

平成10年度厚生科学研究費補助金脳科学研究事業

総括研究報告書・分担研究報告書

研究課題名（課題番号）：脊髄損傷の神経修復に関する研究 (H10-脳-029)

研究実施期間 平成10年4月1日～平成11年3月31日

（3年計画の2年目）

主任研究者 川口 三郎 京都大学大学院医学研究科教授

分担研究者 井出 千束 京都大学大学院医学研究科教授

分担研究者 溝口 明 京都大学大学院医学研究科助教授

分担研究者 西尾 健資 滋賀医科大学助手

総括研究報告書

脊髄損傷の神経修復に関する研究

主任研究者 川口 三郎 京都大学大学院医学研究科教授

研究要旨 これまで再生しないとされてきた後索路の著明な再生を導くことに成功し、また、成ラットの前庭脊髄路を切断し、切断部にラット胎仔の脊髄組織を移植することにより、切断された前庭脊髄路の再生を導くことに成功した。これとは別に、脊髄伝導路の修復の手段として有力視されている末梢神経の移植と胎仔脊髄組織の移植の比較を新生ラットの髄節置換標本を用いて行い、胎仔脊髄組織の方が軸索環境として優れていることを明らかにした。これらは、「哺乳動物の中樞神経系の軸索環境は全体として再生軸索の伸長に対して許容的である」とする我々の仮説を支持する。これらとは別のカテゴリーの再生実験として脈絡叢上衣細胞の移植を行い、移植された上衣細胞により中枢神経軸索の再生が促進されること、上衣細胞がアストロサイト様の細胞に分化することを明らかにした。また、再生軸索を誘導する手掛かり (guidance cues) の解明を試み、Nectin-Afadin-Actin と Neurabin-Actin という2種類の細胞接着機構を見出した。脊髄損傷の神経修復においては、損傷された軸索の再生を導くことと軸索切断後に生じる神経細胞死を阻止することが必要である。その神経細胞死と個体発生時の細胞死は恐らく分子機構を共通にすると考えられるので、個体発生時の細胞死に関わる caspase 活性と DNA の断片化を経時的・定量的に検索し、胎生15日齢から生後3週齢まで DNA の断片化が認められること、それに数日先行して caspase 活性が上昇することを明らかにした。これらの結果は脊髄損傷の神経修復に関する重要な知見と思われる。

川口 三郎 京都大学大学院医学研究科教授
井出 千束 京都大学大学院医学研究科教授
溝口 明 京都大学大学院医学研究科助教授
西尾 健資 滋賀医科大学助手

A. 研究目的

過去10数年間の研究成果は、かつての通説が誤りであり、「哺乳動物においても、機能的意義をもった中枢神経伝導路の再生は可能である」ことを明らかにし、神経修復の可能性を示した。しかし、現在までに達成された神経修復の殆どは極めて限定的である。すなわち、再生した神経投射は量的に僅かであり、距離(軸索の延長)も短く、当然、その多くは異所性であり、機能回復が起こると云ってもその程度は微々たるものである。本研究は脊髄損傷の神経修復による治療法-対麻痺や四肢麻痺になった脊髄損傷者の脊髄伝導路を再構築して、再び歩けるようにし、手を動かすことができるようにする-の開発に向けて展望を切り開くことを目的とする。脊髄損傷の神経修復によって十分な機能的回復を期待するのであれば、運動神経路と感覚神経路の両方において、量的にも、距離的にも限定されないうで、正しい経路を通り、正しい標的に終止する投射、すなわち、正常と同様な投射を再構築しなければならないであろう。本研究はそのような限定されない再生が運動神経路のみならず感覚神経路においても起こりうることを証明し、それに関連する損傷部の局所的条件と人為的操作法、栄養因子の動態、再生軸索伸長の分子機構を解明しようとするものである。

B. 研究方法

後索路の再生：生後8日齢から13日齢のウイスター系ラットの後索路を両側性に完全に切断し、一定期間飼育した後、神経節越え標識法と逆行性標識法によって再生様式を検索した。
末梢神経移植と胎仔脊髄組織移植の比較：生後2日齢のラットの胸髄の1.5~2髄節を切除し、その空所に末梢神経あるいは胎仔脊髄組織を移植し、移植片を越えて形成される下行性伝導路の伸長様式を順行性標識法により調べ、逆行性標識法により起始細胞の定量的評価を行った。
成ラット前庭脊髄路の再生：2~3カ月齢の成ラットの前庭脊髄路を切断し、実験例には胎仔(E14~16)の脳幹-橋組織を移植し、対照例には移植を行わずに、2~3週間飼育した後、順行性標識法により再生の有無を検索した。
脈絡叢上衣細胞の移植：成ラットまたは成マウスの脊髄を損傷し、損傷部に脈絡叢上衣細胞を移植して軸索の伸長様式を電子顕微鏡学的に検索した。
再生軸索伸長機序の解析：マウス胎仔の神経組織の蛋白質の中からアクチン線維と結合活性を持つ膜蛋白質を探索し、それらの局在性を蛍光抗体法と免疫電顕法で検索した。
神経細胞死の機構の解析：胎生期から成熟期にいたるいろいろな日齢のラットの脊髄神経細胞のDNA断片化を酵素免疫測定法で、caspase活性を生化学的測定法で定量的に検索した。

C. 研究結果

後索路の再生：鋭利な切断を行った例では、著明な再生が起こり、再生線維は密な線維束として切断部

を越えて正しい経路を上行し、正しい標的である延髄薄束核に終止していた。

末梢神経移植と胎仔脊髄組織移植の比較：胎仔脊髄組織移植例では皮質脊髄路は移植髄節を越えて腰髄の尾側に伸びていたが、末梢神経移植例では大部分の線維は移植片と宿主脊髄の接合部で留まり、移植片/宿主脊髄接合部を越えたのは僅かであった。そのような線維の多くは接合部近傍に終止し、長く伸びることはなかった。

成ラット前庭脊髄路の再生：対照例25匹の全てにおいて再生は失敗に終わったが、実験例18匹中4匹において、切断部を越えて伸びる線維、すなわち再生線維の存在を認めた。これらな線維は正常な投射と同じ経路を走行し、正常な終止部位に終止した。

脈絡叢上衣細胞の移植：移植した上衣細胞に沿って伸びている多数の再生軸索を観察し、上衣細胞がアストロサイト様の細胞に分化していることを確認した。

再生軸索伸長機序の解析：アクチン線維と結合活性を持つ2種類の膜蛋白質、すなわち Afadin, Neurabin を見出し、Neurabinが発生過程の錐体路の成長円錐に局在すること、形成期のシナプスやグリア細胞に Afadinと Neurabinが発現することを明らかにした。

神経細胞死の機構の解析：脊髄神経細胞のDNA断片化は胎齢17日から生後2日齢をピークに4週齢まで認められ、caspase 1 (ICE) は胎齢13~14日をピークに以後1週齢まで減少し、2週齢で再び上昇したのち3~4週齢以降はほとんど認められなくなった。caspase 3 (CPP32) は胎齢14日をピークに2週齢迄減少し、3週齢以降は殆ど認められなくなった。

D. 考察

近年の研究成果によって「哺乳動物の中枢神経伝導路において機能的意義を有する再生は可能である」ことが多くの人々に受け入れられるようになってきたが、それと並行して「哺乳動物の中枢神経系の軸索環境は全体として再生軸索の伸長に対して拒絶的であり、再生に導くためにはそれを許容的に変えなければならない」との仮説が新たなドグマとして浸透しつつあるように見える。一方、我々は「哺乳動物の中枢神経系の軸索環境は全体として再生軸索の伸長に対して許容的であり、再生を妨げるのは局所的条件である」との仮説を提唱している。ここでは簡単のために先の仮説を全体説、後の仮説を局所説と呼ぶことにしよう。全体説に立脚した実験あるいは全体説を支持すると思われる実験は相当数報告されている。すなわち、軸索伸長抑制因子の抗体を作用させたり、伸長抑制因子が働かないように末梢神経やシュワン細胞を移植したり、あるいは嗅神経鞘細胞を移植して再生をさせようとする実験である。これらの報告では、再生線維は量的に僅かで線維の伸びる距離も短く、機能回復が起こるとしてもその程度は微々たるものである。

中枢神経系の中には多くの投射路が存在し、それ

ぞれ固有の経路を通して固有の標的に終止する。その経路と標的に軸索を誘導するような手掛かり

(guidance cues) が個体発生過程では投射路の形成に先行して予定部位に準備されており、それらは投射路が形成されたあとでも消滅することなく存在し続けるように思われる。我々は、局所説に基づいて、そのような手掛かりをできるだけ損なわないように投射路を鋭利に切断すれば、あるいは胎仔中枢神経組織の移植によって個体発生時の手掛かりを導入すれば、正常な投射と同様な投射路の再生が可能であろうと想定して実験を重ねてきた。後索路の再生実験においては、局所的条件さえ良好ならば、先に明らかにした錐体路の場合と同じように、正常と同様な投射路の再生を導くことが可能であることが判明した。脊髄髄節の置換実験においては髄節切除による空所に、切除した髄節の相同部位を含む胎仔脊髄組織の移植をすれば、すなわち個体発生時の軸索を誘導する手掛かりを導入すれば、宿主の神経路は移植髄節を越えて伸び、機能的意義を十分に持った神経結合ができることが判明した。一方、末梢神経を移植すれば、移植片と宿主脊髄組織の境界部で大部分の線維が止まり、再侵入できるのはごく一部の線維に限られ、しかも再侵入した線維も境界部の近傍に終止することが明らかになった。この結果は中枢神経線維は胎仔の相同組織の中を伸びた場合には宿主脊髄のguidance cuesの認識能力を保持しているのに、末梢神経の軸索環境に曝されるとその認識能力を失うことを示唆している。また、成熟動物においても切断部に胎仔組織を移植すれば、幼若動物におけると同様な再生が誘導されることを見出した。これらの実験では幼若動物であれ成熟動物であれ、切断部を越えて正しい経路に入った再生線維は、そのまま正しい標的に終止するまで、本来の経路を踏み外すことなく伸長しており、その経路を走行する限り、軸索の伸長が抑制されているような所見は認められなかった。これらの実験成績はいずれも我々の提唱している局所説を支持する。

再生を促進するような条件や因子は数多くあるように思われる。本研究で明らかにした脈絡叢上衣細胞の移植もその一つである。また、再生過程で発現・増加するような分子は恐らく数多く存在するであろう。これらの中から本質的に重要なものとそうでないものを見極めなければならないが、現時点ではまだそれができていない。再生が失敗に終われば神経細胞は逆行性に変性・死滅するが、その機構の解明し、細胞死を有効に阻止することは神経修復の臨床応用を考える上で避けて通れない問題であろう。この細胞死の場合にも分子レベルでは様々な変化の起こることが予測されるが、付随的な変化でなく本質的な変化を掴まなければならない。caspase活性の増減が本質的な変化であるか付随的なものであるかは現時点では判定できない。

E. 結論

哺乳動物の中枢神経系はかつて考えられていたところとは異なり、潜在的には極めて大きな軸索の再

生能力と再生した軸索を正しい経路に導き、正しい終止部位に終止させる自己組織化の能力を有しており、その潜在能力を顕在化させれば正常と同様な神経投射を再構築できることが判明した。本研究結果は脊髄損傷を始め、外傷や血管障害によって損なわれた中枢神経回路を修復できる可能性を示している。今後の研究目標は成ラットの脊髄を損傷して対麻痺を引き起こした脊髄損傷モデル動物を作成し、損傷された脊髄伝導路を再構築して、再び四肢協調歩行を可能にすることである。それと共にそれを可能にする条件や因子の解明を進める。これが達成できれば、臨床応用への展望が開けるものと思われる。

F. 研究発表

Ito J, Murata M and Kawaguchi S, Regeneration of the lateral vestibulospinal tract in adult rats by transplants of embryonic brain tissue *Neurosci Lett.* 259: 67-70, 1998.
Ito J, Murata M and Kawaguchi S, Regeneration of the central auditory pathway in adult rats *Acta Otolaryngol (Stockh)* (in press).
Asada Y, Kawaguchi S, Hayashi H and Nakamura T, Neural repair of the injured spinal cord by grafting: comparison between peripheral nerve segments and embryonic homologous structures as a conduit of CNS axons *Neurosci Res* 31: 241-249, 1998.
Inoue T, Kawaguchi S and Kurisu K, Spontaneous regeneration of the pyramidal tract after transection in young rats *Neurosci Lett.* 247: 151-154, 1998.
Kikukawa S, Kawaguchi S, Mizoguchi A, Ide C and Koshinaga M, Regeneration of dorsal column axons after spinal cord injury in young rats *Neurosci Lett* 249: 135-138, 1998.
Ito J, Kawaguchi S, Nakajima K and Mori S, Axonal regeneration with functional restoration in the vestibulospinal tract in young rats *Neurosci Res* 32: 149-156, 1998.
Ito J, Murata M and Kawaguchi S, Spontaneous regeneration and recovery of hearing function of the central auditory pathway in young rats *Neurosci Lett* 254: 173-176, 1998.
Ito J, Murata M and Kawaguchi S, Regeneration of the auditory pathway in adult rats by transplants of fetal brain tissue *NeuroReport* 9: 3815-3817, 1998.
Moriyama T, Mizoguchi A and Ide C, Distribution of synaptosomal associated protein 25 in nerve growth cones and reduction of neurite outgrowth by botulinum neurotoxin A without altering growth cone morphology in dorsal root ganglion neurons *Neuroscience* (in press).
Shirasu M and Ide C, Localization of tyrosine-phosphorylated protein in cultured mouse dorsal root ganglion neurons *J Orthopaed Res* (in press).
Kitada M, Tohyama K and Ide C, Comparison of the axonal and glial reactions between the caudal and rostral border in the cryoinjured dorsal funiculus of the rat spinal cord *Res Neural Neurosci* (in press).
Ide C, Tohyama K, Tajima K and Mizoguchi A, Long acellular nerve transplants for allogeneic grafting and the effects of basic fibroblast growth factor on the growth of regenerating axons in dogs *Exp Neurol* 154: 99-112, 1998.

Senoo E, Tamaki N and Ide C, Effects of prelesioned peripheral nerve graft on nerve regeneration in the rat spinal cord *Neurosurgery* 42: 1347-1356, 1998.
Ide N, Hirao K, Hata Y, Takeuchi M, Irie M, Yao I, Deguchi M, Toyoda A, Nishioka H, Mizoguchi A and Takai Y, Molecular cloning and characterization of rat lin-10 *Biochem Biophys Res Commun* 243: 634-638, 1998.
Fujita Y, Shirataki M, Sakisaka T, Asakura T, Ohya T, Kotani H, Yokoyama S, Nishioka H, Matsuura Y, Mizoguchi A, Scheller H R and Takai Y, Tomosin: A syntaxin-1-binding protein which dissociates Munc18/nsec1 from syntaxin-1 and forms a novel complex in the neurotransmitter release process *Neuron* 20: 905-915, 1998.
Satoh A, Nakanishi H, Obayashi H, Wada M, Takahashi K, Satoh K, Hirano K, Nishioka H, Hata Y, Mizoguchi A, and Takai Y, Neurabin-II An actin filament-binding protein with one PDZ domain localized at cadherin-based cell-to-cell adhesion sites *J Biol Chem* 273: 3470-3475, 1998.
Nishio T, Sunohara N, Furukawa S, Akiguchi I and Kudo Y, Repeated injections of nicergoline increase the nerve growth factor level in the aged rat brain *Jpn J Pharmacol* 76: 321-323, 1998.
Arima K, Ogawa M, Sunohara N, Nishio T, Shimomura Y, Hirai S and Eto K, Immunohistochemical and ultrastructural characterization of ubiquitinated eosinophilic fibrillary neuronal inclusions in sporadic amyotrophic lateral sclerosis *Acta Neuropathol* 96: 75-85, 1998.
Nishio T, Sunohara N and Furukawa S, Neurotrophin switching in spinal motoneurons of amyotrophic lateral sclerosis *Neuroreport* 9: 1661-1665, 1998.
Nishio T, Sunohara N, Mizutani K, Akiguchi I and Furukawa S, Nerve growth factor levels in the cerebrospinal fluids are high in the inflammatory neurological disorders *Clin Chim Acta* 275: 93-98, 1998.
Nishio T, Furukawa S, Akiguchi I and Sunohara N, Medial nigral dopamine neurons have rich neurotrophin support in humans *Neuroreport* 9: 2847-2851, 1998.
Nishio T, Sunohara N, Nonaka I, Tsujino S and Sugie H, Myophosphorylase deficiency and limb-girdle muscular dystrophy in the same pedigree *Acta Neurol Scand* 98: 364-367, 1998.

G. 知的所有権の取得状況

なし

分担研究報告書

脊髄損傷の神経修復に関する研究

分担研究者 川口 三郎 京都大学大学院医学研究科教授

研究要旨 これまで再生しないとされてきた後索路の著明な再生を導くことに成功した。再生した線維は下部胸髄の切断部を越えて伸長し、正常な投射に匹敵するような密な線維束を形成して、正常な経路である後索浅部を通り、正常な終止部位である延髄の薄束核に終止した。また、成ラットの前庭脊髄路を切断し、切断部にラット胎仔の脊髄組織を移植することにより、切断された前庭脊髄路の再生を導くことに成功し、成ラットにおいても正常な投射と同様な脊髄伝導路の再構築が可能であることを証明した。これとは別に、脊髄伝導路の修復の手段として有力視されている末梢神経の移植と胎仔脊髄組織の移植の比較を新生ラットの髄節置換標本を用いて行った。その結果、末梢神経を導通路として伸びてきた軸索は宿主の脊髄に再侵入することが困難で、再侵入しても短い距離しか伸びないのに対し、胎仔脊髄組織を導通路として伸びた軸索は再侵入が容易で、再侵入後も正しい経路を通して長い距離を伸びることが判明した。これらの結果は、我々が提唱している「哺乳動物の中樞神経系の軸索環境は再生した軸索の伸長に対して許容的 (permissive) であり、伝導路の再生を妨げるのは局所的条件である」との仮説を支持するものであり、脊髄損傷の神経修復に大きな希望を与える。

A. 研究目的

哺乳動物の中樞神経伝導路は再生しないと広く信じられてきたが、最近の10数年間の研究成果は成熟ラットにおいても、人為的操作を加えることによって切断された錐体路が再生すること、新生ラットでは人為的操作を加えることなく、自然に再生することを明らかにした。しかし、殆どの報告において、再生は極めて限定的である。すなわち、再生した投射は量的に僅かであり、距離(軸索の延長)も短く、当然、その多くは異所性であり、機能回復が起こると云ってもその程度は微々たるものである。脊髄損傷の神経修復によって十分な機能的回復を期待するのであれば、運動神経路と感覚神経路の両方において、量的にも、距離的にも限定されないで、正しい経路を通り、正しい標的に終止する投射、すなわち、正常と同様な投射を再構築しなければならないであろう。本研究はそのような限定されない再生が起こりうることを証明し、それが起こる条件を解明することを目的とした。

B. 研究方法

後索路の再生: 生後8日齢から13日齢のウィスター系ラットを用い、エーテル麻酔下に、脊髄を胸髄下部(T12~13)で過半側切除し、後索路を両側性に完全に切断した。切断は安全カミソリの刃を用いてできるかぎり、鋭利に行った。一定期間飼育した後、坐骨神経に小麦胚芽凝集素結合ホースラディッシュペルオキシダーゼ(WGA-HRP)あるいはコレラトキシン結合ホースラディッシュペルオキシダーゼを注入して神経節越え軸索輸送によって後索路を終末にいたるまで標識し、標識線維が切断部を越えて伸長するか否かを確かめ、切断部を越えた線維の経

路と終止部位を検索した。また、延髄薄束核に蛍光色素結合デキストランアミンを注入することにより、腰髄後根神経節細胞を逆行性に標識し、再生軸索が正しい標的に終止している細胞を同定した。

末梢神経移植と胎仔脊髄組織移植の比較: 生後2日齢のラットの胸髄の1.5~2髄節を切除し、その空所に末梢神経あるいは胎仔脊髄組織を移植し、2~3週後に大脳皮質感覚運動野にWGA-HRPを注入して皮質脊髄路を順行性に標識して、線維の走行と終止の様式を調べ、また、腰膨大あるいは移植組織と宿主脊髄との尾側接合部に逆行性トレーサーを注入し、赤核脊髄路、前庭脊髄路、縫線核脊髄路の起始細胞を逆行性に標識して、標識細胞の定量的評価を行った。

成ラット前庭脊髄路の再生: 2~3カ月齢の成ラットを用い、前庭脊髄路を頸髄C2~3のレベルで切断し、再生を促すため、胎仔(E14~16)の脳幹-橋組織で切断部を覆った。術後2~3週間して外側前庭神経核にWGA-HRPを注入し、前庭脊髄路を順行性に標識し、標識された線維が切断部を越えて尾側に伸びているかどうか、すなわち再生が起こったか否かを検索した。

C. 研究結果

後索路の再生: 鋭利な切断を行った例では切断部を越えて密な線維束が後索の浅部を上行し、延髄薄束核に終止していた。これらが切り残しにより切断を免れた線維ではなく再生した線維であることの証拠は、1) 切断部を越えて伸長する成長円錐が認められること、2) 延髄薄束核における術後9日目の終末が対照動物に見られるような微細な成熟型と異なり粗な未熟型であること、3) 延髄薄束核に蛍光

色素を注入すれば切断部 (T12~13) を越えて逆行性に腰髄の後根神経節細胞が標識されるが、その標識細胞が軸索切断後の反応である central chromatolysis を示すことである。

末梢神経移植と胎仔脊髄組織移植の比較：胎仔脊髄組織移植例では順行性に標識された皮質脊髄路は移植髄節を越えて腰髄の尾側に伸びていたが、末梢神経移植例では多くの線維が移植片の中に入り、伸びたが、大部分の線維は移植片と宿主脊髄の接合部で留まり、接合部を越えて宿主脊髄に侵入した一部の線維もその多くは接合部近傍に終止し、長くは伸びなかった。

成ラット前庭脊髄路の再生：切断後、そのまま放置した25匹の前例において再生は失敗に終わった。一方、切断部を胎仔中枢神経組織で覆った18匹の中で4匹において、切断部を越えて伸びる線維、すなわち再生線維の存在を認めた。これらの線維は正常な投射と同じ経路を走行し、正常な終止部位に終止した。

D. 考察

近年の研究成果によって「哺乳動物の中枢神経伝導路において機能的意義を有する再生は可能である」ことが多くの人々に受け入れられるようになってきたが、それと並行して「哺乳動物の中枢神経系の軸索環境は全体として再生軸索の伸長に対して拒絶的であり、再生に導くためにはそれを許容的に変えなければならない」との仮説が新たなドグマとして浸透しつつあるように見える。しかし、この仮説に基づいたり、この仮説を支持すると思われる研究、すなわち、軸索伸長抑制因子の抗体を作用させたり、伸長抑制因子が働かないように末梢神経やシュワン細胞を移植したり、あるいは嗅脳のグリア細胞を移植して再生をさせようとする実験の成果は、すべて限定的な再生である。すなわち再生線維は量的に僅かで線維の伸びる距離も短く、従ってその大部分は異所性投射と考えられるものである。一方、我々は、「哺乳動物の中枢神経系の軸索環境は全体として再生軸索の伸長に対して許容的であり、再生を妨げるのは局所的条件である」との仮説を提唱している。中枢神経系の中には多くの投射路が存在し、それぞれ固有の経路を通して固有の標的に終止する。その経路と標的に軸索を誘導するような手掛かり

(guidance cues) が個体発生過程では投射路の形成に先行して予定部位に準備されており、それらは投射路が形成されたあとでも消滅することなく存在し続けるように思われる。我々は、先の仮説に基づいて、そのような手掛かりをできるだけ損なわないように投射路を鋭利に切断すれば、あるいは胎仔中枢神経組織の移植によって個体発生時の手掛かりを導入すれば、正常な投射と同様な投射路の再生が可能であろうと想定して実験を重ねてきた。後索路の再生実験においては、局所的条件さえ良好ならば、先に明らかにした錐体路の場合と同じように、正常と同様な投射路の再生を導くことが可能であることが判明した。脊髄髄節の置換実験においては髄節切除

による空所に、切除した髄節の相同部位を含む胎仔脊髄組織の移植をすれば、すなわち個体発生時の軸索を誘導する手掛かりを導入すれば、宿主の神経路は移植髄節を越えて伸び、機能的意義を十分に持った神経結合ができることが判明した。一方、末梢神経を移植すれば、移植片と宿主脊髄組織の境界部で大部分の線維が止まり、再侵入できるのはごく一部の線維に限られ、しかも再侵入した線維も境界部の近傍に終止することが明らかになった。この結果は中枢神経線維は胎仔の相同組織の中を伸びた場合には宿主脊髄の guidance cues の認識能力を保持しているのに、末梢神経の軸索環境に曝されるとその認識能力を失うことを示唆している。また、成熟動物においても切断部に胎仔組織を移植すれば、幼若動物におけると同様な再生が誘導されることを見出した。これらの実験では幼若動物であれ成熟動物であれ、切断部を越えて正しい経路に入った再生線維は、そのまま正しい標的に終止するまで、本来の経路を踏み外すことなく伸長しており、その経路を走行する限り、軸索の伸長が抑制されているような所見は認められなかった。これらの実験成績はいずれも我々の仮説を支持する。

E. 結論

哺乳動物の中枢神経系はかつて考えられていたところとは異なり、潜在的には極めて大きな軸索の再生能力と再生した軸索を正しい経路に導き、正しい終止部位に終止させる自己組織化の能力を有しており、その潜在能力を顕在化させれば正常と同様な神経投射を再構築できることが判明した。本研究結果は脊髄損傷を始め、外傷や血管障害によって損なわれた中枢神経回路を修復できる可能性を示している。今後の研究目標は成ラットの脊髄を損傷して対麻痺を引き起こした脊髄損傷モデル動物を作成し、損傷された脊髄伝導路を再構築して、再び四肢協調歩行を可能にすることである。これが達成できれば、臨床応用への展望が開けるものと思われる。

F. 研究発表

Ito J, Murata M and Kawaguchi S, Regeneration of the lateral vestibulospinal tract in adult rats by transplants of embryonic brain tissue *Neurosci Lett.* 259: 67-70, 1998.

Ito J, Murata M and Kawaguchi S, Regeneration of the central auditory pathway in adult rats *Acta Otolaryngol (Stockh)* (in press).

Asada Y, Kawaguchi S, Hayashi H and Nakamura T, Neural repair of the injured spinal cord by grafting: comparison between peripheral nerve segments and embryonic homologous structures as a conduit of CNS axons *Neurosci Res* 31: 241-249, 1998.

Inoue T, Kawaguchi S and Kurisu K, Spontaneous regeneration of the pyramidal tract after transection in young rats *Neurosci Lett.* 247: 151-154, 1998.

Kikukawa S, Kawaguchi S, Mizoguchi A, Ide C and Koshinaga M, Regeneration of dorsal column axons after spinal cord injury in young rats *Neurosci Lett* 249: 135-138, 1998.

Ito J, Kawaguchi S, Nakajima K and Mori S, Axonal regeneration with functional restoration in the vestibulospinal tract in young rats *Neurosci Res* 32: 149-156, 1998.

Ito J, Murata M and Kawaguchi S, Spontaneous regeneration and recovery of hearing function of the central auditory pathway in young rats *Neurosci Lett* 254: 173-176, 1998.

Ito J, Murata M and Kawaguchi S, Regeneration of the auditory pathway in adult rats by transplants of fetal brain tissue *NeuroReport* 9: 3815-3817, 1998.

G. 知的所有権の取得状況

なし

研究要旨

脈絡叢の移植により中枢神経線維の再生が促進される。脈絡叢上衣細胞が再生軸索の伸長の支持に働いていることが明らかになった。また上衣細胞とニューロンとの共培養によってニューロンからの神経突起の萌出と伸長が促進される。

培養上衣細胞の成熟マウスへの移植によって上衣細胞がアストロサイト様の細胞に分化することが明らかになった。

A. 研究目的

中枢神経系の再生のために細胞移植がもっとも有望な方策として注目されて久しい。移植細胞には種々な細胞が用いられてきたが、最も多く用いられているのがシュワン細胞である。また最近では嗅神経鞘細胞 (olfactory ensheathing cell) も注目されている。しかしこれらの細胞は末梢神経起源であるため表面に基底膜を形成して、中枢神経系のグリア細胞との間にバリアーをつくる傾向がある。反応性又は幼若なシュワン細胞はアストロサイトと接着するが、次第に基底膜による境界が形成されて、中枢神経と末梢神経の環境が分離してしまう。一方上衣細胞は中枢神経系の細胞で、グリア細胞との間に基底膜を形成することはないと考えられる。私達は脈絡叢の上衣細胞を移植に用いて、中枢神経の再生を促進させることを試みてきた。

B. 研究方法

1. 成熟ラット又はマウスの第四脳室脈絡叢を取り出して、細切した後一塊として他の個体の脊髄 (C2レベル) の損傷部に移植する。脊髄の損傷は後索をハサミで切断することによった。移植塊は横断された脊髄後索内に挿入し、切開部及び硬膜は縫合することなく、皮膚を縫合した。移植細胞は蛍光色素あるいはGFP-トランスジェニックのいずれかで標識することによって、移植後も同定可能であるようにした。また神経線維は時に抗ニューロフィラメント抗体で染色し、移植細胞との相互関係を明らかにした。
2. 生後1~7日のマウスの脈絡叢から上衣細胞を培養し、脊髄神経節細胞との共培養により培養上衣細胞が神経突起伸長促進に働くかどうかを調べた。
3. 培養上衣細胞をマウス脊髄に移植することにより移植上衣細胞の分化を調べた。

C. 研究結果

1. 脈絡叢の移植では、移植された上衣細胞に沿って無数の再生軸索が伸びていることが明らかになった。電子顕微鏡では再生軸索が上衣細胞の表面に接して、あるいは上衣細胞に囲まれて伸びていることが分かった。つまり *in vivo* で移植上衣細胞は再生軸索の伸長を支持し、促進することが明らかである。

これらの再生軸索がワーラー変性部位内に伸びているか否かは今のところ不明である。

2. 培養3週間の上衣細胞に胎生17日前後の胎児から取った脊髄神経節ニューロンを共培養させたところ、ニューロンから多数の神経突起が出、しかも長く伸長することが分かった。これはラミニンコートあるいはアストロサイト培養上に共培養した場合と比べて有意の差があった。つまり培養上衣細胞はニューロンからの神経突起の萌出と伸長に促進的に働くことが明らかになった。

3. 培養上衣細胞を脊髄後索に移植した結果少なくともアストロサイト様の細胞に分化することが分かった。オリゴデンドロサイトへの分化は不明である。

D. 考察

上衣細胞が中枢神経の再生に促進的に働くことは *in vivo* および *in vitro* ともに明らかである。おそらく上衣細胞表面の接着分子あるいは上衣細胞から分泌される栄養因子によるものと考えられるが今のところどちらが主に働いているかは不明である。

上衣細胞は中枢神経系の細胞であるが、移植後1ヶ月には移植部位にオリゴデンドロサイトとシュワン細胞による髄鞘の形成が見られる。これはおそらく上衣細胞の移植によってこれらの細胞の移動が促進されたためと考えられる。ワーラー変性部位への神経の再生ははっきりしない。上衣細胞がワーラー変性部位内に移動できるようになれば軸索の再生も促進されると考えられる。

培養上衣細胞が神経突起の萌出と伸長に促進的に働くことは注目される。この実験系によって今後は責任分子が培養上清にあるか上衣細胞表面にあるかを明らかにしたい。

また培養上衣細胞の脊髄への移植によって上衣細胞の分化がどのようになされるかを調べることはこれからの大きな課題である。上衣細胞の分化は幹細胞 (stem cell) からの分化という意味もあり、興味あるところである。

E. 結論

脈絡叢上衣細胞は *in vivo* および *in vitro* において神経軸索の伸長を促進させる能力を持つ細胞である。従って中枢神経系の再生のための移植細胞として有

望な細胞である。

F. 論文

・ Senoo E., Tamaki N. and Ide C.: Effects of prelesioned peripheral nerve graft on nerve regeneration in the rat spinal cord. *Neurosurgery*, 42:1347-56.(1998)

・ Kitada M., Mizoguchi A., Tohyama K., Ohtsubo A., Fujimoto E., Chakraborty S. and Ide C.: Comparison of the axonal and glial reactions between the caudal and rostral border in the cryoinjured dorsal funiculus of the rat spinal cord. *Restor. Neurol. Neurosci.* (in press)

・ Ide C., et al.: Ependymal cells of the choroid plexus promote the growth of regenerating axons in the dorsal funiculus of the rat spinal cord.(submitted)

・ 井出千束、溝口明、 S. Chakraborty S: 脊髄における損傷後修復の細胞学. *脳神経*,50:236-241.(1998)

・ 井出千束: 神経の再生. *Annual Review 神経*1999, 中外医学社, pp.25-34.

G. 学会発表

・ Ide. C., Kitada M., Chakraborty S., Matsumoto N., Mizoguchi A., Kimura K. and Kinoshita K. : Enhancement of axonal regrowth by grafting of ependymal cells of the 4th ventricle choroid plexus in the spinal cord dorsal funiculus. *Asia Pacific Symposium on Neural Regeneration*. Hong Kong. 12月3-4日.1998.

・ 北田容明、Shushovan Chakraborty, 溝口明、井出千束.
上衣細胞移植による中枢神経系における軸索の再生.
第13回神経組織の成長・再生・移植研究会.東京.6月6日.1998.

・ 北田容明、Shushovan Chakraborty, 溝口明、井出千束.
上衣細胞移植による中枢神経系における軸索の再生.
第21回神経科学大会.東京.9月21-23日.1998.

G. 知的所有権の取得状況

なし

神経細胞至適グリア環境の電子顕微鏡学的解析
- 神経組織における新規の細胞間接着機構の同定と成長円錐の高感度標識法の改良 -

分担研究者 溝口 明 京都大学大学院医学研究科助教授

研究要旨 脊髄の損傷後機能再建では、再生軸索を囲むグリア細胞が、再生軸索を標的細胞へ誘導する多種の Guidance Cues (手がかり)を示すことが予想されてきたが、その実体は殆ど不明であった。そこで本年度、神経細胞・グリア細胞の細胞間接着分子に着目し、神経組織においてアクチン線維と結合する細胞膜蛋白質を検索した。その結果、Nectin - Afadin - アクチン線維 および Neurabin - アクチン線維という2種類の新規の細胞間接着機構を見いだした。Nectinは、イムノグロブリンスーパーファミリーに属す細胞接着分子であり、Cadherin と並んで重要な役割を担うと考えられる。また、Neurabin が、高感度標識法によって錐体路成長円錐に局在することも確認した。これらの新規の細胞間接着機構は、再生軸索を誘導する Guidance Cues を解明する端緒となると考えられる。

A. 研究目的

再生軸索が損傷部位を越えて伸長し、正常の標的細胞に到達し、そこでシナプスを形成するためには、グリア細胞の表面細胞膜にあって再生軸索を標的伝導路や細胞へと誘導する作用を持つ Guidance Cues を同定することが不可欠である。そこで、アクチン線維と結合する細胞膜蛋白質に着目し、発生過程の神経組織を材料としてそのような性質を持つ蛋白質を同定することを研究の目的とした。また、同定した細胞接着分子の生体内の局在を電子顕微鏡的に解析する手段として、成長円錐の高感度標識法の確立も試みた。

B. 研究方法

マウス胎齢16-18日令の神経組織の蛋白質を SDS-PAGEにて分離し、フィルターに転写した後、放射線標識したアクチン線維とインキュベートし、アクチン線維と結合活性を持つ膜蛋白質を検索した。成長円錐の高感度標識法としては、WGA-HRPをトレーサーとして錐体路を標識し、チラミドによって HRP酵素活性をビオチンに変換増幅し、蛍光抗体法と免疫電顕法で検出した。

C. 研究結果

アクチン線維と結合活性を持つ膜蛋白質の検索によって、AfadinとNeurabinという2種類の蛋白質を同定し、さらにAfadinは、イムノグロブリンスーパーファミリーに属する新規の細胞接着分子Nectinと結合することを明かにした。実際、Nectinは細胞表面で細胞間凝集活性を持つことも判明した。一方、Neurabinは、高感度標識法によって発生過程の錐体路成長円錐に局在していた。興味あることに、Neurabinは、最先端を伸長するパイオニア成長円錐には発現が弱く、それらより約1mm後方を伸長する成長円錐には発現が強い傾向があった。また、AfadinやNeurabinは、形成期のシナプスやグリア細胞にも発現していた。

D. 考察

今回見いだしたNectin - Afadin - アクチン線維から構成される細胞間接着機構は、これまでにない以下の3つの神経生物学的な特徴を持っている。1) Nectinの細胞外ドメインは、イムノグロブリン様のループ3回からなり、細胞外ドメイン同志で homophilicに結合する。2) Nectinの細胞内ドメインは、AfadinのPDZドメインと結合する。3) AfadinのC末端は、アクチン線維と結合する。さらにAfadinはPonsinという新規の蛋白質を介してVinculinと結合する。このように、細胞外ドメインからアクチン線維までの分子関連が完全に証明された例は、イムノグロブリンスーパーファミリー細胞接着分子ではNectinが最初であり、cadherin/catenin系およびintegrin系と並んで重要な意義を有すると考えられる。また、Neurabinに関しては、これと結合する細胞膜蛋白質で細胞間接着活性を持つ分子はまだ見つかっていないが、そのような蛋白質はGuidance Cuesの有力な候補と考えられるので、詳細に解析を行うことを計画している。

E. 結論

神経組織から、Nectin - Afadin - アクチン線維 および Neurabin - アクチン線維という2種類の新規の細胞間接着機構を見いだした。これらの細胞間接着機構は、再生軸索を標的細胞へと誘導する Guidance Cues の実体を解明するための鍵になると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Takahashi, K., Nakanishi, H., Miyahara, M., Mandai, K., Satoh, K., Satoh, A., Nishioka, H., Aoki, J., Nomoto, A., Mizoguchi, A., and Takai, Y. Nectin/PRR: An immunoglobulin-like cell adhesion molecule recruited to cadherin-based adherens junction through interaction with afadin, a PDZ domain-containing protein. *J. Cell Biol.*, in press, 1999

Mandai, K., Nakanishi, H., Satoh, A., Takahashi, K., Satoh, K., Nishioka, H., Mizoguchi, A., and Takai, Y. Ponsin/SH3P12: An I-afadin- and vinculin-binding protein localized at cell-cell and cell-matrix adherens junction. *J. Cell Biol.*,144: 1001-1017, 1999.

Fujita, Y., Shirataki, M., Sakisaka, T., Asakura, T., Ohya, T., Kotani, H., Yokoyama, S., Nishioka, H., Matsuura, Y., Mizoguchi, A., Scheller, H. R., and Takai, Y. Tomosin: A syntaxin-1-binding protein which dissociates Munc18/n-secl from syntaxin-1 and forms a novel complex in the neurotransmitter release process. *Neuron* 20: 905-915, 1998.

2. 学会発表

第14回形態科学シンポジウム

G. 知的所有権の取得状況

なし

分担研究報告書

ラット脊髄損傷モデルにおける神経栄養因子の動態に関する研究 -ラット脊髄発達過程におけるcaspase活性とapoptosis-

分担研究者 西尾 健資 滋賀医科大学 助手

研究要旨 中枢神経軸索切断後に生じる神経細胞体の神経細胞死は、apoptosisと考えられる。ラット脊髄の発達過程でおこる神経細胞死を対象に、経時的・定量的にcaspase活性とDNA断片化を検討した。脊髄運動ニューロンがdevelopmental cell deathを起こすと考えられている胎生15日齢～生後第2～3週までの間に、DNAの断片化を認め、それに数日間先行する形でcaspase活性の上昇を認めた。本研究は、脊髄運動ニューロンが発達過程で経験する細胞死も、apoptosisであり、caspaseが関与していることを明らかにした。

A. 研究目的

中枢神経軸索切断後には、切断末梢側の変性（ワラー変性）と共に切断中枢側の軸索断端の退縮や、あるいは神経細胞体の変性脱落（神経細胞死）が生じる。この時に生ずる神経細胞死は、細胞質浮腫や細胞内小器官の膨化が核の障害に先行するnecrosisというよりも、ヌクレオソーム単位でDNAが分断され（DNA fragmentation）、クロマチン濃縮や細胞容積の縮小に特徴づけられるapoptosisが生じていると考えられる。何故なら、軸索切断により、それまで供給されていた栄養因子が供給されなくなった事がこの神経細胞死の主因と考えられ、栄養因子欠乏性apoptosisの存在が報告されているからである。このapoptosisに至る分子発現機構は不明の点も多いが、caspaseと呼ばれる蛋白分解酵素系の活性化が、その中心的役割を担っていると考えられている。そこで、caspaseがapoptosisの過程でどのように活性化されているのかを知る目的で、ラット脊髄の発達過程でおこる神経細胞死（programmed cell death, developmental cell death）を対象に、経時的・定量的にcaspase活性とDNA fragmentationを検討した。

B. 研究方法

1) サンプルの作成

Wistar rat (胎生12日齢；E12～生後72日齢；P72)の脊髄をCell lysis bufferでhomogenizeした後、4℃・16000g・20分で冷却遠心し、上清を以下の生化学的検索に供した。

2) caspase 1 (ICE)、caspase 3 (CPP32)活性の測定：caspaseの特異基質認識部位であるtetrapeptidesと蛍光物質AMCのconjugateを基質として、生成されるAMCの蛍光強度(F1)を定量した。

caspase 1 (ICE)： Ac-YVAD-AMC

caspase 3 (CPP32)： Ac-DEVD-AMC

caspase以外の酵素による非特異的切断の定量：F2

caspaseの特異的阻害剤（非可逆的）tetrapeptides-CHOで前処理したsampleを、上記と同様に生成されるAMCの蛍光強度(F2)を定量した。

F1 - F2

$$\text{caspase活性} = \frac{\text{F1} - \text{F2}}{\text{総蛋白質量}}$$

3)細胞質内断片化DNAの定量：細胞質に存在するnucleosome (histone蛋白とDNA) 単位に分断されたDNA断片を酵素免疫測定法 (EIA) で定量した。

C. 研究結果

- 1)ラット脊髄発達過程におけるcaspase活性の変化：caspase 1 (ICE)は、E13-14をピークに生後第1週まで減少し、第2週で再び上昇した後、第3-4週以降はほとんど認めなかった。caspase 3 (CPP32)は、E14をピークに生後第2週まで減少し、第3週以降はほとんど認めなかった。
- 2)ラット脊髄発達過程における断片化DNAの定量的変化：断片化DNAは、E17-P2をピークにE14～P3と生後第3週をピークに第4週まで認められた。

D. 考察

ラット脊髄運動ニューロンは、E15～P1にかけて、40-45%減少すると報告されているが (Oppenheim RW. J Comp Neurol, 1986.246:281-86) 今回の結果でも、E17-P2をピークにE14～P3に、断片化DNAを認めたことは、この細胞死がapoptosisであることを示唆している。一方これに先行して、E13-14をピークにcaspase活性の著明な亢進を認めたことは、このDNA fragmentationにcaspaseが関与していることを示唆した。しかし、このcaspase活性亢進のピークとDNA断片化定量のピークとの時間的相違は数日であったが、caspase活性化からDNA fragmentationまでの反応時間としてこれで妥当か否かは、今後の検討が必要である。Hayashiら (Stroke, 1998.29:1007-13) は、ウサギ脊髄の一過性虚血モデルを用いて、虚血後8時間でcaspaseが発現し、虚血後2-7日後にDNA断片化 (TUNEL)を認めたと報告している。この事は、今回の結果 (caspase活性とDNA断片化の時間経過) を支

の結果 (caspase活性とDNA断片化の時間経過) を支持する。一方、ラット脊髄運動ニューロンの生後の細胞死に関しては、Tadara (Exp Brain Res, 1979. 35:287-93) は、P10以降で (特に5週までに) 著明な神経細胞死を起こすと報告しているが、Oppenheim RWは、生後の著明な細胞死はないとしている (Oppenheim RW. J Comp Neurol, 1986. 246:281-86)。今回の結果では、生後第3週をピークにDNA fragmentationと第2週をピークにcaspase1活性の亢進を認めた。これは、Tadaraのデータを支持する。

E. 結論

ラット脊髄の発達過程における caspase活性とDNA断片化を定量した。

脊髄運動ニューロンがdevelopmental cell deathを起こすと考えられているE15～生後第2～3週まで、DNA fragmentationを認め、それに数日間先行する形で caspase活性の上昇を認めた。

本研究は、脊髄運動ニューロンが発達過程で経験する developmental cell deathも、apoptosisであり、caspaseが関与していることを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Nishio T, Sunohara N, Furukawa S, Akiguchi I and Kudo Y; Repeated injections of nicergoline increase the nerve growth factor level in the aged rat brain Jpn J Pharmacol 76: 321-323, 1998.
2. Arima K, Ogawa M, Sunohara N, Nishio T, Shimomura Y, Hirai S and Eto K, Immunohistochemical and ultrastructural characterization of ubiquitinated eosinophilic fibrillary neuronal inclusions in sporadic amyotrophic lateral sclerosis Acta Neuropathol 96: 75-85, 1998.
3. Nishio T, Sunohara N and Furukawa S, Neurotrophin switching in spinal motoneurons of amyotrophic lateral sclerosis Neuroreport 9: 1661-1665, 1998.
4. Nishio T, Sunohara N, Mizutani K, Akiguchi I and Furukawa S, Nerve growth factor levels in the cerebrospinal fluids are high in the inflammatory neurological disorders Clin Chim Acta 275: 93-98, 1998.
5. Nishio T, Furukawa S, Akiguchi I and Sunohara N, Medial nigral dopamine neurons have rich neurotrophin support in humans Neuroreport 9: 2847-2851, 1998.
6. Nishio T, Sunohara N, Nonaka I, Tsujino S and Sugie H, Myophosphorylase deficiency and limb-girdle muscular dystrophy in the same pedigree Acta Neurol Scand 98: 364-367, 1998.

2. 学会発表

西尾健資 ラット中枢神経系発達過程における caspase活性 第76回日本生理学会大会. 長崎. 3.28-30.1999.

G. 知的所有権の取得状況

なし