

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11360

研究課題名(和文) イカ巨大軸索・マウス軸索を用いた即時軸索機能回復のための軸索融合法に関する研究

研究課題名(英文) axonal fusion method for functional recovery with using giant axon of squid and axon of mice

研究代表者

成島 三長 (Narushima, Mitsunaga)

三重大学・医学系研究科・教授

研究者番号：80431873

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：イカを用いて、巨大軸索クランプおよびクランプ解除・再疎通後の神経再結合を模した機能回復過程と軸索輸送変化を直視下に電気生理学的手法・蛍光イメージングを用いて形態学的・電気生理学的に軸索機能観察実験を行った。

活イカを新たな神経ブロック半身麻酔の開発と巨大軸索clamp解除時間と機能回復までの時間とを計測し、機能回復のための最適時間を得た。Clamp時に軸索内へカルシウムの流入が示唆され、流入コントロールすることも軸索融合を行う上で重要であることが分かった。またGFPマウスを用いて、ミトコンドリアの軸索内輸送の観察を行い、コントロールデータを得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究にて融合法開発のモデル動物の確立と今後の課題を見出すことができた。神経融合法を開発することでがん治療や外傷によって神経麻痺となった顔面や四肢の回復が自然で元の状態に近い状態へ回復させることが可能となる。今後electrofusion法(電気的融合法)(Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. 2010;2(2):151-61)、PEG法(化学的融合法)(J Neurocytol 2000 29(9):633-43)、HVJ法(センダイウィルスエンベロップ法)の三種類を組み合わせ、最適な融合法を選定して治療に役立てる端緒を得た。

研究成果の概要(英文)：With using squid, function recovery process of a nerve re-connection was observed after clamping and unclamping. Changes in axonal transport were directly observed using fluorescence imaging and electro-physiological techniques.

We developed a new nerve block hemi-anesthesia for squid in vivo and measured the time to release the giant axon clamp and the time to recover function. The influx of calcium into the axons was suggested during clamp. Controlling influx is also important for an axonal fusion. In addition, GFP mice were used to observe the transport of mitochondria into axons, and control data were obtained.

研究分野：形成外科

キーワード：神経融合 軸索 機能再建 イカ 巨大軸索

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌などの腫瘍切除後、マイクロサージェリー技術を用いて神経吻合・神経移植・神経筋移植などを行っている。しかし神経再生は人間本来の回復能力に依存している。このため、)神経再生までに数カ月かかり、筋繊維は再生神経到達前に萎縮し本来の機能回復を得られない。)神経軸索再生時に神経痕が生じ再生軸索数が制限される。様々な神経再生誘導因子が報告されているが、臨床において現状を打破するには至っていない。そこで発想を転換し、神経の軸索変性が不可逆的に生じる前に、軸索の末梢側を中枢側の神経細胞と再接合し、軸索輸送を再疎通させることで即時神経機能再生が行えるのではないかと本研究を発想するに至った。Neumannらによって *C.elegans* neuron で切断後、自然に再接合がされることが解明されてきた。(Dev Dyn (2011). 240(6):1365-1372, Nature (2015)517, 219-222) Waller 変性する前に切断された神経軸索をどのようにつなぐか?その突破口は“細胞融合法”にあると考えた。

この分野に関しては、1986年 Bittnerらにより *in vitro* で crayfish の軸索を切断後、ポリエチレングリコールを用いて融合を行った報告がある。(Brain Research,1986: 5 351-55) また2000年 Shiらは、ポリエチレングリコールを用いた神経傷害修復を報告した。(J Neurocytol 2000 29(9):633-43) さらに2010年に Wesley C. Changらが *in vitro* にて Axon microelectrofusion 法を報告し、2本の axon を交叉融合した。(Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. 2010;2(2):151-61) こういった先進的研究が始まりつつある状況であった。

2. 研究の目的

神経機能回復の新たな治療法確立のため、活イカ巨大軸索およびマウスを用いて Waller 変性を回避と即時神経機能再生の基礎実験を行うこととした。

- a) 巨大軸索 clamp 再疎通後の神経再結合を模した機能回復過程の形態学的・電気生理学的観察
- b) 巨大軸索に対し様々な細胞融合技術を用いた軸索融合の可能性の検討
- c) 巨大軸索で得られた最適な軸索融合技術の結果をもとにマウスでの軸索融合技術の確立により waller 変性の回避可否を検討し、新たな神経機能回復治療法を目指すことを目的とした。

イカの巨大軸索は1909年 Weiss が初めて報告し、その後1930年代に Youngらによって詳しい研究がなされた。特に電気生理学的実験においては Hodgkin と Huxley が巨大軸索を用いたイオン電流研究で電気生理学分野を発展させ1963年にノーベル賞を受賞している。しかしイカの飼育が困難であったため、実験が *ex vivo* で部分的に軸索を切り出して行う研究であり、本当の意味での神経細胞の研究でなかった。これに対して我々は、世界で初めてヤリイカの *in vivo* 直視下神経実験法を確立し報告してきた。(2010年第25回神経組織の成長・再生・移植研究会学術集会 in 大阪) *in vitro* におけるイカ神経の電気生理学的データは多く蓄積がある。このイカ巨大軸索を用いた実験を *in vivo* で行うことで Waller 変性を起こさず軸索機能を回復する過程をリアルタイムに経時的に追跡できると考え実験法をモデルとすることにした。

この神経融合法が樹立されれば、基礎分野における神経機能実験の新たなモデルとなるのみならず、ワラー変性後の自然再生に依存する現状を変えることができる。将来的には臨床で顔面神経麻痺や四肢麻痺などの神経再建さらには眼球移植などの革新的な即時機能回復治療につながると考えられる。つまり神経がダメージを受けたり切断された場合に、この方法を用いて手術することで運動神経であれば一週間程度で元通りに動かすことができるようになる可能性がある。

いままでは回復が難しかった前頭筋や口角下制筋などの回復も可能となり、自然な表情を取り戻したり、四肢の巧緻運動可能となる。感覚神経であれば手術後早期から知覚を得ることができるようになり神経腫を引き起こさないことが考えられる。さらに今までの再生技術では難しい末梢神経のみでなく中枢神経系の神経損傷に対しても応用できる可能性があり、移植や神経再生技術と組み合わせることでこれまで不可能であった効果的な神経の外科的治療法を生み出すと考えている。

3. 研究の方法

生きたイカおよびマウスを用いて、軸索蛍光リアルタイムイメージング法を確立し、イカの巨大軸索を、*in vivo* で直視下に巨大軸索輸送を観察する実験系を確立し、電気生理学的手法を用いて巨大軸索 *in vivo* 筋電図検査法のデータ蓄積を行うこととした。巨大軸索クランプおよびクランプ解除・再疎通後の神経再結合を模した機能回復過程と軸索輸送変化を直視下に電気生理学的手法・蛍光イメージングを用いて形態学的・電気生理学的に軸索機能観察実験を行うこと。さらにミトコンドリア GFP マウスを用いて、軸索内輸送のコントロールデータ 図:イカ巨大軸索の収集を蓄積し、実際の切断時にどのような変化が起こりうるかを検討することとした。

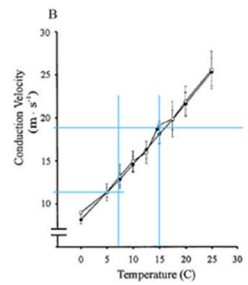


図:イカ巨大軸索の収集を蓄積し、実際の切断時にどのような変化が起こりうるかを検討することとした。

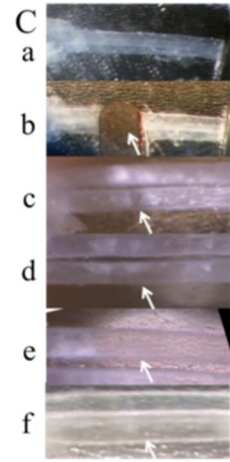
4. 研究成果

イカを用いて、巨大軸索クランプおよびクランプ解除・再疎通後の神経再結合を模した機能回復過程と軸索輸送変化を直視下に電気生理学的手法・蛍光イメージングを用いて形態学的・電気生理学的に軸索機能観察実験を行った。

活イカを新たな神経ブロック半身麻酔の開発と巨大軸索 clamp 解除時間と機能回復までの時間を計測し、機能回復のための最適時間を得た。Clamp 時に軸索内へカルシウムの流入が示唆され、流入コントロールすることも軸索融合を行う上で重要であることが分かった。また GFP マウスを用いて、ミトコンドリアの軸索内輸送の観察を行い、軸索内輸送時の正常時、麻酔時、切断時のデータを得た。データによって、軸索融合の実際に取り組む基礎的な裏付けとなる。



理論値 $v'=0.62T+7.725$ m/s



クランプ

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 成島三長	4. 巻 59
2. 論文標題 臨床医はどのように研究をしたらよいか	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 形成外科	6. 最初と最後の頁 1286-1291
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 成島三長
2. 発表標題 神経損傷に対する様々な再建・再生治療
3. 学会等名 第22回日本口腔学顔面外傷学会総会・学術大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 成島三長
2. 発表標題 イモリにおける再生と神経からScarless wound healingへの可能性を探る
3. 学会等名 第63回日本形成外科学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 成島三長
2. 発表標題 神経軸索輸送のミトコンドリア蛍光観察法 イカから哺乳類まで
3. 学会等名 末梢神経を語る会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 成島三長
2. 発表標題 イカにおける上肢神経血管束の哺乳類との比較検討
3. 学会等名 第25回形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 成島三長
2. 発表標題 人工神経による再生医療の展望
3. 学会等名 第40回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	松本 有 (Matsumoto Yu)	東京大学・医学部・講師 (12601)	
研究協力者	近藤 健二 (Kondo Kenji)	東京大学・医学部・准教授 (12601)	
研究協力者	光嶋 勲 (Koshima Isao)	東京大学・医学部・名誉教授 (12601)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力 者	鷺津 正夫 (washizu Masao)	東京大学・工学部・名誉教授 (12601)	