

# 博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 浅野 広大

横浜市立大学大学院医学研究科 リハビリテーション科学

## 審査員

主査 横浜市立大学大学院医学研究科 神経内科学・脳卒中医学 教授 田中章景

副査 横浜市立大学大学院医学研究科 運動器病態学 教授 稲葉裕

副査 横浜市立大学大学院医学研究科 生理学 准教授 宮崎智之

博士の学位論文審査結果の要旨

**Early mobilization in spinal cord injury promotes changes in microglial dynamics and recovery of motor function**

脊髄損傷後早期離床によるミクログリアの動態変化, 運動機能回復

**【申請者による学位論文の説明】**

まず, 申請者から以下の説明が行われた.

脊髄損傷完全対麻痺は現状では達成困難であるが, 立ち向かわねばならない命題である. 脳卒中患者に対するリハビリテーションは早期離床および早期運動療法が強く推奨されているが, 脊髄損傷患者に対する急性期リハビリテーションは機能維持目的にとどまっており, 脊髄損傷に対する早期運動療法のエビデンスはない. 今回, 脊髄損傷モデル動物を用いて, 早期運動療法の効果を検証した. 成体マウス脊髄損傷では, 損傷部に炎症性ミクログリアが流入することにより, 神経炎症が引き起こされ, 損傷部の周囲はグリア瘢痕が形成され損傷部の中心は線維性瘢痕が形成される. それに対し, 新生仔期マウス脊髄損傷では損傷部に炎症性ミクログリアの流入が起きず, 瘢痕が形成されず, 運動機能も保たれる. このことから, 神経炎症の始まりである炎症性ミクログリア, M1 ミクログリア

の抑制に注目した。運動療法によって、抗炎症性ミクログリア、M2 ミクログリアが増加することが報告されており、早期に運動することにより脊髄損傷部においてM1 ミクログリアが減少するのではないかと考えた。さらに、脊髄損傷急性期に免疫組織学的変化を及ぼす因子として、損傷1日後にピークに達するMMP9と損傷5日から21日後にわたり高い発現量をとるMMP2の、2つの血管新生作用による組織修復効果を持つMMPにも着目した。

予備的検討として、脊髄損傷完全切断ラットに48時間以内から前肢（非麻痺肢）の強制運動を10分間、週5日実施した2週、4週それぞれのエンドポイントで早期運動療法群と非運動療法群に分けて、行動評価と脊髄損傷部内のミクログリアの発現を比較検討した。早期運動療法群では、1週から4週にわたり麻痺肢の運動機能が回復した。早期運動療法群では、4週後の損傷部にM2 ミクログリアが多く発現していた。以上の結果から、早期運動療法は亜急性期、4週の損傷部で抗炎症性作用をもつM2 ミクログリアが発現し、より急性期では神経炎症が抑制されている可能性と、瘢痕形成自体にも影響を与えている可能性が考えられた。これらの結果と中間審査時に、損傷1週までに瘢痕部で何か変化が起きていないか、ミクログリア以外の因子にも変化が起きていないかというご指摘のもと、実験計画を1週、2週、3週それぞれのエンドポイントで早期運動療法群と非運動療法群に分けて、T10 胸髄完全切断ラットの行動評価お

よび免疫組織化学的に定量し比較検討した。早期運動療法群で 1 週および 3 週で麻痺肢運動機能回復がみられた。

損傷後 1 週で損傷部の M1 ミクログリアが減少していた。M2 ミクログリアは有意差がなかった。MMP9 は反応性アストロサイトと共発現していたが、発現量に有意差はなかったことに対し、MMP2 は損傷部のミクログリアと共発現し、早期運動療法群で MMP2 陽性ミクログリアが有意に増加していた。損傷後 3 週で瘢痕部の裂隙および空洞面積が、早期運動療法群で有意に減少し、グリア瘢痕の境界を損傷部と定義し損傷面積を計測し、損傷面積も有意に減少していた。損傷内部の再生軸索の発現量に有意差はなかったが、再生軸索の密度は早期運動療法群で有意に増加していた。さらに、損傷部を超えて尾側に再生する軸索は観察されなかった。

これらの結果から、早期運動療法によって神経炎症抑制効果、M1 ミクログリアの減少を認め、過去に報告された脊髄損傷モデル動物に対する炎症抑制剤投与実験と同等の運動機能回復を認めた。運動機能回復が、炎症抑制効果と関係している可能性がある。MMP9 が損傷部周囲の反応性アストロサイトと発現し、MMP2 は損傷部内のミクログリアで発現し、早期運動療法による MMP2 陽性ミクログリアの増加は、M1 ミクログリアと関係している可能性があり、損傷部内の組織修復に関係している可能性が考えられる。その結果として、3 週の損傷部面積や裂

隙面積が縮小したことが考えられる。損傷部内の再生軸索密度も増加したが、損傷部を超えて尾側に伸長する再生軸索の線維は観察されず、運動機能回復の神経組織学的機序は明らかにできなかった。別の神経回路が活性化された可能性が示唆された。今回の研究では運動療法開始時期による変化まで検証できていないため、今後は早期運動療法による神経回路の活性化がどの部位で起きているかを検証するとともに、48時間以内に開始する運動療法群と、運動療法開始時期を遅らせた群との比較検討を今後の課題としている。また、今回検証しなかった、軸索阻害因子である細胞外基質の検証や、トレーサー実験など瘢痕を超えて通過する軸索の有無の検証が必要であると考えられる。

#### 【質疑応答】

田中主査から、脊髄損傷に対する急性リハビリテーションは早期運動療法が実施されていない背景があり、今回動物実験を用いて検証した、早期運動療法は脊髄損傷でなされていないという主題の確認後、質疑応答が始まった。

まず、稲葉副査からの質疑は4点。それぞれに回答した。

#### 1. この研究は申請者が立案したのか、着想に至った経緯は

臨床経験で脊髄損傷患者の治療のための安静で離床が遅れ、関節機能障害と重度の麻痺が永続した。早期に運動・離床が必要だったと感じた。

2. 廃用性の機能障害とは別の，損傷部自体に変化させるという着想は

脊髄損傷モデル動物では薬剤投与とリハビリテーションの併用療法が効果的であると言われているが，運動療法単独の効果，早期運動療法の効果を検証した実験はないことから立案に至った。

3. 新生仔期の脊髄損傷は瘢痕が出来てから瘢痕が消失するのか

新生仔期では恒常性の特殊なミクログリアが存在していて，炎症性ミクログリアが流入せず，瘢痕が形成されない。

4. ラットの 10 分間の運動は，どの程度のものなのか，ヒトで換算するとどうか

10 分間は，ラットが運動を続けてられる限界の時間であった。10 分以上では途中で運動を止めてしまった。ヒトで換算するとおそらく 2 単位分，40 分の運動療法に相当すると推察している。

次に宮崎副査からの質疑は 4 点。それぞれに回答した。

1. 脊髄損傷後 48 時間以内の運動は，急性期と言えるのか。ヒトで言うと 2 週間くらい経過しているのではないか

実際の運動機能で判断すると，ラットも弛緩性麻痺の状態であるため急性期であると考え。さらに，24 時間以内に運動を開始したラットは生存できずデータが集まらなかったという発表していない結果がある。

2. 早期運動療法のプロトコールは何を参考にしたのか。レビューから指摘されなかったのか

予備実験の検討で、申請者が練り上げた。レビューからの指摘は全くなかった。

3. 運動療法で炎症が抑制されるロジックを説明してほしい

液性因子、サイトカインや神経栄養因子と考えている。運動をすると放出されるサイトカインがあり、IL-6 などの抗炎症作用も知られ始めている。さらに、M2 ミクログリアが IL-10 を放出されることは既知であるため、今回はあえて M1 および M2 ミクログリアの細胞数の定量をした。

4. 損傷部に瘢痕が出来ると軸索再生が起きない、運動機能は軸索が再生しないと生じないのではないのか。

現状では脊髄損傷後瘢痕が形成された後の軸索再生は困難であると感じている。しかし、早期運動療法によって運動機能が回復したことから、より末梢の、腰髄の神経回路が活性化されたと考えている。

続いて田中主査から 6 点の質疑・指摘があり 1・2・3・5 に回答した。

1. 基本的な確認として、運動療法で動かしているのは麻痺肢なのか

非麻痺肢の強制的自動運動を実施した。

## 2. MMP2, MMP9 の動態の解釈について

MMP2 が高いレベルまで達する期間が、早期運動療法に早まったと考えている。  
MMP9 に関しては有意差がなかったため言及しにくいですが、1 週後も早期運動療法によって高い発現量を維持したと考える。

## 3. 脊髄損傷の神経炎症で流入する炎症性のミクログリアは末梢性のものなのか 元々存在しているミクログリアなのか。

中間審査の際に抗CCR2抗体を使用した。CCR2陽性トマトレクチン陽性iNOS陽性ミクログリアは観察されなかった。M2ミクログリアに関してはトマトレクチン陽性細胞とマージしていたため、内在性ミクログリア由来である  
と考えるが、M1ミクログリアに関しては、内在性とは断定できないが、CCR2陽性ではなかったため、末梢ではない可能性が高い。

## 4. 運動することによって、IL-6のような液性因子の変化や、細胞外基質の形成 変化を検証することが望ましい。

## 5. 行動評価で2週群に有意差がなかった原因は。

個体差ではないかと考える。1週、3週は予備実験通りの評点であった。

## 6. リハの開始時期を遅らせた検証も必要である

これらの質疑応答のあと、申請者の本研究への貢献度が確認された。実験手技を指導していただき、運動プロトコル立案の助言を受け、全て申請者が作製した

モデル動物を用い運動療法・観察・解析を申請者自身で行った。行動評価は一部二重盲検とし、教室員と実施した。このように回答した。

以上の審査に基づき、審査員総意のもと、博士（医学）の学位授与に値すると判断された。