

令和 4 年 5 月 6 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09595

研究課題名(和文) PACを用いた脊髄再生の検討

研究課題名(英文) Investigation of the spinal nerve regeneration using PAC

研究代表者

松山 幸弘 (Matsuyama, Yukihiro)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：20312316

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：光活性化アデニル酸シクラーゼ(Photoactivated Adenylyl Cyclase: PAC)遺伝子ベクターの脊髄への導入は困難であった。しかし、同じ中枢神経である視神経を用いて中枢神経再生能について評価したところ、PAC含有ベクターを導入した場合、コントロールベクターと比較して、損傷部位からの軸索再生が確認された。青色光照射を行わないPAC含有ベクターでは、再生軸索の働きが制限されることも確認した。またPAC含有ベクターとコントロールベクターを用いた損傷モデルを比較すると、PAC含有ベクターは軸索再生と軸索数がコントロールベクターより有意に増加していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中枢神経の再生において細胞内のcAMPが主要な役割を担っているという報告がある。今回、光活性化アデニル酸シクラーゼ(Photoactivated Adenylyl Cyclase: PAC)という光刺激により生体でのcAMPの産生をコントロールできる新技术を用いて中枢神経再生効果を組織レベルで評価した。マウスの中枢神経である視神経においてPAC導入により有意に神経再生効果がみられたことは学術的に新規性がある。また中枢神経再生は臨床的にはもちろんのこと、実験レベルにおいても困難な現状があるため、その再生をin vivoにて確認できたことは社会的意義も大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：Photoactivated Adenylyl Cyclase (PAC) genetic vector was difficult to introduce in the spinal cord. Then, nerve regeneration ability of PAC vector was evaluated using optic nerves as a central nervous system. When a PAC-containing vector was introduced, the axon regeneration was confirmed from the damage site of nerve compared to the control vector. It was also confirmed that the function of the regenerative axis was restricted in a PAC-containing vector in which blue light irradiation was not performed. When comparing the PAC-containing vector and the damage model using the control vector, PAC-containing vector increased axon regeneration and number of axons significantly than the control vector.

研究分野：脊椎脊髄外科

キーワード：PAC nerve regeneration central nervous system

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

中枢神経の再生において細胞内の cAMP が主要な役割を担っていることは多数の報告により明らかであるが、効果的に細胞内 cAMP を増加させる方法が無かった。しかし、光活性化アデニル酸シクラーゼ(Photoactivated Adenylyl Cyclase: PAC)という光刺激により生体での cAMP の産生をコントロールできる分子が報告され、この PAC 遺伝子をアデノ随伴ウイルスベクターに導入することで細胞内に PAC 遺伝子を発現させ、細胞内 cAMP 濃度を高精度に調整する技術が開発された。

2. 研究の目的

PAC 遺伝子導入ベクターを用いて中枢神経である脊髄で cAMP 濃度コントロールし脊髄再生を評価すること。

3. 研究の方法

ラットを用いて PAC の導入率を検討した。ラットは SD 系の 9 週齢メスを用いた。麻酔下に T10 高位の椎弓切除を行い、脊髄を露出しマイクロシリンジを用いて T10 高位の髄腔内に 5 μ l の PAC アデノ随伴ウイルスベクター(AAV)を投与し、導入 7 日後に脊髄の組織切片を作成し、導入率を評価し至適なベクター量を決定する方針とした。

4. 研究成果

ベクター量を 5 μ l では PAC の導入は確認出来なかったため 10 μ l まで増量、また髄腔内投与に 1 分かけて緩徐に投与することや、漏出予防ため注射後 5 分間は注射針を硬膜内に留置したままにしてから抜去するなどの調整を施行するも PAC の導入は認められなかった(図 1、PAC 導入細胞は RFP にて発光するが、有意な発光はみられなかった)。

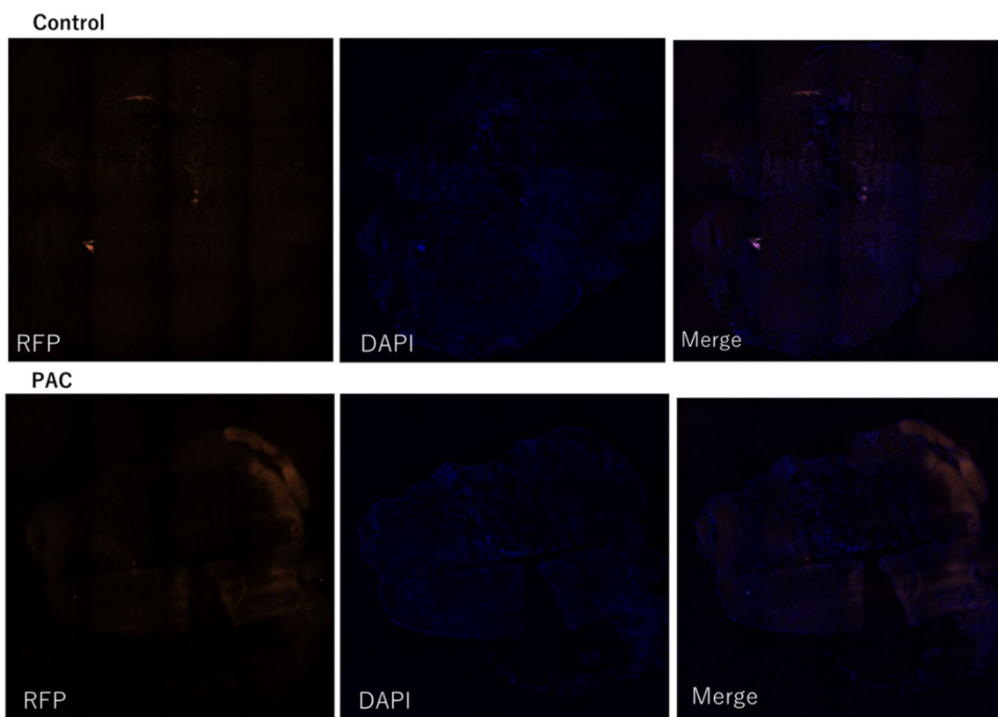


図 1

このベクターを用いた脊髄への PAC 導入は困難であると判断した。そこで同じ中枢神経である視神経を用いて中枢神経再生能について評価することとした。

PAC を導入した視神経の軸索再生への影響を評価した。PAC を導入した網膜神経節細胞(RGC)を *in vivo* 1 日目(DIV1)に刺激し、視神経を損傷した後、DIV5 より青色光を照射した。2 週間の青色光照射後、連日 30 分、合計 2 週間青色光を照射したのち、還流固定をおき凍結切片を作成、RGC からの軸索再生を評価した。まず、PAC 含有ベクターを導入した場合、コントロールベクターと比較して、損傷部位からの軸索再生が確認された(図 2-A)。次に、青色光照射を行わない PAC 含有ベクターでは、再生軸索の働きが制限されることを確認した(図 2-B)。また PAC 含有ベクターとコントロールベクターを用いた損傷モデルを比較す

ると、PAC 含有ベクターは軸索再生と軸索数を有意に増加していた (図 3-A,B)。また、青色光照射の有無にかかわらず、コントロールベクターは再生軸索の機能を欠くことを確認した (図 2-C,D)。

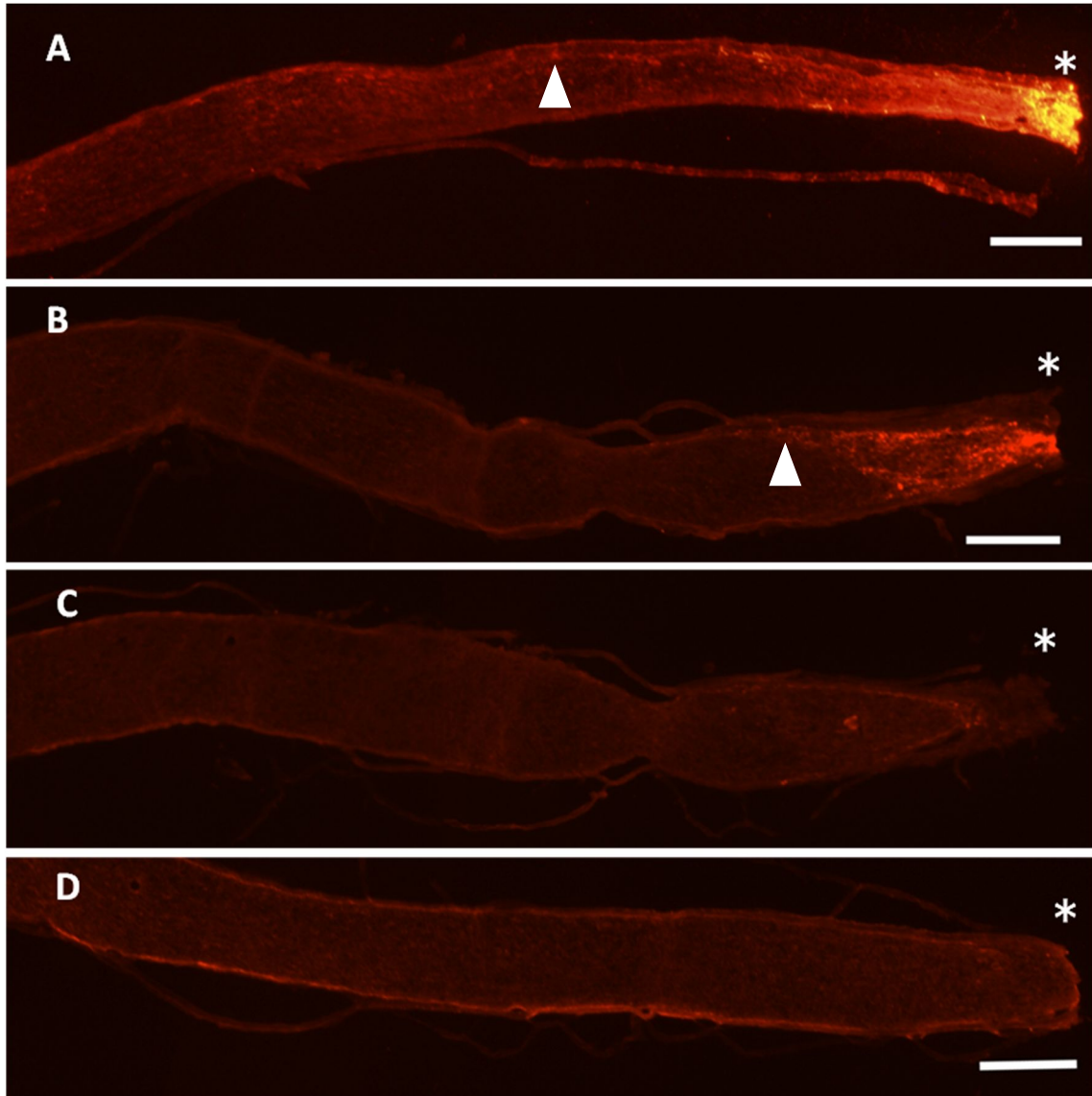


図 2：視神経損傷後の PAC 導入+ブルーライト照射による軸索再生効果
 (A) PAC 導入あり + 青色光照射あり (B) PAC 導入あり + 青色光照射なし
 (C) PAC 導入なし + 青色光照射あり (D) PAC 導入なし + 青色光照射なし

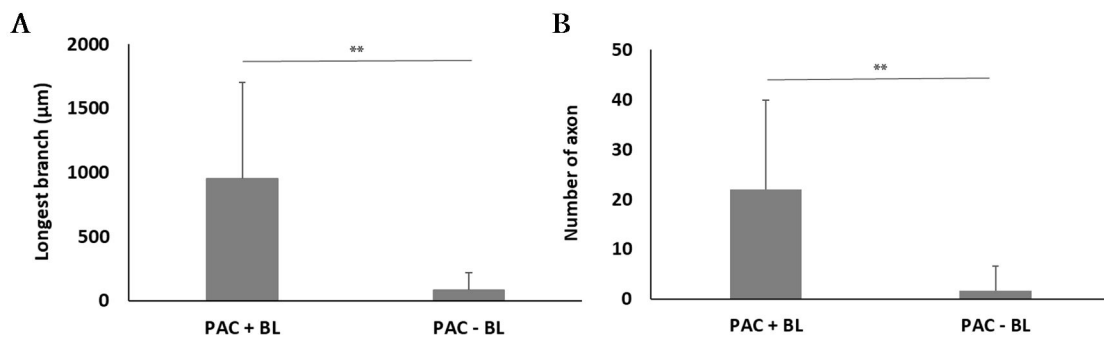


図 3：視神経損傷後の PAC 導入+ブルーライト照射による軸索再生定量評価
 (A) 損傷部からの最大軸索伸長
 (B) 損傷部位から 500 μm 定点における軸索数

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------