
損傷脊髄の機能回復に関する研究

(H10-特別-006)

平成10年度 厚生科学研究費補助金
(厚生科学特別研究事業)

主任研究者 永野 隆 (福井医科大学)
分担研究者 佐藤 真 (福井医科大学)

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）

総括研究報告書

損傷脊髄の機能回復に関する研究

主任研究者 永野 隆 福井医科大学医学部助手

研究要旨

脊髄損傷の治療に向け、様々な試みがなされているが、傷害を受けた錐体路を特異的に回復させる方法は確立していない。我々はいわゆる皮質—橋路の形成にあたり、橋組織 (basilar pons)より(i) 大脳皮質軸索側枝形成促進因子 (ii) 大脳皮質軸索 (側枝) 化学誘引因子が分泌される事実に着目し、本因子を同定し、脊髄損傷の治療につかいうるかどうかを検討する目的で本実験を開始した。残念ながら、最終的に橋由来因子は未だ同定できておらず、現在の結果は以下のとおりである。(1) 研究代表者らはdifferential display法を用い、回路形成期の橋組織に特異的に発現する遺伝子の同定を試みた。その結果、現在までのところ、候補遺伝子として3クローン同定し、その内2つにつき全長cDNAを得、その解析を進めた。(2) 上記の実験に平行し、脊髄損傷の治療には神経栄養因子を効果的に傷害側に投与する必要があると考え、近年澤田らにより報告されている、ある種のマイクログリア細胞に着目し、実験を行った。すなわち、この細胞はいわゆる脳血液関門を通過する能力を有すると報告されているもので、マイクログリア細胞が本来傷害側に集積する性質と併せ、神経栄養因子を分泌するべく本細胞を遺伝子工学的に改変し、生体に投与すれば効果的ではないかと考えた。現在までのところ、本細胞種が脳血液関門を通過しうる能力を有することは確認した。但し、その数は少なく、通過細胞数をあげることが次の課題と思われた。さらに、遺伝子を細胞に導入すると、細胞の多くが死んだり、いわゆる活性型でなくなったりする現象が観察され、この点に関し、現在実験を続けている。

分担研究者：佐藤 真

福井医科大学医学部 教授

A. 研究目的

近年、交通手段の高速化や建物の高層化などにより高度な脊髄損傷例をみることも少なくないが、多くの場合神経機能の回復は見られず、患者・医師の双方にとり対応が難しい場合も多い。現在の医療技術では損傷脊髄の機能的縫合は難しく、この実現に向けた基礎研究の進展が待たれている。臨床的応用に際しては、傷害された回路のみを特異的に再生させることと、傷害部位周囲の神経組織をさらなる死より保護する二つの側面からの対策が求められるものと考えられる。基礎研究のレベルでは、現状では中枢神経系の回路再生は一定の条件下では可能であるとされるが、目的とする回路の効率的修復は依然困難である。我々は以上の点を鑑み、(1) 脊髄損傷時に損傷され影響の大きい錐体路を対象とし本回路の特異的再生を目指す。(2) 損傷部位の神経組織を保護するため効率的な神経栄養因子・保護因子の投与方法を検討するという2つの実験を計画した。即ち橋組織より分泌

される錐体路特異的の化学誘引因子をクローニングし、その因子を傷害側遠位に局在させることにより傷害部位を越えた錐体路の特異的修復が可能であるかどうかを探る実験を計画した。同時に、最近報告された脳血液関門の通過能を有するマイクログリア細胞（の亜株）に着目し、マイクログリア細胞が本来神経傷害部位に集積する性質を有することと併せ、本細胞を担体とし傷害部位への神経栄養因子、保護因子の効率的投与の可能性を探る基礎実験も併せて行うことを計画した。

B. 研究方法

本研究は橋由来の化学誘引因子のクローニングとならびにその因子を傷害脊髄に応用するものと、マイクログリアの応用の可能性を探る実験に分けることができる。実験に際しては、本年度実施した橋組織由来因子のクローニングとマイクログリア細胞への遺伝子導入実験の項目について以下に記す。

(1) 動物

Wistar系ラットを用いた（ケアリー社より購入）。橋由来因子の実験に際しては生直後（生後24時間以内）を用いた。麻

酔は低体温麻酔を用いた。また、マイクログリア細胞の打ち込みには生後6-10週令のものを用いた。麻酔はNembutal(50 mg/Kg)を用い、実験操作は痛覚の反応がないことを確認し行った。動物は、室温22度の環境下にて飼育し使用した。

(2) 橋由来因子のクローニング

ラットをモデルシステムとし、Differential display法を用い、化学誘引活性の確認されている生直後ラット脳の橋組織に発現し、バイオアッセイ上活性の確認されていない同時期の脳皮質組織に発現しない因子を検索した。Differential display法は常法に従った。同法のみでは、候補遺伝子が絞りこめなかったため、in situ hybridization法も併用した。in situ hybridization法はdifferential display法にて得られた遺伝子断片(約300-600bp)をもとにRIラベルしたcRNAを作製し、プローブとして使用した。動物としては、生直後Wistarラットの脳切片を用いた。薄切脳切片は麻酔下の生直後ラットより脳を取り出し、ドライアイスにて凍結したものをクリオスタットにて作製した。in situ hybridization法の可視化には、フィルムオートラジオグラフィーを

用いた。

(3) マイクログリアを用いた実験系

藤田保健衛生大の澤田より確立、供与されたマイクログリアセルラインを培養し実験に用いた。CMVプロモーターを有する発現ベクター(pCDI)とElongation Factorプロモーターを有する発現ベクター(pCE)にマーカー遺伝子を組み込み、細胞にtransfectionし、その発現効率を検討した。濃度は1-20 ng/ulの範囲で検討した。遺伝子導入にあたっては、Transfast、DOTAP試薬を用いた。また、マイクログリア細胞を直接ラベルし、腹腔内、心臓、総頸動脈に打ち込み、脳切片を作製し、脳内への移行を検討した。なお、この実験は大阪市立大学医学部第一解剖前田講師との共同実験にて行った。

C. 研究結果

D. 考察 (併記)

(1) 錐体路に対する化学誘引因子の検索

我々は上記の目的を達成するため、differential display法を応用し、回路形成期の橋に発現する因子の検索を行った。その結果99クローンを候補遺伝子断片として取得した。それらに対してin situ hybridization法による回路形成期の橋で

の発現を検討した結果、40クローンの橋における発現が確認されたが、それらの多くは橋組織由来因子の活性をバイオアッセイ上示さない大脳皮質においても明瞭に発現していた。そこでin situ hybridization法での検討の結果、大脳皮質での明瞭な発現が観察されない8クローンを候補クローン（1次）として選定した。

我々が、橋由来因子の活性の有無を嗅球と小脳組織でバイオアッセイにて検討したところ、その活性は確認されなかった。この事実は橋由来因子がこれらの組織には発現していないか、その発現量が少ないことを意味するものと考えられた。そこで、我々は候補8クローンのmRNAが嗅球や小脳にて発現しているか否かをin situ hybridization法にて検討した。その結果、8クローンのうち5クローンが嗅球もしくは小脳において強い発現を示したので、橋由来因子の候補から除外し、結局3クローン（便宜上#1、#2、#3とする）に対し、全長cDNAの取得・活性検討を目指し実験を進めた。

以下#1-3についての現在までの結果をまとめる。

#1 : in situ hybridization法による

発現を検討したところ回路形成期（生直後）の橋において強い発現が観察された。さらに橋内では内側部に発現が強く、外側部では発現が弱いというgradientが観察された。in situ hybridization法では同時期の大脳皮質には明瞭な発現は観察されなかったものの、Northern blot解析では大脳皮質においてもその発現は確認された。このことは、本遺伝子は大脳皮質において漸慢性に広く発現している、もしくは我々がin situ hybridization法にもちいた切片では発現していないが大脳皮質のある部位に局在して発現している可能性を示している。現在この点について検討中である。又、Northern blot解析では2本のバンド（約9.5kbと5.6kb）が観察されている。この遺伝子については、ほぼ全長と思われるcDNAをすでに取得しており、解析中である。

#2 : in situ hybridization法によって回路形成期での脳内発現を検討したところ橋と下オリーブ核に強い発現が観察された。下オリーブ核は橋と同様に大脳皮質（錐体路）軸索が側枝を伸ばす部位として知られているが、本発現の意義は現在の所不明である。Northern blot解析の結果では、その長さは約7kbであり、大脳皮質で

の発現は確認されなかった。我々は、ほぼ全長と思われるcDNAをすでに取得しており、現在解析中である。

#3 : in situ hybridization法では回路形成期の橋に強い発現を示した。

Northern blot解析の結果では、その長さは約7kbであり、大脳皮質での明瞭な発現は確認されなかった。現在、全長cDNAの取得を目指し、実験を行っている。

(2) マイクログリアの応用

まず、マイクログリアの脳血液関門の通過能の確認と、マイクログリアにどのように目的とする遺伝子を発現させることができるかの基礎実験を行った。その結果、藤田保健衛生大の澤田氏により供与されたマイクログリアのセルラインには通過能があることが確認されたが、脳内にて確認できた数はきわめて少なかった。初代培養のマイクログリアの方が通過能が高いとの報告もあり、この点が今後の課題と考えられた。また、遺伝子導入法に関してはマイクログリアは貪食能があるため、遺伝子導入操作の結果多くの死細胞が生じるようであると、死細胞を近傍のマイクログリアが貪食し、その結果マイクログリアの活性が変化し、通過能（運動活性）が低下することが観察された。CMVプロモーターを有する

発現ベクターとElongation Factorプロモーターを有する発現ベクターをもちいた実験では、後者がより高い活性をもたらす結果が予備実験の結果得られているが、トランスフェクション効率が低く（2-10%）用いるベクターの濃度の検討とあわせ現在実験を重ねている。

E. 結論

残念ながら、実験はいまだ途中でであり最終的な結論は得られない。今後取得した遺伝子の性質を検討するとともに、マイクログリア細胞への遺伝子導入を含め、そのより一層の効率化を進めていく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Nagano, T., Jourdi, H., Nawa, H.: Emerging roles of Dlg-like PDZ proteins in the organization of the NMDA-type glutamatergic synapse. *J. Biochem.*, 124, 869-875, 1998.

Nagano, T., Nakamura, A., Mori, Y., Maeda, M., Takami, T., Shiosaka, S., Takagi, H., Sato, M.: Differentially expressed olfactomedin-related glycoproteins (Pancortins) in the brain.

Mol. Brain Res., 53, 13-23, 1998.

ンポジウム, 1998, 12, 大阪.

Nakamura, T., Tanaka, T., Nagano, T.,
Yoneda, T., Takagi, H., Sato, M.: Distribution
of mRNA encoding Tat binding protein-1
(TBP-1), a component of 26S proteasome,
in the rat brain. *Mol. Brain Res.*, 53, 321-
327, 1998.

2. 学会発表

今野大治郎, 米田託成, 永野 隆, 八木秀
司, 佐藤 真: ラット胎生期神経上皮細胞
に特異的発現を示す新規遺伝子の解析, 第
21回日本神経科学, 第41回日本神経化学
合同大会, 抄録集 (日本神経科学),
P319: P2-55-13, 1998, 9, 東京.

Yoneda, T., Konno, D., Nagano, T., Yagi,
H., Takagi, H., Sato, M.: Cloning and
analyses of a novel gene, neurepin, which
is expressed in a stage-specific manner in
the embryonic neuroepithelium of the rat.
28th Annual Meeting of Soc. for Neurosci.
, Abstr., 412.16: 1032, 1998, 11, Los
Angeles (USA).

八木秀司, 今野大治郎, 永野 隆, 米田託
成, 佐藤 真: 神経上皮に発現する
Neurepinの解析, 脳神経科学の最先端シ

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）

分担研究報告書

損傷脊髄の機能回復に関する研究

分担研究者 佐藤 真 福井医科大学医学部教授

研究要旨

脊髄損傷の治療に向け、様々な試みがなされているが、傷害を受けた錐体路を特異的に回復させる方法は確立していない。我々はいわゆる皮質－橋路の形成にあたり、橋組織 (basilar pons)より(i) 大脳皮質軸索側枝形成促進因子(ii) 大脳皮質軸索(側枝)化学誘引因子が分泌される事実に着目し、本因子を同定し、脊髄損傷の治療につかいうるかどうかを検討する目的で本実験を開始した。残念ながら、最終的に橋由来因子は未だ同定できておらず、現在の結果は以下のとおりである。(1) 研究代表者らはdifferentail display法を用い、回路形成期の橋組織に特異的に発現する遺伝子の同定を試みた。その結果、現在までのところ、候補遺伝子として3クローン同定し、その内2つにつき全長cDNAを得、その解析を進めた。(2) 上記の実験に平行し、脊髄損傷の治療には神経栄養因子を効果的に傷害側に投与する必要があると考え、近年澤田らにより報告されている、ある種のマイクログリア細胞に着目し、実験を行った。すなわち、この細胞はいわゆる脳血液関門を通過する能力を有すると報告されているもので、マイクログリア細胞が本来傷害側に集積する性質と併せ、神経栄養因子を分泌するべく本細胞を遺伝子工学的に改変し、生体に投与すれば効果的ではないかと考えた。現在までのところ、本細胞種が脳血液関門を通過しうる能力を有することは確認した。但し、その数は少なく、通過細胞数をあげることが次の課題と思われた。さらに、遺伝子を細胞に導入すると、細胞の多くが死んだり、いわゆる活性型でなくなったりする現象が観察され、この点に関し、現在実験を続けている。

A. 研究目的

近年、交通手段の高速化や建物の高層化などにより高度な脊髄損傷例をみることも少なくないが、多くの場合神経機能の回復は見られず、患者・医師の双方にとり対応が難しい場合も多い。現在の医療技術では損傷脊髄の機能的縫合は難しく、この実現に向けた基礎研究の進展が待たれている。臨床的応用に際しては、傷害された回路のみを特異的に再生させることと、傷害部位周囲の神経組織をさらなる死より保護する二つの側面からの対策が求められるものと考えられる。基礎研究のレベルでは、現状では中枢神経系の回路再生は一定の条件下では可能であるとされるが、目的とする回路の効率的修復は依然困難である。我々は以上の点を鑑み、(1) 脊髄損傷時に損傷され影響の大きい錐体路を対象とし本回路の特異的再生を目指す。(2) 損傷部位の神経組織を保護するため効率的な神経栄養因子・保護因子の投与方法を検討するという2つの実験を計画した。即ち橋組織より分泌される錐体路特異的化学誘引因子をクローニングし、その因子を傷害側遠位に局在させることにより傷害部位を越えた錐体路の特異的修復が可能であるかどうかを探る実

験を計画した。同時に、最近報告された脳血液関門の通過能を有するマイクログリア細胞（の亜株）に着目し、マイクログリア細胞が本来神経傷害部位に集積する性質を有することと併せ、本細胞を担体とし傷害部位への神経栄養因子、保護因子の効率的投与の可能性を探る基礎実験も併せて行うことを計画した。

B. 研究方法

本研究は橋由来の化学誘引因子のクローニングとならびにその因子を傷害脊髄に應用するものと、マイクログリアの應用の可能性を探る実験に分けることができる。実験に際しては、本年度実施した橋組織由来因子のクローニングとマイクログリア細胞への遺伝子導入実験の項目について以下に記す。

(1) 動物

Wistar系ラットを用いた（ケアリー社より購入）。橋由来因子の実験に際しては生直後（生後24時間以内）を用いた。麻酔は低体温麻酔を用いた。また、マイクログリア細胞の打ち込みには生後6-10週令のものを用いた。麻酔はNembutal(50 mg/Kg)を用い、実験操作は痛覚の反応が

ないことを確認し行った。動物は、室温22度の環境下にて飼育し使用した。

(2) 橋由来因子のクローニング

ラットをモデルシステムとし、Differential display法を用い、化学誘引活性の確認されている生直後ラット脳の橋組織に発現し、バイオアッセイ上活性の確認されていない同時期の脳皮質組織に発現しない因子を検索した。Differential display法は常法に従った。同法のみでは、候補遺伝子が絞りこめなかったため、in situ hybridization法も併用した。in situ hybridization法はdifferential display法にて得られた遺伝子断片（約300-600bp）をもとにRIラベルしたcRNAを作製し、プローブとして使用した。動物としては、生直後Wistarラットの脳切片を用いた。薄切脳切片は麻酔下の生直後ラットより脳を取り出し、ドライアイスにて凍結したものをクリオスタットにて作製した。in situ hybridization法の可視化には、フィルムオートラジオグラフィを用いた。

(3) マイクログリアを用いた実験系

藤田保健衛生大の澤田より確立、供与されたマイクログリアセルラインを培養し実

験に用いた。CMVプロモーターを有する発現ベクター(pCDI)とElongation Factorプロモーターを有する発現ベクター(pCE)にマーカー遺伝子を組み込み、細胞にtransfectionし、その発現効率を検討した。濃度は1-20 ng/ulの範囲で検討した。遺伝子導入にあたっては、Transfast、DOTAP試薬を用いた。また、マイクログリア細胞を直接ラベルし、腹腔内、心臓、総頸動脈に打ち込み、脳切片を作製し、脳内への移行を検討した。なお、この実験は大阪市立大学医学部第一解剖前田講師との共同実験にて行った。

C. 研究結果

D. 考察 (併記)

(1) 錐体路に対する化学誘引因子の検索

我々は上記の目的を達成するため、differential display法を応用し、回路形成期の橋に発現する因子の検索を行った。その結果99クローンを候補遺伝子断片として取得した。それらに対してin situ hybridization法による回路形成期の橋での発現を検討した結果、40クローンの橋における発現が確認されたが、それらの多くは橋組織由来因子の活性をバイオアッセイ上示さない脳皮質においても明瞭に発

現していた。そこでin situ hybridization法での検討の結果、大脳皮質での明瞭な発現が観察されない8クローンを候補クローン（1次）として選定した。

我々が、橋由来因子の活性の有無を嗅球と小脳組織でバイオアッセイにて検討したところ、その活性は確認されなかった。この事実は橋由来因子がこれらの組織には発現していないか、その発現量が少ないことを意味するものと考えられた。そこで、我々は候補8クローンのmRNAが嗅球や小脳にて発現しているか否かをin situ hybridization法にて検討した。その結果、8クローンのうち5クローンが嗅球もしくは小脳において強い発現を示したので、橋由来因子の候補から除外し、結局3クローン（便宜上#1、#2、#3とする）に対し、全長cDNAの取得・活性検討を目指し実験を進めた。

以下#1-3についての現在までの結果をまとめる。

#1 : in situ hybridization法による発現を検討したところ回路形成期（生直後）の橋において強い発現が観察された。さらに橋内では内側部に発現が強く、外側部では発現が弱いというgradientが観察

された。in situ hybridization法では同時期の大脳皮質には明瞭な発現は観察されなかったものの、Northern blot解析では大脳皮質においてもその発現は確認された。このことは、本遺伝子は大脳皮質において瀰漫性に広く発現している、もしくは我々がin situ hybridization法にもちいた切片では発現していないが大脳皮質のある部位に局在して発現している可能性を示している。現在この点について検討中である。又、Northern blot解析では2本のバンド（約9.5kbと5.6kb）が観察されている。この遺伝子については、ほぼ全長と思われるcDNAをすでに取得しており、解析中である。

#2 : in situ hybridization法によって回路形成期での脳内発現を検討したところ橋と下オリーブ核に強い発現が観察された。下オリーブ核は橋と同様に大脳皮質（錐体路）軸索が側枝を伸ばす部位として知られているが、本発現の意義は現在の所不明である。Northern blot解析の結果では、その長さは約7kbであり、大脳皮質での発現は確認されなかった。我々は、ほぼ全長と思われるcDNAをすでに取得しており、現在解析中である。

#3 : in situ hybridization法では回

路形成期の橋に強い発現を示した。

Northern blot解析の結果では、その長さは約7kbであり、大脳皮質での明瞭な発現は確認されなかった。現在、全長cDNAの取得を目指し、実験を行っている。

(2) マイクログリアの応用

まず、マイクログリアの脳血液関門の通過能の確認と、マイクログリアにどのように目的とする遺伝子を発現させることができるかの基礎実験を行った。その結果、藤田保健衛生大の澤田氏により供与されたマイクログリアのセルラインには通過能があることが確認されたが、脳内にて確認できた数はきわめて少なかった。初代培養のマイクログリアの方が通過能が高いとの報告もあり、この点が今後の課題と考えられた。また、遺伝子導入法に関してはマイクログリアは貪食能があるため、遺伝子導入操作の結果多くの死細胞が生じるようであると、死細胞を近傍のマイクログリアが貪食し、その結果マイクログリアの活性が変化し、通過能（運動活性）が低下することが観察された。CMVプロモーターを有する発現ベクターとElongation Factorプロモーターを有する発現ベクターをもちいた実験では、後者がより高い活性をもたらす結果が予備実験の結果得られているが、ト

ランスフェクション効率が低く（2-10%）用いるベクターの濃度の検討とあわせ現在実験を重ねている。

E. 結論

残念ながら、実験はいまだ途中であり最終的な結論は得られない。今後取得した遺伝子の性質を検討するとともに、マイクログリア細胞への遺伝子導入を含め、そのより一層の効率化を進めていく予定である。

（なお、本分担研究にあたり、主任研究者が本研究補助金申請前後に分担研究者と同一の講座に移動となり、主任研究者と分担研究者が同一の実験を互いに共同して行う形をとったため、主任研究者の実験内容と分担研究者の実験内容報告が互いに重複するものとなっている。）

F. 研究発表

1. 論文発表

Nagano, T., Nakamura, A., Mori, Y., Maeda, M., Takami, T., Shiosaka, S., Takagi, H. and Sato, M.: Differentially expressed olfactomedin-related glycoproteins (Pancortins) in the brain. *Mol. Brain Res.*, 53: 13-23,

1998.

Nakamura, T., Tanaka, T., Nagano, T., Yoneda, T., Takagi, H. and Sato, M.: Distribution of mRNA encoding Tat binding protein-1 (TBP-1), a component of 26S proteasome, in the rat brain. *Mol. Brain Res.*, 53: 321-327, 1998.

Nakamura, T., Tanaka, T., Takagi, H. and Sato, M.: Cloning and heterogenous in vivo expression of Tat binding protein-1 (TBP-1) in the mouse. *Biochim. Biophys. Acta*, 1399: 93-100, 1998.

Takami, T., Yoneda, T., Nagano, T., Hakuba, A., Takagi, H. and Sato, M.: Identifying mRNAs involved potentially in corticopontine projection by modified differential display. *Osaka City Medical Journal*, 44: 17-33, 1998.

Yoneda, T., Sato, M., Maeda, M. and Takagi, H.: Identification of a novel adenylate kinase system in the

brain: Cloning of the fourth adenylate kinase. *Mol. Brain Res.*, 62(2): 187-195, 1998.

Ikeda, K., Kawada, N., Wang Y-Q., Kadoya, H., Nakatani, K., Sato, M. and Kaneda, K.: Expression of cellular prion protein in activated hepatic stellate cells. *Am J. Pathol.*, 153(6): 1695-1700, 1998.

2. 学会発表（関連事項のみ）

Yoneda, T., Konno, D., Takagi, H., Sato, M.: Cloning and analyses of a novel gene, neurepin, which is expressed in a stage-specific manner in the embryonic neuroepithelium of the rat. 第103回日本解剖学会全国学術集会, 解剖誌, 73(4): 430, 1998, 8, 大阪.

佐藤 真：脳形成に関わる遺伝子群の探索と解析, 第16回頭頸部自律神経研究会（招待講演）, 1998, 8, 大阪.

今野大治郎, 米田託成, 永野 隆, 八木秀司, 佐藤 真：ラット胎生期神経上皮細胞

に特異的発現を示す新規遺伝子の解析, 第
21回日本神経科学, 第41回日本神経化学
合同大会, 抄録集(日本神経科学),
P319: P2-55-13, 1998, 9, 東京.

Yoneda, T., Konno, D., Nagano, T.,
Yagi, H., Takagi, H., Sato, M.: Cloning
and analyses of a novel gene,
neurepin, which is expressed in a
stage-specific manner in the
embryonic neuroepithelium of the
rat. 28th Annual Meeting of Soc. for
Neurosci., Abstr., 412.16: 1032,
1998, 11, Los Angeles (USA).

八木秀司, 今野大治郎, 永野 隆, 米田託
成, 佐藤 真: 神経上皮に発現する
Neurepinの解析, 脳神経科学の最先端シ
ンポジウム, 1998, 12, 大阪.