

令和 6 年 6 月 27 日現在

機関番号：74314

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2023

課題番号：18K09500

研究課題名（和文）中枢末梢神経軸索再生における癒痕の抑制

研究課題名（英文）The inhibition of scarring in central and peripheral nerve regeneration

研究代表者

石川 奈美子（ISHIKAWA, Namiko）

公益財団法人田附興風会・医学研究所 神経・感覚運動器研究部・主任研究員

研究者番号：00462276

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：4週齢ラットの坐骨神経および中枢神経損傷モデルを作成し、ヘルムホルツコイルを使用し磁場影響下での再生を検討した。マクロファージが損傷部に遊走し損傷によるデブリスを速やかに除去することで線維芽細胞抑制していることが示唆された。マイクロアレイ解析にてActn2、3の発現上昇を認め、免疫染色でも再生軸索成長円錐にF-actinを認めたため、アクチンが軸索伸長に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特定の磁場が発生した環境において再生が促されることは非侵襲的であり今後の新しい治療の選択肢になりうると思われる。

研究成果の概要（英文）：We created sciatic nerve and central nerve injury models in 4-week-old rats and examined regeneration under the influence of a magnetic field using a Helmholtz coil. It was suggested that macrophages migrate to the injured area and rapidly remove debris caused by the injury, thereby suppressing fibroblasts. Microarray analysis revealed increased expression of Actn2 and 3, and immunohistochemistry also revealed F-actin in the growth cones of regenerating axons, suggesting that actin may contribute to axon elongation.

研究分野：神経再生

キーワード：神経 再生 癒痕 磁場

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

末梢神経が損傷すると損傷部の中枢側では、再生芽はシュワン細胞の基底膜に沿って伸長する。シュワン細胞は再生軸索の足場となるのみでなく神経栄養因子(NGF、BDGF、NT-3、CNTF、b-FGF)を分泌し、再生軸索の足場となる接着因子(NCAM、L1、N-cadherin、 α -integrin)を発現し軸索伸長を促進する。軸索再生中に線維芽細胞が侵入し癒痕が形成されると再生軸索の伸長が妨げられる。そこでわれわれは癒痕の形成を防ぐような材料を用いて損傷部を架橋し軸索を早期に支配領域まで到達させることが重要と考え共有結合架橋した多孔性の新たなアルギン酸ゲルや、蟹の甲羅などに含まれるキチンを脱アセチル化して得られるグルコサミンであるキトサンを用いたキトサンゲルを開発し中枢及び末梢神経の再生の研究を行い良好な結果を得てきた (Suzuki, Y., Kataoka, K., Chou, H., Ohta, M., Ishikawa, N., Suzuki, K., Suzuki, S., Tanihara, M., Ide, C.: Alginate can be used for repair of spinal cord injury. *Tissue Engineering*. 2003; 9, 803) (Ohta, M., Suzuki, Y., Chou, H., Ishikawa, N., Suzuki, S., Tanihara, M., Suzuki, Y., Muzushima, Y., Dezawa, M., Ide, C.: Novel heparin/alginate gel combined with basic fibroblast growth factor promotes nerve regeneration in rat sciatic nerve. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2004; 71, 661-668) (Ishikawa, N., Suzuki, Y., Ohta, M., Cho, H., Ide, C. Peripheral nerve regeneration through the space formed by a chitosan gel sponge. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2007;83A (1), 33-40)

多様な分化能を有する間葉系由来の細胞である骨髄間質細胞をラットの大腿骨より採取し分化誘導させたシュワン細胞を、アルギン酸ゲルとキトサンゲルを担体として移植し、末梢神経の軸索再生の検討を行い良好な軸索再生を得た (Ishikawa N, Suzuki Y, Dezawa M, Kataoka K, Ohta M, Cho H, Ide C, Peripheral nerve regeneration by transplantation of BMSC-derived Schwann cells as chitosan gel sponge scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2009;89A(4):1118-24)

神経損傷部位に磁場を生じさせると軸索再生を促進するとの報告がある。細胞内 C-AMP の濃度上昇により中枢及び末梢神経再生軸索伸長が促進されることが報告されている。中枢神経では C-AMP 分解酵素 phosphodiesterase を阻害するロリプラムの投与により運動機能が回復するという報告がある。磁場が癒痕組織を形成する線維芽細胞を抑制する、細胞外基質に影響を与えた、もしくは成長円蓋に何らかの影響を与えていることが考えられている。

以上より、磁場影響下にて神経軸索伸長が促進されることは、より侵襲の少ない再生方法と考えられ研究を開始した。

2. 研究の目的

末梢神経損傷時磁場をかけることで癒痕形成による神経軸索再生阻害を抑制できるかを検討する。癒痕抑制のメカニズムを明らかにすることで末梢神経損傷患者の臨床応用を目標とし、グリア癒痕により再生が阻害されている中枢神経再生の研究にも応用したい。磁場を用いた末梢及び中枢神経の再生の研究は患者の負担も少なく医の倫理に抵触しないため臨床応用可能と思われる。

3. 研究の方法

中枢及び末梢神経軸索再生における磁場の影響、具体的には磁場の成長円蓋、シュワン細胞、細胞外マトリックスに対する影響や、影響を及ぼした磁場の周波数、波形、強さ、時間の検討を行う。

具体的にはラットの坐骨神経に 8mm の欠損部を作成し創を閉鎖するモデルを作成する。1日 4-6 時間程度の動磁場をかけ 4 ヶ月程度飼育する。経時的に作成した標本を免疫組織化学染色にて観察し癒痕形成の有無、シュワン細胞や再生軸索伸長に対する効果を検討する。

また、ラットの脊髄に圧挫損傷を加えたモデルを作成する。動磁場をかけ、急性期において形成された脊髄内の空洞の癒痕形成を免疫組織化学染色にて観察する。

術後早期に坐骨神経を採取しマイクロアレイを用いて調べ、発現が亢進もしくは低下している遺伝子を絞り込み解析を行なう。

4. 研究成果

4 周齢ラットの坐骨神経および中枢神経損傷モデルを作成し、ヘルムホルツコイルを使用し磁場影響下での再生を検討した。波形 (サイン波、スクエア波、パルス波) や磁場の強さを変えて検討したところ、坐骨神経損傷モデルパルス波、100Hz での磁場影響下で軸索がまっすぐに伸長していることが確認できた。中枢神経損傷モデルでは確認できなかった。

マクロファージが損傷部に遊走し損傷によるデブリスを速やかに除去することで線維芽細胞抑制していることが示唆された。マイクロアレイ解析にて Actn2、3 の発言上昇を認め、免疫染色でも再生軸索成長円錐に F-actin を認めたため、アクチンが軸索伸長に寄与している可能性が

示唆された。

磁場をかけた状態で再生軸索先端の成長円錐は損傷神経の遠位端にまっすぐ伸長していることを確認できた。また、損傷部-再生軸索周囲及び末梢端にはたくさんのマクロファージが確認できた。マクロファージは再生軸索先端で軸索に沿って認められたが成長円錐に特異的に認められたわけではなかった。マクロファージが損傷した debris を貪食している像が電顕像にて確認されたため、マクロファージが損傷部に遊走し損傷によるデブリスを速やかに除去することで線維芽細胞抑制に何らかの機序にて寄与していると考えられた。

また、シュワン細胞が成長円錐より遊走していたことから軸索再生の方向性決定に何らかの役割を果たしていることが示唆された。ラミニンはワーラー変性を引き起こしている軸索の損傷末梢側ではなく中枢側の再生軸索の成長円錐近傍に認められたため再生軸索の足場となっていることが示唆された。

坐骨神経及び脊髄損傷モデルにて磁場をかけた条件下にて、損傷後 1-4 週間後の癒痕形成後のモデルに対し磁場の影響を検討した。損傷後早期（48 時間、4 日間）における cAMP の発現は上昇していた。

ラットの坐骨神経切断術後 2 日、4 日、7 日にてマイクロアレイ解析を施行し発現の上昇した遺伝子をコントロールと比べて検討した。Actn2、3、Myh、Atp2a1、Acta1 等細胞の運動性や構造に関係する遺伝子、細胞内カルシウム量の調節に関係する遺伝子が高度に発現していた。免疫染色では再生軸索成長円錐に F-actin を認めたためアクチンが軸索の方向性決定に寄与している可能性が示唆された。

中枢神経損傷モデルでは癒痕の抑制を認める周波数や波形は認められなかった。今後さらなる検討が必要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	鈴木 義久 (SUZUKI Yoshihisa) (30243025)	公益財団法人田附興風会・医学研究所 神経・感覚運動器研究部・研究主幹 (74314)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関