : 中川 浩

研究テーマ:脊髄損傷後の脊髄介在ニューロンを介した代償性神経回路再編機構の解 明

所属先:島根大学医学部 解剖学講座

氏名:中川 浩

(背景と目的)

四肢の随意運動を制御する主要な神経回路として、大脳皮質運動関連領野、脳幹 →脊髄介在ニューロン(INs); 霊長類には脊髄INsを介さずに直接脊髄運動ニューロン に結合する回路も有する→脊髄運動ニューロン→筋という下行性投射がよく知られ ている。外傷や梗塞が原因となって、この神経回路のいずれかが傷害されると運動障 害・麻痺が出現する。中枢神経損傷後に運動機能の回復がもたらされるには、ニュー ロンの可塑的変化によって代償性に神経回路が再編され、正常に働くことが本質的で あると考えられる。脊髄損傷により、大脳皮質や脳幹から直接脊髄に投射する下行性 神経路が損傷された場合、脊髄INsが新たに神経回路を構築しバイパスの役割を担い、 大脳皮質や脳幹からの運動コマンドを脊髄運動ニューロンに伝達するという代償性 機構が知られている(Bareyre et al., Nat Neurosci. 2004; Courtine et al., Nat Med. 2008; Isa et al., Curr Opin Neurol. 2019)。この種の脊髄INsは、他の髄節 に神経軸索を投射させるという解剖学的な特徴をもっている。そのため、損傷部位よ りも頭側に細胞体が位置し、その神経軸索が損傷部の尾側に投射している場合は、脊 髄の完全切断でなければ、運動コマンドを損傷部以下に伝達することが可能である。

われわれは、これまで脊髄損傷後には、大脳皮質運動関連領野から特定の脊髄INs に投射する神経細胞の接続パターンが劇的に変化することを明らかにしている (Ninomiya et al., Front Neural Circuits. 2022; Takata et al., Sci Rep. 2023)。 このことは、脊髄損傷後には大脳皮質の運動関連領野において運動コマンドを出力す る細胞集団(領域)にダイナミクスな出力変化が起きていることを示している。

これらの知見をふまえると、脊髄損傷後には脊髄INs→脊髄INsや脊髄INs→脊髄運 動ニューロンの接続パターンにもダイナミクスな変化が起きている可能性がある。さ らに、われわれはこれまで、胸髄に位置する脊髄INsには、腰髄に神経軸索を投射し ている細胞集団が存在し後肢の運動を直接制御していることをつきとめている。しか しながら、これら神経回路が脊髄損傷などの中枢神経損傷後にどのように働くかにつ いては検討を行っていない。

そこで、本研究は脊髄損傷後に脊髄INsが代償性神経回路として機能する神経メカ ニズムを明らかにすることを目的とした。 (方法)

脊髄損傷モデル

対象は、成体C57BL/6マウス(日本クレア)とした。全ての手術は、ドミトール(日本全薬工業)、ドルミカム(丸石製薬)、ベトルファール(Meiji Seika)の三種混合麻酔を腹腔内投与し深麻酔下にて実施した。マウスの背部を正中に切開し、脊椎の椎弓切除術を行い第10胸髄(T10)の脊髄を露出させた。その後、脊髄のT10をナイフを用いて半切断し、皮膚を縫合して終了した。

行動学的解析

行動解析には、Open-field score、Ladder walk test、Beam walk testの3種類の評価方法を用い、脊髄損傷前とその後、1回/週の頻度で7週間継続して評価を行った。 Open-field scoreのみ、損傷後2日目の解析を加えた。

Open-field score

Open-field scoreは、Open field testのひとつであり、片側脊髄損傷モデルの後肢運動 機能、特に関節の動きや協調性などを客観的にする評価する行動指標である(Brown and Martinez, Exp. Neurol. 2021)。脊髄損傷と同側(障害側)と対側(非障害側) の後肢の関節の動きや協調性などを合計20ポイントで評価を行う。本行動テストに は、事前の練習は必要としない。

Ladder walk test

Ladder walk testは、スキルを必要とする歩行能力と後肢の協調性を評価する行動指 標として用いられている (Metz and Whishaw, J. Neurosci. Methods 115. 2002; Metz GA, Whishaw IQ, J. Vis. Exp. 2009)。マウスを長さ1 mのはしご様の機器の 上に位置させ (床面より約15 cm上空)、そのはしごの上で足を踏み外さないようにゴ ールまで歩くことができるかを評価する。はしご間のスペースは1.5 cmもしくは2.0 cm間隔でイレギュラーに配置した。足の踏み外しは、Foot fault score (スコアリン グシステム)を用いて解析した (Metz GA, Whishaw IQ, J. Vis. Exp. 2009)。全て のトライアルは、ビデオ録画されスローモーションにて、スコア解析を行った。本行 動テストは、試験前に2週間のトレーニングを行った。

Beam walk test

マウスを机面より約20 cm上空に横幅がそれぞれ異なる3種類(5 mm, 10 mm, 15 mm) の木製の板(長さ80 cm)に位置させ、その板の上を、最初からゴールまで踏み外さ ないように何歩で歩くことができるかを測定した。全てのトライアルは、ビデオ録画 されスローモーションにて、踏み外した回数(歩数にて回数を補正)と渡りきるまで の歩数を解析した。本行動テストは、試験前に5日間のトレーニングを行った。

注入実験

神経トレーサーの注入

深麻酔下にて、胸髄に位置する脊髄INsを順行性にラベルする目的で、片側T6-T9領域にAAV-CAG-tdTomato (Addgene #59462, 1.8 x 10¹³ GC/ml) 50 nlを1 mmおきに4か 所注入した (Lateral, 0.25 mm-0.33 mm; Depth, 0.3 mmと0.7 mm)。

神経細胞死の誘導

全ての行動解析が終了した後、深麻酔下にて背部の皮膚を再度切開し、脊髄のT6-T9を露出させるために、対応する脊椎に対して椎弓切除術を行った。損傷側と同側の T6-T9に、神経細胞死を誘導する目的でラプチナール(50 uM、東京化成)150 nlを1 mmおきに4か所注入した(Lateral, 0.25 mm-0.33 mm; Depth, 0.3 mmと0.7 mm)。ラプ チナール注入後3日目に再度、行動学的解析を実施した。

組織解析

深麻酔下にて、4%パラホルムアルデヒドにて経心的に灌流固定した。脊髄を摘出し、 4%パラホルムアルデヒドで一晩後固定を行った。続いて30%スクロースを4℃で一晩浸 透させ、脊髄をOCTコンパウンド(Sakurai Finetek)で包埋した。組織は、クライオ スタットを用いて40 umの連続切片を作製した。

(結果)

脊髄損傷後の運動機能回復

片側T10損傷後の自然経過にともなう後肢運動機能の回復過程を解析した。Openfield scoreでは、損傷後2日目には、同側および対側の後肢運動機能の低下が観察され た(図1)。その後、後肢機能は徐々に回復し、3-4週間後には同テストにて有意 な差はみられなかった。Ladder walk testにおいても、脊髄損傷直後より同側に顕著な 後肢機能の低下がみられた(図2)。対側後肢の機能については、Open-field scoreと 同様に軽度の低下をみとめた。同側および対側の後肢ともに徐々に機能回復を示した が、最終の7週目においても運動機能障害(特に損傷側と同側の後肢)が残存してい た。Beam walk testでは、幅の異なる3種類の板を用いて難易度を分けてそれぞれ評価 を行った。その結果、難易度が異なるいずれの幅においても、同側および対側後肢の 機能低下が観察された。機能回復については、いずれの幅においても観察されたが、 難易度に相応するものであった(図3)。



図1. Open-field scoreによる行動学的解析(N=25)。(A)損傷側と同側の後肢機能の回復過程を示す。(B)損傷側と対側の後肢機能の回復過程を示す。



図2. Ladder walk testによる行動学的解析(N=25)。(A)損傷側と同側の後肢機能の回復過程を示す。(B)損傷側と対側の後肢機能の回復過程を示す。



機能の回復過程を示す。(B)損傷側と対側の後肢機能の回復過程を示す。

脊髄損傷後の運動機能回復における損傷上部の脊髄INsによる代償性機構

脊髄損傷後に7週間の行動学的解析を行ったのち、損傷側と同側もしくは対側の T6-T9領域において脊髄INsの細胞死を誘導した(図4)。注入後3日目に再度、行動 学的解析を行った結果、Open-field scoreでは、損傷側と同側のT6-T9領域の神経細胞 死を誘導した際の同側後肢にのみ有意な後肢の機能低下がみられた(図5)。Ladder walk testでは、損傷側と同側のT6-T9領域の神経細胞死を誘導した際の同側後肢と損 傷側と対側のT6-T9領域の神経細胞死を誘導した際の損傷側と対側後肢(注入側と同 側)に有意な後肢の機能低下がみられた(図6)。Beam walk testでは、歩数について は、同側および対側のT6-T9領域の神経細胞死を誘導した際、いずれにおいても同側 および対側後肢ともに増加した。踏み外すエラーについては、損傷側と同側のT6-T9 領域の神経細胞死を誘導した際の同側後肢にのみ有意な機能低下がみとめられた(図 7)。



図5. 神経細胞死を誘導する前後におけるOpen-field score。(A, B) 損傷側と同側 のT6-T9領域に薬剤を注入。(A) 損傷側と同側の後肢機能の変化。(B) 損傷側と 対側の後肢機能の変化。(C, D) 損傷側と対側のT6-T9領域に薬剤を注入。(C) 損 傷側と同側の後肢機能の変化。(D) 損傷側と対側の後肢機能の変化。



図6.神経細胞死を誘導する前後におけるLadder walk test。(A, B)損傷側と同側のT6-T9領域に薬剤を注入。(A)損傷側と同側の後肢機能の変化。(B)損傷側と対側の後肢機能の変化。(C, D)損傷側と対側のT6-T9領域に薬剤を注入。(C)損傷側と同側の後肢機能の変化。(D)損傷側と対側の後肢機能の変化。





図7. 神経細胞死を誘導する前後におけるBeam walk test。(A, B, E, F) 損傷側と 同側のT6-T9領域に薬剤を注入。(A, C) 損傷側と同側のステップ数の変化。(B, D) 損傷側と対側のステップ数の変化。(C, D, G, H) 損傷側と対側のT6-T9領域 に薬剤を注入。(E, G) 損傷側と同側の踏み外した割合変化。(F, H) 損傷側と対 側の踏み外した割合変化。

胸髄に位置する脊髄INsの神経投射パターン

はじめに、脊髄損傷を施していない無傷のマウス脊髄INsの神経投射パターンを確認した。片側T6-T9領域にAAV-CAG-tdTomatoを注入し、腰髄(L3とL5領域)にて神経軸索を可視化した結果、同側および対側ともに多くのtdTomato陽性の軸索が観察され、その密度は、脊髄背側部に比べて中間部や腹側部に多く観察された(図8)。



図8.脊髄INsの神経軸索の可視化。(A)胸髄における AAV-CAG-tdTomatoの注入部位を示す。(B)腰髄L3領 域における脊髄INsの神経軸索投射パターンを示す。白 丸は中心管を示す。スケールバー:200 um (考察と結論)

本研究は、胸髄に位置する脊髄INsが脊髄損傷後において後肢の運動機能回復にど のように寄与するかを明らかにすることを目的とした。われわれは、これまでに胸髄 に位置する脊髄INsには、腰髄に神経軸索を投射している細胞集団が存在すること、 さらにこれら脊髄INsは同側もしくは対側腰髄のいずれかにしか神経軸索を投射して いないことをつきとめている。本研究においては、片側胸髄損傷モデルを用いること により、同側腰髄に神経投射する細胞集団の軸索を物理的に切断している。一方で、 対側腰髄に神経投射する細胞集団の軸索はほとんど無傷の状態で保たれる。脊髄損傷 により軸索が切断された成体脊髄INsの自然再生は、ほとんど期待できない (Anderson et al., Nature. 2018)。それゆえ、脊髄損傷後における対側腰髄に神経 軸索を投射している細胞集団の機能解析を行うモデルとしては有用である。

行動学的解析の結果、脊髄損傷により同側および対側の後肢機能は、いずれも有意 に低下した。ラットの片側胸髄損傷モデルにおいても同様に損傷直後には損傷側と対 側の後肢機能が低下しており(Arvanian et al., Exp Neurol. 2009; Brown and Martinez, Exp. Neurol. 2021)、この結果を支持するものである。 対側後肢の機能低 下については、脊髄内に存在する脊髄INsには、同髄節において対側に神経投射する 細胞集団が存在し、左右後肢の協調的な動きを制御している (Danner et al., Front Cell Neurosci. 2019)。それら脊髄INsは脳や脳幹からの神経投射を受けている (Ueno et al., Cell Rep. 2018)。さらに、脊髄髄節間をつなぐ神経回路も協調的な動作に おいて重要な役割を担っている (Zhang et al., Elife. 2022)。脊髄損傷により脳や 脳幹からの下行性神経投射や脊髄間神経ネットワークが切断されることにより、それ ら神経回路網が適切に機能しなくなっている可能性が考えられる。

本脊髄損傷モデルにおいても、一定の機能回復がみとめられた。脊髄損傷後に運動機 能回復がみられたのち、T6-T9領域の神経細胞死を誘発した結果より、損傷側と同側 のT6-T9領域に位置する脊髄INsが機能回復に寄与している可能性が考えられた。一方 で、対側においては損傷側と同側後肢の機能回復への寄与は考えにくかった。Ladder walk testとBeam walk testでは、損傷側と対側のT6-T9領域の神経細胞死を誘発した際 に、損傷側と対側の後肢機能(注入側と同側)の低下がみられた。われわれのこれま での成果より、通常状態においてT6-T9領域の脊髄INsは、直接同側後肢の運動コント ロールに寄与していることをつきとめている。つまり、脊髄損傷後であっても、同側 胸髄一腰髄神経ネットーワークは、後肢の運動コントールを直接制御していることが 考えられる。一方で、対側後肢の制御はあったとしても極めて限定的であると考えら れた。

行動学的解析より脊髄損傷後には損傷側と同側の脊髄INsが重要である可能性が示 されたが、同側の腰髄に神経投射する脊髄INsの神経軸索は本モデルにおいては切断 されている。つまり、脊髄損傷後新たに構築された神経ネットワークを介して後肢の 運動コントロールを行っていることになる。大脳皮質や脳幹から脊髄に投射する下行 性神経路を全て左右異なる髄節レベルで切断したモデルでは、切断部での神経再生が なくても後肢機能の回復はみられる(Courtine, Nat Med. 2008)。これには、脊髄 INsの可塑性変化が重要な役割を担っていることが示されている。このように、たと え神経回路網がひとたび破綻したとしても、それを代償する機構が脊髄INsには備わ っており、われわれの結果もこれを支持していると考えられる。しかし、残された課 題として、本行動学的解析においてコントール群の作製に至っていない。また、脊髄 損傷後における脊髄INsの神経軸索の可塑性変化については、依然として解析を進め ている段階である。これらの解析を今後進めることにより、脊髄損傷後における脊髄 INsの神経メカニズムが明らかになるものと考える。

(謝辞)

本研究は、一般社団法人日本損害保険協会の助成を受けて行われた。

(引用文献)

Anderson MA, O'Shea TM, Burda JE, Ao Y, Barlatey SL, Bernstein AM, Kim JH, James ND, Rogers A, Kato B, Wollenberg AL, Kawaguchi R, Coppola G, Wang C, Deming TJ, He Z, Courtine G, Sofroniew MV. Required growth facilitators propel axon regeneration across complete spinal cord injury. Nature. 561, 396-400. 2018.

Arvanian VL, Schnell L, Lou L, Golshani R, Hunanyan A, Ghosh A, Pearse DD, Robinson JK, Schwab ME, Fawcett JW, Mendell LM. Chronic spinal hemisection in rats induces a progressive decline in transmission in uninjured fibers to motoneurons. Exp Neurol. 216, 471-480, 2009.

Baccei ML, Yoshida Y. Corticospinal circuits from the sensory and motor cortices differentially regulate skilled movements through distinct spinal interneurons. Cell Rep. 23, 2018.

Bareyre FM, Kerschensteiner M, Raineteau O, Mettenleiter TC, Weinmann O, Schwab ME. The injured spinal cord spontaneously forms a new intraspinal circuit in adult rats. Nat Neurosci. 7: 269–277. 2004.

Brown AR, Martinez M. Chronic inactivation of the contralesional hindlimb motor cortex after thoracic spinal cord hemisection impedes locomotor recovery in the rat. Exp. Neurol. 343, 113775. 2021.

Courtine G, Song B, Roy RR, Zhong H, Herrmann JE, Ao Y, Qi J, Edgerton VR. Recovery of supraspinal control of stepping via indirect propriospinal relay connects after spinal cord injury. Nat Med. 14: 69-74. 2008.

Danner SM, Zhang H, Shevtsova NA, Borowska-Fielding J, Deska-Gauthier D, Rybak IA, Zhang Y. Spinal V3 interneurons and left-right coordination in mammalian locomotion. Front Cell Neurosci. 13, 516, 2019.

Isa T, Mitsuhashi M, Yamaguchi R. Alternative routes for recovery of hand functions after corticospinal tract injury in primates and rodents. Curr Opin Neurol. 32: 836-843. 2019.

Metz GA, Whishaw IQ. Cortical and subcortical lesions impair skilled walking in the ladder rung walking test: a new task to evaluate fore- and hindlimb stepping, placing, and co-ordination. J. Neurosci. Methods 115, 169-179. 2002.

Metz GA, Whishaw IQ. The ladder rung walking task: A scoring and its practical application. J. Vis. Exp. 28, 1204. 2009.

Ninomiya T, Nakagawa H, Inoue K, Nishimura Y, Oishi T, Yamashita T, Takada M. Origin of multisynaptic corticospinal pathway to forelimb segments in macaques and its reorganization after spinal cord injury. Front Neural Circuits. 16: 847100. 2022.

Takata Y, Yamanaka H, Nakagawa H, Takada M. Morphological changes of large layer V pyramidal neurons in cortical motor-related areas after spinal cord injury in macaque monkeys. Sci Rep. 13:82. 2023.

Ueno M, Nakamura Y, Li J, Gu Z, Niehaus J, Maezawa M, Crone SA, Goulding M, Baccei ML, Yoshida Y. Corticospinal circuits from the sensory and motor cortices differentially regulate skilled movements through distinct spinal interneruons. Cell Rep. 23, 1286-1300. 2018.

Zhang H, Shevtsova NA, Deska-Gauthier D, Mackay C, Dougherty KJ, Danner SM, Zhang Y, Rybak IA.The role of V3 neurons in speed-dependent interlimbcoordination during locomotion in mice. Elife. 11, e73424, 2022.