

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5 月 24 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592288

研究課題名（和文） マイクロサージェリーを駆使した新しい中枢神経軸索再生法の確立と分子生物学的評価

研究課題名（英文） Enhancement of axonal regeneration of CNS neurons after PN grafting by microsurgical strategy.

研究代表者

小阪 淳 (KOSAKA JUN)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：40243216

研究成果の概要（和文）：ラットの視神経切断端への血管柄付き末梢神経移植法を確立することによって、視神経軸索の再生効率がさらに上昇するかを検討した。血管柄無しの遊離末梢神経片移植の結果を対照として比較したところ、血管柄付き移植の方が視神経再生数と有髄線維数を有意に増加させることが判明した。マイクロサージェリーを駆使した末梢神経移植による中枢神経軸索再生法の有効性が確かめられた。

研究成果の概要（英文）：The purpose of the present study is to elucidate whether peripheral nerve-grafting using microsurgical method to the optic nerve stump enhances axonal regeneration of retinal ganglion cells, or not. We sutured the peripheral nerve piece with their artery and vein to the optic nerve stump of the rat. We detected the number of retinal ganglion cells with regenerating axon by retrograde labeling of Granular Blue, 1 month later from the grafting. The regenerating axons was evaluated morphologically with electron microscope. The effect of the operation was compared with the free peripheral nerve-grafting without any artery and vein. Vascularized peripheral nerve-grafting enhanced myelination of the regenerating axons. Vascularized peripheral nerve-grafting to the nerve stump is promising strategy to enhance axonal regeneration of central nervous system neurons.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：網膜神経節細胞、血管柄、視神経、神経移植、ラット

## 1. 研究開始当初の背景

中枢神経系に属する視神経が切断されると、機能的、形態的にも再生することはないとされている。さらには、視神経を軸索とする網膜神経節細胞も逆行性に変性する。

1985年、この視神経切断端に末梢神経片を移植すると、その移植片の中を視神経軸索が再伸長することが、ラットを用いて実験的に確かめられた(So & Aguayo, *Brain Res* 1985)。その後、形態的に軸索が伸長だけでなく、機能的にも再生軸索が視覚情報伝達を担えることが確かめられ(Keirsteadら, *Science* 1989)、さらには、視覚中枢と再シナプスした再生視神経を経由した視覚情報を手がかりにして、逃避行動を学習することも確かめられている(Sasakiら, *Vision Res* 1993)。この実験系は、中枢神経回路の機能再生を研究できる数少ない実験系であり、代表者を中心としたグループも、数多くの業績を重ねてきた。特に、哺乳類の網膜神経節細胞を特異的に染色・同定できるモノクローン抗体C38の単離(Wakabayashiら, *Vision Res* 1996, *Brain Res* 1996他)は、この研究分野の発展に大きく寄与することができた。この抗体を用いて、末梢神経移植を施したフェレット網膜を解析し、視神経再生細胞は網膜中心部に多いこと、再生軸索を持たない生存網膜神経節細胞は周辺部に多いこと、いずれの領域でも再生軸索を持つ細胞は、細胞体直径の大きな細胞であること等を明らかにすることが出来た(Quanら, *IOVS* 1999)。

しかしながら、この末梢神経移植による中枢神経軸索の再生実験系の欠点も、幾つか判明してきている。中でも最も重要な問題点は、末梢神経移植を施しても、再生する視神経軸索の数は高々5%であって10%を超えることはないという事実である。この問題がクリアできなければ、本実験系をヒトに応用して、末梢神経移植による視神経再生や脊髄再生を臨床医学の治療方法とすることは難しいと考えられる。

その原因は、幾つか考えられる。その大きなものとして、中枢神経軸索の再伸長を支持する神経栄養因子や軸索伸長因子が、従来の末梢神経片移植法では、不十分であることがあげられる。すなわち、遊離の末梢神経片移植では、手術当初は移植片の血流が途絶するため、神経栄養因子の供給元や、軸索再生の足場として働くシュワン細胞の生存率が低いことがあげられる。その考えに基づいて、末梢神経片移植と同時に、眼球内に神経栄養因子等を注入することにより、視神経軸索再生の環境を整えてやる戦略が立てられてき

た(Sawaiら, *J Neurosci* 1996; Watanabeら, *Neuroscience* 2003)。しかし、これまで十分な成果が得られたとは言い難い状況である。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、形成外科学分野のmicrosurgery法を用いて、視神経切断端に血管柄付き末梢神経移植術を試み、血流の途絶のない末梢神経片の移植手術法の完成を目指す。加えて、血管柄付き末梢神経移植術が、従来の遊離の血管柄無し末梢神経移植に比較して、中枢神経である視神経軸索の再生を、どの程度促進するかを吟味した。

## 3. 研究の方法

視神経切断端への末梢神経移植術は、代表者が確立した術式を基礎とする(Wakabayashiら, *Brain Res* 1996; Quanら, *IOVS* 1999)。Wistar系ラット(250g)を抱水クロラルで麻酔し、右正中神経を伴行する正中動静脈とともに剥離した。正中動静脈を遠位部で結紮し栄養動脈とする有茎血管移植として挙上した。右視神経を眼球後部で網膜中心動脈の血流を保ったまま切断し、眼球切断端に正中神経を11-0で縫合した。4週間後、蛍光色素Granular Blue(GB)で移植片を標識した。2日後、動物を4%パラフォルムアルデヒド溶液で灌流固定し、網膜を単離後伸展標本として、再生軸索を持つGB陽性の網膜神経節細胞を蛍光顕微鏡下で観察した。同時に移植片をグルタルアルデヒド溶液で固定し、エポン包埋した。標本を電子顕微鏡(Hitachi-H7100S)で観察し、有髓線維の割合を求めた。血管柄無しの遊離の正中神経片移植の結果を対照とした。

## 4. 研究成果

まず、視神経切断端に血管柄付き移植する末梢神経の起源の違いについて重点的に検討した。検討した末梢神経片は、①坐骨神経、②大腿神経、③顔面神経、④正中神経の4種である。坐骨神経と大腿神経は、神経片を栄養動静脈付きで単離し、視神経切断端に吻合すると共に、外頸動静脈と微細吻合術を施行した。顔面神経と、正中神経は、神経片の栄養血管を残した上で切断し、視神経切断端へ吻合移植した。遠位端は切断し、自由遊離片とした。

坐骨神経、大腿神経を利用した場合は、手術時間が長時間となり、術者の労力が大きいばかりでなく、手術侵襲が極めて大きく手術結果が安定しないことが判った。一方で、顔面神経、正中神経を用いた場合は、手術時間が約4時間であり、安定した結果が得られた。大腿神経、顔面神経は末梢神経の径が視神経切断端に比べて小さく、視神経全周にわたって包み込む形の吻合術が出来なかった。また、顔面神経利用時には、特に涙腺の機能が侵されることが多く、角膜表面に障害が起こり、その影響が眼球内にも波及して、結果が安定しない原因となった。

以上の結果より、視神経切断端への栄養血管柄付き末梢神経移植には、正中神経を利用するのが一番得策であるとの結論に至った。その他、これら末梢神経の選択の他に、視神経との吻合術の検討、球後部の視神経へのアプローチ法、正中神経の単離法等の細かい条件検討を行い、その術式の確立に成功するに至った。

次に、血管柄付き正中神経片を用いた末梢神経移植術の視神経再生に対する効果を詳しく評価した。移植片に蛍光色素 GB を逆行性標識し、再生軸索を持った網膜神経節細胞数をカウントした。その結果、血管柄付き移植の動物では、対照に比して約1.5倍の網膜神経節細胞が蛍光色素で標識されており、血管柄付き移植の方が視神経再生をより促進することが判明した (P<0.05)。同時にエポキシ包埋した標本の観察により、血管柄付き移植では神経周膜の構造が良く保たれている傾向があることが判明した。引き続いて、電子顕微鏡観察により移植片の再生軸索の有髄線維の割合を定量的に評価した。軸索直径の1/2以上の幅のミエリン鞘をもつ再生軸索を成熟型 (mature myelinated fiber)、1/2以下の幅の再生軸索を未成熟型 (immature myelinated fiber) の2者を判定すると共に、無髄線維 (unmyelinated fibre) を識別して3者を区別してカウントを行った。2個体のサンプルについてそれぞれ合計100本以上の軸索をランダムにカウント・評価した。その結果、血管柄無し移植では、無髄線維が70%-80%を占め、mature、immature な有髄線維の割合は、少数であった。それに比べて血管柄付き移植では、mature な有髄線維とimmature な有髄線維を合計して50%を超え過半数の線維が有髄化していることが明らかになった。

本研究は、中枢神経軸索の再生を目指す外科的治療法の開発につながるものとして、極めて意義深い。代表者が長年取り組んできた末梢神経移植を用いた視神経再生法は、さらに視覚中枢と架橋移植を行って、視覚回路を再構築させる実験系に発展させることが出来る。血管柄付き末梢神経移植により、特に

再生軸索の有髄化が促進されたことは、神経伝達速度のような再生軸索経路の視覚情報伝達機能が生理的に正常に近い能力で回復できる可能性を示唆しており、本実験系の臨床応用に、大きな期待を抱かせるものである。今後も、鋭意研究を推進していきたい。

#### 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)

[雑誌論文] (計 13 件)

1) Wakabayashi T, Mori T, Hirahara Y, Koike T, Kubota Y, Takamori Y, Yamada H: Nuclear lamins are differentially expressed in retinal neurons of the adult rat retina. *Histochemistry & Cell Biology* 査読有, **136(4)**:427-436, 2011.

2) Suami H, Chang DW, Matsumoto K, Kimata Y: Demonstrating the lymphatic system in rats with microinjection. *The Anatomical Record* 査読有, **294**:1566-1573, 2011.

3) Onoda S, Sakurada M, Asano T, Miyamoto S, Beppu Y, Chuman H, Kawai A, Nakatani F, Kimata Y: Use of vascularized free fiber head grafts for upper limb oncogenic reconstruction. *Plastic and Reconstructive Surgery* 査読有 **127**:1244-1253, 2011.

4) Wakabayashi T, Kosaka J, Mochii M, Miki M, Mori T, Takamori Y and Yamada H: C38, equivalent to BM88, is developmentally expressed in maturing retinal neurons and enhances neuronal maturation. *Journal of Neurochemistry* 査読有 **112**, 1235- 1248, 2010.

5) Wakabayashi T, Kimura T, Yamada H: C38 is a neuron specific mitochondrial protein that controls neuronal development. *Journal of Kansai Medical University* 査

読有, 62:7-12, 2010.

6) Satoh T, Yamashita S, Yasuoka T, Hasegawa K, Namba Y, Kimata Y, Repositioning of the malpositioned ear with a new technique of fascia lata suspension. *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery* 査読有, 63(2):e161-e163, 2010.

7) Sekiguchi-Tonosaki M, Obata M, Haruki A, Himi T and Kosaka J: Acetylcholine induces Ca<sup>2+</sup> signaling in chicken retinal pigmented epithelial cells during dedifferentiation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 査読有 296:C1195-C1206, 2009.

8) Takamori Y, Mori T, Wakabayashi T, Nagasaka Y, Matsuzaki T, Yamada H: Nestin positive microglia in adult rat cerebral cortex. *Brain Research* 査読有, 1270:10-18, 2009.

9) Mori T, Wakabayashi T, Takamori Y, Kitaya K, Yamada H: Phenotype analysis and quantification of proliferating cells in the cortical gray matter of the adult rat. *Acta Histochemica et Cytochemica* 査読有 42(1):1-8, 2009.

10) Namba Y, Watanabe T, Kimata Y: Mastectomy in female-to-male transsexuals. *Acta Medica Okayama* 査読有, 63(5):243-247, 2009.

11) Ujike H, Otani K, Nakatsuka M, Ishii K, Sasaki A, Oishi T, Sato T, Okahisa Y, Mastsumoto Y, Namba Y, Kimata Y, Kuroda S: Association study of gender identity disorder and sex hormone-related genes. *Progress in Neuro-psycho-pharmacology and Biological Psychiatry* 査読有, 33(7):1241-1244, 2009.

12) Mimura H, Fujiwara H, Hiraki T, Gobara H, Mukai T, Hyodo T, Iguchi T, Yasui K, Kimata Y, Kanazawa S: Polidocanol sclerotherapy for painful venous malformations: evaluation of safety and efficacy in pain relief. *European Radiology* 査読有, 19(10):2474-2480, 2009.

13) Kadota H, Sakakibara M, Kimata, Y, Yano T, Hayashi R: Analysis of thrombosis on postoperative day 5 or later after microvascular reconstitution for head and neck cancers. *Head and Neck* 査読有, 31(5):635-641, 2009.

[学会発表] (計 4 件)

1) 小松星児、松本久美子、徳山英二郎、山田潔、木股敬裕、小阪 淳  
「血管柄付き末梢神経移植によるラット視神経再生」20 回形成外科学会・基礎学術集会、2011 年 10 月 6 日～7 日、東京

2) 小阪 淳、関口-外崎真理子  
「網膜色素上皮細胞の脱分化過程におけるアセチルコリン応答性の変化」第 116 回日本解剖学会総会、第 88 回日本生理学会大会合同大会、(2011 年 3 月 28 日～30 日東京→誌上開催に変更)

3) 若林毅俊、大村大輔、小阪 淳、森 徹自、高森康晴、平原幸恵、小池太郎、山田久夫  
「P19EC 細胞のニューロンへの分化過程におけるミトコンドリアの形態変化」第 116 回日本解剖学会総会、第 88 回日本生理学会大会合同大会、(2011 年 3 月 28 日～30 日東京→誌上開催に変更)

4) 若林毅俊、小阪 淳、森徹自、高森康晴、北宅弘太郎、山田久夫  
「神経特異的分子 C38 の細胞内局在と分子機能」第 115 回日本解剖学会総会、2010 年 3 月 28 日～30 日、岩手

[産業財産権]

○取得状況（計1件）

名称：基板、及び標的物質の定量方法  
発明者：小阪淳、佐々木順造  
権利者：国立大学法人・岡山大学  
種類：特許  
番号：特許第4882071号  
取得年月日：平成23年12月16日  
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://square.umin.ac.jp/oka-anat/kosaka/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小阪 淳 (KOSAKA JUN)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授  
研究者番号：40243216

(2) 研究分担者

若林 毅俊 (WAKABAYASHI TAKETOSHI)  
関西医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：90302421

木股 敬裕 (KIMATA YOSHIHIRO)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：50392345

(3) 連携研究者