

機関番号：82609

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20500318

研究課題名 (和文) 中枢神経系の損傷部への細胞移植による神経再生促進のメカニズムの解明

研究課題名 (英文) Studies on the mechanism underlying the promotion of axonal regeneration by cell transplantation into the central nervous system lesion site

研究代表者 川野 仁 (KAWANO HITOSHI)

財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・副参事研究員

研究者番号：20161341

## 研究成果の概要 (和文)：

嗅神経被覆細胞 (OEC) の移植による損傷後の神経再生が線維性瘢痕の形成抑制によることを見出した (Teng et al., 2008; Teng et al., 2010)。線維性瘢痕を形成する髄膜の線維芽細胞には transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) の受容体が発現し (Komuta et al., 2010)、TGF- $\beta$  の機能阻害剤を損傷部へ投与すると、線維性瘢痕の形成が抑制された (Yoshioka et al., 2011)。そこで、アストロサイトと線維芽細胞の共培養系に TGF- $\beta$  1 を添加すると線維性瘢痕によく似た細胞構築と遺伝子発現を持つ細胞集塊が形成された (Kimura-Kuroda et al., 2010)。以上の結果から、線維性瘢痕の形成には損傷後増加する TGF- $\beta$  が関与すると結論された。

## 研究成果の概要 (英文)：

Transplantation of olfactory ensheathing cells (OEC) into the lesion site of the CNS suppressed the formation of the fibrotic scar (Teng et al., 2008; Teng et al., 2010). Receptors for transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) were expressed in meningeal fibroblasts which formed the fibrotic scar after brain injury (Komuta et al., 2010), and an inhibitor of TGF- $\beta$  suppressed the fibrotic scar formation (Yoshioka et al., 2011). When TGF- $\beta$  was added to coculture of astrocytes and fibroblasts, cell clusters which resembled the fibrotic scar were formed (Kimura-Kuroda et al., 2010). These results suggest that TGF- $\beta$  which increases after CNS injury is involved in the fibrotic scar formation.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	400,000	120,000	520,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：中枢神経系の再生

科研費の分科・細目：神経解剖学・神経再生

キーワード：中枢神経系；損傷；細胞移植；神経再生；グリア瘢痕；線維性瘢痕；プロテオグリカン

## 1. 研究開始当初の背景

ほ乳類の中枢神経系では損傷後の軸索再生がほとんど起こらない。その理由として、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンを始

めとする種々の再生阻害因子の存在が挙げられてきた。

線維性瘢痕は中枢神経系の損傷部に髄膜由来の線維芽細胞が侵入・増殖し、コラーゲ

ンなどの細胞外マトリックスを分泌して形成する、いわば「カサブタ」のようなものである。われわれはこれまでに再生阻害因子として、線維性癒痕に注目してきた。その理由は以下の研究成果による。

(1) 新生仔の脳では神経再生が起こりやすい。そこで生後1週目のマウスで黒質線条体ドーパミン神経路を切断したところ、線維性癒痕は形成されず、再生軸索が損傷部を越えて伸長した。しかし、生後2週目には神経再生が起こらなくなり、この時期から線維性癒痕が形成されていた (Kawano et al., *J. Neurosci. Res.*, 2005)。

(2) 線維性癒痕の主成分であるIV型コラーゲンの合成を阻害するDPYをマウスで黒質線条体ドーパミン神経路の切断部位に投与すると、損傷部の線維性癒痕が消失し、神経再生が起こることを見いだした (Kawano et al., *J. Neurosci. Res.*, 2005)。

(3) 次に、脳内でも血液脳関門の形成が不完全である視床下部弓状核に存在するNPYニューロンの軸索を切断したところ、損傷部を越えて軸索が再生した。この場合にも損傷部に線維性癒痕は形成されていなかった (Homma, Kawano et al., *J. Comp. Neurol.*, 2006)。

(4) 一般には、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンが中枢神経系における主要な再生阻害因子と考えられている。しかしコンドロイチナーゼABCを損傷部に投与し、コンドロイチン硫酸を分解すると、軸索再生が起こると同時に線維性癒痕が消失した (Li, Kawano et al., *J. Neurosci. Res.*, 2007)。

以上、4種の脳損傷モデルでは、いずれも線維性癒痕が形成されない状況で神経再生が起こっていた。この一連の研究成果は、線維性癒痕が中枢神経系における主要な再生阻害因子であることを示している。

## 2. 研究の目的

これまで動物実験では脊髄損傷部への嗅球グリア細胞 (olfactory ensheathing cell, OEC) の移植は損傷後の神経再生と機能回復を促進することが示されてきた。OECは脊損患者自身から採取・移植が可能のため、現在、脊髄損傷のもっとも有望な治療法と考えられている。すでに世界中で臨床応用も行われているが、その神経再生促進のメカニズムはいまだ明らかでない。本研究の目的は、「細胞移植が損傷部の線維性癒痕の形成を阻害することによって神経再生を促進させる」という仮説を検証することである。もし、この

仮説が証明されれば、細胞移植による脊髄損傷の治療に明確な理論的根拠を与えることができる。

また、神経再生の有力な阻害因子としては、一般にはグリア癒痕やコンドロイチン硫酸プロテオグリカンが信じられており、線維性癒痕が再生阻害因子と考えて研究を進めているのは世界でも数グループしかない。本研究では線維性癒痕の詳細を調べることも目的としている。具体的には線維性癒痕の形成機序や再生阻害のメカニズムを明らかにすることを目指している。

## 3. 研究の方法

### (1) 脳および脊髄の損傷部への細胞移植

ペントバルビタールで麻酔した成熟雄ラットの頭部を脳定位固定装置に固定し、頭部の皮膚を切開した後、歯科用ドリルで頭蓋骨に穴を開け、カミソリ刃を加工した幅2mmのナイフを垂直に脳内に挿入して、視床下部外側部で黒質線条体ドーパミン線維を切断する。脊髄損傷の場合は背部の皮膚を切開し、脊椎を露出し、第10-12胸椎の椎弓を外し、微小ナイフにより、下位胸髄を切断する。

OECおよび嗅球線維芽細胞 (ONF) の培養はRamon-CuetoとNieto-Sampedro (1992)の方法にしたがって行う。生後5週齢のSDラットの嗅球および嗅神経を取り出し細分化した後、DMEM/F-12培養液を用いて4-6日間培養する。組織片から遊走したOECとONFを、さらに1週間フラスコ内で培養し増殖させる。別に軟膜から線維芽細胞を採取し、同様に培養する。移植する細胞を蛍光色素であるHoechst33342で核染色する。その後トリプシンで細胞を容器より剥離し、遠沈した後に少量の培養液で細胞密度を約 $5 \times 10^7$ /mlになるように調整する。OECとONFをほぼ1:1の割合で含む細胞と、軟膜から採取した線維芽細胞のペレット2 $\mu$ lをそれぞれ、脳の損傷部へハミルトンマイクロシリンジを用いて注入する。回復後、脊髄の手術を行った動物は下肢の運動を定期的に評価する。

術後一定期間の後、4%パラフォルムアルデヒド液で灌流固定し、脳あるいは脊髄の40 $\mu$ m厚の凍結切片を作成し、各種の抗体を用いて免疫組織化学的染色を行い、神経再生と癒痕形成を調べる。

### (2) 線維性癒痕の組織修復における機能

損傷部周辺に形成されるグリア癒痕は以前は神経再生阻害因子と考えられていたが、最近では損傷後の血液脳関門の修復に重要であることが分かってきた。そこで、線維性癒痕の組織修復における機能を知る目的で、IV型コラーゲンの合成阻害剤であるDPYをマウス黒質ドーパミン神経路の切断部に投与し、その後の血液脳関門の修復を調べる。

### (3) 線維性癒痕の形成機序

損傷後発現が増加する **transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )**は線維芽細胞の増殖や細胞外マトリックスの合成を促進する。そこで、**TGF- $\beta$** が線維性癒痕の形成に関与する可能性を調べるために、**TGF- $\beta$** の受容体の発現を **in situ** ハイブリダイゼーション法により損傷脳で調べることを計画した。マウス脳に外科的に損傷を加え、経時的に屠殺し脳を取りだし凍結する。クリオスタットにより **10  $\mu$ m**厚の連続凍結切片を作成し、パラフォルムアルデヒドによって短時間固定した後に、**I型**および**II型**の **TGF- $\beta$**  受容体に対する **RNA**プローブを用いて **in situ** ハイブリダイゼーションを行う。その後切片は免疫染色を行い、各種細胞と受容体の局在の比較を行う。

### (4) 線維性癒痕の形成に対する **TGF- $\beta$** の機能阻害の効果

マウス脳のドーパミン神経路を切断し、損傷部へ **TGF- $\beta$**  の阻害剤である **LY-364947** を浸透圧ミニポンプを用いて連続投与し、線維性癒痕の形成と軸索再生に対する効果を調べる。動物は一定期間後に **4%パラフォルムアルデヒド**液で灌流固定し、**40  $\mu$ m**厚の凍結切片を作成する。まず、**TGF- $\beta$** の細胞内シグナル分子である **Smad** の活性化の有無をリン酸化 **Smad** の免疫組織化学によって確認する。次いで **IV型コラーゲン** の免疫染色により、線維性癒痕の形成の有無を調べ、さらに **チロシン水酸化酵素 (TH)** の免疫染色により、ドーパミン線維の再生に対する効果を調べる。

### (5) 細胞培養系における癒痕モデルの作成

ラット新生仔より脳のアストロサイトと髄膜の線維芽細胞を採取し、それぞれ培養する。チャンバースライド内にアストロサイトと線維芽細胞を別々のコロニーとして培養し、細胞がディッシュを覆うまでに成長した後に、**TGF- $\beta$ 1** を添加する。その後実体顕微鏡下で細胞の動態を調べる。一定期間後に細胞を **4%パラフォルムアルデヒド**液で固定し、種々の抗体を用いて蛍光多重免疫染色を行い、**TGF- $\beta$ 1** の作用を調べる。

また、アストロサイトと線維芽細胞の共培養に、新生仔の小脳ニューロンを加え、突起伸長阻害作用についても検討する。

## 4. 研究成果

### (1) 脳の損傷部への細胞移植による神経再生の促進

ラットで黒質線条体ドーパミン神経路を幅 **2 mm**のナイフで切断すると、損傷後2週間ではドーパミン線維は損傷部を越えて再生することはなく、損傷部には線維性癒痕が形成され

ていた。それに対し、新生仔ラット嗅球より採取し、培養したOECを損傷部に移植したラットでは多くの再生線維が損傷部を越えて伸長していた。OEC移植によりグリア癒痕の形成やコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの発現に変化は見られなかったが、線維性癒痕は形成されていなかった (Teng et al., 2008)。

ラットの胸髄を切断した場合には、下肢の運動機能はほとんど回復が見られず、下行性のセロトニンおよびノルアドレナリン線維と上行性のCGRP線維は損傷部を越えて再生しなかった。損傷部には巨大な線維性癒痕が形成されていた。それに対し、OECを損傷部に移植したラットでは下肢の運動機能に有意な改善が見られ、多くの再生線維が損傷部を越えて伸長していた。損傷部の線維性癒痕は存在していたが、その大きさは有意に縮小していた (Teng et al., 2010)。

以上の結果から、線維性癒痕が中枢神経系における軸索再生の阻害因子であることが改めて確認されるとともに、OEC移植による神経再生と機能回復の促進が線維性癒痕の形成抑制によるものであることを初めて明らかにした。

### (2) 線維性癒痕の組織修復における機能

**DPY**を損傷部に投与すると、線維性癒痕の形成は完全に抑制され、ドーパミン線維は損傷部を越えて再生した。しかし、血液脳関門は損傷中心部まで修復されていた。この結果は、線維性癒痕の形成阻害が組織修復過程を阻害せずに神経再生を促進することを意味しており、**DPY**が中枢神経系の外傷の治療法として有望なことを示している (Yoshioka et al., 2010)。

### (3) 線維性癒痕の形成機序について

損傷脳で**TGF- $\beta$** 受容体の発現を **In situ** ハイブリダイゼーション法で調べると、受容体は損傷後3日より損傷部に出現した。免疫組織化学で発現細胞を調べると、受容体は線維性癒痕を形成する髄膜由来の線維芽細胞に発現していたが、グリア癒痕を形成する反応性アストロサイトには発現していなかった。このことから、損傷後、増加するサイトカインである**TGF- $\beta$** が線維性癒痕の形成に関与すると結論された (Komuta et al., 2010)。

### (4) 線維性癒痕の形成における**TGF- $\beta$** の機能

マウス黒質線条体ドーパミン神経路を切断すると、損傷後2週間では、ドーパミン線維は損傷部を越えて再生することはなく、損傷部には線維性癒痕が形成されていた。また損傷部周辺には**Smad**の活性化を示すリン酸化**Smad**が増加していた。これに対し、**TGF- $\beta$** の機能阻害剤である**LY-364947**を連続投与した損傷脳では、リン酸化**Smad**はほとんど検

出されず、線維性癆痕の形成が完全に抑制され、神経再生が促進した (Yoshioka et al., 2011)。以上の結果は、損傷脳において増加する TGF- $\beta$  が線維性癆痕の形成に重要であることが示された (Yoshioka et al., 2011)。

(5) 細胞培養系における癆痕モデルの作成  
脳のアストロサイトと線維芽細胞の共培養系に TGF- $\beta$ 1 を添加した。コントロールの共培養では 2 種類の細胞は互いに別々の単層のコロニーを形成しているが、TGF- $\beta$ 1 を添加すると線維芽細胞が増殖して細胞集塊を形成し、その周りをアストロサイトが取り巻いた。この細胞集塊には線維性癆痕と同じように、NG2 プロテオグリカン、コンドロイチン硫酸、セマフォリン 3A、テネイシン、Eph2B などの軸索突起伸長抑制因子が発現し、小脳ニューロンの神経突起の伸長が著しく阻害された。このような中枢神経系の損傷部を反映する培養モデルは今回が初めてである (Kimura-Kuroda et al., 2010)。今後このモデルを用いて、癆痕形成と、損傷部における神経再生阻害のメカニズムを調べることを計画している。

#### 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 11 件)

1. 川野仁、木村-黒田純子、小牟田縁、吉岡望、脊髄損傷後の軸索再生と組織修復—グリア癆痕と線維性癆痕の機能、脳 21、査読無 (総説)、Vol.1、2011、pp.114-118.
2. Yoshioka N, Kimura-Kuroda J, Saito T, Kawamura K, Hisanaga S, Kawano H, Smallmolecule inhibitor of type I transforming growth factor- $\beta$  receptor kinase ameliorates inhibitory milieu in injured brain and promotes regeneration of nigrostriatal dopaminergic axons. J. Neurosci. Res. 査読有, 89, 2011, 381-393.
3. Yoshioka N, Hisanaga S, Kawano H, Suppression of the fibrotic scar formation promotes axonal regeneration without disturbing the blood-brain barrier repair and withdrawal of leukocytes after traumatic brain injury. J. Comp. Neurol. 査読有, 518, 2010, 3867-3881.
4. Teng X, Yoshioka N, Kimura-Kuroda J, Kawamura K, Kawano H, Li HP, Transplantation of olfactory ensheathing cells promotes axonal regeneration in a rat model of spinal cord injury. Neur. Regener. Res., 査読無,

5, 2010, 651-656.

5. Kimura-Kuroda J, Teng X, Komuta Y, Sango K, Yoshioka N, Kawamura K, Raisman G, Kawano H, An in vitro model of the inhibition of axon growth in the lesion scar formed after central nervous system injury. Mol. Cell. Neurosci., 査読有, 43, 2010, 177-187.
6. Komuta Y, Teng X, Yanagisawa H, Sango K, Kawamura K, Kawano H, Expression of transforming growth factor- $\beta$  receptors in meningeal fibroblasts of the injured mouse brain, Cell. Mol. Neurobiol., 査読有, 30, 2010, 101-111.
7. Teng X, Nagata I, Li H-P, Kimura-Kuroda J, Sango K, Kawamura K, Raisman G, Kawano H, Regeneration of nigrostriatal dopaminergic axons after transplantation of olfactory ensheathing cells and fibroblasts prevents fibrotic scar formation in the lesion site, J. Neurosci. Res., 査読有, 86, 2008, 3140-3150.

[学会発表] (計 24 件)

1. 川野仁、木村-黒田純子、吉岡望、小牟田縁、三五一憲、川村光毅、中枢神経系の損傷部に形成される線維性癆痕について I. 神経再生の阻害因子、Neuro2010、2010年9月3日、神戸コンベンションセンター
2. 小牟田縁、木村-黒田純子、柳澤比呂子、三五一憲、川野仁、中枢神経系の損傷部に形成される線維性癆痕について II. Transforming growth factor- $\beta$  の役割、Neuro2010、2010年9月3日、神戸コンベンションセンター
3. 吉岡望、阿相皓晃、木村-黒田純子、久永眞市、川野仁、中枢神経系の損傷部に形成される線維性癆痕について III. 脳外傷後の組織修復と神経再生のメカニズムについて、Neuro2010、2010年9月3日、神戸コンベンションセンター
4. Yoshioka N, Takeuchi K, Hisanaga S, Kawano H, The involvement of lesion scar on healing of damaged CNS tissue and axonal regeneration. 7th Forum of European Neuroscience, 2010年7月7日, オランダ Amsterdam
5. Kawano H, Yoshioka N, Komuta Y, Takeuchi K, Sango K, Kawamura K The fibrotic scar is a major impediment for axonal re-generation after traumatic central nervous system injury.

7th Forum of European Neuroscience, 2010年  
7月7日, オランダAmsterdam

6. 吉岡望、阿相皓晃、木村-黒田純子、久永眞市、川野仁、中枢神経系における組織修復と神経再生のメカニズムについて、第25回神経組織の成長・再生・移植研究会、2010年5月22日、大阪市立大学
7. 小牟田縁、柳澤比呂子、木村-黒田純子、三五一憲、川野仁、脳損傷部におけるtgfb受容体の発現と局在 第25回神経組織の成長・再生・移植研究会、2010年5月22日、大阪市立大学
8. 木村-黒田純子、小牟田縁、吉岡望、川野仁、培養系を用いた神経再生阻害モデルの確立、第25回神経組織の成長・再生・移植研究会、2010年5月22日、大阪市立大学
9. 川野仁、木村-黒田純子、小牟田縁、吉岡望、三五一憲、中枢神経系における神経再生阻害のメカニズム、第25回神経組織の成長・再生・移植研究会、2010年5月22日、大阪市立大学
10. 川野仁、藤錫川、木村-黒田純子、小牟田縁、吉岡望、三五一憲、川村光毅、損傷後の中枢神経系における再生阻害のメカニズム、第24回 神経組織の成長・再生・移植研究会、2009年6月21日、群馬県渋川市(ホテル天坊)。
11. 吉岡望、藤錫川、小牟田縁、久永眞一、川野仁、脳損傷後の血液脳関門の修復に果たす瘢痕組織の役割について、第24回 神経組織の成長・再生・移植研究会、2009年6月21日、群馬県渋川市(ホテル天坊)
12. Kawano H, Teng X, Kimura-Kuroda J, Takeuchi K, Sango K, and Kawamura K, Cell transplantation that promotes regeneration of transected rat dopaminergic axons prevents the fibrotic scar formation in the lesion site., FENS Forum 2008, 2008年7月15日、Palexpo Conference Center, Geneva, Switzerland
13. Kimura-Kuroda J, Kawano H、線維性瘢痕による神経再生阻害：培養モデル系を用いた研究、第31回日本神経科学大会、2008年7月9日、東京国際フォーラム
14. Kawano H, Teng X, Kimura-Kuroda J, Sango K, Kawamura K, Cell transplantation that promotes axonal regeneration of rat

nigrostriatal dopaminergic neurons prevents the fibrotic scar formation in the lesion site., Neuro2008, 2008年7月9日、東京国際フォーラム

15. 川野仁、藤錫川、木村-黒田純子、三五一憲、損傷後のマウス脳内への細胞移植による軸索再生促進のメカニズム、神経組織の成長・再生・移植研究会、2008年5月17日、ホテルスプリングス幕張

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等  
身近な医学研究「脊髄損傷」  
<http://tmin.igakuken.or.jp/medical/18/spinalcord1.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川野 仁 (KAWANO HITOSHI)  
財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・副参事研究員  
研究者番号：20161341

### (2) 研究分担者

黒田純子 (KURODA JUNKO)  
財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・研究員  
研究者番号：20142151