

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500414

研究課題名(和文) 脊髄損傷モデルにおける軸索再生現象の比較解剖学的解析

研究課題名(英文) Comparative anatomy of the axon regeneration after spinal cord injury models

研究代表者

船越 健悟 (FUNAKOSHI, Kengo)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60291572

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類と異なり、非哺乳類の脊髄損傷では損傷部位を超える自発的な軸索再生が認められ、運動機能が回復することがある。キンギョの脊髄半切モデルでは、再生軸索が損傷部を超える際、瘢痕の中に出来るラミニン陽性の管状構造の内部を通過するが、この管状構造は軸索と一緒に侵入してくるグリア線維と基底膜によってつくられることが明らかになった。同様な再生過程はキンギョの脊髄挫滅モデルでも認められた。一方、両棲類の脊髄切断モデルでは、再生軸索は瘢痕を避けて損傷部を通過しており、明らかな違いが認められた。

研究成果の概要(英文)：In contrast to mammals, spontaneous nerve regeneration beyond the lesion site occurs in non-mammals after spinal cord lesions, resulting in the good recovery of locomotive activities. In a goldfish hemisection model, regenerating axons beyond the lesion site pass through the laminin-positive tubular structures formed in the scar. We confirmed that these tubular structures were formed by the glial fibers and the basement membrane, which entered the scar in combination with the axons. Similar regenerative processes were observed also in a goldfish compression model. In amphibian models, on the other hand, the regenerating axons beyond the lesion site avoid the scar tissue, suggesting that this model is quite different from the goldfish model.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経解剖学・神経病理学

キーワード：脊髄損傷 神経再生 魚類 両棲類 比較神経科学

1. 研究開始当初の背景

(1) 哺乳類の脊髄損傷による運動機能障害の原因の一つとして、損傷部位に形成される瘢痕組織が軸索の再生を阻害していることが挙げられる。一方、非哺乳類では、脊髄を切断しても、しばらくすると脊髄下行性軸索が再生し運動機能が回復することがあるが、そのメカニズムには不明な点が多く、どのような因子が軸索再生に関わっているのかは明らかではなかった。

(2) 我々は、本研究開始前から、キンギョの脊髄半切モデルにみられる軸索再生現象について以下のことを明らかにしていた。

遊泳運動に関わる脳幹の核からの脊髄下行路が、線維性組織からなる瘢痕部を越えて再生し、脊髄運動ニューロンや介在ニューロンへ投射していること、損傷後に脊髄におけるニューロン発生が亢進し、セロトニンを含む新生ニューロンが数多く瘢痕部に定着する。

瘢痕部には線維性組織が存在するものの、肥大化アストロサイトからなるグリア瘢痕は形成されず、哺乳類の瘢痕で再生軸索の伸長を阻害するとされているグリア由来軸索伸長阻害因子・コンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPGs) の発現は強くない。

軸索再生時には、ラミニンに陽性を示す細長い管状の構造物が、神経組織との境界部分から線維性瘢痕の内部に陥入し、その管の中に再生軸索や、セロトニンニューロン、グリア線維が侵入する。

時間の経過とともに、瘢痕組織や空洞は縮小する一方、再生軸索を包む管状構造物は拡大し、瘢痕部を通過する軸索の数は正常時の90%に達する。

(3) 脊髄切断後の軸索再生は、その他の非哺乳類でも報告されているが、線維性瘢痕の有無や、ニューロン新生、CSPGs の発現、さらにミエリン関連糖タンパク質 (MAG)、ミエリン由来軸索伸長阻害因子などの発現パターンを調べた組織学的な解析は乏しく、損傷部を再生軸索が通過する過程については不明な点が多かった。また、キンギョを含め非哺乳類の脊髄再生研究は、ほとんどが脊髄切断モデルを用いたものであり、挫傷や圧迫などのモデルでは、どのような病態や再生現象が見られるかについても不明であった。

2. 研究の目的

(1) キンギョ脊髄半切モデルにおける、軸索再生現象をより詳細を明らかにし、再生軸索に直接影響を与えている因子を明確にする。具体的には、

線維性瘢痕を軸索が通過する際に鍵となるラミニンに陽性を示す管状構造は何に由来するのか？

再生軸索がラミニン陽性管状構造に侵入する際に、グリアはどのような役割をしているのか？

ラミニン陽性管状構造を構成する細胞性要素は何か？また、再生軸索とはどのような形態学的関連を持っているのか？

グリア由来の軸索伸長抑制因子は、軸索伸長にどのような影響を与えているのか？

(2) キンギョの脊髄に圧迫を加えた挫滅モデルにおいて、以下の点を明らかにし、半切モデルと比較する。

運動の回復は認められるか？

損傷部に線維性瘢痕組織が形成されるか？

損傷部を通過する軸索再生がみられるか？

再生を促進する組織変化がみられるか？

CSPG や、ミエリン由来軸索伸長阻害因子はどの程度発現しているか？

ニューロン新生があるか？

(3) キンギョ以外の非哺乳類の軸索再生現象について、両棲類の脊髄損傷モデルを用いて以下の点を明らかにする。

損傷部の組織像

軸索伸長阻害因子の発現

ラミニンなど軸索伸長促進因子の発現

これらの物質と軸索との形態学的関連

(4) ラットの脊髄損傷モデル

ラットでは薬剤の投与により、再生軸索の瘢痕への侵入を促進することができる。本研究では、哺乳類と非哺乳類の再生現象の共通点と相違点を明らかにする目的で、ラットモデルにおける解析も行った。

3. 研究の方法

(1) モデルの作成

キンギョ脊髄半切モデル

麻酔下で上位脊髄の左側をハサミで切断し、3日、1週間、2週間、3週間、4週間、6週間、12週間生存させた。

キンギョ挫滅 (圧迫) モデル

麻酔下で上位脊髄をクリップで圧迫し、3日、1週間、2週間、3週間、4週間、6週間、12週間生存させた。

アフリカツメガエル (ゼノパス) モデル
麻酔下で脊髄をメスで切断し、一定期間生存させた。

ラットモデル

麻酔下で下位胸髄をメスで切断し、損傷部に選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) を、浸透圧ポンプを用いて持続的に投与し、

一定期間生存させた。

(2) 逆行性トレーサー標識

動物を再麻酔し、切断部位の尾側を再切断し、デキストランアミンを注入する。3 - 4日後に灌流固定し、切断部位を含む脊髄を取り出し、クリオスタットで凍結切片を作成した。

(3) 透過電子顕微鏡観察

ラミニン陽性管状構造の詳細と、その再生軸索との形態学的関係を明らかにするため、癒痕を含む損傷部を透過電子顕微鏡で観察した。具体的には、損傷部を取り出しグルタル固定を施した後、エポキシ樹脂に包埋し、ウルトラミクロームで超薄切片を作成した。電子染色の後、透過型顕微鏡で再生軸索とグリア細胞、線維芽細胞、血管、基底膜などとの関係を観察した。

(4) 免疫組織化学を含む組織化学染色観察
凍結切片に対し、免疫組織化学など組織染色を施し、損傷部位の組織化学的解析を行った。免疫組織化学に使用した抗体は以下の通りである。

抗グリア線維性酸性タンパク(GFAP)抗体
抗ラミニン抗体
抗コラーゲン-1抗体
抗フィブロネクチン抗体
抗アセチル化チュブリン抗体
抗ニューロフィラメント抗体
抗ビメンチン抗体
抗ネスチン抗体
抗線維芽細胞増殖因子-1抗体
抗セロトニン抗体
抗NG2抗体
抗CD-31抗体
抗ZO-1抗体
抗S-100抗体
抗O1(オリゴデンドロサイト)抗体
抗MAG抗体
抗Nogo-A抗体

4. 研究成果

(1) キンギョ脊髄半切モデル

ラミニン陽性管状構造の由来について
ラミニン陽性管状構造について、当初血管とそれに付随する基底膜の可能性があると予想されたが、この管状構造はtomato lectinの組織染色によっては明瞭に標識されず、tomato lectinを血管内投与した場合も染色されなかったことなどから、血管とは異なる組織であることが明らかになった。

そこで、ラミニン陽性管状構造の経時的変化を詳細に検討したところ、損傷後しばらくすると線維性癒痕とまわりの神経組織との間にラミニン陽性のグリア境界膜が形成され、管状構造はこのグリア境界膜と連続性を持っていること、またグリア境界膜は髄膜との連

続を保っていることが明らかになった。

再生軸索がラミニン陽性管状構造に侵入する際のグリアの役割

線維性癒痕に侵入した再生軸索はラミニン陽性の細い管状構造の中を通過してゆく。この管状構造は時間の経過とともに内腔が拡大し、それとともに管内を通過する再生軸索の数も増加する。

GFAPをグリアマーカーとした光学顕微鏡での観察では、内部にGFAP陽性線維を含まない管状構造が多数認められたことから、再生軸索はグリア線維とは関係なく癒痕内に伸長してゆくものと推測されたが、透過型電子顕微鏡で詳細に観察したところ、再生軸索が線維性癒痕に侵入する部位では、ほとんどすべての再生軸索はグリア線維に被われていた。また、グリア線維とまわりの癒痕組織との間には基底膜の存在が確認された。

また、線維性癒痕内の軸索の中には、1本から数本の単位でシュワン細胞に包まれているものが存在し、シュワン細胞の外側には基底膜が存在することが明らかになった。これらのことから、脊髄切断後に遊走してきたシュワン細胞も再生軸索に何らかの影響を持っている可能性が示唆された。

ラミニン陽性管状構造の細胞性要素と再生軸索との形態学的関連

透過型電子顕微鏡による観察によって、細い管状構造だけでなく、内径が広い管状構造の壁もグリア線維と基底膜によって形成されていることが確認された。これらのことから、再生軸索とともに線維性癒痕に侵入するグリア線維こそが管状構造を構成要素であり、ラミニンはグリア線維を包む基底膜が発現しているものと結論付けられた。

グリア由来軸索伸長抑制因子の影響

グリア由来軸索伸長抑制因子NG2は、線維性癒痕部位に一致して発現の増強が認められた。軸索はNG2の発現が強い部位を避けるように伸長していたが、時間の経過とともに発現が減弱してくると、NG2を発現している部位を貫通する軸索が認められた。したがって、NG2は再生軸索の伸長を阻害する働きを持っている可能性があるものの、その阻害効果は限定的なものにとどまっていると考えられた。

キンギョ半切モデルの研究成果は、国際的な学術雑誌に投稿し、現在掲載に向けて最終版の完成を目指しているところである。

(2) キンギョ脊髄挫滅(圧迫)モデル

計画では半切モデルと同様、損傷後12週まで、段階的に組織学的解析を行う予定であったが、研究期間内にすべては完了しなかった。しかし、脊髄半切モデルとの間に以下のような共通点と差異を認めることができた。

運動の回復は半切モデルと同程度以上に認められた。

損傷部には髄膜の外側に線維性組織が形成される。

再生軸索は線維性組織を好んで通過する。線維性組織内には、半切モデルと同様に、ラミニン陽性の管状構造が現れ、再生軸索は管状構造内を通過してゆく。

線維性組織には NG2 の発現が認められる。

(3) 両棲類脊髄切断モデル

これまで有尾両棲類では切断部を越えて軸索が再生するが、無尾両棲類では再生しないとされていた。しかし、今回ゼノパスで確かめたところ、無尾両棲類でも、損傷部を越えて軸索が再生することが確かめられた。再生軸索は中心管周囲を通過しており、癒痕部を貫通するような線維は認められなかった。癒痕部の組織を調べたところ、癒痕部には細管が侵入してくるものの、吻尾軸と直交する方向のものが多く、侵入する再生軸索はあるものの、癒痕部を通過できない様子が確認された。このように、当初の予想と異なり、両棲類とキンギョの軸索再生メカニズムは非常に異なっている可能性が示唆された。

(4) ラット脊髄切断モデル

ラットの再生軸索伸長を促進する薬剤として当初は CSPGs を分解する働きをもつ chondroitinase ABC を投与することを計画していたが、より効果が強いことが期待される SSRI を用いることとした。コントロール群では癒痕部を越える軸索再生は認められなかったが、SSRI を投与した群では癒痕部を越える軸索再生が確認された。ラットでも癒痕部に多数の細管の侵入が認められ、少数の再生軸索が吻尾軸方向の細管を通過していることが明らかになった。このような管状構造は損傷を加えて 5-7 日で観察されるようになることが明らかになった。

再生軸索と細管のより詳細な関係を明らかにするために、癒痕部の超微細形態を透過型電子顕微鏡で観察したところ、再生軸索はほぼすべてシュワン細胞に取り囲まれており、それらは、血管やそれを取り巻くグリア細胞の周りに数多く存在していた。このことから、光学顕微鏡で観察された細管構造は血管とグリアから形成されており、軸索再生に関わっている可能性が示唆された。

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)

[学会発表](計 9 件)

武田昭仁、跡部好敏、船越健悟：キンギョの脊髄損傷部における有髄化機構。日本解剖学会第 119 回全国学術集会、下野、2014、3、29。

跡部好敏、武田昭仁、滝口雅人、金子貫

一郎、大垣福太郎、船越健悟：軸索伸長のガイドとなる可能性が示唆される脊髄損傷部に出現するラミニンを含む管状構造物。日本解剖学会第 119 回全国学術集会、下野、2014、3、29。

武田昭仁、跡部好敏、船越健悟：キンギョ脊髄切断後の癒痕内における軸索支持構造の解析。第 10 回水生動物の行動と神経系シンポジウム、鹿児島、2013、12、1。

武田昭仁、跡部好敏、船越健悟：キンギョ脊髄損傷後の癒痕内に出現する管状構造の由来。医学生物学電子顕微鏡技術学会 第 29 回学術講演会、横須賀、2013、6、8。

跡部好敏、武田昭仁、滝口雅人、大垣福太郎、船越健悟：ラット脊髄損傷部癒痕組織に生じる筒状構造物についての透過電顕観察。医学生物学電子顕微鏡技術学会 第 29 回学術講演会、横須賀、2013、6、8。

船越健悟、望月優暁、滝口雅人、武田昭仁、跡部好敏：脊髄損傷部を通過する再生軸索についての電顕的観察。日本顕微鏡学会 第 69 回学術講演会、吹田、2013、5、21。

武田昭仁、跡部好敏、船越健悟：魚類の脊髄切断後において実質内に出現する結合組織の組織修復への関与。118 回日本解剖学会総会・全国学術集会、高松、2013、3、29。

跡部好敏、武田昭仁、滝口雅人、船越健悟：抗うつ剤 (SSRI) のニューロン新生促進作用を利用した脊髄再生の試み。第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会、甲府、2012、3、28。

武田昭仁、跡部好敏、船越健悟：魚類の脊髄再生過程において癒痕内に形成される管状構造の由来。第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会、甲府、2012、3、26。

[その他]

ホームページ等

<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~neuroana/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

船越 健悟 (FUNAKOSHI Kengo)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号：60291572

(2) 連携研究者

跡部 好敏 (ATOBE Yoshitoshi)
横浜市立大学・医学研究科・助教
研究者番号：60264602

中野 真人 (NAKANO Masato)
岩手医科大学・統合基礎講座・助教

研究者番号： 50237351

武田 昭仁 (TAKEDA Akihito)
横浜市立大学・医学部・嘱託員
研究者番号： 00553728