

令和 2 年 3 月 18 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 30 年度

受付番号 201860400

氏 名 原 正 光

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： ロサンゼルス （国名： 米国 ）
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。
電氣的脊髄刺激を用いた新規脊髄損傷治療法の開発
3. 派遣期間：平成 30 年 4 月 1 日 ～ 令和 2 年 3 月 2 日
4. 受入機関名及び部局名
University of California, Los Angeles, Department of Integrative Biology and Physiology

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10－別紙 1～4 に記入の上、併せて提出すること。

【本研究の背景・目的】

現在まで、外傷性脊髄損傷に対する有効な治療法はないと長年に渡って信じられてきたが、たとえ慢性期であっても、リハビリテーションや硬膜外または経皮的な電氣的脊髄刺激によって非障害部位の神経が代償性に新たな機能を獲得することが明らかになってきた。近年、受入研究者である Edgerton 教授らの研究により、脊髄損傷中心部だけでなく、損傷部より遠位の二次運動ニューロンと損傷部より頭側の介在ニューロンとのシナプス再構築が機能予後に重要であり、動物レベルでは前肢及び後肢の運動がこのシナプス再構築を増加させ、運動機能回復を促進する事が報告された。さらに、Edgerton 教授らは、脊髄損傷後慢性期のラットやヒトに対して、リハビリテーションだけでなく電氣的脊髄刺激を加えることで、運動完全麻痺患者がステップ様運動を行うことが可能となったことを報告した (*J Neurotrauma.*, 2015)。電氣的脊髄刺激を行うと、非障害部位の脊髄介在ニューロンから運動ニューロンへ投射が増加し、新しいシナプス結合が形成され、運動ニューロンプールからの同期的な反応が増強されることで、リハビリテーション単独よりも運動機能が回復することもわかっている。しかし、電氣的脊髄刺激がどのようにして神経ネットワークを活性化させるかは不明であり、このメカニズムの解明を目的とした。この目的の遂行のため、まず、1 回の電氣的脊髄刺激が損傷脊髄にどのような影響を与えているのかを Whole transcriptome analysis を用いて解析した。

【本研究の遂行状況及び成果】

受入研究室ではすでに、ラットに対する電氣的脊髄刺激を行う実験系が確立していたため (*J Neurosci Res.*, 2015)、この実験系を用いた。なお、すべての動物実験は University of California Los Angeles Chancellor's Animal Research Committee (ARC) の規範や、National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council, 2011) のガイドラインに沿って行った。

実験方法について、成体ラット♀(255-285 g body weight)の脊髄を第9胸髄レベルで右半分を切断した。切断して麻酔から覚醒後、すべてのラットの右下肢の運動機能について、BBB (Basso, Beattie, and Bresnahan) scoreが0で点であることを確認した。電氣的脊髄刺激を行う群(Stim群、n=4)と行わない群(Control群、n=4)に分けた。Stim群に対して電氣的脊髄刺激を行うために、テフロンコートしたワイヤー電極をヘッドプラグと接続し、ワイヤー電極はL2-S1レベルに留置し、ヘッドプラグは頭部にネジで固定し、周囲と縫合した。脊髄損傷5日後にStim群に対して電氣的脊髄刺激を行った。電氣的脊髄刺激は、40 Hz、電圧は下肢筋収縮が見られる閾値の95%の強さとし、35分間行った。その後、第9胸髄を採取し、RNA-Seq用ライブラリーを作成した(Figure1)。サンプルの採取は電氣的脊髄刺激後90分以内に行った。また、ラットの非損傷脊髄(n=4)からも第9胸髄を採取した。

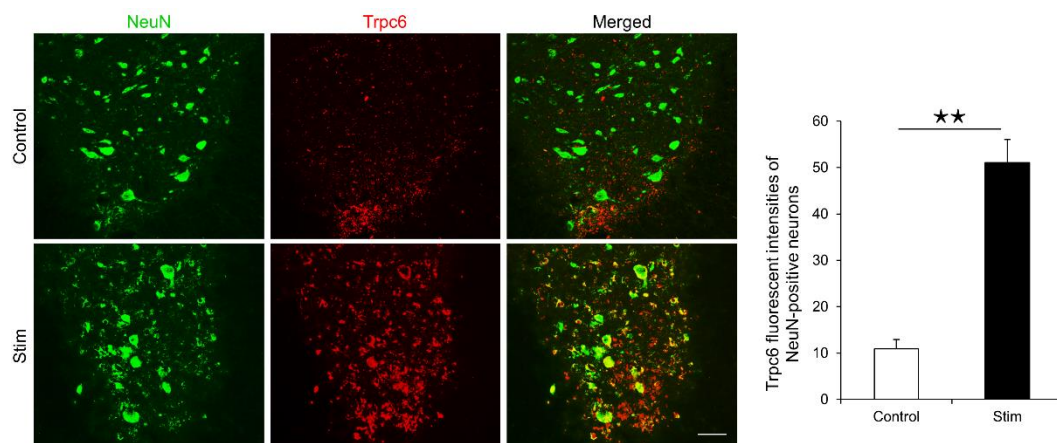
その後、RNA-Seqによって得られたすべての遺伝子発現量に関するハイスループット情報をバイオインフォマティックス解析により定量化した。非損傷脊髄と比較したStim群とControl群におけるすべての遺伝子発現量からヒートマップを作成して比較すると、遺伝子発現プロファイルに違いを認めた。これは、1回の電氣的脊髄刺激が損傷脊髄の遺伝子の発現量を変化させていることを示している。さらに、Stim群とControl群において、すべての遺伝子について発現量を比較すると、Control群と比較してStim群で4倍以上も発現量が増加した遺伝子の数は810個も認めた。

電氣的脊髄刺激は神経回路の再構築に関与するという報告が多数あり、発現量が4倍以上に増加した遺伝子群についてsynapseやaxon、dendriteを含むneuronal plasticityに焦点を当ててGO term解析を行い、gene-term 2D map viewを作成し、Control群と比較して、電氣的脊髄刺激が神経回路の可塑性に大きく関与していることを示した。さらに、このgene-term 2D map viewに示された遺伝子リストを用いて、それぞれの遺伝子の発現量を解析し、発現量の多い遺伝子を調べると、Trpc6が最も高く発現していた。

このTrpc6は、Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily C Member 6であり、これまでに興奮性シナプスの形成や神経突起の伸長、中枢神経系損傷後のニューロンの生存に貢献していると報告されている(*Nat Neurosci.*, 2008, *J Cell Sci.*, 2008, *J Neurochem.*, 2013, *Nat Neurosci.*, 2007)。我々は、Trpc6が電氣的脊髄刺激による脊髄損傷後の神経回路の再構築を仲介していると考えた。

Trpc6の損傷脊髄における局在や発現量を解析するため、同様にラットを用いて脊髄損傷モデルを作成し、Stim群とControl群に分け、脊髄損傷5日目にStim群に対して電氣的脊髄刺激後、すべてのラットにおいて麻酔下に心臓より脱血し、Paraformaldehyde (PFA)にて灌流固定を行った。その後、第9胸髄を取り出し、PFAやスクロースを用いて組織の固定・脱水を行った。サンプルをOCTコンパウンドに包埋し、凍結切片をaxial方向、20 μ mの厚みで作成し、免疫組織学的解析を行った。抗Trpc6抗体と抗NeuN抗体を用いて反応させた。結果として、Control群と比較して、Stim群ではNeuN陽性ニューロンにおけるTrpc6の発現は有意に上昇していた(Figure1)。NeuN陰性領域におけるTrpc6の発現はControl群とStim群で有意な差を認めなかった。

Figure1



これまでの結果から、電氣的脊髄刺激が損傷脊髄におけるニューロンでのTrpc6の発現を上昇させ、それによって神経回路の再構築を促進していることが示唆された。本研究結果については、現在論文投稿中である。また、gene-term 2D map viewに示された神経回路の可塑性に関与する遺伝子リストにおいて、Trpc6以外の遺伝子にも着目して解析を始めている。さらに、一回の電気刺激だけでなく、脊髄損傷5日後から11日後まで毎日脊髄電気刺激を行った損傷脊髄のWhole transcriptome analysisも現在解析中であり、脊髄電気刺激を用いた脊髄損傷治療法の開発・改良に向けて研究を進めている。本研究費による研究期間は終了し、日本に帰国したが、今後も受入研究者であるEdgerton教授との共同研究として本研究を継続し、研究成果を論文としてまとめ、国際誌に発表したいと考えている。

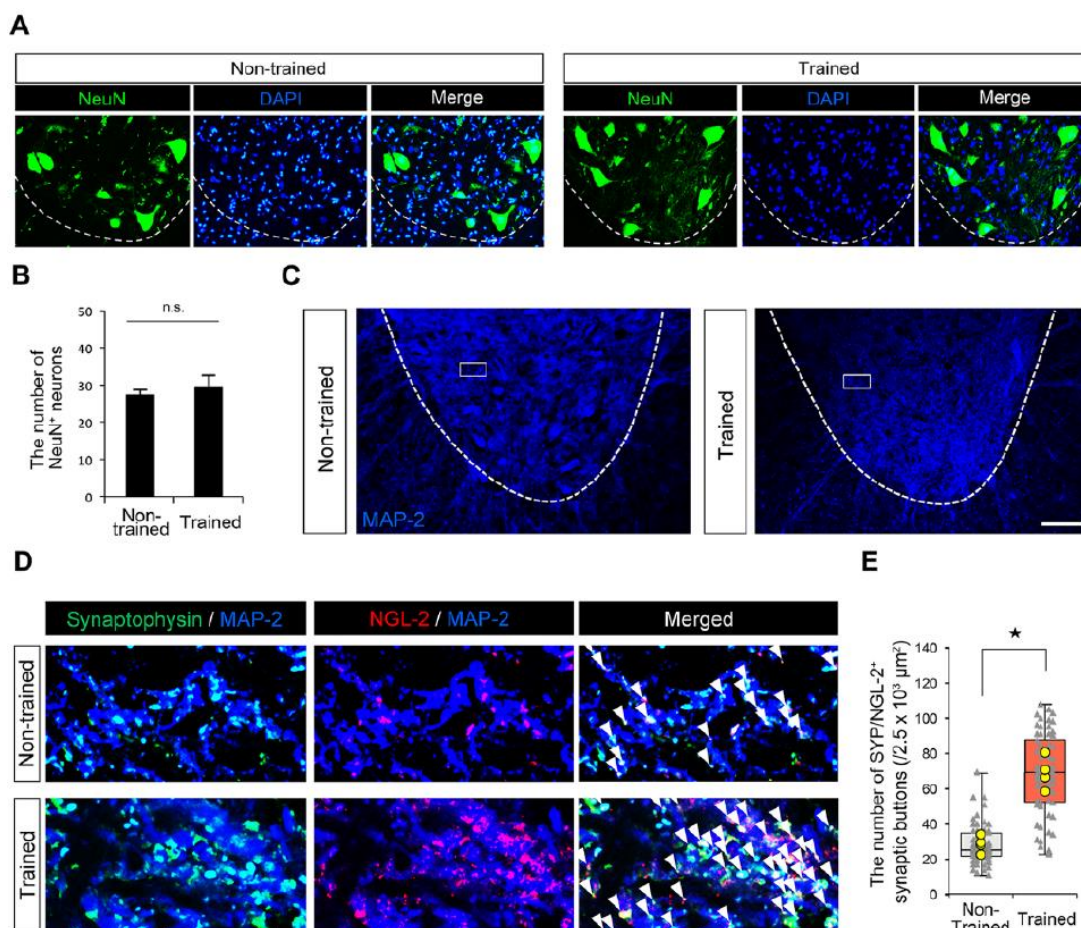
また、前述のように、脊髄損傷後の機能回復には電氣的脊髄刺激とリハビリテーションの二つを併用することが大変重要であり、脊髄損傷患者への電氣的脊髄刺激を行う場合、前提としてほぼ全ての脊髄損傷患者がリハビリテーション治療を受けているため、リハビリテーションがどのようなメカニズムで運動機能回復を促進するかを解明することは、本研究課題の遂行に必要であると考えた。受入研究者の研究室に在籍していた他の研究者との共同して研究を行い、結果が学術誌にて受理・発表されたため(*Neurorehabil Neural Repair.*, 2019)、報告する。

実験はラットの第9胸髄の右半分を切断し、脊髄損傷4日後から21日後まで毎日トレッドミルトレーニングを行う群(Trained群、n=4)とトレッドミルトレーニングを行わない群(Non-trained群、n=4)に分け、脊髄損傷23日後に第1腰髄を採取し、RNA-Seq用ライブラリーを作成した。RNA-Seqによって得られたすべての遺伝子発現量に関するハイスループット情報をバイオインフォマティクス解析により定量化した。得られたデータより、Non-trained群とTrained群におけるすべての遺伝子発現量をヒートマップで表すと、遺伝子発現プロファイルに違いを認めた。次に、Non-trained群とTrained群において、すべての遺伝子について発現量を比較すると、Non-trained群と比較してTrained群で2倍以上も発現量が増加した遺伝子の数を806個も認めた。過去の報告において、脊髄半分切断後にトレッドミルトレーニングを行ったラットではニューロンの間の接続性が向上していた

ことが逆行性トレーサーを用いた実験で示されている。我々は、シナプス可塑性に焦点を当て、RNA-SeqのデータのNon-trained群と比較してTrained群で2倍以上も発現量が増加した遺伝子についてGO term解析を行い、gene-term 2D map viewを作成した。このgene-term 2D map viewを用いて、Control群と比較して、トレッドミルトレーニングがシナプスにおける再構成や機能変化に大きく関与していることを示した。さらに、このgene-term 2D map viewに示された遺伝子リストを用いて、それぞれの遺伝子の発現量を解析して比較すると、Lrrc4 (coding netrin-G ligand 2, NGL-2)が最も高く発現していた。我々は、このNGL-2についてさらなる解析を行った。

これまで、NGL-2 (postsynaptic) と synaptophysin (presynaptic) の共有は興奮性シナプスの数に影響を与えており、トレーニングが脊髄損傷後の運動ニューロンの興奮性を誘導すると報告されているため、我々は、トレーニングに誘導されたLrrc4 (NGL-2) の発現上昇が運動ニューロンにおけるシナプスの数に関係しているかもしれないと考えた。免疫染色を行うと、NeuN陽性ニューロンの数はNon-trained群とTrained群の間で有意差を認めなかったが(Figure2 A, B)、Non-trained群と比較してTrained群ではNGL-2陽性/ synaptophysin陽性シナプスの数は有意に多かった(Figure2 C-E)。これらの結果から、我々は胸髄半分切断後のトレッドミルトレーニングは多様なシナプス関連遺伝子、特にLrrc4、の発現を上昇させ、シナプス構造を変化させる重要な役割を果たしていることを発見した。我々の知見は、中枢神経損傷後のリハビリテーションが活動依存性のシナプスの再構成を促進していることを示している。

Figure2



さらに、リハビリテーションが損傷脊髄へ与える影響について解析するため、下記の実験を行った。実験はラットの第9胸髄の右半分を切断し、脊髄損傷5日後から11日後まで毎日トレッドミルトレーニングを行う群(Trained群、n=4)とトレッドミルトレーニングを行わない群(Non-trained群、n=4)に分け、脊髄損傷11日後に第9胸髄を採取し、RNA-Seq用ライブラリーを作成した。RNA-Seqによって得られたすべての遺伝子発現量に関するハイスループット情報をバイオインフォマティクス解析により定量化した。得られたデータより、Non-trained群とTrained群におけるすべての遺伝子発現量をヒートマップで表すと、遺伝子発現プロファイルに違いを認めた。次に、Non-trained群とTrained群において、すべての遺伝子について発現量を比較すると、Non-trained群と比較してTrained群で2倍以上も発現量が増加した遺伝子の数を1952個も認めた。発現量が2倍以上に増加し

た遺伝子群についてsynapseやaxonを含むneuronal plasticityに焦点を当ててGO term解析を行い、gene-term 2D map viewを作成したところ、Control群と比較して、リハビリテーションが損傷脊髄の神経回路の可塑性に大きく関与していることを示していた。さらに、このgene-term 2D map viewに示された遺伝子リストを用いて、それぞれの遺伝子の発現量を解析し、発現量の多い遺伝子を調べると、Kidins220が最も高く発現していた。

このKidins220は、Kinase-D interacting substrate of 220 kDaであり、ARMS (Ankyrin repeat-rich membrane spanning)として知られている。Kidins220は、これまでにニューロンの分化や生存、シナプスの可塑性に貢献すると報告されている(*J Cell Sci.*, 2012, *Front Cell Neurosci.*, 2016)。また、Kidins220のダウンレギュレーションは、シナプスの欠損を引き起こし、学習や記憶のような高度な認知機能に影響を与えたと報告されている(*Dev Neurobiol.*, 2009, *J Biol Chem.*, 2010, *Exp Neurol.*, 2011, *J Neurosci.*, 2018)。我々は、Kidins220がリハビリテーションによる脊髄損傷後の神経回路の再構築を仲介していると考え、現在、引き続き解析を進めている。さらに、脊髄損傷5日後から11日後まで毎日脊髄電気刺激+リハビリテーションを行った損傷胸髄と腰髄のWhole transcriptome analysisもそれぞれ現在解析中であり、脊髄電気刺激を用いた脊髄損傷治療法の開発・改良に向けて研究を進めている。本研究費による研究期間は終了し、日本に帰国したが、今後も受入研究者であるEdgerton教授との共同研究として本研究を継続し、研究成果を論文としてまとめ、国際誌に発表したいと考えている。

また、以前より受入研究者であるEdgerton教授らは脊髄損傷患者への脊髄電気刺激による治療の臨床研究も行っており、Edgerton教授らは新たな臨床研究を本研究費による研究期間中に立ち上げた。これは、脊髄損傷患者に対する経皮的脊髄電気刺激に加え、Buspironeという薬剤を投与することで治療効果が促進されるかを検証するという内容である。脊髄電気刺激+Buspironeが脊髄電気刺激単独と比較して、治療効果があるのは動物実験を用いてEdgerton教授らが過去に発表しており、実際の脊髄損傷患者でも治療効果があるのかを証明することを目的としている。この臨床研究にも関わる予定であったが、残念ながら諸事情により実際の臨床研究のスタートが遅れ、始めの一部分にしか関われなかった。しかし、Edgerton教授らから脊髄損傷患者に対する脊髄電気刺激を行う装置の使用法などを学び、日本において必要な諸手続きを終えることができれば、Edgerton教授らとの共同研究として帰国後に日本の病院で臨床研究を行うことも可能であることをすでに話しており、今後もEdgerton教授との共同研究を継続し、研究成果を発表していきたいと考えている。