

令和元年6月24日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10900

研究課題名(和文)再生視神経回路のリハビリテーションによる視覚中枢の遺伝子発現パターン修飾

研究課題名(英文) Functional recovery and gene expression in the regenerated visual pathway after vascularized peripheral nerve graft.

研究代表者

小阪 淳 (Kosaka, Jun)

国際医療福祉大学・医学部・教授

研究者番号：40243216

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：視神経切断端への血管柄付き末梢神経移植法を改良し、高度な視覚機能の再建を目指す基礎研究を行った。網膜-視覚中枢神経の1対1のシナプス結合(retinotopy)の再構築に関わるEphA5と ephrinA2の、視神経切断前後、末梢神経移植前後の発現変動を解析する準備を整えた。血管柄付き正中神経移植、坐骨神経移植、顔面神経移植を試み、それぞれの長所短所を考察した。視神経切断による細胞変化は、軸索が切断される網膜神経節細胞のみならず、その環境を構成する網膜組織にも変化を与えることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管柄付き末梢神経移植法は、改良の余地を残している。しかし、利用する末梢神経の種類によって、侵襲の程度に大きな差があると示された点は、手術を受ける個体の状況により手術法を柔軟に変更できる可能性を示したもので、この手術法の未来への可能性を上げたと言える。一方で、視神経切断により影響を受け、細胞死に至る変化を起こすのは、視神経を軸索とする網膜神経節細胞に限られると信じられてきた。本研究成果により、網膜神経節細胞を取り巻く他の細胞種にも変化が起こり、障害の大きさに関与するのではないかと示唆されたことは、従来の中枢神経細胞死の研究領域の考え方を改訂する画期的な知見である。

研究成果の概要(英文)：We tried to develop new strategies to reconstitute once damaged visual pathway into a normal level. We have carried out localizing EphA5 and ephrinA2 quantitatively after optic nerve dissection in the retina and the superior colliculus. Three new vascularized peripheral nerve transplantation to the optic nerve stump using the median, sciatic and facial nerves were examined. We analyzed molecular alternation of retinal tissues after traumatic optic nerve injury, especially the major lipid component of cell membrane. These results suggest that not only axotomized retinal ganglion cells but also other retinal cells were influenced by traumatic optic nerve injury.

研究分野：視覚科学

キーワード：視機能再建 末梢神経移植 マイクロサージェリー

1、研究開始当初の背景

視神経は網膜神経節細胞（RGC: Retinal Ganglion Cells）の軸索であり、中枢神経系に属する。哺乳類では、視神経軸索が障害を受けると、その軸索が再伸長することはない。ラット等の実験動物で、視神経傷害部に末梢神経片を自家吻合移植するとRGCの一部は軸索を再生する。しかしその再生数は極めて少なく、網膜 - 視覚中枢神経の1対1のシナプス結合(retinotopy)も再構築されない。これらの問題点は、この実験系の臨床応用を進めるにあたって、最大の障害として立ちはだかってきた。国内外の多数の研究者が様々なアプローチでこの問題を解決しようと挑んできたが、未だ、大きな前進は見られていない。そのような状況の中、代表者は、形成外科学領域のマイクロサージェリーを活用して、視神経切断端への血管柄付き末梢神経移植の可否を検証してきた。栄養血管を保持したまま末梢神経片を視神経に移植すると、髄鞘の再形成と軸索の再伸長が促進され、長い視神経軸索の再生が見込める。本研究課題の開始時点で、血管柄付き正中神経移植法はすでに確立し、論文として発表した（Komatsu, Wakabayashi, Yamada, Matsumoto, Kimata, Kosaka, *Neuroreport*, 2013）。

2、研究の目的

本研究課題は、再伸長する視神経軸索の数をさらに増やすことに挑戦し、高度な視覚機能の回復に欠かせないretinotopyの再生を目指して、その手掛かりを得るために開始された。(1) retinotopy再構築に向けた分子レベルの手掛かりを蓄積する、(2)血管柄付き末梢神経移植法の改良と条件検討を進める、(3)視神経障害、末梢神経移植時に動態が変動する分子群の情報を蓄積する、の3点を研究目的として、具体的な実験計画を立案した、

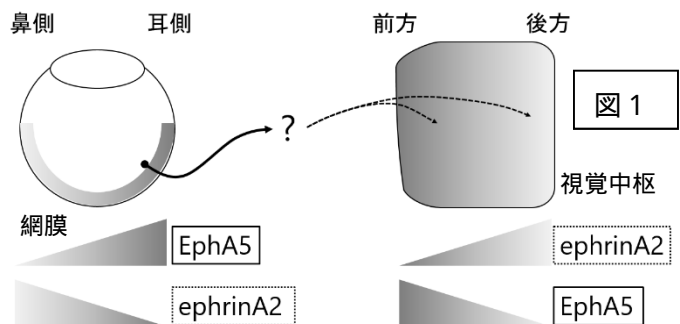
3、研究の方法

(1) retinotopy 再構築に向けた手掛かりの探索：

脊椎動物の系統発生を通じて、retinotopy を司る分子の機能は、良く保存されていることが知られている。中でも特に、Eph A5 と、 ephrin A2 分子は、網膜内と視覚中枢内でその局在の濃淡が相補的な局在になっていることが判明している（図1）。Australia の Dunlop らが、それぞれの特異抗体を用いて、視神経切断前後、末梢神経移植前後で両分子の局在変化が起こることを報告している。そこで、Eph A5 と ephrin A2 の転写レベルでの発現を詳細に解析し、最終的には、それらの発現を人為的に操作することにより、retinotopy の再構築への手掛かりをつかむことを目指した。まず、rat Eph A5 と rat ephrin A2 の既知の cDNA 配列から primer を設計した。rat 網膜 mRNA を単離精製後、これら primer で RT-PCR を行った。

(2) 血管柄付き末梢神経移植手術の改良と検討：

移植する末梢神経片を、その栄養血管を保ったまま視神経切断部に移植吻合する。正中神経を利用した血管柄付き末梢神経移植法は、ほぼ手法として確立した。しかし、正中神経では、神経束の断面が狭く、再生する視神経数は、有意ではあるがわずか 1.7 倍増加するにすぎない。そこで、最も太い末梢神経片である坐骨神経を栄養血管とともに単離し、マイクロサージェリーを利用した微細血管吻合術を用いて外頸動脈と吻合した。一方で、正中神



と正中神経を吻合した。一方で、正中神

経よりも、より眼球に近い顔面神経を用いて血管柄付き移植を試みた。

(3) 視神経障害、末梢神経移植時に動態が変動する分子群の解析：

視神経切断前後のラット網膜を、組織化学の手法を用いて解析した。軸索が切断された RGC を取り巻く組織環境をより詳細に調べるため、質量顕微鏡を用いて、網膜内の代謝や脂質局在の変化を調査した。

4、研究成果

(1) retinotopy 再構築に向けた手掛かりの探索：

Eph A5 と ephrin A2 の cDNA 断片の単離に成功した。現在、視神経切断前後の網膜（鼻側-耳側軸の横断切片）、視覚中枢（前後軸の横断切片）について *in situ* ハイブリダイゼーションによる発現解析を進めている。網膜については、代表者が開発した flatmount 標本での *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、網膜内局在の 2 次元情報を保った標本で、発現の強弱を調査する予定である。発現の強弱については、発色を tyramide-Alexa488 による蛍光発色とし、その蛍光強度を共焦点レーザー顕微鏡で定量化する(Wakabayashi, Kosaka et al., *Journal of Neurochemistry*, 2005)。以上の解析により、retinotopy 形成、ならびに、視神経切断、末梢神経移植時の retinotopy 変化と再構築の手掛かりをつかみたい。

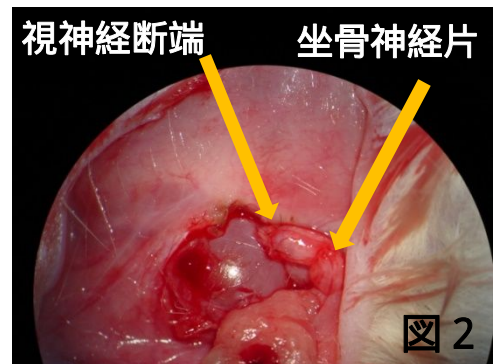
(2) 血管柄付き末梢神経移植手術の改良と検討：

血管柄付き坐骨神経移植法の術中写真を示す（図 2）。遊離栄養血管を外頸動脈に吻合し、血流を確認した。手術手技としては実施可能であることが明らかになった。坐骨神経は神経片の断面径が大きく、切断された視神経を完全に覆うことが出来る。しかしながら、donor となる坐骨神経を単離する大腿部、視神経切断・吻合手術を行う球後部、ならびに外頸動脈のある顔面頸部というように、複数の切開が必要なため、動物に大きな侵襲を与えることが判明した。今後の検討の余地を残している。

これら侵襲性を小さくするため、血管柄付き顔面神経移植を試みた（図 3）。当然であるが、これまで試みた正中神経移植、坐骨神経移植の血管柄付き末梢神経移植のうち、この顔面神経移植が、最も侵襲性が小さいことが明らかになった。しかしながら、顔面神経束断面径の小ささは予想以上で、端々吻合を行っても、視神経断面の方がはるかに大きい。以上、3 種類の血管柄付き末梢神経移植手術によって、それぞれ移植片内に視神経軸索が再伸長していることが確かめられた。それぞれの手法の長所短所が明確になったので、今後も手術手技の検討を継続してゆく。

(3) 視神経障害、末梢神経移植時に動態が変動する分子群の解析：

視神経切断前後の網膜の脂質構成を質量顕微鏡で調査した。主として細胞膜に大量に局在する phosphatidyl inositol は、正常網膜では、外顆粒層、神経節細胞層に局在していた。一方で、視神経切断後網膜では、外顆粒層での局在が低下した。ADP, ATP, AMP, UDP の局在で確認される網膜色素上皮細胞の代謝レベルは、視神経切断の影響を受けていないことが確かめられた。従って、視神経切断の際に、脈絡膜や毛様動脈が障害され、その結果として脈絡膜、色素上皮により栄養保護される光受容細胞に影響が出るとは考えにく



い。従って、上記の phosphatidyl inositol の変化は、視神経切断の直接の影響と考えるのが妥当である。phosphatidyl serine のうち、PS(18:0/22:6)は、正常網膜では内網状層に局在していた。一方、脂肪酸組成の異なる phosphatidyl serine は、局在のパターンが異なっていた。PS(18:0/20:4)・PS(18:0/18:1)は、網膜全層にわたり局在し、神経節細胞層での局在量が若干多い。視神経切断後、PS(18:0/22:6)・PS(18:0/20:4)の局在は変化がなかったが、PS(18:0/18:1)は、全層にわたり増加傾向にあった。

考察

血管柄付き末梢神経移植術は、完全に有髄化した長い視神経を再生させることが可能であり、非常に有望な手法である。しかし、ラットのような小動物を材料にして手術法を検討するには、その侵襲性の面からも難点がある。これらの手術法が、直接ヒトに応用できるわけではないが、血管柄付き末梢神経移植法が、中枢神経軸索の再生促進を図る外科的手法の一角を占めることは間違いがない。

本実験系では、眼神経の血流を傷つけることなく視神経のみを切断している。TUNEL 法による解析でも、apoptosis を示す DNA の断片化は RGC にのみ検出される。従って、これまでは RGC のみが軸索切断により障害を受け、何らかの遺伝子発現変化を起こしていると考えられていた。しかし、本研究成果により、RGC を取り巻く組織環境としての他種の網膜神経細胞、ミュラー細胞をはじめとしたグリア系細胞等にも、何らかの質的量的変化が起こっていることが強く示唆された。代表者はこれまで、RGC をターゲットとして、細胞死を防ぎ、軸索再生数を増やすことのみ着目してきた。今後は、RGC 以外の胞種も、広い意味でレスキューしていく方策を検討する必要があるかもしれない。今回の研究成果は、新しい視覚機能再建の戦略を立てる上で、さらには、中枢神経機能の再生を目指す上で、大きな知見が得られたと考えられる。

5、主な研究論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

Shibuta S, Morita T, **Kosaka J**, Kamibayashi T, Fujio Y, Only extra-high dose of ketamine affects L-glutamate-induced intracellular Ca²⁺ elevation and neurotoxicity. *Neuroscience Research* **98**: 9-16, 2015. doi: 10.1016/j.neures.2015.04.005

Koike T, **Wakabayashi T**, Mori T, Hirahara Y, Yamada H, Sox2 promotes survival of satellite glial cells in vitro. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **464**(1): 269-274, 2015. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.06.141

Morita T, Shibuta S, **Kosaka J**, Fujio Y, Thiopental sodium preserves the responsiveness to glutamate but not acetylcholine in rat primary cultured neurons exposed to hypoxia. *Journal of Neurological Science* **365**, 126-131, 2016. doi: 10.1016/j.jns.2016.04.027

Suzuki DG, Fukumoto Y, Yoshimura M, Yamazaki Y, **Kosaka J**, Kuratani S, Wada H, Comparative morphology and development of extra-ocular muscles in the lamprey and gnathostomes reveal the ancestral state and developmental patterns of the vertebrate head. *Zoological Letters* **2**: 10, 2016. doi:10.1186/s40851-016-0046-3

系数昌史、久保晃、谷口敬道、**小阪淳**、バーチャル教材を用いた解剖学演習後の学生の解剖学への興味と苦手意識の変化、*理学療法学***31**(5): 715-717, 2016.

Hirahara Y, **Wakabayashi T**, Mori T, Koike T, Yao I, Tsuda M, Honke K, Gotoh H, Ono K, Yamada H, Sulfatide species with various fatty acid chains in oligodendrocytes at different developmental stages determined by imaging mass spectrometry. *Journal of Neurochemistry* **140**: 435-450, 2017. doi 10.1111/jnc.13897

Ando A, Ando I, Suda H, Nishimoto K, Kamei S, **Kosaka J**, Nishiyama Y, Yamamoto Y, Kuroda M, Kanazawa S, The studies of in vitro distributions of radioiodinated Cobalt-bleomycin in tumor-bearing animals by the whole body autoradiography. *Radioisotopes* **66**: 307-310, 2017. doi: 10.3769/radioisotopes.66.307

Han H, **Kosaka J**, Chon S-C, Itokazu M, Kubo A, Responses of Korean physical therapy students after practice with a virtual anatomical system in Japan. *Journal of Physical Therapy Science* **29(10)**:1749-1752, 2017. doi:10.1589/jpts.29.1749

Matsumoto K, **Kosaka J**, Suami H, Kimata Y, Enhancement of lymphatic vessels in the superficial layer in a rat model of a lymphedematous response. *Plastic & Reconstructive Surgery-Global Open* **6(5)**: e1770, 2018. doi:10.1097/GOX.0000000000001770.

Shibuta S, Morita T, **Kosaka J**, Intravenous anesthetic-induced calcium dysregulation and neurotoxic shift with age during development in primary cultured neurons. *Neurotoxicology* **69**: 320-329, 2018. doi: 10.1016/j.neuro.2018.08.002

Ishii T, Hara T, Kusano S, Miura K, Kubo A, **Kosaka J**, Positive association between the cross-sectional area of the rhomboid muscle, and the range of shoulder abduction after neck dissection surgery. *Physical Therapy Research* **21(2)**: 39-43, 2018. doi: 10.1298/ptr.E9944

Takamori Y, Hirahara Y, **Wakabayashi T**, Mori T, Koike T, Kataoka Y, Tamura Y, Kurebayashi S, Kurokawa K, Yamada H, Differential expression of nuclear lamin subtypes in the neural cells of the adult rat cerebral cortex. *IBRO Reports* **5**:99-109, 2018. doi: 10.1016/j.ibror.2018.11.001.

〔学会発表〕(計 9 件)

小阪淳、*in situ* ハイブリダイゼーション組織化学法の標準化、

第 5 回国際医療福祉大学学会 2015/8/30、 国際医療福祉大学・大田原キャンパス(栃木県大田原市)

平原幸恵、**若林毅俊**、森徹自、矢尾郁子、津田雅之、本家孝一、小池太郎、後藤仁志、小野勝彦、山田久夫、質量分析イメージング法を用いたオリゴデンドロサイト分化過程の可視化．日本医用マスメクトル学会、2015/9/18、アクトシティ浜松

Wada-Hirahara Y, **Wakabayashi T**, Gotoh H, Mori T, Koike T, Ono K, Yamada H, A role for estrogen receptors

in morphological changes in oligodendrocyte maturation, 第39 回日本神経科学大会、2016/7/20、パシフィ
コ横浜

小阪淳、三木友香理、*in situ* ハイブリダイゼーション組織化学法の陰性コントロールの確立、第6回国際医療
福祉大学学会、2016/8/28、国際医療福祉大学・大田原キャンパス（栃木県大田原市）

平原幸恵、後藤仁志、若林毅俊、森徹自、小池太郎、小野勝彦、山田久夫、膜型エストロゲン受容体のオリ
ゴデンドロサイト細胞骨格構築への関与、第122 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2017/3/28、長崎大
学坂本キャンパス

小阪淳、三木友香理 *in situ*ハイブリダイゼーション用組織標本のRNase-free化条件の検討、第7回国際医
療福祉大学学会 2017/8/27 国際医療福祉大学・赤坂キャンパス（東京都港区）

平原幸恵、若林毅俊、小池太郎、高森康晴、山田久夫、視神経損傷モデルにおける視神経と網膜の質量顕微
鏡解析、第58 回日本組織細胞化学会総会・学術集会、2017/9/23-24、愛媛大学重信キャンパス

高森康晴、平原幸恵、若林毅俊、森徹自、小池太郎、山田久夫、グリア細胞における核ラミナ主要成分ラミ
ンのサブタイプ、第123 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2018/3/28、日本医科大学武蔵境校舎

小阪淳、松本久美子、三木友香理、リンパ浮腫動物モデルの作成、
第8回国際医療福祉大学学会 2018/8/26 国際医療福祉大学・赤坂キャンパス（東京都港区）

平原幸恵、若林毅俊、小池太郎、高森康晴、山田久夫、視神経損傷モデルにおける網膜の炎症反応と脂質変
化、第59 回日本組織細胞化学会総会・学術集会、2018/09/29、宮崎市民プラザ

平原幸恵、若林毅俊、小池太郎、山田久夫、視神経損傷モデルにおける網膜の環境とリン脂質分子種の変
化、第124 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2019/3/27、朱鷺メッセ・新潟コンベンションセンター

〔図書〕(計0件)

6、研究組織

(1) 研究分担者：若林 毅俊

ローマ字氏名：Wakabayashi Taketoshi

所属研究機関名：関西医科大学

部局名：医学部

職名：非常勤講師

研究者番号(8桁)：90302421