

令和元年6月4日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K01400

研究課題名(和文) 血管柄付き神経移植による視機能の回復

研究課題名(英文) Vascularized peripheral nerve graft and recovery of visual function

研究代表者

若林 毅俊 (WAKABAYASHI, Taketoshi)

関西医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：90302421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：視神経切断端への末梢神経移植が網膜神経節細胞(RGC)の軸索再生を促進することは、RGCの環境がRGCの生存・軸索再生に影響することを示す。視神経傷害後のRGCの分子環境の変化を網膜で調べた。phosphatidylinositolは視神経傷害後に外顆粒層で発現が低下した。phosphatidylserineは脂肪酸構成により発現パターンが異なるが、視神経傷害後はその多くが発現低下する。docosahexaenoic acidを有するphosphatidylethanolamineは、視神経傷害後網膜全層で発現が上昇した。視神経傷害はRGCだけでなく、網膜全層で分子レベルの変化をもたらす。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の光学顕微鏡レベルの研究で、視神経傷害後にはRGCとグリア細胞の分子発現が変化することは知られていた。一方で、視神経切断は視細胞など他のニューロンには影響しないとされていた。しかし今回の報告により、視神経傷害は視神経に軸索を投射しているRGCだけでなく、網膜全層にわたって分子レベルの変化を引き起こし、RGCの細胞死や軸索再生に影響を及ぼしていることが示唆された。このことは、RGCの生存・軸索再生、さらには末梢神経移植により視機能再建を目指すうえでRGC以外のニューロンの機能変化も考慮する必要があることを明らかにした点で、学術的に極めて重要な知見である。

研究成果の概要(英文)：We have revealed the axonal regeneration of retinal ganglion cells (RGC) is induced by autologous peripheral nerve graft, and the efficient approach to regenerate of axon needed the environment adjustment of RGC. However, it remains unknown about the RGC environment by optic nerve injury. Thus we analyzed molecular alteration of retina after traumatic optic nerve injury (TONI), especially the major lipid component of cell membrane. Phosphatidylinositol (PI) 18:0/20:6 was localized to the three nuclear layer structures in control retina, but the localization of 18:0/20:6 PI after TONI was decreased in the outer nuclear layer. Meanwhile, phosphatidylserine (PS) 18:0/22:6 specifically showed in the inner plexiform layer, but the signal intensity was dramatically reduced after TONI. Phosphatidylethanolamine (PE) with docosahexaenoic acid was increased after TONI. These results suggest that not only RGC but also other retinal neurons were influenced by TONI.

研究分野：視覚生物学

キーワード：視神経傷害 視機能再建

## 1. 研究開始当初の背景

視神経は網膜神経節細胞 (RGC: retinal ganglion cells) の軸索であり、中枢神経の一部である。視神経が傷害を受けると RGC の 99% 以上が細胞死に陥り、細胞死を免れても軸索は再生しない。このため、視機能は永続的に失われてしまう。しかし、視神経傷害部と視覚中枢を架橋するように末梢神経片を吻合・移植すると、細胞死が抑制され、さらに一部の RGC は移植神経片内に軸索を再生し、視機能の一部が回復する。しかし、軸索を再生する RGC が少なく、高度な視機能の回復は達成できていない。

従来の末梢神経移植は、自らの栄養血管を持たない遊離移植のため、軸索再生促進作用を持つ移植片内のシュワン細胞は大半が死滅してしまい、軸索再生促進作用が弱かった。研究代表者は、栄養動静脈の血管柄付きの末梢神経移植を用いることで、再生軸索数が増加することを明らかにしてきた。しかし、血管付き神経移植は比較的侵襲の大きい手法であるため、神経の採取法や血管の吻合などでもまだ改善の余地があると考えられた。また、Oncomodulin の眼内投与による眼炎症の惹起が視神経傷害後の RGC の細胞死の抑制や軸索再生を促進することが示されている (Benowitz & Yin, 2010)。このことは、軸索切断された RGC の生存・軸索再生が、RGC が置かれた周辺組織の状態・環境によって影響を受けることを強く示唆する。我々は栄養動静脈の血管柄付きの末梢神経移植の研究を継続する中で、視神経傷害が RGC を取り巻く網膜細胞にも分子レベルでの変化をもたらし、これが RGC の細胞死・軸索再生に影響を与えている可能性を考慮するに至った。

## 2. 研究の目的

視神経傷害による RGC を取り巻く環境の変化を、RGC 以外の網膜ニューロンの変化も含めて詳細に明らかにする。同時に、血管付き移植の手法を洗練されたものにするため、移植手法の改良を行う。一連の研究から、視神経軸索再生を促進させる手法につなげることを目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 血管付き末梢神経移植の手法の改良

栄養血管を付けたまま正中神経を挙上し、この栄養血管を眼球付近の動静脈に吻合したのち、正中神経の一端を視神経切断端に吻合移植する手法を開発している。本手法は従来の遊離神経移植に比較して RGC の軸索再生促進作用を有するものの、その効果は十分ではない。また、移植自体長時間がかかるため、動物個体への侵襲が大きいという欠点があった。そこで、採取する移植神経片を変更など、血管吻合方法の再検討を行った。

### (2) 視神経傷害における瘢痕形成と網膜全層の分子構成の変化の組織学的検討

視神経傷害部の瘢痕形成が軸索再生への障壁になっていることが想定される。そのため、視神経損傷部における分子発現の変化を組織学的に調べた。また視神経傷害の手技が、視神経内に軸索を伸長している RGC 以外の網膜ニューロンには細胞傷害を起こさないことを TUNEL 法と核膜の免疫組織化学により確認した。また RGC を取り巻く環境をより詳細に調べるため、質量顕微鏡を用いて網膜の代謝や脂質発現の変化を調べた。

## 4. 研究成果

### (1)血管柄付き末梢神経移植法の検討

顔面神経を用いた手法では、顔面神経が視神経の近傍に存在するため血管吻合することなく血管柄付き神経移植が可能であった(図1)。本手法は移植による侵襲が少ないが、視神経切断端への移植には神経の直径が細すぎることが判った。神経の直径が太く、神経移植には有利である坐骨神経を血管柄付きで用いることも検討したが、動物個体への侵襲が極めて大きいことが明らかになった。



### (2)視神経傷害モデルの作成とその組織学的検討

傷害後の視神経を免疫組織学的に調べると、傷害部の中枢側で神経軸索のマーカである Neurofilament 200 による染色の断片化が認められ、軸索障害が確認できた。それに伴い Reactive astrocyte が集積しており、それによって産生される Chondroitin sulfate も増加していた。一方で、網膜側の視神経でもミエリンの主たる構成成分である C24:1 sulfatide および C18 sulfatide が減少しており、同部の脱髄を反映していた。

#### 視神経傷害後の網膜

視神経傷害後の網膜層の分子レベルでの変化を調べた。視神経傷害後には TUNEL により GCL でのみアポトーシスが認められ、それ以外の層には変化はなかった。また、核ラミナの構成成分である Lamin C で標識される核膜構造は、神経節細胞層においてのみ変化が認められた。視神経切断後にミュラー細胞の GFAP 発現が上昇するなど、グリア細胞の変化は確認されたが、免疫組織学的手法では RGC 以外のニューロンには視神経傷害による影響は確認できなかった。

#### 視神経傷害後の網膜全層での分子構成の変化の検討

視神経傷害後の網膜の脂質構成を質量顕微鏡で調べた。細胞膜に多く局在する phosphatidyl inositol は正常網膜では外顆粒層・内顆粒層・神経節細胞層に局在していたが、視神経傷害により外顆粒層での発現が低下した(図2)。ADP(図3)や ATP・AMP・UDP の発現で確認される網膜色素上皮の代謝レベルは視神経傷害の影響を受けていないことから、視神経傷害の際に脈絡膜や網膜色素上皮を栄養する毛様動脈も同時に傷害され、その結果として脈絡膜・色素上皮により栄養される視細胞に影響が出たものとは考えにくく、視神経傷害そのものの影響と考えられる。

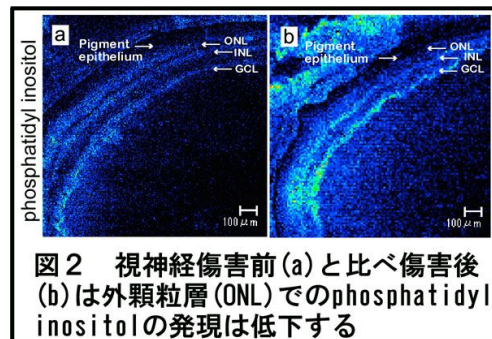


図2 視神経傷害前(a)と比べ傷害後(b)は外顆粒層(ONL)でのphosphatidyl inositolの発現は低下する

phosphatidyl serine のうち、PS(18:0/22:6)は、正常網膜では内網状層に発現している。一方、脂肪酸組成の異なる phosphatidyl serine は、発現パターンも異なっていた。PS(18:0/20:4)・PS(18:0/18:1)

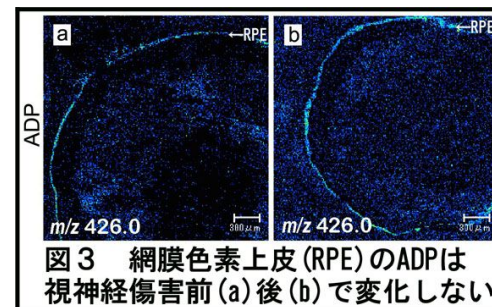


図3 網膜色素上皮(RPE)のADPは視神経傷害前(a)後(b)で変化しない

は網膜全層にわたり発現し、神経節細胞層での発現が若干高い。視神経傷害後、PS(18:0/22:6)・PS(18:0/20:4)の発現は変わらないが、PS(18:0/18:1)は全層にわたり増加傾向にあった。

ドコサヘキサエン酸(DHA)は網膜に最も多く存在する不飽和脂肪酸であり、網膜の酸化傷害を保護する働きがあることが知られている。DHA は phosphatidyl ethanolamine などのリン脂質を構成しているため、DHA またはそれ以外の脂肪酸を含む phosphatidyl ethanolamine の局在を調べた。正常網膜では、phosphatidyl ethanolamine はその構成脂肪酸によって、網膜内

分布が異なっている。しかし、視神経傷害後、DHA を含む phosphatidyl ethanolamine のみが網膜全層での発現が上昇し、DHA を含まない phosphatidyl ethanolamine は変化しなかった。

## 考察

視神経内に軸索を投射する網膜ニューロンは RGC だけであるため、従来より視神経傷害は RGC を選択的に傷害でき、その影響は RGC および RGC 細胞死に反応したグリア細胞に局限すると考えられてきた。しかし今回の報告では、視神経傷害は RGC だけでなく RGC 以外の網膜ニューロンにも分子レベルで影響を与えることが明らかとなった。このことは、視神経切断端への移植を行っても、網膜内での RGC 自体が置かれた環境が変化し、RGC の再生に影響を及ぼしうること、また RGC に光刺激を伝達する視細胞や双極細胞などが正常とは異なってしまっていることを示唆するため、軸索を再生した RGC の視覚機能回復にも RGC 以外のニューロンの機能についても考慮する必要があることを示唆する。視神経傷害以外でも同様なメカニズムが働いていることが類推されるので、今回の報告は、神経移植による軸索再生・視機能再建のみならず、広く視覚機能再建術後の機能回復を考えるうえで重要な知見と考えられる。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 11 件)

Takamori Y, Hirahara Y, Wakabayashi T, Mori T, Koike T, Kataoka Y, Tamura Y, Kurebayashi S, Kurokawa K, Yamada H, Differential expression of nuclear lamin subtypes in the neural cells of the adult rat cerebral cortex., *IBRO Rep* 5:99-109, 2018. doi: 10.1016/j.ibror.2018.11.001.

Matsumoto K, Kosaka J, Suami H, Kimata Y, Enhancement of lymphatic vessels in the superficial layer in a rat model of a lymphedematous response., *Plast Reconstr Surg-Glob Open* 6(5): e1770, 2018. doi: 10.1097/GOX.0000000000001770.

Shibuta S, Morita T, Kosaka J, Intravenous anesthetic-induced calcium dysregulation and neurotoxic shift with age during development in primary cultured neurons., *Neurotoxicol* 69: 320-329, 2018. doi: 10.1016/j.neuro.2018.08.002

Ishii T, Hara T, Kusano S, Miura K, Kubo A, Kosaka J, Positive association between the cross-sectional area of the rhomboid muscle, and the range of shoulder abduction after neck dissection surgery., *Phys Ther Res* 21(2): 39-43, 2018. doi: 10.1298/ptr.E9944

Hirahara Y, Wakabayashi T, Mori T, Koike T, Yao I, Tsuda M, Honke K, Gotoh H, Ono K, Yamada H, Sulfatide species with various fatty acid chains in oligodendrocytes at different developmental stages determined by imaging mass spectrometry., *J Neurochem* 140: 435-450, 2017. doi 10.1111/jnc.13897

Ando A, Ando I, Suda H, Nishimoto K, Kamei S, Kosaka J, Nishiyama Y, Yamamoto Y, Kuroda M, Kanazawa S, The studies of in vitro distributions of radioiodinated Cobalt-bleomycin in tumor-bearing animals by the whole body autoradiography., *Radioisotopes* 66: 307-310, 2017. doi: 10.3769/radioisotopes.66.307

Han H, Kosaka J, Chon S-C, Itokazu M, Kubo A, Responses of Korean physical therapy students after practice with a virtual anatomical system in Japan., *J Phys Ther Sci* 29(10): 1749-1752, 2017. doi: 10.1589/jpts.29.1749

Suzuki DG, Fukumoto Y, Yoshimura M, Yamazaki Y, Kosaka J, Kuratani S, Wada H, Comparative morphology and development of extra-ocular muscles in the lamprey and gnathostomes reveal the ancestral state and developmental patterns of the vertebrate head., *Zoological Lett* 2: 10, 2016. doi:10.1186/s40851-016-0046-3

Morita T, Shibuta S, Kosaka J, Fujio Y, Thiopental sodium preserves the responsiveness to glutamate but not acetylcholine in rat primary cultured neurons exposed to hypoxia., *J Neurol Sci* 365, 126-131, 2016. doi: 10.1016/j.jns.2016.04.027

Koike T, Wakabayashi T, Mori T, Hirahara Y, Yamada H, Sox2 promotes survival of satellite glial cells in vitro., *Biochem Biophys Res Commun* 464(1): 269-274, 2015. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.06.141

Shibuta S, Morita T, Kosaka J, Kamibayashi T, Fujio Y, Only extra-high dose of ketamine affects L-glutamate-induced intracellular Ca<sup>2+</sup> elevation and neurotoxicity., *Neurosci Res* 98: 9-16, 2015. doi: 10.1016/j.neures.2015.04.005

〔学会発表〕(計8件)

平原幸恵、若林毅俊、小池太郎、山田久夫、視神経損傷モデルにおける網膜の環境とリン脂質分子種の変化、第124回日本解剖学会総会・全国学術集会、2019

高森康晴、平原幸恵、若林毅俊、森徹白、小池太郎、山田久夫、グリア細胞における核ラミナ腫瘍成分ラミンのサブタイプ、第123回日本解剖学会総会・全国学術集会、2018

平原幸恵、若林毅俊、小池太郎、高森康晴、山田久夫、視神経損傷モデルにおける網膜の炎症反応と脂質変化、第59回日本組織細胞化学会総会・学術集会、2018

平原幸恵、若林毅俊、小池太郎、高森康晴、山田久夫、視神経損傷モデルにおける視神経と網膜の質量顕微鏡解析、第58回日本組織細胞化学会総会・学術集会、2017

平原幸恵、後藤仁志、若林毅俊、森徹白、小池太郎、小野勝彦、山田久夫、膜型エストロゲン受容体のオリゴデンドロサイト細胞骨格構築への関与、第122回日本解剖学会総会・全国学術集会、2017

Wada-Hirahara Y, Wakabayashi T, Gotoh H, Mori T, Koike T, Ono K, Yamada H, A role for estrogen receptors in morphological changes in oligodendrocyte maturation., 第39回日本神経科学大会、2016

小阪淳、三木友香理、In situ ハイブリダイゼーション組織化学法の陰性コントロールの確立、第6回国際医療福祉大学学会、2016

平原幸恵、若林毅俊、森徹白、矢尾郁子、津田雅之、本家孝一、小池太郎、後藤仁志、小野勝彦、山田久夫、質量分析イメージング法を用いたオリゴデンドロサイト分化過程の可視化、日本医用マススペクトル学会、2015

〔図書〕(計1件)

糸数昌史、久保晃、谷口敬道、小阪淳、バーチャル教材を用いた解剖学演習後の学生の解剖学への興味と苦手意識の変化、*理学療法学* 31(5): 715-717, 2016.

(1)研究分担者

研究分担者氏名：小阪 淳

ローマ字氏名：KOSAKA, Jun

所属研究機関名：国際医療福祉大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：40243216

(2)研究協力者

研究協力者氏名：平原(和田) 幸恵

ローマ字氏名：HIRAHARA-WADA, Yukie

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。