

学位論文の要旨

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)

December, 2022

(2022年12月)

Kohta Asano

浅野 広大

Rehabilitation Science

Yokohama City University Graduate School of Medicine

横浜市立大学 大学院医科学研究科 医科学専攻 リハビリテーション科学

(Research supervisors: Kengo Funakoshi, Professor)

(研究指導教員 船越 健悟 教授 横浜市立大学医学部神経解剖学)

(Doctoral supervisor: Takeshi Nakamura, Professor)

(指導教員 中村 健 教授 横浜市立大学医学部リハビリテーション科学)

学位論文の要旨

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および運動機能回復)

- PMID: 35586775
- PMCID: [PMC9108724](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC9108724/)

<https://doi.org/10.1016/j.ibneur.2022.04.002>

1. 序論

脊髄損傷急性期のリハビリテーション、早期離床の効果は検証がほぼされていない。横断性の脊髄損傷によって、左右の上下肢ともに同程度の運動麻痺や膀胱直腸障害や自律神経障害が生じる。急性期治療の段階では、自律神経の過剰な反射を防ぎ、椎体の安定化を得るために床上の関節可動域維持訓練に留まることが多く、脳血管障害のリハビリテーション(The AVERT Trial Collaboration group, 2015)と比べると早期離床は障壁が多いのが現状である。動物モデルを使用することにより、脊髄損傷後の早期離床が損傷部の二次損傷、神経炎症による組織破壊を抑制し、軸索の再生に有利に働くと仮説を立てた。運動機能を行動学的に、損傷部組織は免疫組織化学的に検証した。

2. 実験材料と方法

9-12週齢のWistar雌ラット41匹を使用した。早期運動群(Early mobilization: EM)と非早期群(non-Early mobilization: NEM)に分け、胸髄10レベルでの脊髄を完全切断した脊髄損傷モデルラットを作成した。脊損術後48時間以内にEM群は運動を開始した。運動内容は、後肢を徒手的に支持し体幹を挙上させ、両前肢の強制使用による歩行運動を10分間、週5回実施した。行動学的評価として術後1週、2週、3週に後肢機能をBBB Motor Score(Basso DM, et al., 1995)で評価した。術後1週(急性期)と術後3週(亜急性期)にラットを灌流固定し、胸髄Th7-Th12を切り出した。ライカ製のクライオスタットを操作し12 μ m厚の脊髄水平断、連続切片スライドを6-8セクションで8セット作成し、各種一次抗体および蛍光色素で標識された二次抗体を用いて間接法による免疫染色を行った。細胞数の評価は、キーエンス社Bz-x810オールインワン顕微鏡を用いて観察し、スライドガラスの3切片の平均で解析した(1週EM n=4, 1週NEM n=4; 3週EM n=4, 3週NEM n=4)。損傷部とその周辺領域に発現しているミクログリア:(CD163陽性, iNOS陽性, トマトレクチン陽性), MMP2陽性, およびMMP9陽性細胞数を40倍の観察視野で網羅的にBZ-X解析アプリケーションでカウントした。CD163・トマトレクチン・DAPIの共局在およびMMP2・トマトレクチン・DAPIの共局在の観察には、オリンパスFluoViewFV1000

共焦点レーザー顕微鏡を用いて 60 倍で観察した。裂隙もしくは空洞の評価には、3 週 EM n=4, 3 週 NEM n=4 のスライドガラス 3 切片の平均で解析した。キーエンス社 Bz-x810 オールインワン顕微鏡で 10 倍観察し、裂隙・空洞部分を BZ-X 解析アプリケーションで面積を計測した。GAP43 構造物(再生軸索)の評価は、3 週 EM n=3, 3 週 NEM n=3 のスライドガラス 3 切片の平均で解析した。キーエンス社 Bz-x810 オールインワン顕微鏡の 20 倍で観察し、損傷部を GFAP が発現していない領域と定義し、損傷部の面積および GAP43 構造物の面積を BZ-X 解析アプリケーションで計測した。データの集積および解析は一部分的に盲検化した。すべてのデータは平均値と標準誤差で合わせて示した。1 週, 2 週, 3 週それぞれの運動群 BBB スコア, 非運動群 BBB スコアをウェルチの t 検定で比較分析した。1 週運動群および 1 週非運動群の CD163 陽性細胞数, iNOS 陽性細胞数はマンホイットニーの U 検定を用いて比較分析した。1 週運動群および 1 週非運動群の MMP2 陽性細胞数, MMP9 陽性細胞数をそれぞれマンホイットニーの U 検定を用いて比較分析した。3 週運動群, 3 週非運動群の裂隙もしくは空洞の比較にはマンホイットニーの U 検定を用いた。有意水準 p が 0.05 未満の場合, 統計学的有意差と定めた。データの解析には IBM 社ソフトウェア SPSS の 22.0 版を使用した。今回の動物実験は横浜市立大学動物実験委員会 [F-A-17-006](#) で承認されたものである。

3. 結果

術後 1 週の損傷部では、EM では NEM に比し炎症性 M1 ミクログリア/マクロファージ発現が有意に減少していたが、抗炎症性 M2 ミクログリアの発現には有意差がなかった。MMP2 陽性のミクログリアは EM で有意に多かった。MMP9 陽性の活性化グリア細胞は、EM で多い傾向であった。術後 3 週の比較では、損傷中心部の面積および空洞・裂隙面積は EM で有意に縮小しており、その結果 GAP43 の発現量では EM, NEM において有意差は認めなかったものの、GAP43 発現密度は、EM で有意に高かった。

4. 考察

今回の早期運動療法による運動機能回復の効果は、過去の神経炎症抑制をターゲットにした Neuregulin-1 (Alizadeh A, et al., 2017) やメラトニン (Zhang Y, et al., 2019) 投与と同等であった。組織学的変化も同様に、急性期の脊髄損傷部における M1 ミクログリアもしくは M1 マクロファージの発現が、非運動群と比較して運動群では抑制されていた。さらに、3 週後の損傷部の免疫組織化学的検証により、非運動群に比較して運動群では損傷部の瘢痕領域の面積が縮小されていたことから、早期運動療法が急性期の炎症性ミクログリアもしくはマクロファージの流入を抑制(Zhou X et al., 2020)し、神経炎症を抑制した結果、組織修復の促進もしくは組織破壊、二次傷害に対して有利となるような損傷部の微小環境調整がなされた可能性が示唆された。

Key word: Early mobilization, spinal cord injury, microglia, neuroinflammation, motor function recovery

主要引用文献リスト

Alizadeh A, Dyck SM, Kataria H, Shahriary GM, Nguyen DH, Santhosh KT, Karimi-Abdolrezaee S. Neuregulin-1 positively modulates glial response and improves neurological recovery following traumatic spinal cord injury. *Glia*. 2017 Jul;65(7):1152-1175. doi: 10.1002/glia.23150. Epub 2017 Apr 29. PMID: 28456012.

AVERT Trial Collaboration group. Efficacy and safety of very early mobilisation within 24 h of stroke onset (AVERT): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2015 Jul 4;386(9988):46-55. doi: 10.1016/S0140-6736(15)60690-0. Epub 2015 Apr 16. Erratum in: *Lancet*. 2015 Jul 4;386(9988):30. Erratum in: *Lancet*. 2017 May 13;389(10082):1884. PMID: 25892679.

Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma*. 1995 Feb;12(1):1-21. doi: 10.1089/neu.1995.12.1. PMID: 7783230.

Zhang Y, Liu Z, Zhang W, Wu Q, Zhang Y, Liu Y, Guan Y, Chen X. Melatonin improves functional recovery in female rats after acute spinal cord injury by modulating polarization of spinal microglial/macrophages. *J Neurosci Res*. 2019 Jul;97(7):733-743. doi: 10.1002/jnr.24409. Epub 2019 Apr 22. PMID: 31006904.

Zhou X, Wahane S, Friedl MS, Kluge M, Friedel CC, Avrampou K, Zachariou V, Guo L, Zhang B, He X, Friedel RH, Zou H. Microglia and macrophages promote corraling, wound compaction and recovery after spinal cord injury via Plexin-B2. *Nat Neurosci*. 2020 Mar;23(3):337-350. doi: 10.1038/s41593-020-0597-7. PMID: 32112058; PMCID: PMC7412870.

論文目録

I 主論文

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

Asano, K., Nakamura, T., Funakoshi, K.

IBRO Neuroscience Reports Volume 12, June 2022, Pages 366-376

II 副論文

なし

III 参考論文

なし