

A. 研究目的

“点对点投射”を満足する形で中枢神経の損傷後機能再建を示すことは、神経再生医療のゴールである。この目標の完遂のための基礎実験として、本研究では、(1) 著明な損傷後再生の形態学的特徴の検討、(2) 健常部と損傷部のガイダンス・キューの整合性の検討、(3) ヒトに応用可能な代用脊髄の候補の選定、を実施した。

B. 研究方法

- (1) 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。
- (2) 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。
- (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。

C. 研究結果

- (1) 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。
- (2) 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。

(3) 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。

D. 考察

(1) 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。

(2) 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。

(3) 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。

E. 結論

(1) 再束化による伝導路軸索の著明な再生の証明、

(2) 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、

(3) 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。

F. 研究発表

1、論文発表

1. 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

2. 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.

3. Nishida, A., Takahashi, M., Tanihara, H., Nakano, I., Takahashi, J.B., 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.

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促進因子の同定

分担研究者 西尾 健資 京都大学医学研究科 認知行動脳科学 助手

研究要旨

昨年度までの検討から、ブタ胎仔脳には中枢軸索再生を促進する拡散性分子が存在がすると考えられる。しかし、どのようなメカニズムでこのブタ胎仔脳由来拡散性分子が中枢軸索再生を誘導しているのかは不明である。我々はこれを明らかにするために、ブタ胎仔脳細胞質分画を成熟ラット脊髄切断モデルに投与し、切断部局所におけるグリア関連分子の発現を検討した。生理的食塩水投与群では、脊髄切断後早期から GFAP 陽性アストロサイトが切断部局所において減少 (glial framework の消失) したのに対して、ブタ胎仔脳細胞質分画投与群では、早期から切断部局所において GLAST 陽性グリアが発現することを見いだした。GLAST 陽性グリアは radial glia の一種であり、radial glia は発生過程において軸索伸長を誘導することが知られている。従って、ブタ胎仔脳に含まれる拡散性分子は、損傷後早期から切断部局所において、軸索伸長を誘導する作用を持つ細胞を発現させ、この結果脊髄損傷部における軸索再生を誘導しているものと推定された。

- A. 研究目的
- | | |
|-----------------------------------|---|
| 幼若な哺乳動物の中枢伝導路は、鋭利な切断後に量的にも距離的にも経路 | に於いても正常の伝導路とほぼ同様の再生線維の伸長（非制限的再生）が認められるのに対して、成熟哺乳動物で |
|-----------------------------------|---|

はいくら鋭利に切断しても再生は認められない。我々は、この成熟動物における軸索再生不成功の原因は、成熟哺乳動物の軸索伸長能力が低いわけではなく、損傷によって局所の軸索誘導機構が失われるためと考えている。我々は昨年度までの研究で、成熟ラット脊髄切断後にブタ胎仔脳細胞質分画を投与すれば、量的にも十分な軸索再生を誘導することが出来ること、またこの分画はアストロサイトまたはその突起を一直線に配列する活性があることを見いだしている。しかし、ブタ胎仔脳由来拡散性分子が、どのようなでメカニズム軸索再生を誘導するのかは不明である。そこで、今年度はこのメカニズムを明らかにするために、損傷部局所におけるグリア関連分子の発現を検討した。

B. 研究方法

B-1) ブタ胎仔脳細胞質分画の調製

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、protease inhibitor を含む buffer で

10% (w/v) に homogenize し、4°C・16000xg・60 分間遠心。上清を凍結乾燥し、ブタ胎仔脳細胞質分画を得た。(脳凍結湿重量の約 20%重量の細胞質分画を得た。)

B-2) 成熟ラット脊髄切断モデルへのブタ胎仔脳細胞質分画の投与

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^R (Yamanouchi) 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 spongel^R を被覆した成熟ラット (Sprague-Dawley rats, P74, female, n=10) と比較した。

B-3) 切断局所の免疫組織蛍光法による検討

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 4% paraformaldehyde を用いて、灌流固定し、50 μm 凍結切片を作成して、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 neurofillament 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

ブタ胎仔脳細胞質分画の効果 (in vivo)

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 の消失は認められたが、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

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

成熟ラットの脊髄切断後早期から、局所において認められる glial framework の消失は、軸索非再生の一因と考えられた。一方、ブタ胎仔脳細胞質分画投与群において認められた損

傷部局所の幼若グリア細胞は、軸索伸長の誘導に作用しているものと推定された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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

4) 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. 34th International

Union of Physiological Sciences, Abstract. 2001

3) 西尾健資、川口三郎、伊勢田努力、長谷隆生、川崎隆之、小島憲 成熟ラットにおける脊髄損傷部局所のグリア環境の検討 第79回日本生理学会大会 広島 3.28-30. 2002

G. 知的財産権の出願・登録状況

出願番号：特願 2001-253586

名称：脊髄損傷治療剤、並びにヒト及び他の哺乳動物における脊髄損傷の治療方法 PCTによる国際出願済

研究成果の刊行に関する一覧

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)

20010632

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。