

機関番号：34417

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592064

研究課題名 (和文) 血管付き神経移植による視神経再生促進作用の解析

研究課題名 (英文) Analysis of axonal regeneration of retinal ganglion cells after vascularized peripheral nerve graft.

研究代表者

若林 毅俊 (WAKABAYASHI TAKETOSHI)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90302421

研究成果の概要 (和文)：

視覚をになう網膜神経節細胞は、その軸索である視神経が傷害されると軸索を再生できず、細胞死に陥る。一方、切断端に末梢神経片を遊離自家移植することで軸索が再生することが知られていたが、その割合は数%にすぎず、未だ臨床応用が困難な状況であった。我々のグループは末梢神経を栄養血管つきで移植することで網膜神経節細胞の軸索再生を著しく促進出来ることを見いだした。また、再生軸索は組織学的にも正常に近い形態を回復していた。血管付きでの移植は従来の遊離神経移植よりも軸索再生能が高いことが明らかになった。以上から、血管付き神経移植片による視神経の再建は有望な手法であると考えられた。

研究成果の概要 (英文)：

Retinal ganglion cells belong to the central nervous systems and once their axons are transected, they cannot regenerate their axons spontaneously. When autologous peripheral nerve is grafted to the optic nerve stump, only small populations of retinal ganglion cells regenerate their axons. In this study, we tried to graft vascularized peripheral nerve and showed that large number of retinal ganglion cells regenerated their axons into the graft than that without vascularization. Our results suggest that vascularized peripheral nerve graft promotes axonal regeneration of retinal ganglion cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：眼科学

科研費の分科・細目：眼科学

キーワード：網膜神経節細胞, 視神経, 末梢神経移植, 栄養血管, 軸索再生, シュワン細胞, 組織化学

1. 研究開始当初の背景

(1) 成熟哺乳動物の視神経は網膜神経節細胞の軸索であり、中枢神経系に属する。ひとたび切断されると、95%以上の網膜神経節細胞は細胞死に至る。また、細胞死を免れた網膜

神経節細胞も、その軸索を再生できない。しかし、視神経切断端に末梢神経片を吻合・移植すると、網膜神経節細胞死は抑制され、一部の網膜神経節細胞は軸索を再生する。しかし、たとえこのような処置を行っても、細胞

死が阻止され、残存する網膜神経節細胞は、正常網膜の約2割で、さらに、軸索を再生し、視機能再建にかかわる網膜神経節細胞は数%に過ぎず、機能回復に至る視覚機能は満足できるものではない。網膜神経節細胞の生存を促進し、さらにその軸索の再生を促進させることが、臨床応用可能な視神経再建法の確立にむけたもっとも基本的な第一段階である。

(2)従来の末梢神経移植は遊離神経移植であり、移植片である坐骨神経は頭皮下に埋没して置かれるのみであった。この場合、網膜神経節細胞の生存と軸索再生を促進することが知られている移植片内のシュワン細胞の大半は死滅し、移植片の線維化が起こる。一方、近年のマイクロサージェリー技術の進展により、移植片となる神経を栄養血管とともに採取し、栄養血管を移植先の血管と吻合することで、血行を有する神経の採取と移植が可能となってきた。この場合、移植片のシュワン細胞の生存率はほぼ100%で、移植片の線維化が完全に防止でき、末梢神経の再建において、長い移植片が必要な場合に特に有効であることがすでに臨床的にも確かめられている。申請者らはラットにおいて、神経移植片をその栄養血管とともに採取したのち、その血管を血管吻合に適した外頸動脈および外頸静脈に、形成外科学分野で用いられる超微小血管吻合術をもちいて吻合した上で、視神経切断端に移植する技術を確立した。しかし、本手法が、中枢神経である網膜神経節細胞の軸索再生促進作用を有するのには十分には明らかになっていない。また、移植手術の手法もいまだ十分確立されたものとは言えない。

2. 研究の目的

(1)血管付き末梢神経移植が、網膜神経節細胞の軸索再生を促進するか明らかにする。

(2)再生した軸索の組織化学的な特徴を明らかにする。

(3)移植手法の検討をおこない、より効率的な術式を確立する。

3. 研究の方法

(1)成熟ウイスターラット(8週齢オス)の片眼の視神経を完全に切断した。網膜中心動・静脈と短後毛様動脈は傷害しないよう充分注意した。同一個体において、坐骨神経などの末梢神経片を栄養血管付きで採取した。採取した神経片は、外頸動脈および外頸静脈に超微小血管吻合術により吻合したのち、視神

経切断端に移植した。

(2)術式検討においては、超微小血管吻合術はきわめて繊細な手法であり手術時間も要する。また、採取する神経の種類によっては術後の機能障害が大きい場合がある。このことから、研究の効率化と術後機能障害の軽減を目指すため、移植片となる神経の種類選択と血管吻合が不要な術式の検討も行った。具体的には、頭頸部に近い末梢神経を、栄養血管の血流を維持したまま採取し、視神経切断端に移植可能となるような神経の選択と術式の開発についても検討した。

(3)移植1ヶ月後、移植片に逆行性標識物質granular blue(GB)を注入し、軸索を再生した網膜神経節細胞を逆行性に標識した。3日後、移植片と網膜を一塊として回収した。網膜神経節細胞特異的モノクローナル抗体であるC38抗体を用いて残存する網膜神経節細胞のすべてを標識した。逆行性標識との二重標識により、網膜神経節細胞を再生軸索の有無で区別し、カウントした。再生軸索の超微細構造を明らかにするため、移植片の超薄切切片を作成し組織学的に観察した。

4. 研究成果

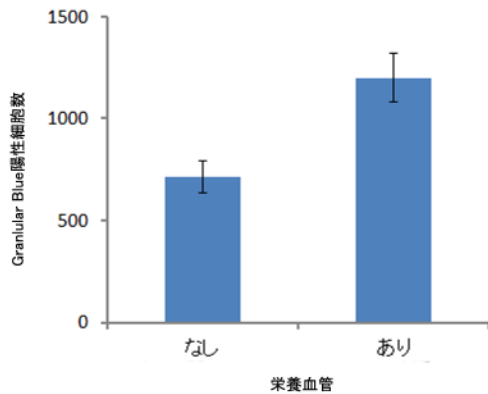
(1)術式の選択

以前より、視神経切断—末梢神経移植では、坐骨神経が多用されてきた。今回も坐骨神経を用いて血管付きで神経移植を行ってきたが、一方でそれに伴う機能障害も大きい。また、手術侵襲も長時間で大きい。そこで、其れ以外の神経についても利用可能か検討した。検討したのは①坐骨神経、②大腿神経、③顔面神経、④正中神経の4種である。坐骨神経と大腿神経は、神経片を栄養動・静脈付きで単離し、これを外頸動静脈と微細吻合術を施行した。顔面神経と、正中神経は、神経片の栄養血管を残した上で切断した。それぞれの神経の近位端を視神経切断端へ吻合移植する一方、遠位端は切断し、自由遊離片とした。坐骨神経・大腿神経を利用した場合は、血管吻合に長時間を要するため手術に10時間ほど要し、術者の労力が大きいばかりでなく、手術侵襲が大きく結果が安定しないことが判った。一方で、顔面神経、正中神経を用いた場合は、血管吻合に要する時間が不要となるため手術時間が約4時間となった。一方で、大腿神経、顔面神経は神経の直径が視神経の直径よりはるかに小さく、視神経全体を含むような吻合術が困難であった。また、顔面神経利用時には、特に涙腺の機能が侵されることが多く、角膜表面に障害が起こり、結果が安定しなかった。以上の結果より、視神経切断端への栄養血管付き末梢神経移植に

は、今のところ、正中神経を用いるのが最良であると判断した。

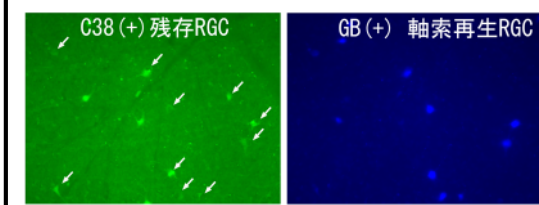
(2) 栄養血管の有無による再生軸索数の相違
移植片の栄養血管の有無による再生軸索数の違いでは、血管なし群では再生軸索を有する網膜神経節細胞は 712 ± 78 個/網膜であったが、血管付き群では 1199 ± 120 個/網膜であり、統計学的に有意に再生軸索数が増加していた(図1 : $p < 0.05$)。

図1: 栄養血管の有無による再生軸索数の相違



(3) 残存する網膜神経節細胞と再生軸索
血管付き移植では、C38 抗体により標識された残存網膜神経節細胞のほとんどが逆行性に標識される個体が認められた(図2)

図2: C38抗体とGBとの二重標識



(4) 再生軸索の組織学的特徴
再生軸索の周りのシュワン細胞によるミエリン鞘は、血管なし群ではほとんど認められなかった(図3)これに対し、血管付き群では再生神経線維束の周りに神経周膜が形成されており(図4、弱拡大図)、さらに、再生軸索にはミエリン鞘が良好に形成されていた(図4、強拡大図)

(5) まとめ
血管付き神経移植は、軸索切断後の網膜神経節細胞において、その軸索再生を著しく促進する作用があることがわかった。また、再生軸索は、組織学的に正常の末梢神経に類似した形態を示し、ミエリン鞘が再生されない血管なしの場合とくらべて、再生した軸索の生理学的特性がより生理的な状態に近いと考

えられた。以上から、血管付き神経移植は視神経を含む中枢神経系の機能再建にも有用であると考えられた。

図3: 栄養血管(-)の移植片

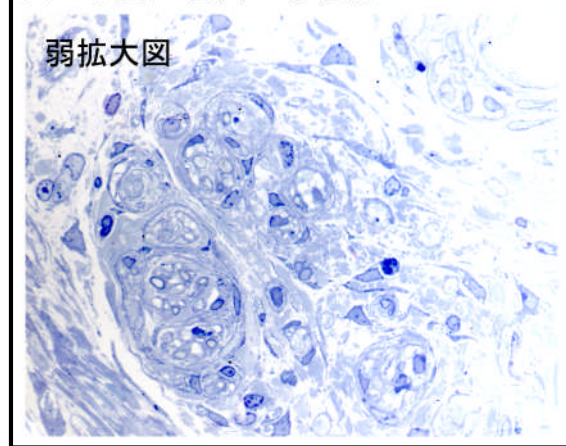
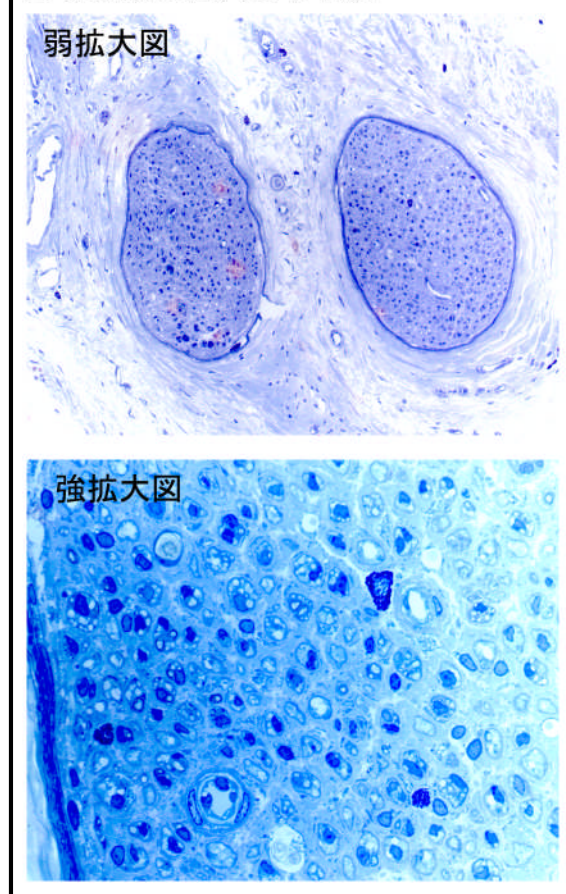


図4: 栄養血管(+)の移植片



(6) 今後の展望
今回は末梢神経片として正中神経を用いたため、視神経との口径差が大きく、これが、軸索再生に阻害的に働いていた可能性が考えられる。より適切な移植片の選択が、本手

法の臨床応用には必要であると考えられる。

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5件)

- ① Wakabayashi, T., Kosaka, J., Mochii, M., Miki, Y., Mori, T., Takamori, Y., Yamada, H. C38, equivalent to BM88, is expressed in maturing retinal neurons and enhances neuronal maturation. Journal of Neurochemistry, 査読有, 112(5):1235-1248, 2010.
- ② Wakabayashi, T., Kimura, T., Yamada, H. C38 is a neuron specific mitochondrial protein that controls neuronal development. Journal of Kansai Medical University, 査読有, 62: 7-12, 2010.
- ③ Mori, T., Wakabayashi T., Takamori, Y., Kitaya, K. Yamada, H. Phenotype analysis and quantification of proliferating cells in the cortical gray matter of the adult rat. Acta Histochemica et Cytochemica, 査読有, 42(1):1-8, 2009.
- ④ Takamori Y., Mori T., Wakabayashi T., Nagasaka Y., Matsuzaki T., Yamada H. Nestin positive microglia in adult rat cerebral cortex. Brain Research, 査読有, 1270:10-18, 2009.
- ⑤ Wakabayashi, T., Kosaka, J., Mori, T., Takamori, Y., Yamada, H. Doublecortin expression continues into adulthood in horizontal cells in the rat retina. Neuroscience Letters, 査読有, 442(3):249-252, 2008.

[学会発表] (計8件)

- ① 若林毅俊, 大村大輔, 小阪淳, 森徹自, 高森康晴, 平原幸恵, 小池太郎, 山田久夫. P19EC 細胞のニューロンへの分化課程におけるミトコンドリアの形態変化. 第116回日本解剖学会総会, 2011年3月30日, パシフィコ横浜, 横浜(誌上開催).
- ② 高森康晴, 若林毅俊, 森徹自, 北宅弘太郎, 平原幸恵, 小池太郎, 山田久夫. 成獣フェレットの脳におけるニューロン新生領域の構造および細胞構成, 第116回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2011年3月30日, パシフィコ横浜, 横浜(誌上開催).
- ③ 森徹自, 若林毅俊, 高森康晴, 北宅弘太郎, 平原幸恵, 小池太郎, 山田久夫. てんかん発作後の成獣脳における神経幹/前駆細胞の細胞周期に関する組織学的解

析, 第116回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2011年3月28日, パシフィコ横浜, 横浜(誌上開催).

- ④ 高森康晴, 若林毅俊, 小阪淳, 森徹自, 北宅弘太郎, 山田久夫. 成獣フェレットの脳におけるニューロン新生領域の組織構築および細胞構成. Neuro2010, 2010年9月2日, 神戸コンベンションセンター, 神戸.
- ⑤ 若林毅俊, 森徹自, 高森康晴, 北宅弘太郎, 山田久夫. 神経特異的分子 C38 の細胞内局在と分子機能, 第115回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2010年3月30日, 岩手県民会館, 盛岡市.
- ⑥ 若林毅俊, 森徹自, 高森康晴, 北宅弘太郎, 山田久夫. 神経特異的分子 C38 は神経成熟を促進する. 第50回日本組織細胞化学会総会・学術集会, 2009年9月27日, ビアザ淡海, 大津市
- ⑦ 若林毅俊, 小阪淳, 山田久夫. 網膜神経節細胞の成熟を制御する分子の解析, 第114回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2009年3月29日, 岡山理科大学, 岡山市.
- ⑧ 高森康晴, 森徹自, 若林毅俊, 北宅弘太郎, 山田久夫. ラット終脳皮質におけるネスチン陽性ミクログリアの同定, 第114回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2009年3月29日, 岡山理科大学, 岡山市.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

若林 毅俊 (WAKABAYASHI TAKETOSHI)
関西医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 90302421

(2) 研究分担者

小阪 淳 (KOSAKA JUN)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号: 40243216
森 徹自 (MORI TETSUJI)
関西医科大学・医学部・講師
研究者番号: 30285043
木股敬裕 (KIMATA TAKAHIRO)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 50392345

(3) 連携研究者

山下修二 (YAMASHITA SYUJI)
岡山大学・医学部・歯学部付属病院・医員
研究者番号: 30457220
(H20年度のみ)