

平成30年 4月16日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15550

研究課題名(和文) 神経回路網の復元をめざす新たな脊髄損傷治療法の開発

研究課題名(英文) Research on restoration of neural networks after spinal cord injuries

研究代表者

西尾 健資(Nishio, Takeshi)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：70303790

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：成熟ラット脊髄切断モデルを用いて、現在困難と考えられている「切断部を超える軸索再生」を可能にする治療法の開発を目的として研究を実施した。当初はブタ胎仔脳由来の活性分子などの外来因子による軸索再生誘導を模索し、そのシグナル伝達経路の同定に焦点を当てて研究したが、外来因子なしでも軸索再生が成功することを見いだしたことから、内因性の軸索伸長阻害因子の同定に研究目的をシフトさせた。その結果、脊髄切断部に生じる異常軸索断片(軸索-グリア複合体)が再生軸索の伸長を阻害していることを発見し、これを除去することにより「切断部を超える軸索再生」を誘導できることを見いだした。

研究成果の概要(英文)：Axonal regeneration is very limited after transection of adult rat spinal cord. We previously demonstrated that regenerative axons reached the lesion site within 6 hours of sharp transection with a thin scalpel. However, they failed to grow across the lesion site, where injured axon fragments (axon-glia complex, AGC) were accumulated. Considering a possible role of these axon fragments as physicochemical barriers, we examined the effects of prompt elimination of the barriers on axonal growth beyond the lesion site. In this study, we made additional oblique section immediately after the primary transection and surgically eliminated the AGC (debridement). Under this treatment, regenerative axons successfully traversed the lesion site within 4 hours of surgery. These results suggest that the sequential trial of reduction and early elimination of the physicochemical barriers is one of effective approaches to induce spontaneous and rapid regeneration beyond the lesion site.

研究分野：神経再生

キーワード：軸索再生 軸索断片 軸索-グリア複合体 成熟ラット 脊髄切断

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷により白質神経路が切断されると損傷部以下の広範な神経障害が生じるが、成熟哺乳動物の中枢神経組織では、損傷部を超える軸索再生は困難であるため、この障害は永続する事が多い。

このような成熟哺乳動物の中枢神経組織における軸索再生不全の原因は、詳細不明であるが、現在のところの Nogo や MAG などのミエリン関連分子や CSPG などのグリア瘢痕関連分子が、阻害因子として有力視されている。というのは、これらの分子を抗体で阻害あるいは酵素的に分解するなどして、減弱ないし阻害した場合に、損傷部を超える軸索再生が誘導される事が報告されているからである。(Silver, J., Miller, J.H., 2004. Regeneration beyond the glial scar. Nat. Rev. Neurosci. 5. 146-156; Schwab, M.E., Strittmatter, S.M., 2014. Nogo limits neural plasticity and recovery from injury. Curr. Opin. Neurobiol. 27. 53-60)

しかし、それらの方法によっても誘導される再生軸索はわずかで、機能回復も軽度であり、軸索再生を誘導する治療法が十分に開発されているとは決して言えない状況である。

これに対して研究代表者は、幼若ラットの脊髄を切断すると、1) 何の薬剤を加えなくても、自発的に再生軸索が損傷部を超えること、2) 再生軸索は 24 時間以内に切断部を超えること、3) 再生軸索が損傷部を超えたあとは、そのままオリジナルの神経白質経路を伸長すること〔即ち、オリジナルの神経経路を回復できること〕4) 軸索再生の成功には損傷部局所の未熟アストロサイトが鍵を握っていること等を発見した。

(Iseda, T., Nishio, T., et al, 2003. Spontaneous regeneration of the corticospinal tract after transection in young rats: collagen type IV deposition and astrocytic scar in the lesion site are not the cause but the effect of failure of regeneration. J. Comp. Neurol. 464. 343-355)

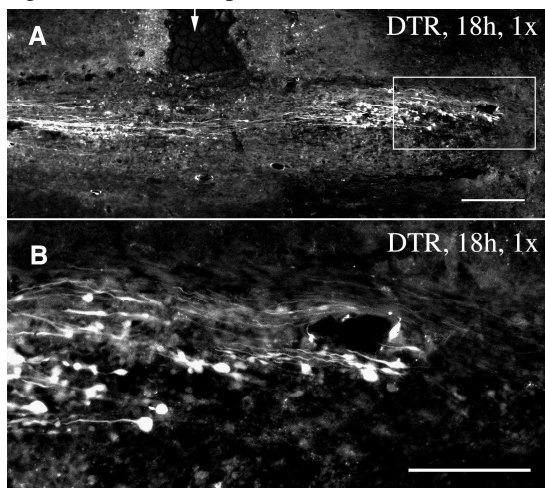


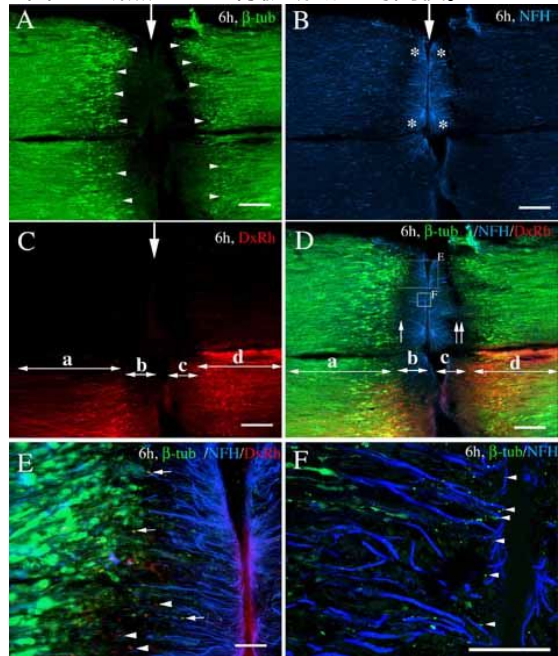
図 1：生後 14 日齢のラット脊髄切断。切断後 18 時間以内に再生軸索は損傷部を超えた。

一方、研究代表者は、成熟ラット脊髄切断モ

デルにおいて、1) 再生軸索が 6 時間以内に切断部に達していること、2) 脊髄切断後数時間以内に切断部には、異常軸索断片が生じることを発見した。

(Nishio, T., et al., 2008. Emergence of highly neurofilament-immunoreactive zipper-like axon segments at the transection site in scalpel-cordotomized adult rats. Neuroscience 155. 90-103)

図 2：成熟ラット脊髄切断 6 時間後。



切断部には neurofilament 強陽性の軸索断片が出現しており、一方、beta-III-tubulin 陽性の再生軸索はすでに 6 時間後までに切断部に達している。

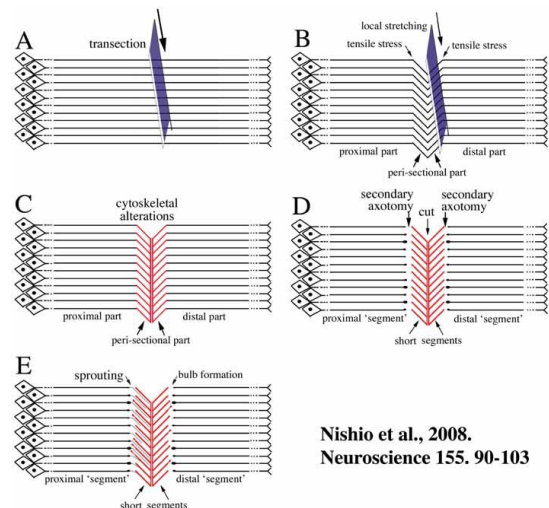


図 3： ナイフによる脊髄白質切断により切断部に異常軸索断片が生じるメカニズム。ナイフの白質への圧迫が軸索の局所的断片化(二次的軸索切断)と軸索凝集を引き起こす。

このことから、従来の軸索伸長阻害因子仮説〔定説〕に疑問を持った。何故ならば、ミエリン関連分子が軸索伸長を

障害するというが、再生軸索は一旦退縮した後、ミエリンが豊富に存在する白質経路内を伸長して切断部に達することができること、さらに、グリア瘢痕関連分子が軸索伸長を障害するというが、損傷部の瘢痕形成には切断後7日以上を要するので、再生軸索が切断面に達する術後6時間というタイミングでは、瘢痕は影も形もないので、障害できないからである。

従って、これらの定説以外の軸索伸長障害因子の候補として、切断部の異常軸索断片が新たに浮上して来たのである。

## 2. 研究の目的

本研究では、上記のように1)成熟ラット脊髄切断部に生じる異常軸索断片が、これまで指摘されて来なかった新たな軸索伸長障害因子であるか否か、また、もしそうならば、この異常軸索断片を何らかの方法で除去することにより、切断部を超える軸索再生を誘導することが出来るか否かを明らかにする事を目的とする。

また、その方法によって切断部を超える軸索再生が誘導できた場合、2)そのように早期に再生を開始して損傷部を超える再生軸索(再生的パイオニア軸索)の特徴を明らかにすることを第二の目的とする。

## 3. 研究の方法

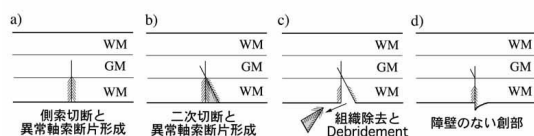
1) 実験動物：60-70日齢の成熟SDラット(N=31)(7匹を脊髄1回切断後の軸索ラベルと軸索断端の定量実験に、6匹を脊髄1回切断後の免疫組織検討に、3匹を脊髄1回切断後の電子顕微鏡検索に、6匹を脊髄2回切断と損傷部組織除去実験に、9匹を脊髄2回切断+損傷部組織除去+切断の証拠となるミクロスフェアまたはメッシュシート挿入実験に)用いた。

### 2) 外科手技

ラットを麻酔後に背側皮膚を正中切開して、脊椎後面を露出してT8-T12レベルにおいて椎弓と側方のペディクルも含めて除去して大きく脊髄背・側面を露出する。硬膜切開した後手術用顕微鏡下に脊髄左側側索をディスプレイブルナイフで切る。

1回切断の場合：そのまま止血して次の実験操作(軸索トレーシング等)に移る。

2回切断の場合：1回目の切断によって生じた局所の軸索断片を除去する目的で、一次切断部から300~500ミクロン尾側よりナイフを斜め吻側に刺入する。〔図4b〕



続いて、1次切断と2次切断に挟まれた領域の白質損傷組織を先端の細いピンセットで

除去する〔図4c〕。その際に、切断端の壊死組織も同時に注意深く除去する〔debridement〕。そして、長さの異なる断端を接合してバリアーのない非対称的な創部を作成する。

3) 脊髄切断の証拠となる異物の挿入  
蛍光ミクロスフェアは(Fluoresbrite YG microsphere 3.0 micron #17155, Polysciences, Inc. 400 Valley Road, Warrington, PA)  
エポキシ樹脂製メッシュシート：SU-8 photoresistより作成。直径125ミクロン、150ミクロンピッチで厚さ19.6ミクロンのメッシュシートを作成した。

### 4) 軸索トレーシング

テトラメチルローダミンもしくはAlexa Fluor 488標識のデキストランを脊髄切断部の近傍に注入した。

### 5) 免疫組織検索

別記参照(Nishio, T., et al., 2008. Emergence of highly neurofilament-immunoreactive zipper-like axon segments at the transection site in scalpel-cordotomized adult rats. Neuroscience 155: 90-103)

### 6) 定量的解析

軸索断端の伸長度合いを定量的に評価するために、脊髄切断-軸索トレーシング後の脊髄を水平断にフリージングマイクロトームで50ミクロン厚に切って組織切片を作成した。左側索の切断部を含む切片は1匹あたり12-17切片作成されたが、そのうち定量検索には1枚おきに用いた(7-9切片/1匹)  
これらの定量的切片を蛍光顕微鏡〔オリンパスIX-70〕下で観察して直ちに画像解析ソフトOpenlab 2.2 (Improvision, Coventry, England)を用いてコントロールぴゅうたーに取り込み、切断部から100ミクロン以内に断端が存在する軸索断端の本数を各切片毎に数えて、1匹毎に集計した。

### 7) 統計処理

切断部から100ミクロン以内に軸索断端を有する軸索の本数を切断2時間後に固定したラットと4時間後に固定したラットで比較するとき、Mann-Whitney U testを用いて統計学的に比較した。

## 4. 研究成果

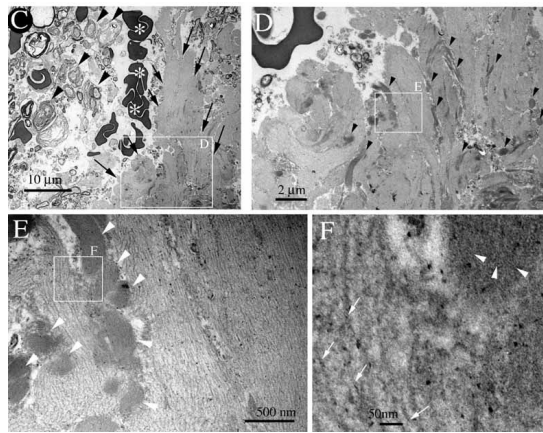
1) 再生的パイオニア軸索は4時間以内に再生を開始し、損傷部に達しており、クネクネと湾曲した特徴的な形態を持つ

2) 切断部では軸索断片とアストロサイト突起が絡んで凝集して、特異な複合体(axon-glial complex; AGC)を形成する〔図5〕。

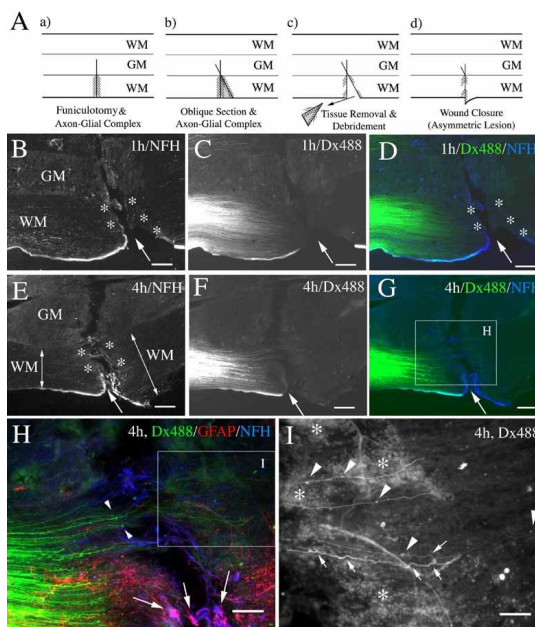
3) 切断部のAGCを除去すると損傷部を超える軸索再生が誘導できる〔図6〕

4) 切断24時間後には再生的パイオニア軸索束形成している。(図7)

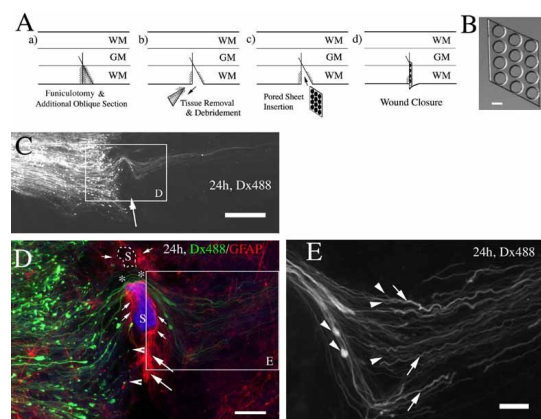




(図5)



(図6)



(図7)

この実験では、成熟ラット脊髄切断部の axon-glial complex 除去後に、エポキシ樹脂製メッシュシート（直径 125 ミクロン、150 ミクロンピッチで厚さ 19.6 ミクロン）を挿入して、24 時間後に固定した。切断を確認すると同時に再生軸索の束形成を観察した。メッシュシートを越えて再生軸索が束形成

しながら伸びている。また、束形成を電子顕微鏡でも確認した。無髄の再生軸索が束形成しながら、一部はアストロサイトの突起に接しながら挿入された人工シートの中の進入しているのが観察された。

本研究は、成熟ラット脊髄切断部において、異常軸索断片とアストロサイト突起が絡みついて形成される凝集体（axon-glial complex）の特徴を明らかにし、これを除去することにより損傷部を超える軸索再生が誘導できることを示して、この AGC が新たな軸索伸長阻害因子であることを証明した。

本研究は世界的に見ても非常にユニークな研究であり、この結果を基にさらに新たな軸索再生的な治療法を開発出来る道を開いたと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

Takeshi Nishio, Hiroshi Fujiwara<sup>2)</sup>, Isaku Kanno  
Immediate elimination of injured white matter tissue achieves a rapid axonal growth across the severed spinal cord in adult rats. *Neurosci. Res.* in Press, DOI: 10.1016/j.neures.2017.10.011 (Open Access)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

西尾 健資 (NISHIO, Takeshi)  
京都大学・医学研究科 助教  
研究者番号：70303790