

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25年 5月28日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22791339

研究課題名（和文） 成体脳における脳内伝導路の再生誘導

研究課題名（英文） Regeneration of lesioned tract fibers in the adult brain

研究代表者

福島 菜奈恵（FUKUSHIMA NANAÉ）

信州大学・医学部・准教授

研究者番号：90334888

研究成果の概要（和文）：嗅覚の脳内伝導路である外側嗅索を成熟ラットにおいて切断後、切断部に発現する軸索伸長阻害因子（コンドロイチン硫酸プロテオグリカン・ミエリン関連蛋白）を排除することによって、成体脳での脳内伝導路の再生を誘導する実験を行った。コンドロイチン硫酸プロテオグリカン分解酵素の切断部への注入、および髄鞘化されていない自然再生後の外側嗅索の再切断により軸索伸長阻害因子の影響を減少させた結果、切断部を超えて伸長する再生線維の存在が確認された。

研究成果の概要（英文）：Chondroitin sulfate proteoglycans (CSPGs) and myelin-associated proteins are known as axon-inhibitory molecules. Axonal regeneration after transection of the lateral olfactory tract (LOT), the main fiber tract of the central olfactory system, was promoted in the adult brain by degradation of CSPGs or re-transection of the naturally regenerated-LOT that consisted of unmyelinated fibers.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、脳神経外科学

キーワード：神経再生、嗅覚機能、脳内伝導路

1. 研究開始当初の背景

神経再生については多くの研究が行われてきたが、中枢神経系、特に脳外傷後の再生に関しては、いまだに多くの課題を残している。これまでの実験から、新生児ラットにおいて脳内伝導路を損傷しても自然再生することを確認した。しかし、成熟ラットでは新生児期とは異なり、脳内伝導路の損傷後の自然再生は起こらない。成熟ラットの脳内には、軸

索伸長阻害因子であるコンドロイチン硫酸プロテオグリカンや髄鞘関連蛋白が存在することがその大きな要因として考えられている。そこで、成熟ラットの脳内伝導路を損傷後、損傷部における軸索伸長阻害因子を排除し、成体脳においても脳内伝導路を再生することを目的として本研究を計画した。

2. 研究の目的

外側嗅索は、嗅神経からの嗅覚情報を嗅球から嗅皮質へと伝達する嗅球ニューロン（僧帽細胞）の軸索の集合体で、嗅覚における主要な神経伝導路である。これまでの実験で、新生児期に外側嗅索を切断されたラットでは自然再生が起こること、切断4週間後には切断部を超えて伸長する再生線維が存在することを確認した。さらに嗅覚機能検査を行った結果、機能的にも再生し、嗅覚が回復したことを確認した。そこで次に、同様の外側嗅索切断実験を成熟ラットで行ったが、新生児ラットで観察されたような構造的また機能的な自然再生を確認することはできなかった。成体脳における損傷後の神経再生が困難なことは広く知られているが、その大きな要因として考えられているのが再生線維の伸長を阻害する因子の存在であり、グリア瘢痕由来のコンドロイチン硫酸プロテオグリカンと髄鞘に存在するミエリン関連蛋白の軸索伸長阻害作用がよく知られている。実際に新生児期の脳内においては、グリア細胞が未熟で、傷害による損傷部にグリア瘢痕が形成されず、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンがほとんど存在しないこと、また、新生児期には髄鞘が形成されていないことが確認されており、この2つの要因が新生児期の外側嗅索切断後の自然再生を可能にしたと考えられた。そこで、成熟ラットにおいても軸索伸長阻害因子の働きを抑制することによって、切断後の外側嗅索の再生を促し、構造的かつ機能的な神経再生を目的として本研究を実施した。

3. 研究の方法

(1) 外側嗅索切断ラットの作成

成熟ラット（12週齢）に麻酔をかけ、手術用顕微鏡下で左側の外側嗅索を露出した後、眼科用角膜切開メスで鋭利に外側嗅索を切断した。外側嗅索が完全に切断されていることを確認するため、外側嗅索切断後に逆行性の神経トレーサー（Fluoro-Gold (FG)) を切断部より後方の嗅皮質（梨状葉皮質）へ注入した。

(2) イブプロフェン（非ステロイド系抗炎症薬）による再生誘導

グリア瘢痕の形成は、炎症反応を抑えることによって抑制することができる。そこで、グリア瘢痕由来の軸索伸長阻害因子であるコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの発現を抗炎症薬によって抑制し、外側嗅索の再生を促すことを目的として実験を行った。(1)の方法で外側嗅索切断ラットを作成後、ラットの皮下にイブプロフェンをつめた浸透圧ポンプを埋め、イブプロフェンの持続投与を

行った。外側嗅索を切断してから4～6週後に、再生線維の有無を確認するため、順行性の神経トレーサー（Biotynylated Dextran Amine (BDA)) を嗅球へ注入した。BDAの注入4日後に灌流固定し脳を取り出し、外側嗅索に平行な面で凍結切片（50 μm厚・300 μm間隔）を作成した。切片を蛍光顕微鏡下で観察し、嗅球にFG陽性の僧帽細胞が観察された場合は、外側嗅索の不完全切断例として実験から除外した。完全切断例においてBDAを検出し、BDA陽性線維を観察した。

(3) コンドロイチナーゼABC（コンドロイチン硫酸プロテオグリカン分解酵素）による再生誘導

グリア瘢痕由来の軸索伸長阻害因子であるコンドロイチン硫酸プロテオグリカンを積極的に酵素分解することによって、外側嗅索の再生を促すことを目的として実験を行った。(1)の方法で外側嗅索切断ラットを作成し、最もコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの発現が多い外側嗅索切断7日後に、切断部を含む嗅索全体に及ぶようにコンドロイチナーゼABCを注入した。外側嗅索を切断してから4～6週後に、(2)の実験と同様にBDAの注入、灌流固定、凍結切片の作成、不完全切断例の除外を行い、完全切断例におけるBDAの検出およびBDA陽性線維の観察を行った。

(4) 新生児期外側嗅索切断ラットを用いた外側嗅索再切断後の再生誘導

新生児期に切断され自然再生した外側嗅索には髄鞘がほとんど存在しないことを利用し、軸索伸長阻害因子であるミエリン関連蛋白の影響の少ない条件下において再度切断することによって、外側嗅索の再生を促すことを目的として実験を行った。生後1日の新生児ラットに冷凍麻酔をかけ、左側外側嗅索を鋭利に切断した。外側嗅索が完全に切断されていることを確認するため、逆行性の神経トレーサー（Fast Blue (FB)) を切断部より後方の嗅皮質（梨状葉皮質）へ注入した。成長後、(1)の方法で再度左側の外側嗅索を切断した。2回目も外側嗅索が完全に切断されていることを確認するため、FGを切断部より後方の嗅皮質（梨状葉皮質）へ注入した。1回目と2回目に別の逆行性トレーサーを使用することによって、それぞれに切断判定をすることが可能である。外側嗅索を切断してから4～6週後に、(2)の実験と同様にBDAの注入、灌流固定、凍結切片の作成を行い、嗅球にFB陽性またはFG陽性の僧帽細胞が観察された場合は、外側嗅索の不完全切断例として実験から除外した。完全切断例においてBDAを検出し、BDA陽性線維の観察を行った。

(5) 嗅覚機能検査

外側嗅索を切断し軸索再生を促したラットが、機能的にも再生したかどうかを確認する実験として行った。外側嗅索を切断してから4週後に、嗅覚機能を左側（切断側）のみとするために右側（非切断側）の嗅球を吸引し除去した。ラットを2日間絶水させた後に、水道水とシクロヘキシミド溶液を嗅覚によって識別できるかどうかで嗅覚の有無を判定した。検査は外側嗅索切断の4週後、6週後、8週後、10週後に行った。

4. 研究成果

(1) 外側嗅索の構造的な再生

① イブプロフェンの効果

イブプロフェンの持続投与により炎症反応を抑え、切断部におけるグリア瘢痕の形成を抑制し、グリア瘢痕由来の軸索伸長阻害因子であるコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの発現を減少させることによって、外側嗅索が再生することを期待した。しかし、切断部を超えて伸長するBDA陽性の再生線維は観察されず、外側嗅索の再生に対するイブプロフェンの効果は確認できなかった。

② コンドロイチナーゼABCの効果

切断部に発現するグリア瘢痕由来の軸索伸長阻害因子であるコンドロイチン硫酸プロテオグリカンを、切断部に注入したコンドロイチナーゼABCによって分解し除去した結果、外側嗅索が完全に切断されたラットにおいて、外側嗅索の切断4週後に、切断部を超えて伸長するBDA陽性線維の存在が確認され、コンドロイチナーゼABCによって外側嗅索の再生が誘導されることを証明した。

③ 非髄鞘化外側嗅索切断の効果

新生児期外側嗅索切断ラットの自然再生後の外側嗅索を再切断することによって、切断部における髄鞘由来のミエリン関連蛋白を減少させた結果、外側嗅索が2回とも完全に切断されたラットにおいて、外側嗅索を再切断してから6週後に、切断部を超えて伸長するBDA陽性線維の存在が確認された。成熟ラットにおいても、髄鞘がほとんどない条件下では、外側嗅索の再生が誘導されることを証明した。

(2) 新生児期外側嗅索切断ラットにおける新たな髄鞘化線維束の出現

外側嗅索の再生を誘導する実験の1つとして、新生児期外側嗅索切断ラットを作成し、そのラットの外側嗅索が自然再生した後に再度外側嗅索を切断する実験を行ったが、その実験の中で、自然再生後の脳に異所性の新たな神経線維束を発見した。追加実験を行い、

新生児期外側嗅索損傷ラットにおける外側嗅索の再構築について調べた結果、新生児期に外側嗅索を完全に切断されたラットの脳において、本来の外側嗅索の位置とは異なる場所（嗅脳溝直下）に再生線維による新たな細い髄鞘化線維束が出現していること、また、その再生した線維の投射範囲は正常ラットと比較すると吻側に限局していることがわかった。さらに、不完全切断（一部損傷）例においても、切断されずに残存した外側嗅索に加えて、完全切断ラットと同様の新たな髄鞘化線維束が出現することを発見した。

(3) 外側嗅索の機能的な再生

外側嗅索の構造的な再生が確認されたため、次に機能的な再生について調べた。コンドロイチナーゼABCによって外側嗅索の再生を誘導したラットを用いて、外側嗅索を切断してから4週後、6週後、8週後、10週後と定期的に嗅覚機能検査を行ったが、切断10週後においても嗅覚機能の回復は確認できなかった。しかし、これらのラットの嗅球にBDAを注入し、灌流固定、凍結切片の作成、BDAの検出、BDA陽性線維の観察を行った結果、切断部を超えて伸長する再生線維の存在が確認された。外側嗅索の構造的な再生は誘導されたものの、機能的な再生（嗅覚の回復）にはさらに多くの再生線維が必要であると考えられた。

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1件）

- ① Fukushima N, Yokouchi K, Sakamoto M, Sekiguchi Y, Koike H, Kawagishi K, Moriizumi T. Analysis of spontaneous regeneration of olfactory structures with emphasis on myelination and re-innervation of cortical areas. *Neurosci Lett* 537: 35-39, 2013, 査読有
DOI: 10.1016/j.neulet.2013.01.016

〔学会発表〕（計7件）

- ① 福島菜奈恵, 横内久美子, 小池央, 川岸久太郎, 森泉哲次. 成熟ラットにおける脳内伝導路の再生誘導, 第118回日本解剖学会, 2013.3.29, 高松
- ② 福島菜奈恵, 小池央, 横内久美子, 川岸久太郎, 掛川晃, 住友深憲, 森泉哲次. 新生児期外側嗅索損傷ラットにおける伝導路の再構築, 第117回日本解剖学会, 2012.3.28, 甲府

- ③ 小池央, 横内久美子, 川岸久太郎, 掛川晃, 住友深憲, 森泉哲次, 福島菜奈恵, 外側嗅索再生の阻害因子に対するコンドロイチナーゼABCの効果, 第117回日本解剖学会, 2012. 3. 28, 甲府
- ④ 福島菜奈恵, 横内久美子, 平山周一, 川岸久太郎, 森泉哲次. 外側嗅索損傷新生児ラットにおいて出現する髄鞘化線維束について, 第45回日本味と匂学会, 2011. 10. 6, 金沢
- ⑤ 福島菜奈恵, 小池央, 横内久美子, 関口泰之, 川岸久太郎, 掛川晃, 住友深憲, 森泉哲次. Regeneration of the lateral olfactory tract in the neonatally tract-transected young adult rats, 第116回日本解剖学会, 2011. 3. 30, 横浜
- ⑥ 小池央, 福島菜奈恵, 横内久美子, 関口泰之, 川岸久太郎, 掛川晃, 住友深憲, 森泉哲次. Induction of axonal regeneration by chondroitinase ABC in the lateral olfactory tract of adult rats, 第116回日本解剖学会, 2011. 3. 30, 横浜
- ⑦ 関口泰之, 横内久美子, 福島菜奈恵, 川岸久太郎, 森泉哲次. 外側嗅索再生へのイブプロフェンの効果, Neuro 2010, 2010. 9. 3, 神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福島 菜奈恵 (FUKUSHIMA NANAE)
信州大学・医学部・准教授
研究者番号：90334888

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：