

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592714

研究課題名(和文) 2本の血管柄付き末梢神経移植による網膜 - 視覚中枢投射の再構築

研究課題名(英文) Functional recovery of visual pathway after vascularized peripheral nerve grafting

研究代表者

小阪 淳 (Kosaka, Jun)

国際医療福祉大学・保健医療学部・教授

研究者番号：40243216

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロサージェリーを利用した血管柄付き末梢神経移植が、視神経再生を促進するか否かを検討した。ラットの正中神経を栄養血管を保ったまま視神経切断端に移植吻合した。視神経を再生した網膜神経節細胞の数を、蛍光色素の逆行性標識法で検証したところ、血管柄付き移植群は、従来の血管柄無し移植群と比較して約1.7倍再生細胞が多かった。透過型電子顕微鏡で再生軸索の髄鞘を観察したところ、従来法に比べて成熟した有髄線維の割合が有意に多かった。血管柄付き末梢神経移植法の中枢神経軸索再生誘導に対する有効性が確かめられた。

研究成果の概要(英文)：We studied whether the use of vascularized peripheral nerve graft on the optic nerve stump enhances axonal regrowth of retinal ganglion cells compared with classical non-vascularized grafts. The rat median nerve was microsurgically sutured with its supplying artery and vein to the optic nerve stump. The number of retinal ganglion cells with regrowing axons was evaluated and counted by retrograde labeling into the grafted nerve. Myelination of the regrowing axon fibers was examined by transmitted electron microscopy. The number of retinal ganglion cells with regrowing axons in the vascularized graft was significantly higher than in the classical non-vascularized graft. The ratio of myelinated axon fibers was also increased in vascularized graft. Thus, peripheral nerve grafting with their supplying arteries and veins to the injured nerve axon represents a promising strategy to accelerate axonal regeneration.

研究分野：視覚科学

キーワード：血管柄付き移植 マイクロサージェリー 網膜神経節細胞 視神経 視覚中枢

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系に属する網膜・視神経系は、哺乳類ではその組織再生力は極めて乏しい。実験的にラットの視神経を完全切断すると、視神経軸索は再伸長することは決してなく、視神経を軸索として持つ網膜神経節細胞の細胞体も逆行性変性に陥る。

ラットの視神経切断端に、同一個体の末梢神経片を自家移植として吻合すると、移植片の中へ本来は再伸長しないはずの視神経軸索が切断端を超えて再生することが知られている。この実験系は、脊髄損傷などのように、中枢神経の軸索が損傷された場合の外科的治療法として、最も有望視される手法である。代表者を中心とする研究グループは、将来の臨床応用を目指して、本実験系の基礎研究を推進してきた。これまで、基礎研究に必要な網膜神経節細胞を特異的に標識するモノクローン抗体 C38 の単離 (Wakabayashi, Kosaka ら, 1996a, b)、末梢神経片を移植したフェレット網膜で再生視神経を持たない生存細胞の同定 (Quan, Kosaka, Wakabayashi ら, 1999) など、数々の業績を発表してきた。

一方で、種々の遺伝子操作マウスを用いて、視神経を挫滅損傷し、視神経の自然再生を見た研究が複数報告されている。双方とも、将来の中枢神経軸索の再生法の開発に、必要不可欠な情報をもたらしている。

本研究開始の時点で、「視神経再生」の研究分野では、臨床応用に向けて次のような解決すべき問題点が、残されている。

①再伸長する視神経数が極めて少なく、また有髄線維の割合も極めて少ないこと。

②鼻側網膜から尾側中枢へ、耳側網膜から吻側中枢へという、網膜-視覚中枢の特異的なシナプス投射パターン (retinotopy) が再構築されないこと。

また、基礎研究を遂行する上でも

③再生視神経を同定できる最良の手法についてコンセンサスが見られないこと。

という重大な研究課題が残されたままである。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、上記の①～③の解決を目指すため、まず外科的な手術法の改良を試みることにした。具体的には、形成外科学領域の臨床で用いられている **microsurgery** の手法を駆使して、移植する末梢神経片の栄養動静脈を残したまま視神経切断端に移植吻合した。移植片中のシュワン細胞の生存性を高めることにより、再生視神経数、および、有髄化の割合に与える効果を検証した。その過程で、再生視神経数の同定、特に有髄線維の同定法について検討した。最終的には、鼻

側、耳側に 2 本の血管柄付き末梢神経移植を試み、**retinotopy** の再構築を試みた。

3. 研究の方法

(1) 血管柄付き正中神経移植手術法の開発・改良

ラットを麻酔し、上腕～前腕にかけて切開し、正中神経を開放した。正中神経の栄養動静脈を注意深く止血しながら開放した。同時に眼窩上部を開放して視神経を直視下に完全切断した。Bipolar coagulator で止血を繰り返ししながら、正中神経遠位部を離断・反転し視神経切断端に移植吻合した。正中神経中枢端は、マークしたうえで切断遊離した。栄養動静脈は、遠位端を止血し、血流が保存されていることを確認して、“血管柄付き移植”とした (図 1)。

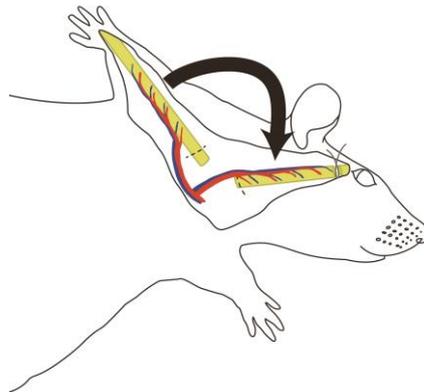


図 1 血管柄付き正中神経移植法の模式図 (文献 3 より)

(2) 再生視神経を持つ網膜神経節細胞の同定

血管柄付き末梢神経移植実施から 1 か月後、眼窩上部を再度開放後、移植片を露出し、吻合部から 10mm の部位に、止血用ゼラチン sponge1 (アステラス製薬) にしみこませた蛍光色素 Granular Blue (GB:Sigma) を挿入し、逆行性標識とした。

さらに、2 日後、動物を深麻酔により殺処分し、4% paraformaldehyde 溶液を左心から還流し全身固定を行った。眼球摘出後、網膜を単離し、grid 付きのスライドガラス上で伸展標本とした。正立蛍光顕微鏡 (Carl Zeiss: Axioscope) で UV 励起により GB 陽性細胞を同定、カウントした (図 2)。結果は t 検定を行い、 $P < 0.05$ として有意差を検定した。

(3) 透過型電子顕微鏡による有髄線維の同定

移植吻合部から 5mm までの末梢神経片を単離し、2% パラフォルムアルデヒド/2% グル

タルアルデヒド溶液で一昼夜固定した。1% オスニウム溶液で4°C1時間処理後、脱水し、60°C3日間エポン包埋した (Epon812:応研商事)。超薄切片を作成して、透過型電子顕微鏡 (H-7650:日立) で観察した。軸索部分をすべて写真撮影し、デジタル情報として保存した。

軸索の髄鞘形成度は、次の3つに分類し解析を進めた (図5の上のパネル3図参照)。
①無髄線維 (unmyelinated)、②未成熟型有髄線維 (immature myelinated)、③成熟型有髄線維 (mature myelinated) である。軸索の長径と短径の平均値の1/2よりも厚い髄鞘を持っている線維を成熟型有髄線維とし、1/2以下のものを未成熟型有髄線維とした。血管柄付き末梢神経移植群2匹、血管柄無し移植群2匹の移植片を透過型電子顕微鏡で観察し、各標本について最低でも400本以上の軸索を上記3つに分類した。結果は、 χ^2 乗検定を行い、 $P=0.05$ として有意差を検定した。

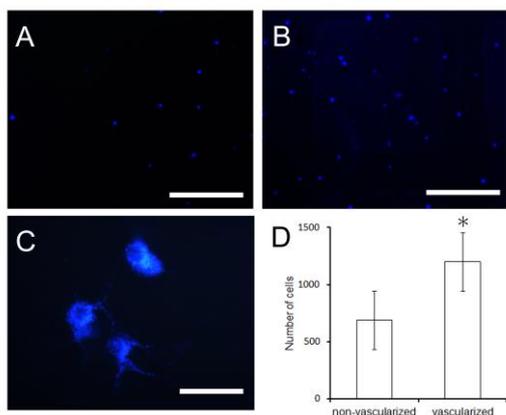


図2 網膜伸展標本上で逆行性標識されたGranular Blue (GB)陽性細胞。(A)対照の血管柄無し移植の網膜。(B)血管柄付き移植の網膜。(C)血管柄付き移植のGB陽性細胞の強拡大像。細胞1個1個の形態を強拡大で観察して網膜神経節細胞であることを確認後カウントした。Bar=50 μ m。(D)血管柄付き移植による視神経再生促進効果。血管柄無し移植 (non-vascularized; n=6)、血管柄付き移植 (vascularized; n=3)。平均値 \pm SDで示した。 $P<0.05$ で有意差有。(文献3より)

4. 研究成果

(1) 血管柄付き末梢神経移植の視神経再生促進効果の検証

血管柄付き移植群と血管柄無し移植群の網膜進展標本のGB陽性細胞を観察した。図2に示すように、弱拡大では、あきらかに血管

柄付き群でGB陽性細胞が多いことが判る (図2A,B)。1つ1つのGB陽性細胞の強拡大の観察で、その細胞体の形態、細胞体が局在する層の高さ (神経節細胞層であること)、axon hillockの形態を検証し、間違いなく網膜神経節細胞であることを同定した。最終的に、GB陽性細胞を2群でカウントした。血管柄付き移植群では、GB陽性細胞数は $1,200 \pm 208$ (n=3)で正常の1.2%であった (正常な成獣ラットの網膜神経節細胞数を98,000とする。McCallら, 1987)。血管柄無し移植群では、 691 ± 213 (n=6)で正常の0.7%がGB陽性細胞として検出できた。両者には、約1.7倍の開きがあり、統計的に優位差があった。血管柄付き末梢神経移植により、視神経を再生する網膜神経節細胞数が増加することが明らかになった。



図3 シュワン細胞による視神経軸索の有髄化。髄鞘の近傍に核があることから、シュワン細胞が髄鞘を形成していることが判る (未発表)。

(2) 血管柄付き末梢神経移植による髄鞘形成促進効果の検証

移植片中の再生視神経を透過型電子顕微鏡で観察すると、血管柄無し移植群と比較して、明らかに血管柄付き移植群の標本で、有髄線維が多かった (図4A,C)。高倍率で観察を行っても、成熟した髄鞘を持つ再生視神経が多数観察できた (図4D)。髄鞘を形成しているグリア細胞がシュワン細胞であることは、細胞質が髄鞘を取り囲み、核が髄鞘の近傍に見られることから同定できた (図3)。

定量的な解析を行うため、両標本内の無髄線維、未成熟型有髄線維、成熟型有髄線維の割合を調べた。その結果、血管柄無し移植群では、約70%の再生軸索が無髄線維であり、わずかに10%の線維のみが成熟型有髄線維であった。それに比較して、血管柄付き移植群では、約35%が成熟型有髄線維であり、無髄線維は50%以下であった。この割合を χ^2 乗

検定により統計解析したところ、両群には優位差があることが明らかになった。以上の結果から、血管柄付き移植は再生視神経軸索の有髓化を促進することが明らかとなった。

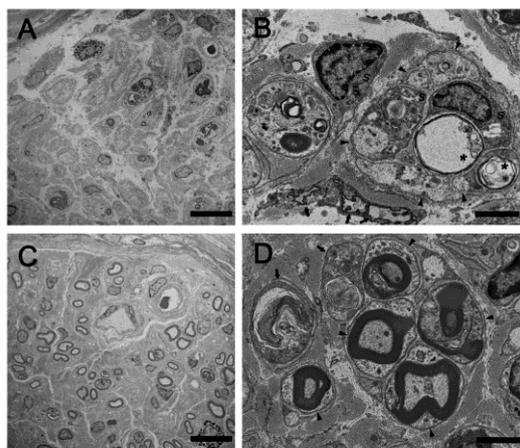


図4 移植末梢神経片内の再生視神経の透過型電子顕微鏡像 A, B:血管柄無し移植。C, D:血管柄付き移植。B:矢印は、非典型的な層状構造を細胞質内に持つシュワン細胞を示す。(S)シュワン細胞の細胞体を示す。(*)は、薄い髄鞘をかぶった軸索を示す。矢頭は、無髓線維を示す。D: 矢頭は、成熟型有髓線維を示す。シュワン細胞の細胞質も最外層に確認できる。矢印が示す2つのシュワン細胞は、細胞質内にミエリンの層状構造を示す。弱拡大 A, C の Bar=10 μ m, 強拡大 B, D の Bar=2.0 μ m。 (文献3より)

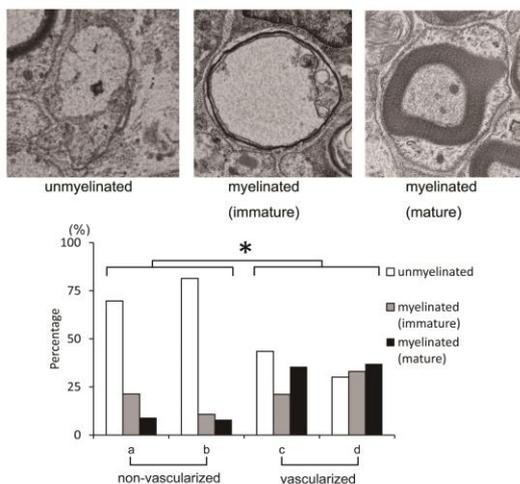


図5 血管柄付き移植、無し移植の有髓線維の割合の比較。上のパネルは左から、無髓線維 (unmyelinated)、未成熟型有髓線維 (immature myelinated)、成熟型有髓線維 (mature myelinated) の典型的な電子顕微鏡像を示す。下のパネルは、(左) 血管柄無し移植、(右) 血管柄付き移植における、無髓、未成熟有髓、成熟有髓線維の割合を示す。x

2乗検定により、両者には優位差が存在することが確かめられた。(文献3より)

(3) 細胞死を促進する Puma のコリン作動性アマクリン細胞における新たな生理機能の可能性

Puma は、BH3-only protein の1つであり、細胞死を抑制する bcl-2 などの機能を阻害することで、細胞死を促進する分子とされている。これまでに、代表者のグループでは、BH3-only protein である、Hrk や、BimEL が、ラットの視神経切断後に早期に発現誘導されることを示してきた (Wakabayashi, Kosaka ら, 2002, ; Wakabayashi Kosaka ら, 2005,)。網膜神経節細胞の視神経切断による逆行性変性のカギを握る分子群である。ラット網膜発生過程における Puma 発現局在の変化を、免疫組織化学を用いて解析し、Puma の新しい生理機能を示唆する結果が得られたので報告する。

ラットの網膜の発生初期において、網膜神経節細胞、アマクリン細胞、双極細胞、水平細胞、視細胞に Puma タンパク質の局在が見られた。その発現局在は、網膜の正常発生過程のプログラム細胞死が起こる時期に一致し、開眼後の細胞死が終了する時期である生後 21 日目以降には、その発現は消退した。

しかしながら、弱い抗原陽性部位が内網状層に 2 つのバンドとして、出生 21 日目以降も残り、生後 8 週間まで継続した。この内網状層の 2 本バンドは、双極細胞の神経終末と網膜神経節細胞の樹状突起が作るシナプス領域の層 (高さ) を示し、アマクリン細胞の樹状突起も、そのシナプス構造に参加することが知られている。

そこで、生後 14 日~8 週のラット網膜で、2 重免疫染色によりこの抗原陽性細胞を探索した (図6)。その結果、ChAT (Choline acetyl transferase)、Ca²⁺ 結合タンパク質 Cal-retinin、homeodomain を持つ転写因子 Chx10 と共局在が見られた。この結果により、ほぼすべてのコリン作動性アマクリン細胞で、プログラム細胞死が終了した生後 21 日目以降も、Puma の発現が継続していることが判明した。以上の所見は、細胞死を促進する分子である BH3-only protein の1つ Puma が、細胞死促進以外の何らかの生理機能をコリン作動性アマクリン細胞で果たしていることを示唆している。

網膜は、以上のように正常発生過程のプログラム細胞死を追跡することもできる材料でもあり、また視神経切断により逆行性変性を誘導することもできる。また、動物を 24 時間の暗黒下で飼育することにより、シナプ

ス入力を修飾することもできる優れた研究材料である。BH3-only protein の新しい生理機能の探索に、また、細胞死に関わる分子の動態を知るうえで、重要な情報を得ることができた。

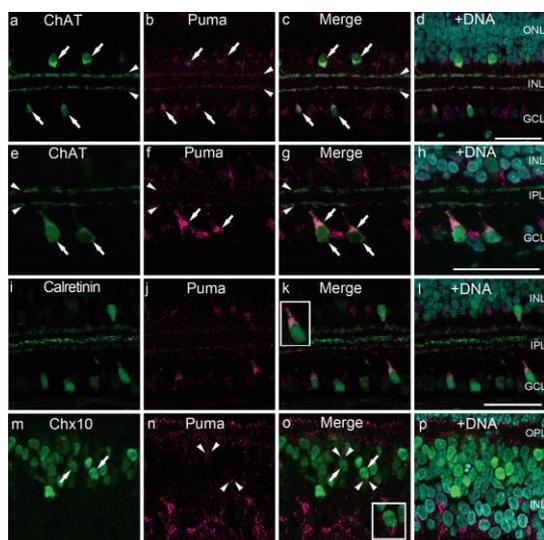


図6 生後14日目ラット網膜におけるPumaと分化マーカーとの共局在 (a~h)ChATとPumaの2重染色。矢印が示すように、ほぼすべてのChAT陽性細胞がPuma抗体でも2重染色されている。矢頭が示す内網状層の2本のバンドも、2重陽性である。(i~l)calretininとPumaの2重染色。(m~p)Chx10とPumaの2重染色結果。標本は、Hoechst33258で核染色を施した。GCL:神経節細胞層、IPL:内網状層、INL:内顆粒層、OPL:外網状層、ONL:外顆粒層。Bar=50μm(文献1より)

(4) 2本の血管柄付き末梢神経移植によるretinotopyの再構築

末梢神経移植による視神経軸索の再生実験系を用いて、移植片の中枢端を視覚中枢に刺入することにより、視覚中枢でのシナプスが再生され、網膜-視覚中枢回路を再構築できることが確かめられている(Keirsteadら, 1989)。そこで視神経の切断端ではなく、眼球の耳側と鼻側に2本の末梢神経片を刺入し、視覚中枢の吻側、尾側に2本の架橋移植とすること、さらには、この2本の末梢神経移植を血管柄付きとすることを試みた。

現在までのところ、この手法は完成していない。手術の侵襲性が思いのほか大きく、虚血による神経細胞死が起きたり、眼球内出血が生じたりする問題が解決できていない。今後も、継続して手法の改良を続けていく予定である。

参考文献

- Keirstead et al., *Science* 246:255-257, 1987.
 McCall et al., *Neurosci. Lett.* 79:78-84, 1987.
 Quan, **Kosaka**, **Wakabayashi** et al., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40:2360-2366, 1999.
 Shibuta, **Kosaka** et al., *Br. J. Pharmacol.* 124:804-810, 1998.
Wakabayashi, **Kosaka** et al., *Vis. Res.* 36:1081-1090, 1996a.
Wakabayashi, **Kosaka** et al., *Brain Res.* 725:121-124, 1996b.
Wakabayashi, **Kosaka** et al., *Neurosci. Lett.* 318:77-80, 2002.
Wakabayashi, **Kosaka** et al., *J. Neurochem.* 95:529-536, 2005.

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] (欧文計7件)

- Wakabayashi T***, **Kosaka J**, Mori T and Yamada H. (2012). Prolonged expression of Puma in cholinergic amacrine cells during the development of rat retina. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 査読有 **60**, 777-788. DOI: 10.1369/0022155412452737
- Li XJ, Weng L, Ling YF, Li A, Wang CE, Yan S, Sun M, Gaertig M, Mitha N, **Kosaka J**, **Wakabayashi T**, Xu X, Tang B, Li S. (2013). Loss of Ahil affects early development by impairing BM88/Cend1-mediated neuronal differentiation. *Journal of Neuroscience* 査読有 **33**, 8172-8184. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0119-13.2013
- Komatsu S, **Wakabayashi T**, Yamada K, Matsumoto K, **Kimata Y**, **Kosaka J***. (2013). Vascularized peripheral nerve grafting promotes myelination of regrowing optic nerve. *Neuroreport* 査読有 **24**, 566-571. DOI: 10.1097/WNR.0b013e3283625b39
- Takamori Y, Wakabayashi T, Mori T, **Kosaka J**, Yamada H. (2014). Organization and cellular arrangement of two neurogenic regions in the adult ferret (*Mustela putorius furo*) *Brain. Journal of Comparative Neurology* 査読有 **522**, 1818-38. DOI: 10.1002/cne.23503
- Shibuta S*, Morita T, **Kosaka J**, Kamibayashi T, Fujio Y. (2015).

Only extra-high dose of ketamine affects L-glutamate-induced intracellular Ca^{2+} elevation and neurotoxicity.
Neuroscience Research 査読有 **98**, 9-16.
DOI: 10.1016/j.neures.2015.04.005

6) Koike T, **Wakabayashi T**, Mori T, Hirahata Y, Yamada Y. (2015).
Sox2 promotes survival of satellite glial cells in vitro.
Biochemical and Biophysical Research Communication 査読有 464(1) 269-274.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.06.141

7) Suzuki D*, Fukumoto Y, Yoshimura M, Yamazaki Y, **Kosaka J**, Kuratani S, Wada H. (2016).
Comparative morphology and development of extra-ocular muscles in the lamprey and gnathostomes reveal the ancestral state and developmental patterns of the vertebrate head.
Zoological Letters 査読有 **2**, 10.
DOI: 10.1186/s40851-016-0046-3

[学会発表] (計 4 件)

1) **小阪 淳**、小松星児、**若林毅俊**、松本久美子、徳山英二郎、山田潔、高橋寛二、山田久夫、**木股敬裕**
「血管柄付き正中神経志保区によるラット視神経再生の促進と有髄化」
第 116 回日本眼科学会総会 2012 年 4 月 5 日～8 日 東京都千代田区

2) **小阪 淳**、小松星児、**若林毅俊**、山田潔、松本久美子、徳山英二郎、杉山成史、**木股敬裕**
「血管柄付き末梢神経移植による視神経再生の促進」
第 118 回日本解剖学会総会 2013 年 3 月 28 日～30 日 香川県高松市

3) **若林毅俊**、**小阪 淳**、森徹自、山田久夫
「ラット網膜発生過程での BH-3 only protein の一種 Puma の発現パターン」
第 119 回日本解剖学会総会 2014 年 3 月 27 日～29 日 栃木県・自治医科大学

4) **小阪 淳**
「*in situ* ハイブリダイゼーション組織化学法の標準化」
第 4 回国際医療福祉大学学会 2015 年 8 月 30 日 栃木県・大田原市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]
ホームページ等
①岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・細胞組織学分野・ホームページ (25 年度まで)
<http://square.umin.ac.jp/oka-anat/index.html>

②網膜生物学・視神経再生研究グループ・ホームページ
<http://square.umin.ac.jp/oka-anat/kosaka/>

③国際医療福祉大学・基礎医学研究センター・ホームページ (26 年度より)
<http://www.iuhw.ac.jp/gakubu/fundamental.html>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
小阪 淳 (KOSAKA, Jun)
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・准教授
(～平成 25 年度まで)
国際医療福祉大学・保健利医療学部教授
(平成 26 年度～)
研究者番号：40243216

(2) 研究分担者
木股 敬裕 (KIMATA, Yoshihiro)
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科教授
研究者番号：50392345

(3) 研究分担者
若林 毅俊 (WAKABAYASHI, Taketoshi)
関西医科大学医学部・准教授
(～平成 26 年度)
関西医科大学医学部・非常勤講師
(平成 27 年度～)
研究者番号：90302421