

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09459

研究課題名(和文)「白質再建」の脊髄損傷治療への臨床応用に関する研究

研究課題名(英文) Strategy for reconstruction of the injured white matter in spinal cord injuries

研究代表者

西尾 健資 (Nishio, Takeshi)

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：70303790

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)：研究代表者は成熟ラット脊髄切断後早期に再生を開始し、切断3時間以内に損傷部に達する「再生的パイオニア軸索」が存在することを発見した。一方、脊髄切断直後から損傷部に出現する「軸索グリア複合体」(軸索断片とグリア突起が凝集したもの)がそのパイオニア軸索の再生を阻害すると考え、外科的もしくは化学的にこの複合体を除去して早期に白質を再建したところ、パイオニア軸索が早期に損傷部を越えて再生した。本研究は新たな脊髄損傷の治療戦略の可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊髄損傷患者では、しばしば損傷後の麻痺は永続する。その主因として「損傷部を越える中枢神経軸索の再生は制限されている事」が挙げられる。即ち、神経軸索が損傷部を越えて再生できれば、損傷された神経ネットワークを再構築することができ、脊髄機能も回復できる。

本研究では、成熟ラットの脊髄切断モデルを用いて、切断後数時間という早期の変化に着目し、旺盛な再生能力を持つパイオニア軸索に対して、切断部に生じる早期の障害物を除去すれば、パイオニア軸索は切断部を超えて本来の白質経路を伸長できることを示した。この結果は脊髄損傷の新たな治療戦略を示した。

研究成果の概要(英文)：After transection of the spinal cord in adult rats, some of severed axons start regeneration within 2 hours of section and can reach the lesion site within 3 hours, which we named as "regenerative pioneering axons; RPA". We also found at the lesion site an abnormal structure that consisted of axon fragments and glial processes, which we named as "axonoglia complex, AGC". The spatiotemporal relationship between the RPA and AGC suggested the AGC would be an obstacle against the RPA.

The present study tried to remove the AGC through a surgical technique or a chemical digestion with some proteases, and found that the RPA could penetrate the lesion site within several hours of section growing along the original white matter.

Thus, the present study has revealed an effectiveness of a new strategy to modify the injured white matter in acute phase removing the "AGC" at the lesion site.

研究分野：神経科学

キーワード：脊髄損傷 軸索グリア複合体 再生的パイオニア軸索 白質再建

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷はスポーツや自動車運転など日常生活で受傷することが多く、誰も「脊髄損傷とは無縁である」と言い切れる人はいない。さらに、一旦脊髄を損傷すると、損傷部以下の身体部位に麻痺が生じて日常生活に多大な制限を受けることになるが、この麻痺は永続することが多い。

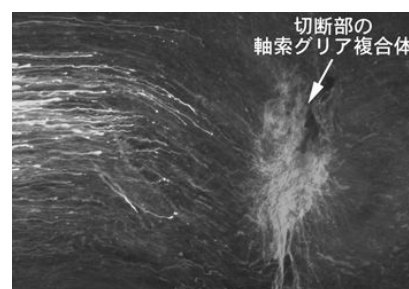
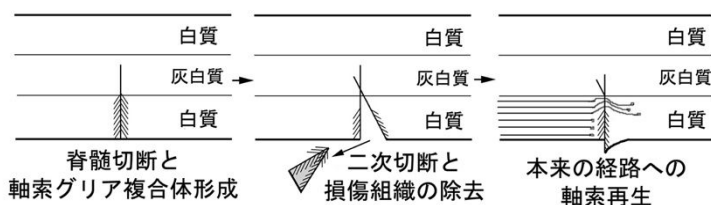
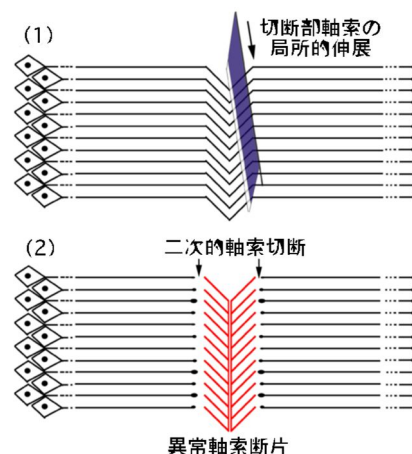
一般に、脊髄損傷によって神経軸索が切断された場合、初期の再生は起こるが再生軸索は損傷部を越えて伸びることができないため、損傷された神経経路は修復されず、機能回復も起こらない。脊髄損傷による「麻痺の永続」はこのような「軸索再生の制限」が主因と考えられている。

「軸索再生の制限」については、多くの研究の結果、脊髄損傷部を含む軸索周囲の環境(軸索環境)に複数の軸索伸長阻害分子が存在することが指摘されてきた。中枢のグリア細胞であるオリゴデンドロサイトの細胞膜が作る髓鞘に関連する分子(ミエリン関連分子)や損傷部の修復過程で生じるグリア瘢痕に関連する分子(瘢痕関連分子)がそれである。そしてこれらの軸索伸長阻害分子を抗体で抑制・または酵素で分解除去することによって「軸索再生制限」を解除して「軸索再生を誘導」しようとする試みがなされたが、結果として、わずかな再生軸索が灰白質を異所性に伸びるのみで、機能回復をもたらす大きな成果は得られていない。

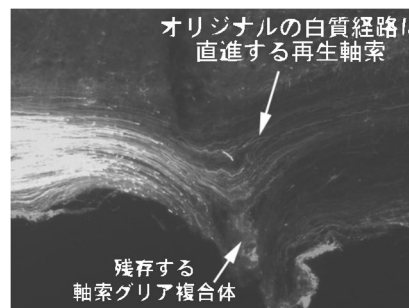
2. 研究の目的

上記の学術的背景に対して、研究代表者は先行研究において、従来指摘されていなかった新たな軸索伸長阻害因子を発見した(Nishio et al., Emergence of highly neurofilament-immunoreactive zipper-like axon segments at the transection site in scalpel-cordotomized adult rats. Neuroscience 2008, 155: 90-103)。研究代表者が成熟ラットの脊髄をナイフで切断する実験を繰り返していた時に、切断部に予想外の軸索断片が出現することを見出した(右図)。

さらに、後続の研究でこの異常軸索断片が切断部においてアストロサイトの突起と複雑に絡み合って異常構造物(軸索グリア複合体、axonoglia complex; AGC)を形成することを見出した(右図)。



研究代表者はこの「軸索グリア複合体: AGC」が軸索伸長を阻害する重要なプレーヤーではないかと考え、上図に示すように、これを外科的に除去して、損傷部の「白質再建」を行うことにより、損傷部を越える軸索再生を誘導できるのではないかと考えた。そして、結果的に右図に示すような「神経束を形成しながら本来の白質経路を直進する軸索再生」を誘導できることを見出した(Nishio et al., Immediate elimination of injured white matter tissue achieves a rapid axonal growth across the severed spinal cord in adult rats. Neurosci Res



これらの一連の研究結果から、研究代表者は、「脊髄損傷部に生じる軸索グリア複合体 (AGC) を除去して、損傷した白質を AGC-free の白質に変換 (白質再建) することにより、損傷部を越える軸索再生を誘導して、十分な機能回復ももたらすことができる」という作業仮説を建てた。そして、次の個別の研究目的を設定した。

目的-1) 損傷した白質を AGC-free の白質に変換 (白質再建) する戦略として、すでに証明した外科的除去による方法ではなく、酵素により化学的に除去する方法を確立する

目的-2) 脊髄切断後に外科的・もしくは化学的に AGC-free の白質に変換 (白質再建) した場合に、機能回復が認められるか否かを明らかにする。

目的-3) 脊髄切断ではなく、脊髄の鈍的損傷 (挫傷) 後に、外科的・もしくは化学的に AGC-free の白質に変換 (白質再建) する方法を確立する。

3 . 研究の方法

生後 2 ヶ月～6 ヶ月の成熟ラット (SD ラット、メス、) を用いて実験を行った。

脊髄半側切断：麻酔下に実験用顕微鏡を用いて下部胸髄 (T8 レベル) の左側半分を眼科用ディスプレイプルーナーナイフで切断した。

脊髄の鈍的損傷：ピンセットで 5 秒間圧迫して鈍的損傷を作った。

外科的 AGC 除去：上図のように、損傷した白質を含む脊髄組織の近傍を眼科用ナイフで鋭利に切断して AGC を含む組織を除去して、断端同士を接合させる

化学的 AGC 除去：研究代表者は、そもそも軸索断片もグリア突起も凝集して塊を形成するから軸索グリア複合体：AGC となるのであって、凝集させている責任分子はフィブリンであろうと考えた。そこで、フィブリンを分解する目的で、複数のタンパク分解酵素を投与した。

機能回復実験：脊髄損傷後のラットを、直径 1 m の円卓に乗せて自由に歩行できるようにしながら観察すると同時にビデオ撮影して、後肢の動きを BBB scale で rating した。

4 . 研究成果

成果 1) 酵素による軸索グリア複合体 (AGC) の化学的除去に関して

プロメライン・パパイン等のプロテアーゼを局所に投与して、GFAP/NFH に対する免疫染色で AGC を同定するとともに、軸索トレーサーによる再生軸索の同定を組み合わせ、有効なプロテアーゼを検索した。その結果、プロメラインが最も有効率が高かった。一方、プロメラインの有効性を確認するために、同時にプロテアーゼインヒビターを投与したところ、予想に反してプロメライン単独よりもプロメライン・プロテアーゼインヒビターの併用投与の方が安定的に軸索再生を誘導した。一方、プロメラインのターゲットとなっている基質は、フィブリンと考えられたが、プロメライン濃度を上げると、損傷部の再出血を認めた。また、フィブリン融解を意図して、損傷部局所に tPA (アルテプラゼ) を投与したところ、損傷部を越える軸索再生が誘導できた。しかし、この tPA (アルテプラゼ) 投与例でも、損傷部の状態や個体によって、局所の再出血をきたす例も認められた。また、この場合にも同時にプロテアーゼインヒビターを投与して、良好な軸索再生を得られた。

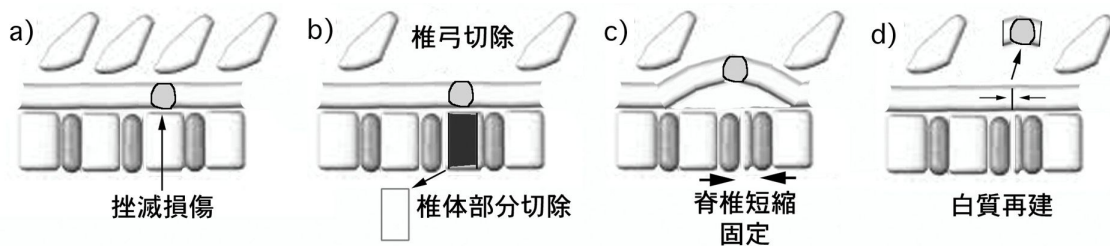
考察としては、創傷治癒課程における止血機構とフィブリン融解機構は同時並行的に進みながら微妙なバランスの上に成り立っており、どちらか一方に偏れば良好な結果は得られないと考えられる。そして、この系の上に正にこの軸索再生系も関与しており、奥が深い印象を受けた。

成果2) 成熟ラット脊髄切断モデルにおける軸索グリア複合体(AGC)除去と機能回復

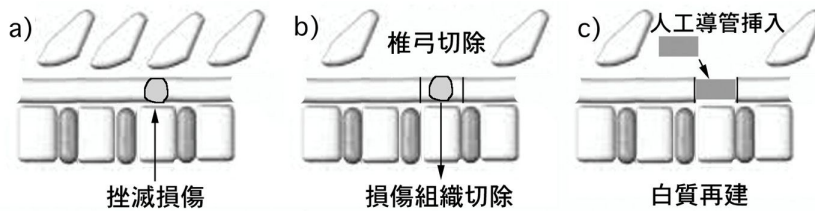
脊髄半切断後に、化学的もしくは外科的に軸索グリア複合体除去捜査を加えたのちに、経時的にラットの後肢の動きを BBB scale で rating した。その結果、損傷部を越える軸索再生を認めるのが、脊髄切断後3時間であることに一致して、再生的パイオニア軸索の伸長は非常に早く、後肢の機能回復も脊髄切断24時間後より明らかとなり、脊髄切断後2-3日で、体重を支えて歩行できるようになった。

この損傷した白質を AGC-free の白質に変換(白質再建)することにより、再生軸索が損傷部を越えるのも早く、機能回復も早いことが証明された。

成果3) 脊髄の鈍的損傷(挫傷)後に、外科的・もしくは化学的に AGC-free の白質に変換(白質再建)法を確立する



または



を目指したが、今回の研究期間内には成功しなかった。

これは今後の課題である。

<論文発表>

期間内には発表できていない

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------