

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08131

研究課題名(和文) 再生神経線維の髄鞘化誘導による機能回復効果

研究課題名(英文) Myelination of the regenerated nerve in the central olfactory pathway

研究代表者

福島 菜奈恵 (Fukushima, Nanae)

信州大学・学術研究院医学系・准教授

研究者番号：90334888

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：脳内の嗅覚伝導路である外側嗅索は、新生児期に切断されても自然再生する。しかし、本来の外側嗅索内の神経線維とは異なり、再生した神経線維では髄鞘化が起こらず、外側嗅索内に有髄線維がほとんどない状態となる。本研究では、外側嗅索を切断した新生児ラットに、中枢神経損傷後の神経保護作用や髄鞘化促進作用が報告されているアセチル-L-カルニチンおよび甲状腺ホルモンを投与し、再生神経線維の髄鞘化誘導を目的として実験を行った。その結果、アセチル-L-カルニチン投与群において、外側嗅索内の再生線維の髄鞘化促進効果が確認され、有髄線維数の明らかな増加が認められた。

研究成果の概要(英文)：Acetyl-L-carnitine (ALC) has various neuroprotective effects against neurodegenerative diseases and facilitates myelination of regenerated axons after peripheral nerve injuries. We previously reported that spontaneous regeneration of the lateral olfactory tract (LOT), the main fiber tract of the central olfactory system, consistently occurred in newborn rats and a majority of these regenerated fibers were unmyelinated in neonatally LOT-transected young adult rats. To investigate the effects of ALC treatment on myelination in LOT, neonatal rats were treated with ALC after LOT transection. The study revealed that ALC accelerates myelination of regenerated fibers in neonatally LOT-injured young adult rats and the number of myelinated axons of regenerated fibers was found to be statistically higher in ALC-treated rats compared to control rats.

研究分野：神経解剖学

キーワード：神経再生 髄鞘形成

1. 研究開始当初の背景

ラットの神経損傷モデルを用いたこれまでの研究から、新生児期中枢神経伝導路を損傷されたラットでは、損傷後に神経再生が起こり、再生線維によって機能も回復することが確認された。また、末梢神経系においては、成熟ラットでも神経損傷後に神経再生が起こり、再生線維によって機能が回復することが確認された。しかし同時に、中枢神経系の損傷では、損傷の時期が遅くなると機能が回復しないということ、また、末梢神経系の損傷では、神経が反復的に損傷された場合においては機能の回復が遅くなる、または、回復したとしても元の状態にまでは戻らない、ということが確認された。

中枢神経損傷モデルとして確立した脳内の嗅覚伝導路である外側嗅索切断ラットにおいては、切断が新生児期に行われれば、切断された外側嗅索は自然再生することが明らかとなっている。しかし、再生した線維においてはほとんど髄鞘化が起こらず、再生線維内の有髄線維はごく少数であることが確認された。さらに、外側嗅索切断後の再生線維自体、損傷された時期が遅くなるほど、その数が減少することも明らかとなっている。

末梢神経損傷モデルとして確立した坐骨神経損傷ラットを用いた実験では、成熟ラットの坐骨神経を圧迫損傷しても、損傷後に神経線維が再生することが分かっている。しかし、再生した神経線維における有髄線維の数および、髄鞘の厚さを損傷前(正常ラット)と比較すると、顕著に減少していることが明らかとなっている。

一般的に脱髄性疾患では、髄鞘が消失することによって神経伝導速度が遅くなり、運動および感覚の麻痺が生じる。そのため、神経損傷後に機能を十分に回復させるためには、再生した線維における髄鞘化を誘導し、有髄線維の数を増加させること、また、それぞれの神経線維の髄鞘を、損傷前と同じ程度まで厚くすることが必要であると考えた。そこで、すでに確立している神経損傷ラットを利用し、再生後の神経線維の髄鞘化を促進する実験を開始した。

2. 研究の目的

損傷した神経を再生させ、その機能を回復させるためには、神経損傷後に再生した神経線維の再髄鞘化を促す必要がある。本研究では、これまでの研究で確立した中枢神経再生モデルを利用して、再生した神経線維の髄鞘化を誘導し、有髄線維の数および髄鞘の形成を促進することによって、神経再生動物の機能回復を図ることを目的として実験を行った。本研究で利用した中枢神経再生モデルとは、嗅球から嗅皮質へと投射する嗅覚の脳内伝導路である外側嗅索(嗅覚系の中枢伝導路)を新生児期に切断したラットであり、新生児期に外側嗅索を切断されたラットでは、切断された外側嗅索において神経が自然再

生するものの、その再生線維はほとんど髄鞘化されないことが確認されている。そこで本研究では、外側嗅索切断新生児ラットに対し、神経損傷後の神経保護作用や、髄鞘化促進作用が報告されているアセチル-L-カルニチン(0-Acetyl-L-carnitine hydrochloride)または甲状腺ホルモン(L-Thyroxine sodium salt pentahydrate)を継続的に投与することによって、外側嗅索の再生神経線維の髄鞘化を誘導し、再生後の神経線維の再髄鞘化の程度および機能回復速度や機能回復程度を調べ、神経再生における薬剤投与による効果について検証することを目的として実験を実施した。

3. 研究の方法

(1) 外側嗅索切断新生児ラットの作成

生後2日の新生児ラットを使用した。ラットに低体温麻酔をかけ、手術用顕微鏡で確認しながら、片側の外側嗅索を鋭利に切断した。外側嗅索の切断は左側で行い、眼科用角膜切開メスを用いて行った。外側嗅索切断後、外側嗅索が完全に切断されていることを確認するため、逆行性の神経トレーサーであるFast Blue (FB)を切断部より後方の嗅皮質へ注入した(1%, 0.1 μ l)。手術後は母ラットの元に戻し生育させた。

(2) 薬剤投与

外側嗅索を切断し、母ラットの元で生育中のラットを、甲状腺ホルモン投与群とアセチル-L-カルニチン投与群、および、コントロール群に分けた。生後5日目から20日目にかけて、甲状腺ホルモンは200 μ g/kgで、また、アセチル-L-カルニチンは100mg/kgで、それぞれ1日1回、外側嗅索切断ラットの腹腔内に投与した。薬剤の代わりに同量の生理食塩水を投与した動物をコントロール群とした。

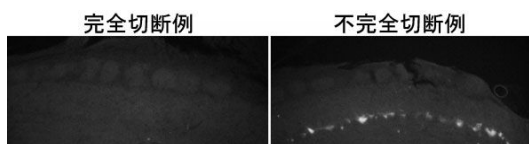
(3) 試料作成

生後30日目に、外側嗅索切断ラットを4%パラホルムアルデヒド溶液で灌流固定し、脳を採取した。採取した脳は、同じ固定液で1日間固定した後、30%スクロース溶液に2日間浸漬した。その後、脳を嗅球とそれ以外の部位に分け、嗅球からは矢状断の凍結切片(50 μ m厚, 150 μ m間隔)を作成した。

嗅球から作成した切片を蛍光顕微鏡で観察し、外側嗅索の不完全切断例を除外した。外側嗅索不完全切断例においては、切断直後に切断部より後方の嗅皮質へ注入したFBが、残存する神経線維に取り込まれて逆行性に嗅球へと運ばれるため、嗅球内にFB陽性の投射ニューロン(僧帽細胞)が観察された。この場合には、以降の実験から除外した。外側嗅索完全切断例では、嗅球内にFB陽性の僧帽細胞は観察されなかった。

嗅球内にFB陽性の僧帽細胞が観察されなかった外側嗅索の完全切断例において、外側

嗅索および嗅皮質を含む残りの脳から前額断の凍結切片 (50 μm 厚, 300 μm 間隔) を作成した。



(4) 免疫染色

外側嗅索および嗅皮質を含む脳から作成した凍結切片に対し、浮遊法で抗 Myelin basic protein (MBP) 抗体を用いた免疫染色を行い、外側嗅索内の神経線維の髄鞘を検出した。発色後、切片をスライドガラスに貼り付け、脱水および透徹後に封入剤で封入した。

(5) MBP 陽性部位の計測

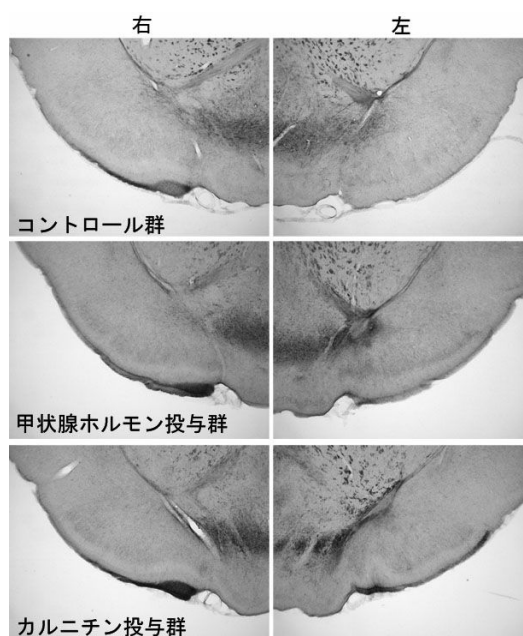
甲状腺ホルモン投与群、アセチル-L-カルニチン投与群、およびコントロール群のラットにおいて、MBP 免疫染色を施した 300 μm 間隔の凍結切片を光学顕微鏡で観察し、外側嗅索内の MBP 陽性部位を確認した。外側嗅索切断側 (左側) と非切断側 (右側) において、画像解析ソフトウェアである ImageJ を用いて MBP 陽性部位の面積を計測した。それぞれの動物における MBP 陽性部位面積を、甲状腺ホルモン投与群およびアセチル-L-カルニチン投与群とコントロール群で比較した。

(6) 有髄線維数の計測

外側嗅索および嗅皮質を含む脳から作成され、MBP 免疫染色を施された凍結切片に隣接する一部の切片から、切断側 (左側) および非切断側 (右側) の外側嗅索を含む部位を小さく切り出し、エポキシ樹脂に包埋後、超薄切片を作成した。作成した超薄切片を電子顕微鏡で観察し、外側嗅索内の神経線維の髄鞘を詳細に調べた。さらに、外側嗅索切断側 (左側) と非切断側 (右側) において、外側嗅索内の有髄線維の数を計測し、甲状腺ホルモン投与群およびアセチル-L-カルニチン投与群とコントロール群で比較した。

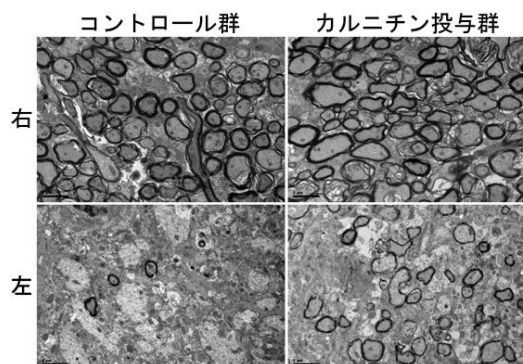
4. 研究成果

コントロール群のラットの脳から作成した MBP 染色切片を観察した結果、外側嗅索非切断側 (右側) において、外側嗅索の領域全体で MBP 陽性部位が確認された。しかし、切断側 (左側) では、MBP 陽性部位はほとんど観察されなかった。甲状腺ホルモン投与群、およびアセチル-L-カルニチン投与群の脳においては、両群で、非切断側 (右側) にはコントロール群と同程度の MBP 陽性部位が確認された。しかし、外側嗅索切断側 (左側) における MBP 陽性部位は、アセチル-L-カルニチン投与群ではコントロール群と比較して陽性領域の増加が観察されたものの、甲状腺ホルモン投与群ではコントロール群と同程度の陽性部位しか確認できなかった。



アセチル-L-カルニチン投与群の脳を、光学顕微鏡下でさらに詳細に観察したところ、外側嗅索切断側 (左側) および非切断側 (右側) の両側において確認された MBP 陽性部位は、外側嗅索領域と一致しており、また、その MBP 陽性部位は、非切断側 (右側) ではコントロール群と同程度であったものの、切断側 (左側) では、コントロール群に比べて明らかに増加していた。しかし、その範囲は、非切断側に比べれば少ないことが確認された。以上の MBP 染色切片の観察から、アセチル-L-カルニチンの投与によって、外側嗅索内の再生線維の髄鞘化が誘導されている可能性が示唆された。

次に MBP 染色切片において、外側嗅索切断側 (左側) と非切断側 (右側) の MBP 陽性部位の面積を計測し、アセチル-L-カルニチン投与群とコントロール群で比較した結果、アセチル-L-カルニチン投与群において、外側嗅索切断側 (左側) の MBP 陽性部位の面積が有意に増加していた。また、電子顕微鏡で観察した超薄切片において、外側嗅索切断側 (左側) と非切断側 (右側) の外側嗅索内における有髄線維数を計測し、アセチル-L-カルニチン投与群とコントロール群で比較した結果、アセチル-L-カルニチン投与群にお



いて、外側嗅索内の有髄線維数も有意に増加していることが確認された。

新生児期に外側嗅索を切断されたラットは、自然再生によって神経線維が再生するが、その再生線維はほとんど髄鞘化が起こらず、外側嗅索内には、ほとんど有髄線維が存在しない状態となる。しかし、新生児期外側嗅索切断ラットにおいて、外側嗅索切断後に継続的にアセチル-L-カルニチンを投与すると、再生した外側嗅索内の神経線維の髄鞘化が促進されることが確認され、アセチル-L-カルニチンには、髄鞘形成を誘導する効果があることが明らかとなった。

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)

[雑誌論文](計1件)

Fukushima N, Yokouchi K, Kuroiwa M, Kawagishi K, Moriizumi T, Acetyl-L-carnitine enhances myelination of regenerated fibers of the lateral olfactory tract, Neurosci Lett, 653, 215-219, 2017, 査読有 DOI: 10.1016/j.neulet.2017.06.001

[学会発表](計2件)

福島菜奈恵, 横内久美子, 森泉哲次, アセチル-L-カルニチンによる再生線維の髄鞘化促進, 第123回日本解剖学会, 2018.3.28, 東京

福島菜奈恵, 横内久美子, 黒岩正文, 川岸久太郎, 森泉哲次, 新生児ラットにおける外側嗅索再生線維の髄鞘化誘導, 第122回日本解剖学会, 2017.3.29, 長崎

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

福島 菜奈恵 (FUKUSHIMA, Nanae)
信州大学・学術研究院医学系・准教授
研究者番号：90334888

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

黒岩 正文 (KUROIWA, Masafumi)
信州大学・大学院生
研究者番号：なし

横内 久美子 (YOKOUCHI, Kumiko)
信州大学・技術専門職員
研究者番号：なし

住友 憲深 (SUMITOMO, Norimi)
信州大学・技術職員
研究者番号：なし