

機関番号：22701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20500312

研究課題名（和文） 中枢自律神経下行路再生の比較解剖学的解析

研究課題名（英文） The regeneration of the central autonomic descending pathways -comparative aspects

研究代表者

船越 健悟（KENGO FUNAKOSHI）

横浜市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：60291572

研究成果の概要（和文）：

キンギョの脊髄を半切した場合、損傷部には線維性癒痕が形成されるが、やがて癒痕内にチューブ状の構造が吻尾側から侵入し、癒痕を架橋するようになる。それとともに、チューブ内に侵入してきた再生軸索も癒痕を通過する。再生軸索の伸長を誘導するチューブ状構造は、血管に由来する可能性がある。一方、哺乳類では線維性癒痕の構造が軸索再生を障害する因子であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Although the fibrous scar is formed in the lesion site after the spinal hemisection of the goldfish, many tubules invade the fibrous scar from both rostral and caudal sides of the scar, and eventually bridge the scar. Accordingly, regenerating axons invading the tubules pass the scar. The tubules that induce growth of the regenerating axons might be derived from the blood vessels. In mammals, on the other hand, the structure of the fibrous scar seems to be a factor that impedes axonal regeneration

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学、神経解剖学・神経病理学

キーワード：神経再生・神経可塑性

1. 研究開始当初の背景

(1) 哺乳類の脊髄が損傷を受けた場合、脊髄投射路が再生できない原因が、損傷部に形成される癒痕にあることが示されていた。特にグリア癒痕に発現しているコンドロイチン

硫酸プロテオグリカン（CSPG）が軸索伸長阻害因子と目され、CSPG を分解することで、投射路が再生する可能性が示されていた。

(2) 一方、魚類や両棲類、爬虫類では脊髄に損傷が加わっても、脊髄投射路が損傷部を越

えて再生することが、それまでの研究から知られており、われわれもキンギョにおいて、遊泳運動に関わる脊髄下行路が再生することを確かめていた。

2. 研究の目的

(1) CSPG など軸索伸長阻害因子の機能を阻害することで、癒痕部を越える軸索再生が哺乳類でも可能になると推測し、再生された下行性脊髄投射路が、脊髄の運動機能、自律神経機能の回復に関わるかを評価しようとした。

(2) キンギョの脊髄半切モデルを作成し、自律神経下行路が損傷部を越えて再生して、自律神経機能の回復に関わるかを評価しようとした。

(3) また、哺乳類とキンギョの脊髄投射路がともに、損傷部を通過して再生するとして、その過程にどのような違いや特徴があるのか調べようとした。

3. 研究の方法

(1) ラットやマウスの脊髄を全切または半切した後、ポンプを使って CSPG 分解酵素を持続的に注入するモデルを作成、一定時間経過した後、順行性または逆行性トレーサーとしてデキストランアミン (DA) を注入したり、免疫組織化学法によって特異的な投射路を染色することによって、損傷部を越える投射路の再生がおきているかを調べた。

(2) ラットやマウスの脊髄損傷部を取り出し、損傷部を構成する細胞や細胞外基質と、再生軸索との関係を免疫組織化学法によって調べようとした。

(3) キンギョの脊髄損傷部を取り出し、(2)と同様に、損傷部に存在する細胞や細胞外基質と、再生軸索との関係を免疫組織化学法によって調べた。

4. 研究成果

(1) ラットとマウスで脊髄切断モデルを作成し、組織像を経時的に比較した。ラットではグリア細胞由来の軸索伸長阻害因子、CSPGを分解する働きのある chondroitinase ABCを損傷部に投与して軸索再生を促したが、軸索はグリア性癒痕を通過し、線維性癒痕内に侵入するものの、期待したような癒痕部を越える軸

索再生を確認することはついにできなかった。したがって、予定していた中枢性自律神経下行路再生の評価には至らなかった。

(2) 再生軸索が線維性癒痕に侵入するものの、ほとんど通過することができない理由を検討したところ、癒痕内において再生軸索の伸長を促すと考えられるチューブ状構造が、キンギョに比較して細く、走行も不均一であることが確認された。

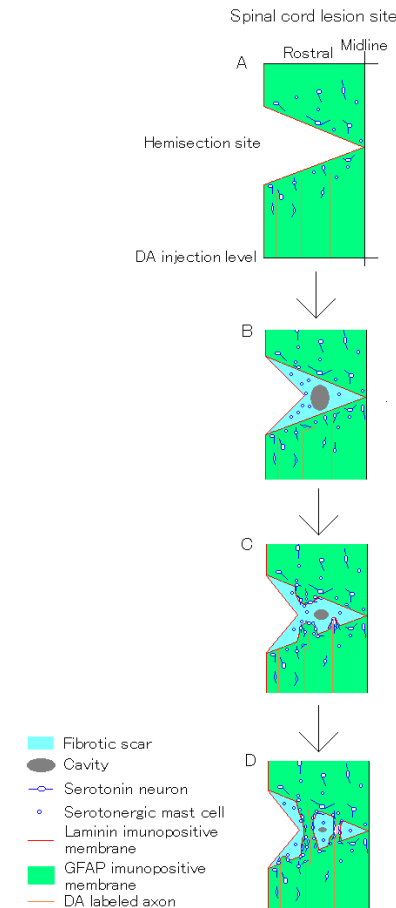


図1 キンギョ脊髄損傷後の組織学的変化のまとめ

(3) キンギョの脊髄半切モデルにおいて、どのように再生軸索が損傷部を通過してゆくのかについて、興味深い知見を得ることができた。図1Aのように脊髄を半切して3週間経過すると、図1Bに示すように、キンギョでも、哺乳類と同様に線維性癒痕や空洞が形成されるものの、図1Cに示すように、チューブ状の構造が吻側と尾側の両方から癒痕部に侵入してきて、このチューブの中に再

生軸索やグリアが周囲から入り込むようになる。そして、図1Dに示すように、反対側から入り込んできたチューブ同士が結合することによりチューブは癒痕を越える架橋を形成し、チューブ内に侵入していた再生軸索も癒痕部を通過することができるようになる。

さらに時間の経過とともにチューブの内径が拡大し、癒痕部を通過する線維も著しく増加してゆく。このように、チューブが拡大するにつれて、線維性癒痕は徐々に縮小してゆくことになる。

一方、グリア細胞の肥大化など哺乳類で見られるグリア癒痕の像は確認されなかった。

(4) チューブ状構造の性質と由来について解析したところ、チューブ状構造の壁にはラミニンが発現しており、ラミニンが基質として再生軸索の伸長を誘導して可能性が考えられた。また、ラミニン陽性の膜状構造物に接して、血管内皮細胞のマーカであるトマトレクチンと、タイトジャンクションの裏打ちタンパクであるZO-1に陽性の構造が確認された。これらのことより、チューブ状構造は血管に由来すると考えられた。一方、両棲類や爬虫類で、損傷部を通過する軸索再生を誘導すると考えられている上衣グリア細胞(ependymoglia)は突起がチューブ内に侵入していることが確認できたが、必ずしも再生軸索に先導する訳ではなく、軸索伸長を誘導しているとは考えにくいと結論付けた。また、チューブ状構造の内側にはセロトニンニューロンが集積していて、再生軸索と近接している像が確認された。

これらの成果を裏付け、さらに軸索再生現象の脊椎動物間における類似点と相違点を明確にする目的で、平成23年度より、「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(基盤研究(C):課題番号23500414)」に着手している。

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)

①Takeda A, Nakano M, Goris RC, Funakoshi K, Adult neurogenesis with 5-HT expression in lesioned goldfish spinal cord, *neuroscience*, 査読有、Vol. 151, No. 4, 2008, 1132-1141

[学会発表] (計6件)

①Funakoshi K, Axonal regeneration and neurogenesis in the goldfish spinal cord. 日本解剖学会関東支部第18回懇話会・シンポジウム Development of the central nervous system. Tokyo, 2008, 6.

②Takeda A, Nakano M, Atobe Y, Goris RC, Funakoshi K: Mechanism of axonal regrowth beyond the scar after transection of the goldfish spinal cord. Society for Neuroscience 38th Annual Meeting, Washington DC, 2008, 11.

③武田昭仁, 跡部好敏, 船越健悟: キンギョ脊髄切断後の再生過程における線維性癒痕の変化. 日本解剖学会第115回全国学術集会, Acta Anat Nippon, 85(Suppl): 191, 盛岡, 2010, 3.

④跡部好敏, 武田昭仁, 吉川輝, 船越健悟: 機能的な回復が認められた脊髄損傷Ratの組織学的検討. 日本解剖学会第115回全国学術集会, Acta Anat Nippon, 85(Suppl): 194, 盛岡, 2010, 3.

⑤Funakoshi K: Comparative anatomy of the descending motor pathways and their regenerative capacity. Bit's 1st Annual World Congress of NeuroTalk 2010, Singapore, 2010, 6.

⑥Funakoshi K: Comparative study of axonal regeneration beyond scar tissue after spinal injury. Bit's 3rd Annual World Congress of Regenerative Medicine & Stem Cells 2010, Shanghai, 2010, 12.

[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。大学院医学研究科・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・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 60264602

中野 真人 (Nakano Masato)
岩手医科大学・解剖学講座・助教
研究者番号 : 50237351