

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：32206

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2022

課題番号：20K23235

研究課題名(和文) 視覚経路の退行性変性における神経配列に関する分子的・細胞学的解析

研究課題名(英文) Molecular and cellular analysis of retinotopic projection pattern during degeneration of visual pathway

研究代表者

石井 貴弥 (ISHII, TAKAYA)

国際医療福祉大学・医学部・助手

研究者番号：30882716

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：視神経を切断した成獣ラットの中脳上丘におけるEphA5、ephrinA2の発現分布と偏在性、細胞1個単位での発現強度を明らかにした。同側と対側の上丘におけるEphA5とephrinA2の発現量は、どちらも対向的な濃度勾配を呈しており、同側よりも対側の方が、発現量が高い傾向が認められた。この変化は軸索誘導を誘発するものなのか、視神経切断によるシナプス入力喪失に起因するものなのかは、今後の検討課題である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

視神経損傷後に再発現したEphA5とephrinA2が、発達期と同様の現象なのか、投射する視神経再生の誘導に備えての反応なのか、再伸長した視神経のシナプス再結合を阻害する反応なのかという疑問点は、未だに解決されていない。両分子が視神経損傷後に、網膜神経節細胞と上丘の「どの部分で」、「どの程度」分布し、かつ細胞単位での「定量的な発現量」を明らかにする必要がある。哺乳類でRetinotopyを備えた視神経回路の再構築が起こらない理由、および末梢神経移植によってもRetinotopyが再構築されない理由が明らかになれば、脊髄運動系の機能再建等を含めた将来の中枢神経機能再生へと応用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to elucidate how the retinotopic pattern is formed on the optic nerve projections. The distribution of EphA5 and ephrinA2 immunoreactivities in the midbrain were studied using fluorescent immunohistochemistry in the optic nerve dissected rat. The immunoreactivities of EphA5 and ephrinA2 still showed retinotopic gradient pattern from rostral to caudal in the contralateral side. Semi-quantitative analysis suggested that these immunoreactivities in the contralateral side were greater than the ipsilateral side. We strongly speculate that the retinotopic gradient of EphA5 and ephrinA2 is decided not by the number of immunopositive neurons but the intensity on each cell. Further analysis will reveal molecular and cellular mechanisms of retinotopic projection in the developmental stage and optic nerve regrowth.

研究分野：社会医学、看護学およびその関連分野

キーワード：視覚経路 in situ ハイブリダイゼーション mRNA定量 Retinotopy 中枢神経機能再生 視覚回路 神経配列

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の中樞神経系では、ニューロン間の線維連絡がひとたび切断されると、神経ネットワークは2度と元には戻らない。切断された軸索が再伸長することはなく、ましてや元のニューロン同士の線維結合が再構築されることもない。この事実は、他臓器の再生医療の様に、失われた細胞のみを質的量的に補充すれば完了するのではなく、中枢神経系の機能再生の難しさを示している。

本研究では、ラットの視覚系(網膜-視神経回路)を中枢神経障害のモデル実験系とし、視神経損傷後に末梢神経移植による再建を行うことによって、網膜-視神経系の1対1の線維連絡が、どのように形成され、また障害後、何故再構築しないのかを探る。本研究は、将来の高度な中枢神経機能再生の可否についての手掛かりを得ようとするものである。

視神経は、網膜神経節細胞(Retinal Ganglion Cells; RGCs)の軸索であり、げっ歯類では中脳上丘に軸索投射する。網膜-視覚中枢投射には、Retinotopy (Retinotopic map)という3次元的な視覚情報を伝達するための次のような形態学的な基盤が存在する。耳側のRGCsは上丘の前方へ軸索投射し、鼻側のRGCsは後方へ投射する(図1)。この1対1の神経線維連絡であるRetinotopyの空間的配列の形成は、光のON-OFF情報に留まらない、高度な視覚機能伝達に大きく寄与している。視覚回路損傷後のRetinotopyの再建は、1対1のシナプス結合に立脚した中枢神経機能を再獲得するために必要不可欠であって、視覚以外の中枢神経機能再建についての研究の良い実験モデルとなりえる。

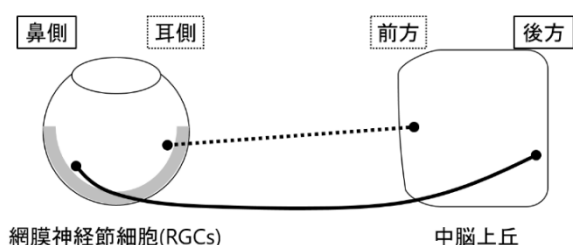


図1: Retinotopic map

左図: 眼球、右図: 中脳上丘。

鼻側軸索: 中脳上丘の前方へ投射。(実線)

耳側軸索: 中脳上丘の後方へ投射。(点線)

初期発生過程におけるRetinotopy形成の分子的な機序は概ね明らかになっている(Scicolone G, 2009)。EphA5とephrinA2は、Retinotopy形成の鍵を握る分子とされている。RGCsと中脳上丘に、これら2つの分子は対向的な濃度勾配を呈して発現し、retinotopicなシナプス結合パターンを誘導する(図2)。しかし、これらの分子は、Retinotopy形成期は発現するものの、一度Retinotopyが完成されてしまうと発現低下する。さらに、視神経損傷後にEphA5は発現量が減少し、ephrinA2は増加することが知られている(Goldshmit Y, 2006)。つまり、視神経切断のような視覚回路の障害時には、両分子の発生過程の様な発現パターンが維持できないために、網膜-視覚中枢回路のRetinotopyは、元通りに再生しないと推測される。

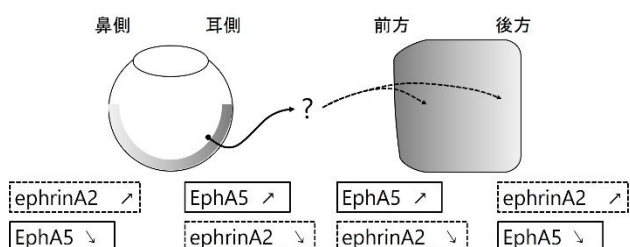


図2: 対向的な濃度勾配

左図: 眼球、右図: 中脳上丘。

RGCs: EphA5は耳側で発現量が高く、鼻側で低いgradientな分布を示す。ephrinA2は耳側で発現量が低く、鼻側が高い。

中脳上丘: EphA5は前方で発現量が高く、後方で低い。ephrinA2は前方で発現量が低く、後方で高い。

2. 研究の目的

視神経切断後の網膜、中脳上丘における Retinotopy の変性・消失についての分子的背景を、形態学的な情報とともに明らかにすること。末梢神経移植による視神経再建によって、Retinotopy を決める分子群 EphA5 と ephrinA2 が、どのように発現変化するか、また、その変化によって中枢神経細胞同士の 1 対 1 のシナプス再結合が、促進、または阻害される仕組みを明らかにすること。以上の 2 つを研究目的とした。

3. 研究の方法

退行性変性モデルの作成と EphA5 と ephrinA2 タンパク質量と mRNA 発現量の調査

成獣 Wistar rat の視神経を麻酔下で切断し「退行性変性モデル」を作成した。手術後 30 日経過した後、網膜、中脳を摘出した。網膜は伸展標本 (Flatmount) とし、中脳は上丘部分を矢状面で薄切した。EphA5 ポリクローナル抗体 (Bioss antibodies, Woburn, MA, United States)、ephrinA2 モノクローナル抗体 (OriGene Technologies, Rockville, MD, United States) を用いて網膜、中脳に免疫組織化学染色法 (2 重染色) を施した。mRNA の検出には、RT-PCR にて既に単離に成功した EphA5、ephrinA2 断片を pBluescript に ligation し、cRNA probe を作成して *in situ* ハイブリダイゼーション組織化学染色を行った。網膜伸展標本では、耳側～鼻側軸においての RGCs に局在する EphA5、ephrinA2 タンパク質と mRNA 濃度分布を調べ、中脳上丘標本では前後軸の濃度分布を調べた。さらに、細胞単位でのタンパク質と mRNA の発現量を半定量的に計測した。

4. 研究成果

退行性変性モデルの上丘について重点的に検討した。片側の視神経を麻酔下で外科的に切断した。視神経切断手術 1 か月後、動物を深麻酔により殺処分し、網膜標本、上丘切片に対して、神経細胞を特異的に染色するクレシル・バイオレット染色を行った。同側と対側の上丘の矢状断画像を示す (図 3A、B)。同側の上丘のよりも対側の上丘が退縮し面積が縮小していた (図 3A と 3B を比較)。げっ歯類では、90~97% の視神経が対側の上丘へ投射し、眼球摘出後に投射領域内の細胞数は、40% 減少すると言われている (Smith, 1997)。この面積の縮小は、視神経切断による上丘内の神経組織の脱落を示すと考えられた。

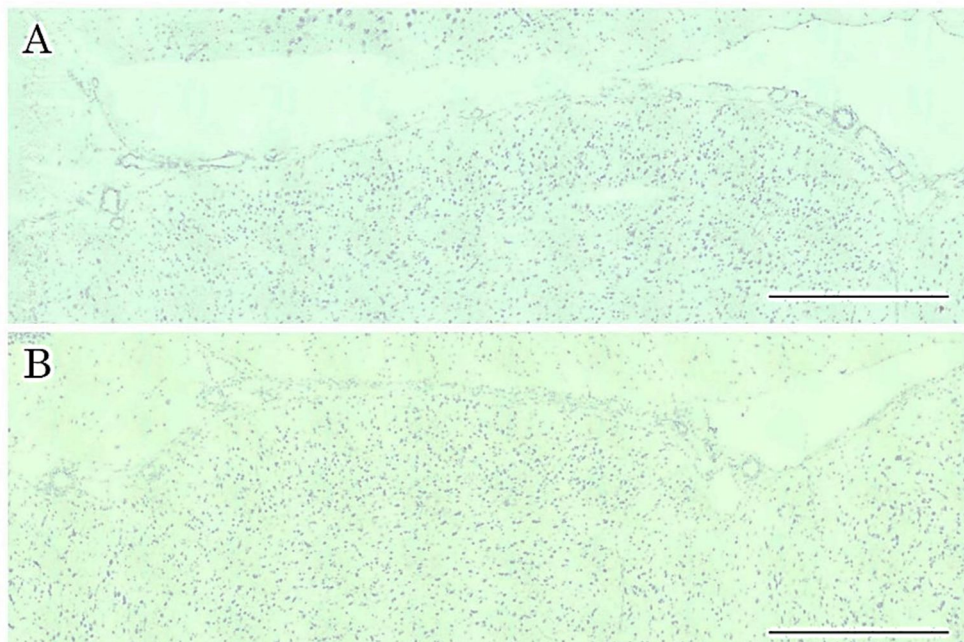


図 3 : 左側 : 中脳上丘の前方、
右側 : 中脳上丘の後方
A : 同側の上丘、
B : 対側の上丘
Scale bar: 500
μm

対側の上丘における同一標本での EphA5 ポリクローナル抗体と ephrinA2 モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学染色を行った（図 4A、B）。

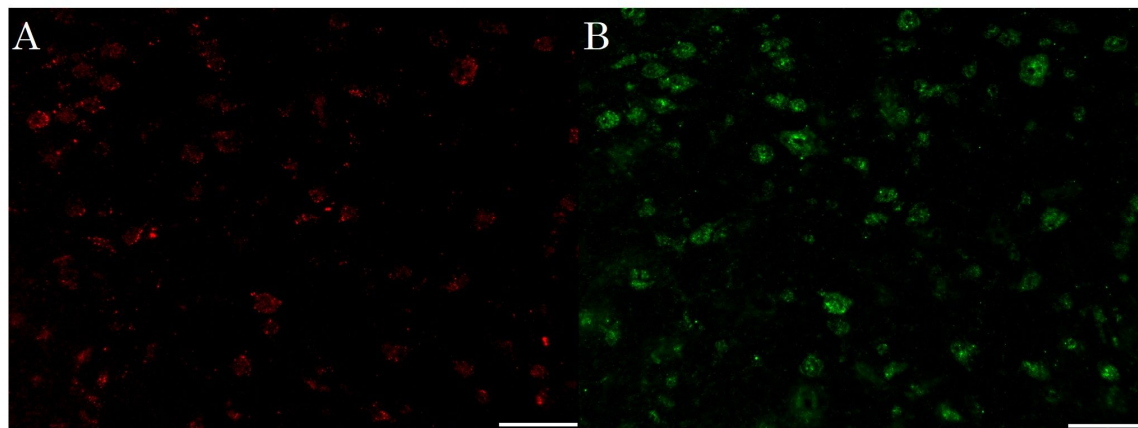


図 4：中脳上丘強拡大像
A：EphA5 陽性細胞、B：ephrinA2 陽性細胞、Scale bar: 50 μm

Symonds らの計測方法の計測方法を参考にして、前後軸において 100 μm 四方の計測点を 20～40 個設定し、EphA5、ephrinA2 陽性細胞の個数と輝度の計測を行った。計測は BZ-H4M（KEYENCE, Osaka, Japan）を使用した。うち代表的な 1 例の輝度の計測結果を図 5A、B に示す。

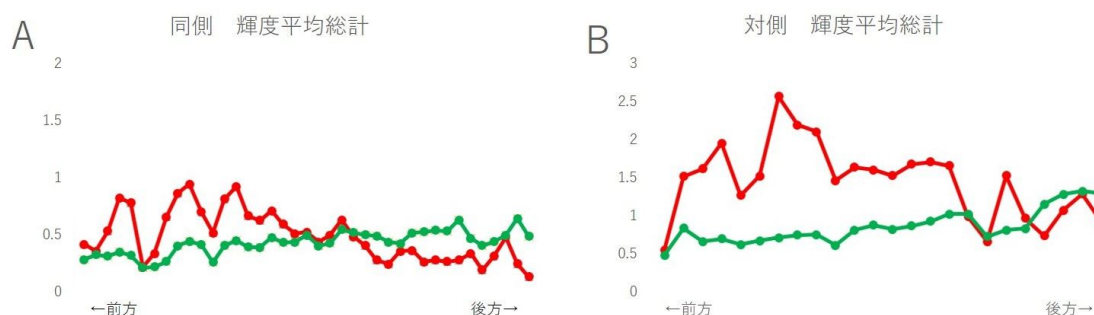


図 5：中脳上丘の前後軸での平均輝度総計
A：同側、B：対側、赤：EphA5 陽性細胞の分布、緑：ephrinA2 陽性細胞の分布

抗体で陽性に染色された細胞個数の計測では、EphA5 と ephrinA2 とともに前後軸で変化はなかった。輝度の計測では、EphA5 は、中脳上丘の前方で平均輝度総計値が高く、後方では輝度平均総計値が低かった（図 5A）。また、ephrinA2 は、中脳上丘の前方で平均輝度総計値が低く、後方では輝度平均総計値が高かった（図 5B）。これらの結果は、同側と対側ともに共通していた。また、同側よりも切断された視神経が投射していた対側の方が、輝度平均総計値が高い傾向が認められた。

以上を統括すると、ラットでは視神経切断後に投射部位である対側の上丘で、発生過程と同様な EphA5、ephrinA2 局在の濃度勾配は残存していた。そればかりか、蛍光強度の定量化によって、同側上丘に比べて局在量が増加している傾向がみられた。さらに、陽性細胞の細胞数には変化は認められなかった。従って、正常個体、および視神経切断後の Retinotopy を形成する EphA5、ephrinA2 両分子の濃度勾配は、両分子が局在する細胞数の差によって生じるのではなく、局在量の増減によって生じている可能性が考えられた。

これらの結果を踏まえて、今後引き続き解析を行っていく。さらに、「同側投射の影響」や「mRNA 量とタンパク質量の相関」などの解析を行っていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Takaya Ishii, Kyutaro Kawagishi, Shogo Hayashi, Shinnosuke Yamada, Hirotaka Yoshioka, Yoshiharu Matsuno, Yasutake Mori, Jun Kosaka	4. 巻 43(7)
2. 論文標題 A bilateral third head of the gastrocnemius which is morphologically similar to the plantaris.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Surgical and Radiologic Anatomy	6. 最初と最後の頁 1095-1098
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00276-020-02670-w	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 -

1. 著者名 Takaya Ishii, Kyutaro Kawagishi, Shogo Hayashi, Shinnosuke Yamada, Hirotaka Yoshioka, Yoshiharu Matsuno, Yasutake Mori, Jun Kosaka	4. 巻 245
2. 論文標題 A novel categorization of the muscular branches of the tibial nerve within the popliteal fossa	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Annals of Anatomy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.aanat.2022.151997	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 米山蓮太郎, 伊藤千紘, 小山田直樹, GUOSHEN Mandukhai, 久木ひな子, 清水友美, 石井貴弥, 鈴木裕, 川岸久太郎
2. 発表標題 低形成の疑われる肺中葉の破格例
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石井貴弥, 川岸久太郎, 林省吾, 山田晋之介, 吉岡広陽, 松野義晴, 森泰丈, 小阪淳
2. 発表標題 ヒト膝窩部における脛骨神経の筋枝分布
3. 学会等名 第11回国際医療福祉大学学会学術
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石井貴弥, 伊藤千紘, 小山田直樹, 米山蓮太郎, GUOSHEN Mandukhai, 久木ひな子, 清水友美, 鈴木裕, 川岸久太郎
2. 発表標題 低形成と中葉症候群の鑑別が困難であった破格水平裂を呈した右肺の一例
3. 学会等名 第11回国際医療福祉大学学術大会
4. 発表年 2021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

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