

厚生科学研究費補助金

脳科学研究事業

脳・脊髄損傷の再生的治療法の開発

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 川口 三郎

平成14（2002）年4月

## 目 次

I. 総括研究報告書		
脳・脊髄損傷の再生的治療法の開発	-----	2
川口 三郎		
II. 分担研究報告		
1. 脳・脊髄損傷後の再生における電子顕微鏡学的検索	----	14
井出 千束		
2. 中枢神経伝導路再生軸索誘導因子の同定	-----	19
溝口 明		
3. 中枢神経伝導路再生促進因子の同定	-----	23
西尾 健資		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	28
IV. 研究成果の刊行物・別冊	-----	31

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

分担研究報告書

脳・脊髄損傷の再生的治療法の開発

主任研究者 川口 三郎 京都大学医学研究科 認知行動脳科学 教授

研究要旨

本研究の目標は機能的神経伝導路の再構築機構を解明し、脳・脊髄損傷によって引き起こされる片麻痺や対麻痺・四肢麻痺の再生的治療法の開発に向けて展望を切り開こうとするものである。この目標を達成するためには、ラットで脊髄損傷モデルを作り、そのモデルについて十分な機能的意義を有する脊髄伝導路の再構築ができることを証明することが必要であり、それができれば、臨床的応用は可能になるというのが、現在、この領域の研究者における共通の認識になっている。この目標に向って、1) 新生ラットにおける脊髄髄節置換標本を用いて、再構築された神経結合と機能回復の相関を明らかにし、2) 幼若ラットにおいて脊髄伝導路の著明な再生が可能となる条件を解明し、3) 成熟ラットにおいて脊髄の完全切断標本を作成し、切断部局所を神経路の再生可能な環境にして神経回路を再構築し、対麻痺から著明な機能回復を図り、4) 脈絡叢上衣細胞の移植による脊髄後索の上行線維の再生促進を試み、5) 軸索誘導機構と細胞接着機構の関連を明らかにし、6) 中枢神経軸索の再生を促進するブタ胎仔脳由来拡散性分子の分離・同定を進めるとともに、その再生促進メカニズムの解明を進めた。

A. 研究目的

本研究は脳・脊髄損傷によって引き起こされる片麻痺、対麻痺、四肢麻痺の再生的治療法の開発を目指す。再生

的治療法というのは、損傷された神経伝導路の再生を導き、失われた神経回路網を再構築して機能回復を図ろうとするものである。現在、我が国には1

0万人の脊髄損傷患者がおり、交通事故などにより毎年新たに5千人の患者が発生すると云われており、さらに頭部外傷ではその数倍、脳血管障害では10数倍の患者の存在が報告されている。これらの患者は対麻痺、四肢麻痺、片麻痺に苦しんでいる。脳・脊髄損傷の再生的治療が可能になれば、多く患者とその家族にとって計り知れない福音をもたらすだけでなく、国家財政の面から見ても大きな医療費負担の軽減になるであろう。このような治療法は、かつては不可能と考えられてきたが、私達の報告を含めて最近10数年の研究成果は、その可能性を明らかにしただけでなく、それを現実的な研究目標にした (Science 273:451, '96)。欧米諸国では、この研究が国民の保健・医療・福祉の向上に役立つという観点からだけでなく、新たな産業に結びつく可能性を秘めた、したがって国際競争の場におかれた課題であるとの認識の下に、戦略的観点から研究基盤の強化が図られている。私達は、この研究領域で先駆的な研究成果を挙げてきており、本研究事業によって中枢神経損傷

の再生的治療法開発の先端を切り開きたいと思う。

## B. 研究方法

1) 新生ラット (SD系 rat, 生後2日齢) の下部胸髄を 1.5-2 髄節切除し、その空隙に胎生14日目の胎仔ラット脊髄をにおける移植した。このラットを経時的に行動観察し BBB scale を評価すると共に、筋電図を用いて前肢・後肢の運動を評価し、前肢・後肢の協調性を検討した。また、WGA-HRP を順行トレーサーとして sensorimotor cortex に注入し、fast blue を逆行性トレーサーとして腰膨大に注入して、大脳皮質・赤核・縫線核・前庭神経核を検索して、再構築された神経結合と機能回復の相関を明らかにした。

2) 幼若ラット (SD系 rat, 生後2週齢) の下部胸髄を切断し、WGA-HRP と dextranamin-Texas Red を順行トレーサーとして sensorimotor cortex に注入した。切断部局所におけるグリア関連分子・細胞外マトリックス関連分子を、免疫組織学的に検索した。トレーサースタディーによって明らかになった再生成功例と再生失敗例の局所条件

の違いを比較検討し、脊髄伝導路の著明な再生が可能となる条件を解明した。

3) 成熟ラット(SD系 rat, 生後2月齢)において上部頸髄(C2-3)を切断し、切断部局所に胎生13日目の胎仔ラット脊髄組織を移植し、赤核脊髄路を再生させた後、逆行性トレーサーを腰膨大・頸膨大に注入して、その体部位局在の再現性を検索した。

4) 脈絡叢としては、成獣ラットの第四脳室脈絡叢を用い、採取後細切して、同じ系統のラット脊髄(C2レベル)後索に移植した。移植後10ヶ月まで経時的に電子顕微鏡と免疫組織化学を用いて組織学的な検索を行った。また、坐骨神経よりHRPを注入して経神経節的に再生軸索をラベルした。さらに電気生理学的に、損傷部位の5mm頭側に於いて、誘発電位を記録した。

培養系では、生後1~10日のマウス脈絡叢を3週間培養して、脈絡叢上衣細胞の単層培養系を作った。それに胎生14日の脊髄後根神経節のニューロンを共培養した。培養後4.5時間でニューロンからの突起の伸長を調べた。比較にはラミニンを基質とする培養と

アストロサイト単層培養との共培養を行った。

5) 髄部置換では、生後2日齢ラットへの胎齢14日目胸髄の移植を行い、術後18日目に錐体路を標識して錐体路軸索の組織増を観察した。

ガイダンス・キューの候補であるNectinについては、Nectinの特異的機能阻害物質であるgD存在下で神経細胞を培養し、形成されたシナプスの形態と個数を解析した。ヒトに応用可能な代用脊髄の候補として、ラット海馬由来の神経幹細胞を試験管内や生体内で分化誘導して、神経機能再建に陽的な機能を果たしうるかを解析した。

6) ブタ胎仔脳細胞質分画の調製は、妊娠ブタを麻酔下に帝王切開して摘出したブタ胎仔(E50~E80)から脳を採取し、直ちに液体窒素で凍結後遠心し、上清を凍結乾燥し、ブタ胎仔脳細胞質分画を得た。成熟ラット(Sprague-Dawley rats, P74, female, n=20)を第11胸髄レベルで右半側切断(over-hemisection)し、spongel<sup>R</sup>に吸収させたブタ胎仔脳細胞質分画(生理食塩水で25mg/ml濃度に調製)を切断局所に

被覆した。対照群として生理的食塩水を吸収させた sponge1<sup>R</sup> を被覆した成熟ラット (Sprague-Dawley rats, P74, female, n=10) と比較した。ブタ胎仔脳細胞質分画投与群 (n=20) と生食投与群 (n=10) を術後 12 時間、24 時間、48 時間、72 時間で灌流固定し、切断局所の分子発現を以下の抗体を用いて免疫組織蛍光法により検討した。一次抗体として抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体 (mouse monoclonal IgG, GA-5, Behringer, 0.5 microgram/ml)、抗 neurofilament 抗体 (mouse monoclonal IgG, Behringer, 1 microgram/ml)、抗 tenascin-C 抗体 (rabbit polyclonal IgG, Transformation Research Inc. 2 microgram/ml)、抗 NG2 抗体 (rabbit polyclonal IgG, Chemicon 1 microgram/ml) を 4°C・24 時間反応させた後、二次抗体として抗 mouse IgG-FITC (Southern Biotechnology, 2 microgram/ml)、抗 goat IgG-TRITC (Chemicon, 2 microgram/ml) を 4°C・12 時間反応させ、蛍光顕微鏡下に観察した。

### C. 研究結果

1) 髄節置換されたラットは、正常ラットの生後発達に約 5 日遅れて後肢の運動機能を獲得し、BBB scale では平均で  $15.3 \pm 4.13$  であった。また、脳幹の標識ニューロンの数と運動機能の BBB scale の点数が良い相関を示した。また、歩行中の四肢筋電図と BBB scale の点数は良く対応していた。四肢協調歩行の獲得には、皮質脊髓路の再構築が必要であることが判明した。

2) 皮質脊髓路を切断された幼若ラットは、約半数が著明な再生を認め、残りの半数が再生失敗であった。再生失敗例では、切断部局所において、アストロサイトが消失する広い領域 (astrocyte free area: AFA) を認めたのに対して、再生成功例では、切断部局所において未熟アストロサイトを認め、明らかな AFA を認めなかった。また、4 型コラーゲンの沈着は、再生が失敗に終わってから結果として生じており、またグリア瘢痕も再生失敗の原因ではなく結果であることが判明した。

3) 赤核脊髓路を切断された成熟ラッ

トの一部は著明な軸索再生を示しており、おおむね正常と同様の体部位局在の再現を認めた。しかし、一部は異所性投射を認めた。この異所性投射は著明な再生を認めた例では少なく、逆に再生の程度が低い例ほど異所性投射の割合が増加した。

4) 電子顕微鏡および免疫組織化学で、無数の再生軸索が移植片内に伸びること、および再生軸索は脈絡叢上衣細胞と密に接して、その表面に沿って伸びることを示した。また、再生軸索の中には CGRP 線維が含まれており、少なくとも一部は後索線維からの再生であることを示した。坐骨神経より HRP を注入して経神経節的に再生軸索をラベルすると、後索上行線維からの再生軸索が移植片内に伸びていることが明らかとなった。この状態は移植後 10 ヶ月でも変わりなかった。電気生理学的に、損傷部位の 5 mm 頭側に於いて、対照群とは違ってはっきりした誘発電位が記録された。この結果から、脈絡叢上衣細胞は移植細胞として有望であると考えられた。

一方、培養系では、培養後 4.5 時間

でニューロンからの突起の伸長を調べた。その結果、脈絡叢上衣細胞との共培養では、突起が長いこと（{総ての突起の長さ/ニューロン}の値は、ラミニン上の培養； $285 \pm 14 \mu\text{m}$ 、アストロサイトとの共培養； $395 \pm 15 \mu\text{m}$ 、脈絡叢上衣との共培養； $565 \pm 12 \mu\text{m}$ ）、および枝分かれの頻度（枝分かれの数/神経突起）も高いことが明らかとなった（ラミニン上の培養； $1.51 \pm 0.24$ 、アストロサイトとの共培養； $2.50 \pm 0.30$ 、脈絡叢上衣細胞との共培養； $2.75 \pm 0.28$ ）。これらの結果は、培養系に於いても脈絡叢上衣細胞はニューロンの突起伸長促進作用を持つことを示している。

5) 著明な損傷後再生の形態学的特徴は、再生錐体路軸索が移植片内で一旦脱束化した後、無髄神経の神経束として再束化すること、さらに移植片内部および宿主末梢脊髄内部においてシナプスを形成することであった。再束化した神経束の本数は、損傷部より近位の錐体路軸索のその約 50% に達していた。また再生シナプスは、形態学的に正常のそれと遜色がなかった。培

養神経細胞で Nectin の機能を gD をいて阻害すると、シナプスの大きさは正常の約 60% になり、個数は正常の約 240% に増加した。ラット海馬由来の神経幹細胞は、正常海馬細胞と混ぜて培養すると全体の約 0.3% が、グルタミン酸作動性の興奮性および GABA 作動性の抑制性のシナプスに分化した。この神経幹細胞を損傷網膜に移植するとその約 10% は神経細胞やグリア細胞へと分化し、網膜組織再形成に参加した。

6) 生理的食塩水投与の対照群では、切断 12 時間後から切断部局所において GFAP 陽性細胞、NG2 陽性細胞による glial framework の消失を認めた。これに対して、ブタ胎仔脳細胞質分画投与群では、同様の glial framework の消失は認めたが、切断面において GLAST 陽性細胞の発現を認め、この細胞は GFAP・vimentin・tenascin-c も陽性であった。また切断 48 時間後～72 時間において、損傷部白質の NG2 陽性細胞は生理的食塩水投与の対照群でも増加を認めたが、ブタ胎仔脳細胞質分画投与群では、一層 NG2 陽性細胞の増加を

認めた。

#### D. 考察

- 1) 著明な運動機能に獲得には、再生線維の量・距離が重要である事が明らかになった。この事は、現在世界中で行われている中枢環境を非許容的から許容的に変える試みでは、わずかな量の異所性投射が再構築されるに過ぎず、著明な機能回復を達成できないことを説明する根拠となる。
- 2) 脊髄損傷後にグリア瘢痕が生じることが軸索再生失敗の原因であろうと長い間考えられてきたが、グリア瘢痕が再生失敗の原因ではなくむしろ結果であり、再生失敗の原因と考えられるのは損傷早期に局所において軸索再生を促進すると考えられる未熟アストロサイトが存在しないことと考えられた。
- 3) 成熟ラットにおいても局所環境さえ改善してやれば、正常と同様の体部位局在を再現する著明な軸索再生が可能であることが明らかになった。この事は中枢神経修復において明るい展望を切り開いた。
- 4) 脈絡叢上衣細胞の移植によって、



脊髄後索線維の再生が促進されることが明かとなったが、再生軸索が損傷部位を越えて宿主の後索内に進入しないのは、中枢神経の再生に関わる最も大きな問題点である。脈絡叢上皮細胞によって、機能的なグリア瘢痕の形成が抑制される事を期待したが、期待通りには行かないことが分かった。この対策として、強制的にニューロトロフィンを分泌させるように遺伝子導入した脈絡叢上皮細胞の移植を考慮中である。

In vitro に於ける脈絡叢上皮細胞の神経突起伸長促進作用に関与する要因として、培養上清に分泌される栄養因子および細胞表面の接着分子が考えられる。これまで少数ではあるが、脈絡叢上皮細胞に発現される接着分子、栄養因子についての報告があるが、系統的に調べられてはいない。我々が調べた限りでは、接着分子として NCAM および N-cadherin が、栄養因子としては bFGF, IGF-1, -2, GDNF など多くの栄養因子が発現されていることが分かった。今後は、これ等の機能分子の発現を詳しく調べ、それらが神経再生にどのように関与しているかを調べる必要

があると考えられる。

5) 再生錐体路軸索の再束化能およびシナプス再形成能は、今回初めて実証された概念で、点对点投射の回復を考える上で画期的な意義を持つと考えられる。即ち、この結果は、中枢神経伝導路が広範囲に渡って分布する標的細胞に整然と軸索を配るためには、神経が束という機能形態をとることが必要であることを示唆しており、さらに、何故、正常中枢神経で線維連絡が束という機能形態で行われているのかという基礎的な問いに対する明確なヒントを示している。また、再束化による再生軸索の本数が、もとの約 50% に達した事実は、従来、視神経の末梢神経移植による再生軸索がもとの約 5% であることと比較すると、この再生が量的にも格段に優れていることがわかる。さらに深く考察すると、従来伝導路軸索の変性・退行性変化と考えられてきた損傷部近位部の脱束化は、損傷された中枢神経伝導路軸索が広範囲にひろがって、失われたガイダンス・キューを探索しようとする積極的な対応とみなすこともでき、この対応能力を再生に

利用することも大いに期待できると考えられる。また、NINCDSの特別委員会が提示した再生の判断基準、“中枢神経細胞の突起による離断部の架橋”と“神経突起による接合部形成”が、本実験によって完全に証明された。Nectinの機能阻害によるシナプス形成異常は、Nectinによるシナプス位置・大きさの制御機構の存在を世界で初めて示した。ラット海馬由来の神経幹細胞による機能的シナプスへの分化誘導および網膜組織へと分化誘導は、神経幹細胞の有用性を示した。

6) 個体発生の過程において、神経軸索は複雑なネットワークを形成する。伸長する軸索を正しい方向に誘導するメカニズムの詳細は不明な点も多いが、現在のところ、軸索伸長を誘導するメカニズムとして、4種類の誘導機構(Four guidance forces)が考えられている。すなわち、比較的遠距離から拡散性分子の密度勾配によって伸長軸索を誘導すると考えられる long-range cues (chemoattraction or chemorepulsion)と、伸長軸索と接触しながら短距離で伸長軸索を誘導すると

考えられる short-range cues (contact attraction or contact repulsion)である。

今回の結果で、損傷部早期から切断部局所において glial framework が消失したことは、上記の誘導機構のうち short-range cues (contact attraction or contact repulsion)が消失したものと解釈できる。これに対して、ブタ胎仔脳細胞質分画投与群では、損傷部局所、特に白質切断面において GLAST・GFAP・vimentin・tenascin-c 陽性細胞が認められた。この GLAST・GFAP・vimentin・tenascin-c 陽性細胞は、個体発生の過程において、伸長軸索を誘導することが知られている radial glia の表原型とも一致する。従ってこの細胞が、損傷によって消失した short-range cues (contact attraction or contact repulsion)の再構築に寄与しているのではないかと考えられた。

## E. 結論

1) 中枢神経の再生においては、再生線維の量・距離が重要である事を明らかにした。

2) 中枢神経の再生・失敗は損傷部の局所環境が重要であり、とくに早期に誘導される損傷部局所の未熟アストロサイトが重要である。

3) 成熟ラットにおいても、正常と同様の体部位局在を再現する著明な軸索再生が可能であることを明らかにした。

4) 脈絡叢上衣細胞は中枢神経の再生のための移植細胞として有望であると考える。

5) 再束化による伝導路軸索の著明な再生の証明、細胞接着分子 Nectin によるシナプス位置・大きさ制御機構の証明、ラット海馬由来神経幹細胞の移植組織としての有用性を明らかにした。

6) 損傷後早期に局所に認める glial framework の消失は、軸索非再生の一因である事を明らかにした。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Ide C., Kitada M., Chakraborty S., Taketomi M., Matsumoto N., Kikukawa S., Mizoguchi A., Kawaguchi S., Endo K. and Suzuki Y. : Grafting of choroid plexus ependymal cells promotes the growth of regenerating axons in

the dorsal funiculus of rat spinal cord: A preliminary report. *Exp. Neurol.* 167:242-251 (2001)

2. Chakraborty S., Kitada M., Matsumoto N., Taketomi M., Kimura K. and Ide C. : Choroid plexus ependymal cells enhance the neurite outgrowth from dorsal root ganglion neurons in vitro. *J Neurocytol.* (in press)

3. Mligiliche N., Kitada M. and Ide C. : Grafting of detergent-denatured skeletal muscles provides effective conduits for extension of regenerating axons in the rat sciatic nerve. *Arch. Histol. Cytol.* 64: 29-36 (2001)

4. Nishida A., Takahashi M., Tanibara H., Nakano I., Takahashi J., Mizoguchi A., Ide C. and Honda Y. : Incorporation and differentiation of neural stem cells transplanted in injured adult rat retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41:4268-4274 (2000)

5. Kataoka K., Suzuki Y., Kitada M., Ohnishi K., Suzuki K., Tanihara M.,

- Ide C., Endo K. and Nishimura Y.: Alginate, a bioresorbable material derived from brown seaweed, enhances elongation of amputated axons of spinal cord in infant rats. *J. Biomed. Mater. Res.* 54:373-384 (2000)
6. Shirasu M., Kimura K., Kataoka M., Takahashi M., Okajima S., Kawaguchi S., Hirasawa Y., Ide C. and Mizoguchi A.: VAMP-2 promotes neurite elongation and SNAP-25A increases neurite sprouting in PC12 cells. *Neurosci. Res.* 37:265-75 (2000)
7. Morihara 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 on dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* 91:695-706 (1999)
8. Mligiliche N. and Ide C.: Nerve regeneration through detergent-treated skeletal muscle grafts. *Peripheral Nerve* 10:79-87 (1999)
9. 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 spinal cord. *Res. Neurol. Neurosci.* 14: 251-263 (1999)
10. 井出千束: 神経再生とグリア細胞 *Clin. Neurosci.* 18: 32-34 (2000)
11. 井出千束: 神経の再生 脳神経科学 (伊藤正男 監修) 三輪書店 (印刷中)
12. 溝口 明、井出千束: 成長円錐の伸長 脳神経科学 (伊藤正男 監修) 三輪書店 (印刷中)
13. Mizoguchi, A., Nakanishi, H., Kimura, K., Matsubara, K., Ozaki-Kuroda, K., Katata, T., Honda, T., Kiyohara, Y., Heo, K., Ide, C., and Takai, Y. Nectin: A key adhesion molecule involved in formation of synapses. 投稿中
14. Toda, H., Takahashi, J., Mizoguchi, A., Koyano, K., and Hashimoto, N. Neurons generated from

- adult rat hippocampal stem cells form functional glutamatergic and GABAergic synapses in vitro. *Exp Neurol* 165: 66-76, 2000.
15. Nishida, A., Takahashi, M., Tanihara, H., Nakano, I., Takahashi, JB., Mizoguchi, A., Ide, C., Honda, Y. Incorporation and differentiation of hippocampus-derived neural stem cells transplanted in injured adult rat retina. *Invest., Ophthalmol., Vis., Sci.*, 41: 4268-4274, 2000.
16. Kawasaki T, Nishio T, Kawaguchi S, Kurosawa H. Spatiotemporal distribution of GAP-43 in the developing rat spinal cord: A histological and quantitative immunofluorescence study. *Neurosci Res* 39: 347-358, 2001
17. Hase T, Kawaguchi S, Hayashi H, Nishio T, Asada Y, Nakamura T. Locomotor performance of the rat after neonatal repairing of spinal cord injuries: Quantitative assessment and electromyographic study. *J Neurotrauma* 19: 267-277, 2002
18. Hase T, Kawaguchi S, Hayashi H, Nishio T, Mizoguchi A, Nakamura T. Spinal cord repair in neonatal rats: a correlation between axonal regeneration and functional recovery. *Eur J Neurosci* 15: 969-974, 2002
19. Kawaguchi S, Nishio T. Repair of Mammalian Central Nervous Pathways: Attempts to Reconstruct Normal Neural Connections with Marked Functional Recovery. *Strategic Medical Science against Brain Attack*, ed. by Kikuchi H, Springer-Verlag, Berlin (in press)
2. 学会発表
- 1) Hase T, Kawaguchi S, Nishio T. Neural repair of spinal cord injuries in neonatal rats-relationship between the grade of restored function and the extent of regenerated neural connections. *Restor Neurol Neurosci* 16: 269-270, 2000 5th International Neurotrauma Symposium, 1-5 October 2000, Garmisch-Partenkirchen, Germany
- 2) Nishio T, Kawaguchi S, Iseda T, Hase

T, Kojima K, Kawasaki T. Spinal cord repair in adult paraplegic rats by glial transplantation: recovery of walking with hind-forelimb coordination. 34<sup>th</sup> International Union of Physiological Sciences, Abstract. 2001

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

分担研究報告書

脳・脊髄損傷後の再生における電子顕微鏡学的検索

分担研究者 井出 千束 京都大学医学研究科 機能微細形態学 教授

研究要旨

脈絡叢上衣細胞の移植によって、ラット脊髄後索の上行線維からの再生が促進されることを明らかにした。移植後10ヶ月でも無数の再生軸索が移植部位内に伸びた状態であった。しかし損傷部位を越えてさらに宿主の後索内に入る再生軸索は極僅かであった。これは中枢神経再生の大きな問題点である。一方、培養脈絡叢上衣細胞と共培養された脊髄後根神経節ニューロンは、ラミニンやアストロサイト上に培養された場合に比べて、有意に長い突起を出し、枝分かれの頻度も高いことが明らかとなった。これらの結果は脈絡叢上衣細胞が神経突起伸長促進作用を持つことを示している。

A. 研究目的

中枢神経の再生は、僅か20年位前には不可能であるとして片付けられていた状態である。しかし、末梢神経を移植するという Aguayo らの研究から、中枢神経も適当な環境を与えれば再生する事がはっきりと認識され、以来多くの研究がなされて来た。中枢神経の

再生研究の基本的な考え方は、中枢神経が再生しないのはグリア細胞を中心とする組織環境のためであり、この環境を改善することによってで中枢神経の再生が可能になるという立場である。原因とされる組織環境を構成する主な細胞はオリゴデンドロサイトとアストロサイトで、いずれも再生軸索の伸長

に対して阻害的に働くか、或いは少なくとも促進的には作用しないという事実である。従来から問題にされているアストロサイトによるグリア瘢痕の形成も、神経再生に対する大きな障害となっている。

組織環境を改善するために移植材料として用いられてきた細胞（或いは組織）は、シュワン細胞、胎児組織、活性化マクロファージ、olfactory ensheathing cell（嗅神経鞘細胞）などである。また、遺伝子導入によってニューロトロフィンを強制分泌させた線維芽細胞の移植という試みもなされている。実際、これらの細胞或いは組織の移植によって、再生軸索を損傷部に伸長させることは出来るが、損傷部位より先の宿主組織内に進入させることが困難である。これが中枢神経再生の最も大きな問題点である。

本研究では、脈絡叢上衣細胞という中枢神経系に属する細胞を脊髄に移植することによって神経再生が促進されるか、また同時に、培養系に於いて脊髄後根神経節ニューロンに対して突起伸長促進作用を持つか否かを調べた。

## B. 研究方法

脈絡叢としては、成獣ラットの第四脳室脈絡叢を用い、採取後、細切して、同じ系統のラットの脊髄（C2 レベル）の後索に移植した。移植後10ヶ月まで経時的に電子顕微鏡と免疫組織化学を用いて組織学的な検索を行った。また、坐骨神経より HRP を注入して経神経節的に再生軸索をラベルした。さらに電気生理学的に、損傷部位の5mm 頭側に於いて、誘発電位を記録した。

培養系では、生後1～10日のマウス脈絡叢を3週間培養して、脈絡叢上衣細胞の単層培養系を作った。それに胎生14日の脊髄後根神経節のニューロンを共培養した。培養後4.5時間でニューロンからの突起の伸長を調べた。比較として、ラミニンを基質としての培養、およびアストロサイト単層培養との共培養を行った。

## C. 研究結果

電子顕微鏡および免疫組織化学で、無数の再生軸索が移植片内に伸びること、および再生軸索は脈絡叢上衣細胞



と密に接して、その表面に沿って伸びることを示した。また、再生軸索の中には CGRP 線維が含まれており、少なくとも一部は後索線維からの再生であることを示した。坐骨神経より HRP を注入して経神経節的に再生軸索をラベルすると、後索上行線維からの再生軸索が移植片内に伸びていることが明らかとなった。この状態は移植後 10 ヶ月でも変わりなかった。電気生理学的に、損傷部位の 5 mm 頭側に於いて、対照群とは違ってはっきりした誘発電位が記録された。この結果から、脈絡叢上衣細胞は移植細胞として有望であると考えられた。

一方、培養系では、培養後 4.5 時間でニューロンからの突起の伸長を調べた。その結果、脈絡叢上衣細胞との共培養では、突起が長いこと（{総ての突起の長さ/ニューロン}の値は、ラミニン上の培養； $285 \pm 14 \mu\text{m}$ 、アストロサイトとの共培養； $395 \pm 15 \mu\text{m}$ 、脈絡叢上衣との共培養； $565 \pm 12 \mu\text{m}$ ）、および枝分かれの頻度（枝分かれの数/神経突起）も高いことが明らかとなった（ラミニン上の培養； $1.51 \pm$

$0.24$ 、アストロサイトとの共培養； $2.50 \pm 0.30$ 、脈絡叢上衣細胞との共培養； $2.75 \pm 0.28$ )。

これらの結果は、培養系に於いても脈絡叢上衣細胞はニューロンの突起伸長促進作用を持つことを示している。

#### D. 考察

脈絡叢上衣細胞の移植によって、脊髄後索線維の再生が促進されることが明かとなったが、再生軸索が損傷部位を越えて宿主の後索内に進入しないのは、中枢神経の再生に関わる最も大きな問題点である。脈絡叢上衣細胞によって、機能的なグリア瘢痕の形成が抑制される事を期待したが、期待通りには行かないことが分かった。この対策として、強制的にニューロトロフィンを分泌させるように遺伝子導入した脈絡叢上衣細胞の移植を考慮中である。

In vitro に於ける脈絡叢上衣細胞の神経突起伸長促進作用に関与する要因として、培養上清に分泌される栄養因子および細胞表面の接着分子が考えられる。これまで少数ではあるが、脈絡叢上衣細胞に発現される接着分子、栄

養因子についての報告があるが、系統的に調べられてはいない。我々が調べた限りでは、接着分子としてNCAMおよびN-cadherinが、栄養因子としてはbFGF, IGF-1, -2, GDNFなど多くの栄養因子が発現されていることが分かった。今後は、これ等の機能分子の発現を詳しく調べ、それらが神経再生にどのように関与しているかを調べる必要があると考えられる。

#### E. 結論

脈絡叢上衣細胞は中枢神経の再生のための移植細胞として有望であると考ええる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Ide C., Kitada M., Chakraborty S., Taketomi M., Matsumoto N., Kikukawa S., Mizoguchi A., Kawaguchi S., Endo K. and Suzuki Y.: Grafting of choroid plexus ependymal cells promotes the growth of regenerating axons in the dorsal funiculus of rat spinal cord: A preliminary report. *Exp.*

*Neurol.* 167:242-251 (2001)

2. Chakraborty S., Kitada M., Matsumoto N., Taketomi M., Kimura K. and Ide C.: Choroid plexus ependymal cells enhance the neurite outgrowth from dorsal root ganglion neurons in vitro. *J Neurocytol.* (in press)

3. Mligiliche N., Kitada M. and Ide C.: Grafting of detergent-denatured skeletal muscles provides effective conduits for extension of regenerating axons in the rat sciatic nerve. *Arch. Histol. Cytol.* 64: 29-36 (2001)

4. Nishida A., Takahashi M., Tanibara H., Nakano I., Takahashi J., Mizoguchi A., Ide C. and Honda Y.: Incorporation and differentiation of neural stem cells transplanted in injured adult rat retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41:4268-4274 (2000)

5. Kataoka K., Suzuki Y., Kitada M., Ohnishi K., Suzuki K., Tanihara M., Ide C., Endo K. and Nishimura Y.: Alginate, a bioresorbable material

derived from brown seaweed, enhances elongation of amputated axons of spinal cord in infant rats. *J. Biomed. Mater. Res.* 54:373-384 (2000)

6. Shirasu M., Kimura K., Kataoka M., Takahashi M., Okajima S., Kawaguchi S., Hirasawa Y., Ide C. and Mizoguchi A.: VAMP-2 promotes neurite elongation and SNAP-25A increases neurite sprouting in PC12 cells. *Neurosci. Res.* 37:265-75 (2000)

7. Morihara 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 on dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* 91:695-706 (1999)

8. Mligiliche N. and Ide C.: Nerve regeneration through detergent-treated skeletal muscle grafts. *Peripheral Nerve* 10:79-87 (1999)

9. 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 spinal cord. *Res. Neurol. Neurosci.* 14: 251-263 (1999)

10. 井出千束：神経再生とグリア細胞 *Clin. Neurosci.* 18: 32-34 (2000)

11. 井出千束：神経の再生 脳神経科学 (伊藤正男 監修) 三輪書店 (印刷中)

12. 溝口 明、井出千束：成長円錐の伸長 脳神経科学 (伊藤正男 監修) 三輪書店 (印刷中)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

分担研究報告書

中枢神経伝導路再生軸索誘導因子の同定

分担研究者 溝口 明 京都大学医学研究科 機能微細形態学 助教授

三重大学医学研究科 神経再生学・細胞情報学 教授

研究要旨

中枢神経伝導路軸索の損傷後再生能は、現在広く認められるに至っている。従って次の最重要課題は、損傷後神経機能再建のゴールである点对点投射の回復を可能とする分子基盤の解明とヒトに応用可能な代用脊髄の開発である。本年度は、以下の3種の成果を得た。(1) 著明な損傷後再生を示した伝導路軸索の解析の結果、再生軸索が移植片内で脱束化した後、無髄神経線維の束として再集合すること、また、この再生軸索は移植片内部および宿主末梢脊髄内部において形態学的に正常なシナプスを形成することを証明した。これによって、著明な再生における再生軸索の再束化の重要性が認識された。(2) ガイダンス・キューの候補である細胞接着分子Nectinに関して、Nectinの接着機能を阻害すると、正常より小型のシナプスが正常より多数形成されることを明らかにした。このことから、Nectin-Afadin系細胞間接着機構はシナプスの位置と大きさを制御することが示唆された。(3) ヒトに応用可能な代用脊髄の候補として、ラット海馬由来の神経幹細胞に注目し、この神経幹細胞が興奮性および抑制性の機能的なシナプスを形成しうることを示した。また、この神経幹細胞は、損傷網膜に移植するとその一部は神経細胞へと分化することを明らかにした。この結果、神経幹細胞も代用脊髄組織の候補になりうることを示唆された。