

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 8 月 28 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659830

研究課題名（和文）神経成長円錐の新しい分子マーカーによる神経再生・可塑性発現メカニズムの検討

研究課題名（英文）Investigation of nerve regeneration and its plasticity using a new antibodies against phosphorylated GAP-43 (p-GAP-43)

研究代表者

柴田 実 (SHIBATA MINORU)

新潟大学・医歯学系 教授

研究者番号：50196432

研究成果の概要（和文）：

神経端側吻合についてドナー神経の神経周膜の開窓や意図的損傷の有効性について組織学的に検証した。術後 7 日目に灌流固定し、標本を作成。抗ニューロフィラメント抗体、市販の RT97 および、抗リン酸化 GAP-43 抗体 p-GAP-43 で免疫染色を行った。抗 p-GAP 抗体は再生軸索の識別に有用である事が明らかになった。神経端側縫合には神経周膜の開窓が必要であり、意図的なドナー神経の損傷はレシピエント神経への再生軸索量を増加させる事を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Histological changes were observed in peripheral nerves following end-to-side nerve coaptation to determine the effects of perineurial opening and deliberate donor nerve injury during surgery. Seven days after coaptation of the musculocutaneous (recipient) nerve to the ulnar (donor) nerve, the nerves were immunohistochemically analysed using antibodies against neurofilament-H (RT97) and phosphorylated GAP-43 (p-GAP-43). The latter was found to detect specifically generating nerve fibers. Statistical evaluation revealed increased efficacy of perineurial opening and deliberate donor nerve injury in end-to-side nerve coaptation, suggesting that partial nerve fiber herniation with partial axonotmesis or neurotomesis was important for effective axonal regeneration in end-to-side nerve coaptation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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：p-GAP-43、end to side coaptation、epineurial window、nerve injury、perineurial window

1. 研究開始当初の背景

成長円錐は発生初期の神経細胞の突起の先端に形成される特殊構造で突起の成長と成長経路の選択を担っている。

成長円錐は発生におけるシナプス形成の経路や標的選択に決定的な役割を果たすが、そればかりではなく神経損傷後における可塑性や軸索再生など、成熟末梢神経の諸現象にも重大な意義を持っている。

本研究協力者の五十嵐はプロテオミクスの手法を用いて成長円錐蛋白質の解析を行い、円錐蛋白質の存在を証明した。さらにリン酸化プロテオミクスを行い、リン酸化部位を特定し、成長円錐に発現度数の極めて高いリン酸化を検討し、それらは軸索成長に必須であることを証明した。

さらに、RNAi で神経成長に寄与する分子群を 18 種類同定し、これらはいずれも従来の分子マーカーGAP-43 と同等あるいはそれ以上の意義を持つ分子で、その多くはこれまで神経成長との関連性が見出されていない新しいものが大多数であることを報告 (PNAS 106:17211-6,2009) した。

本研究はこの新しく開発された分子マーカーp-GAP43 (S96) を用いて、神経経路形成・神経再生・可塑的経路形成における神経成長円錐の動向を In vivo で解析する世界最初の研究である。本研究の期間内に以下の項目を明らかにすることが重要と考えた。

(1) 末梢神経損傷と再生機序の検討

正常神経の turnover 現象として自然状態で起きる神経変性と再生神経成長円錐分布と頻度を正常末梢神経で検討、さらに神経圧迫、絞扼(entrainment)、クラッシュ、切離・修復後の成長円錐動向を検討

(2) 以上と平行しておこなう具体的な応用

① 神経端側接合における神経再生機序の検討: 神経上膜開窓操作後の神経線維損傷発生有無の検討:

ラット尺骨神経上膜開窓のみのモデルによる神経繊維の herniation による神経損傷とその再生に伴う神経再生機序惹起の有無を検討し、端側接合による神経再生のメカニズムを検討・解明する

さらに、神経上膜開窓に伴う神経端側接合による神経再生機序の開始と進行を時間、日単位で検討

② 神経交叉術後の可塑的再生経路発現機序の検討: 研究者らはアデノウイルスを用い、脊髄支配髄節の重複しない筋皮・尺骨神経を用いて交叉した近位神経の過誤神経支配のみならず、交叉遠位神経の支配髄節レベルからも再生が起こることを証明したが、その再生発芽部位が神経細胞近位、末梢部で起こる軸索からの側芽によって起きるのかを検討するのに応用する。

2. 研究の目的

神経成長円錐(Growth cone)は脳の発生において成長と軸索経路探索および正確なシナプス形成などの神経配線に関与する極めて重要なキーである。

また損傷を受けた成熟神経細胞の再生か変性かの運命を決定し、その再生にあたっては可塑的再編機能を担っている。

この神経成長円錐の情報伝達系は解明されておらず、唯一 GAP-43 が機能的分子マーカーとして取り上げられてきたが、これは神経成長円錐のみでなく軸索にも存在する。

研究協力者の五十嵐らはプロテオミクスの手法を用いて神経成長円錐に特異的なマーカーp-GAP43 (S96) を同定した。

本研究は in vivo モデルを用いて世界で初めて、この抗体マーカーにより末梢神経再生における神経成長円錐の動向を検討し、末梢神経再生・再編のメカニズムを解明することである。

3. 研究の方法

平成 23 年および 24 年度に以下の Basic および Applied モデルを作成し、それぞれの検討をおこなった。

(1) 平成 23 年度

Basic Model

① control model: まず、正常末梢神経 (上腕遠位部 筋皮、正中、尺骨、橈骨神経) の神経成長円錐の発現頻度・分布をみた。

② minor injury model (neuroapraxia, axonotomesis): 上記末梢神経をクリッピングまたは鉗子による圧座損傷を加えたのち、神経再生に伴う成長円錐分布を観察・定量測定した。

③ sever injury model (axonotomesis) 末梢神経切離・縫合後の成長円錐分布観察・定量測定した。

研究代表者は研究協力者 1 から p-GAP43

(S96) 特異抗体の作成・提供をうけた。研究代表者によるマーカーの特性検証の目的とするラットを用いた Basic Model の作成、大学院生指導を行い、筋皮、正中、尺骨、橈骨神経のそれぞれで外傷を加えた部位から 5mm 近位および遠位で標本作製・抗体染色を行い成長円錐の出現・分布を検討した。

(2) 平成 24 年度

Basic Model の結果を基本にして具体的な発展モデルを用いて検討した。

Applied Model を用いて、神経発芽の様式・生理を検討した

① 神経端側接合モデルにおける sprouting の開始、部位、経時的変化の検討

尺骨神経上腕遠位部を用いて epineural window を作成し神経線維の window からの herniation により、神経損傷が起きるか否か検討 (window 作成後 12 時間、24 時間、3 日、7 日でマーカー染色) 成長円錐発現分布、単位面積あたりの定量測定を行った。

② 支配髄節の重複しない尺骨神経幹に筋皮神経遠位端を端側接合し、発芽状況を検討した。

4. 研究成果

体重 200～300 g の雄 Wistar rat 20 頭を用いて 4 グループを作成した。

グループ 1: 神経周膜を開窓せずに端側吻合を施行。

グループ 2: ドナー神経の神経周膜開窓だけ行い、端側吻合を施行。

グループ 3: ドナー神経の神経周膜を開窓し、脱出した神経線維に圧挫損傷を加え、端側吻合を施行。

グループ 4: ドナー神経の神経周膜を開窓し、脱出した神経線維の中心を切断し、端側吻合を施行。端側吻合 7 日後に組織学的観察を行った。

その結果、グループ 1 では、レシピエント神経内への再生軸索の伸長を認めなかった。

グループ 2 では、神経周膜開窓部から脱出して損傷を受けた軸索に沿って尺骨神経内を近位・遠位両方向に伸長する再生軸索を認めた。

グループ 3 と 4 では、細い再生軸索がレシピエント神経、ドナー神経両方においてグループ 2 よりも多数伸長していた。

それぞれのグループの定量解析を行った結果、神経周膜を開窓し、意図的にドナー神経を損傷したグループでより多くの軸索が伸長していた。

本研究では RT97 と抗-GAP-43 に対する抗体を用いて神経端側縫合後に起こる神経生成伸長を検討した。

RT97 は再生神経と共に変性軸索や変性後のデブリを含めて染色したのに対して p-GAP-43 は伸長する再生軸索に豊富に存在する神経内膜に関連するリン酸蛋白を染色する特徴を認め、成長神経円錐にいたるまで

染色する特性を認めた。本研究での結果では p-GAP-43 (phosphorylated at serine 96) は再生軸索内に特異的に存在するが健全な軸索内には存在しない事が判明した。

このことにより、再生軸索を正確に探索することが可能にであった。

これに加えて、RT97 と p-GAP-43 抗体を用いることにより外傷後や、移植神経片内あるいは神経接合後の正常神経軸索と再生軸索の解析、鑑別が可能である事が判明した。

4 つの異なるラット端側縫合モデルを確立し、神経損傷後の神経再生を検討したがその結果は神経周膜の開窓によって起こる神経軸索損傷は神経端側接合に導かれる神経再生には欠かせない操作であり、この神経損傷により、神経再生が促進される事が明らかとなった。

特に、神経を部分的に切離する操作は単純な神経周膜開窓や開窓し圧挫損傷を加えた場合に比べ、再生軸索の伸長がより効果的に誘導される。

本結果より、端側吻合に神経周膜開窓は必要で、さらに意図的なドナー神経の損傷は再生軸索を増加することが明らかとなった。神経部分切離による再生神経増加効果と切離によってもたらされる神経過支配によるデメリットについては今後の検討が必要である。

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)

[雑誌論文] (計 1 件)

Oyamatsu H, Koga D, Igarashi M, Shibata M, Ushiki T.: Morphological assessment of early axonal regeneration in end-to-side nerve coaptation models. J Plast Surg Hand Surg. 46(5):299-307, 2012 査読あり

[学会発表] (計 1 件)

親松 宏: 神経端側吻合モデルにおける軸索再生早期の形態学的分析 (学術奨励賞受賞講演). 第 56 回形成外科学会総会 (招待講演). 2013 年 04 月 04 日. 東京 京王プラザホテル

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 実 (SHIBATA MINORU)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号: 50196432

(2) 研究分担者
「なし」

(3) 連携研究者
「なし」