

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462803

研究課題名(和文) 短期的電気刺激による神経再生促進の検討と糖尿病マウスへの応用について

研究課題名(英文) The examination of brief electrical stimulation for axonal regeneration and its application for diabetes mice

研究代表者

名取 悠平 (Yuhei, Natori)

順天堂大学・医学部・非常勤助手

研究者番号：80445478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Thy1 YFP-16マウスを用い神経再生について検討を行った。Thy1 YFP-16マウスの蛍光強度と組織学的な軸索再生には相関関係が見られ、中でも再生軸索数との相関関係が最も強かった。短期的電気刺激で60分刺激群は他群に比べ初期の軸索伸長速度が速い傾向にあり、再生軸索が挫滅部を乗り越える期間を主に短縮するのではないかと考えられた。更に運動神経・感覚神経共に再生促進作用があり、今後様々な場面での応用が期待できると考える。

研究成果の概要(英文)：We studied nerve regeneration using Thy1 YFP-16 mice. There was correlation between fluorescence intensity and histological axon regeneration in Thy1 YFP-16 mice, with the number of regenerated axons showing the strongest correlation. In brief electrical stimulation, the speed of axon growth in early stage was faster in the 60-minute stimulation group as compared with other groups, suggesting that it may primarily reduce the period where regenerated axon travels beyond the crush site. Moreover, regeneration promoting effect was observed in motor nerves as well as sensory nerves, thus application to various scenes can be expected in the future.

研究分野：末梢神経

キーワード：Thy1 YFP-16マウス 短期的電気刺激 神経再生

1. 研究開始当初の背景

現在、末梢神経の再生を促進する方法は非常に少なく、特に臨床の現場において使用可能な有効な手段がないことが問題となっている。

そこで我々は、簡便で有りながら末梢神経再生の促進作用を認めるとされる末梢神経への短期的電気刺激に注目した。この手法は神経損傷部近位に双極型電極を装着し、周波数 20Hz、刺激時間 100 μ s、電圧 3V で 1 時間の電気刺激を単回で行なうものである。

電気刺激が神経再生を促進することは 1930 年頃から報告されているが、1983 年に Nix らが 4 週間 24 時間 4Hz の電気刺激の有用性を報告した。その後、2000 年に Maied らが 1 時間 20Hz での単回刺激が運動・知覚神経再生の促進やその過誤支配の予防に効果的であると報告し、様々な追実験行われてきた。短期的電気刺激の作用機序には BDNF や GAP43 の発現増加が神経再生の促進に関与しているとの報告が散見されるが、神経伸長速度や再生軸索数の増加といった具体的な作用については、まだ一定の見解が得られていない。

2. 研究の目的

我々は短期的電気刺激の有用性について研究を行ってきた。多くの研究者がラットを用いた実験を行ってきたが、我々はトランスジェニックマウスを用いその特性を生かし独自の手法で、再生軸索の伸長速度促進作用やミエリン形成の促進作用の存在を確認した。

神経再生の評価として組織学的評価、免疫学的評価、電気生理学的評価が一般的であるが、これらの評価方法はある特定の時点における再生状態を評価しているのみである。そこで同一固体において経時的に神経再生の評価が行えるトランスジェニックマウスを用い神経再生を観察し、そこから得られた所見から再生軸索の発色強度を用い組織学的評価が行えるのではないかと考えた。また短期的電気刺激は、その作用としてあげられている運動・知覚神経再生の促進や過誤支配の予防については、まだ具体的に評価を行えておらず、トランスジェニックマウスの特性を生かした手法で、その詳細を検討する事が可能であると考えた。さらに短期的電気刺激は挫滅後の神経再生モデルで多く用いられてきたが様々な場面での神経再生促進作用への応用が期待でき今回は神経移植モデルでの評価を行う事とした。

3. 研究の方法

まず、神経軸索が全て(Yellow fluorescent protein:YFP)発色する Thy1-YFP16 トランスジェニックマウスを使用し、伸長した軸索の蛍光発色の程度と軸索再生の組織学評価の関係性について検討を行った。

(1) 再生神経の評価の為に、軸索の発色していない無蛍光な神経を作成しその中を伸長した軸索を蛍光顕微鏡下で観察した。

吸入麻酔下に Thy1-YFP16 トランスジェ

ニックマウスを腹臥位で固定し、右臀部に皮膚切開をおき、右坐骨神経を露出後に脊髄流入部位 3mm 末梢を 5 秒間 5 番マイクロ摂子で圧迫しワーラー変性を起こし神経を無蛍光化した。その 14 日後に吸入麻酔下に再開創し無蛍光化した神経内を遠位へと伸長する蛍光軸索の様子を蛍光顕微鏡下に観察した。蛍光顕微鏡下での観察の際には坐骨神経周囲に組織が介在していると蛍光発色が減弱してしまう為、坐骨神経周囲の組織を可能な限り愛護的に除去する必要がある。

蛍光顕微鏡で観察した画像は Leica の画像解析ソフト LAS AF Lite を用い蛍光発色を定量後に蛍光発色が低下し始める部位から 3mm 中枢と末梢の坐骨神経を採取した。中枢の発色強度を 1 とし、末梢の発色強度の比を計測した。その比と再生軸索数と平均ミエリン厚、軸索の平均短径の関係性を総合的に判断して蛍光顕微鏡下での軸索の発色強度と組織学的な神経再生結果との整合性を評価した。

組織の採取の際は下記手順で灌流固定を行った。

アバチンで腹腔麻酔を行い仰臥位で四肢を固定し、開腹後心臓を損傷しないように注意し横隔膜を切開し、左右の肋骨を頭側に切開し胸骨を頭側に反転させ心臓を露出させた。左心室に 23G 翼状針を挿入し PBS100ml を注入し右心耳を切開し脱血を行い、4%パラホルムアルデヒドを 50ml 注入し還流固定を行った。検体は遮光し 4°C で冷蔵保存した。

短期的電気刺激群の運動・知覚神経それぞれの再生を評価する目的で下記実験を行った。

(2) 吸入麻酔下に Thy1-YFP16 トランスジェニックマウスを腹臥位に固定し右坐骨神経を展開し、坐骨神経を 5 秒間 5 番マイクロ摂子で圧迫し無蛍光化し、その一週間後に吸入麻酔下に再開創し坐骨神経圧迫部を同様に圧迫後、神経刺激装置を圧迫部中枢に装着し下記 3 群に分け電気刺激を行った。

Group1 (コントロール群) : 神経刺激装置の電源を入れず 60 分間無刺激とした。

Group2 (30 分刺激群) : 30 分間電気刺激を行い、その後 30 分間無刺激とした。

Group3 (60 分刺激群) : 60 分間電気刺激を行った。

電気刺激は周波数 20Hz、刺激時間 100 μ s、電圧 3V で行い生理食塩水を浸したガーゼで創部を覆い神経の乾燥を予防した。

① 軸索伸長距離の評価

電気刺激後 7 日毎に吸入麻酔下にマウスの右臀部を開創し坐骨神経を露出させ蛍光顕微鏡下に経時的な軸索伸長を評価した。伸長距離は挫滅部から発色強度を計測し、発色強度が低下し始めるまでの距離を LAS AF Lite で計測した。

② 知覚神経の評価

電気刺激 60 日後に Electrical Von Frey (Bioseb 社) を用い知覚再生評価を行った。

Electrical Von Frey は機械の先端に針を装着し、マウスの後ろ足に針先をあてマウスが痛みを感じ、足を上げた時の圧を 0.1g 単位で計測する。これを左右各々 10 回計測しその平均値を算出し、健側を 1 とした患側との比を算出した。

その後灌流固定を行い、足背外側皮膚を脱毛し経皮的に蛍光顕微鏡下で撮影した。発色強度を LAS AF Lite で計測し健側を 1 とした患側の比を計測し、経皮的に神経再生の程度を定量評価した。

③ 運動神経の評価

電気神経刺激 60 日後に還流固定の後に長母指伸筋の採取を行った。

長母指伸筋は、 α -バングラトキシン溶液 4°C で 30 分間浸し、その後 PBS に浸し 4°C で 30 分攪拌しこれを 3 回繰り返して神経終末を染色した。これを whole mount で共焦点レーザー顕微鏡下に無作為に撮影し、運動神経の神経終末への再支配状況を観察した。神経支配は神経終末が α -バングラトキシンのみで染色された赤い状態であれば再支配がされておらず、神経終末が黄色に染色されていれば神経支配がされていると判断し、神経支配が行われた神経終末の割合を算出した。

最後に神経移植における短期的電気刺激の有用性について検討を行った。

(3) Wild type マウスの坐骨神経を採取し、移植神経が抗原性を持たないようにするために Wisconsin solution (ビアスパン+ペニシリン G 200,000U/L+インスリン 40U/L+ベタメタゾン 16mg/L) の中に 7 週間冷所保存した。Wisconsin solution は週に 1 回交換した。

移植モデルの作成は Thy-1 YFP16 マウスを吸入麻酔下に腹臥位で固定し、右臀部に切開をおき右坐骨神経を露出させ、脊髓流入部より 4mm の部位で坐骨神経に 5mm のギャップを作成し上記処理を行った神経を 1cm 移植し 10-0 ナイロンで 3 針縫合固定した。移植神経と脊髓流入部間の坐骨神経に電気刺激装置を装着し下記 3 群に分け電気刺激を行った。

Group1 (コントロール群) : 神経刺激装置の電源を入れず 60 分間無刺激とした。

Group2 (30 分刺激群) : 30 分間電気刺激を行い、その後 30 分間無刺激とした。

Group3 (60 分刺激群) : 60 分間電気刺激を行った。

電気刺激は周波数 20Hz、刺激時間 100 μ S、電圧 3V で行い、神経刺激装置を装着している時は乾燥を予防する目的に生食ガーゼで創部を覆うようにする。

評価方法

① 軸索伸長距離

電気刺激後 1 週毎に吸入麻酔下に右坐骨神経を再露出し蛍光顕微鏡下に観察を行った。軸索伸長距離は挫滅部から発色強度が低下し始めるまでの距離を LAS AF Lite を用い計

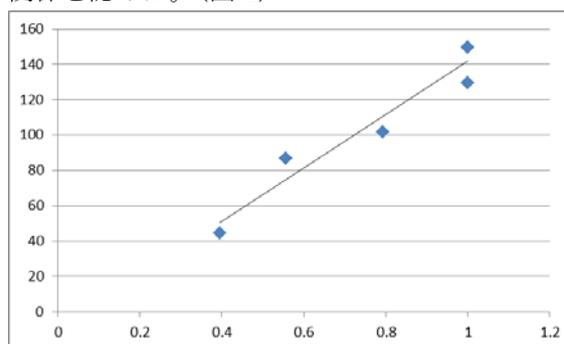
測した。

② 組織学的評価

電気刺激 4 週後に灌流固定を行い、神経の採取を行った。観察する部位は移植神経中央と移植神経より 3mm 末梢の坐骨神経とし、採取した神経は電子顕微鏡下 ($\times 1000$) に観察した。無作為に撮影し各視野のミエリン厚を計測しその平均値を計測した。

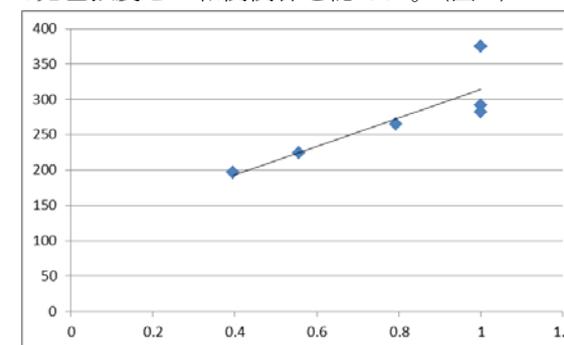
4. 研究成果

(1) 発色強度の比と視野毎の軸索数では近似直線が $Y=151.45X-9.4375$ となり、相関係数は 0.9673 と発色強度と軸索数の強い相関関係を認めた。(図 1)



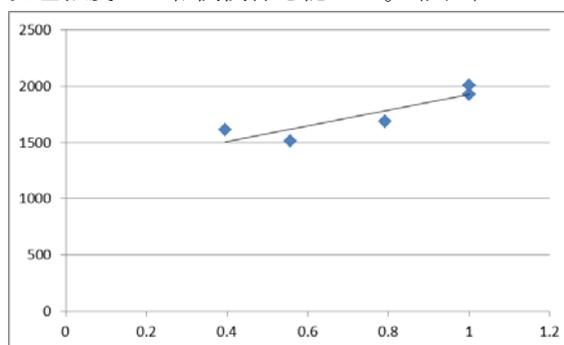
(図 1) 軸索数と発色強度

平均ミエリン厚との比較では、近似直線は $Y=201.1X+113.42$ となり相関係数は 0.8487 で発色強度との相関関係を認めた。(図 2)



(図 2) 軸索数と発色強度

平均短径との比較では、近似直線は $Y=695.88+1224.9$ となり相関係数は 0.905 で発色強度との相関関係を認めた。(図 3)



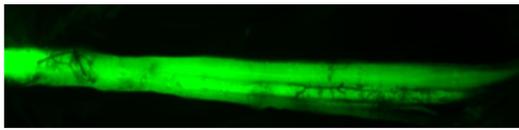
(図 3) 平均短径と発色強度

ただし、平均ミエリン厚・平均短径共には軸索数に比べ Y 切片が大きな値となった。

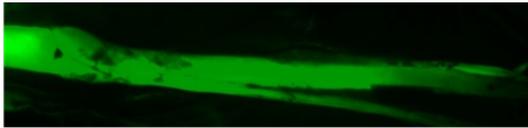
(2) ① 軸索伸長距離

刺激 1 週後では軸索伸長距離は Group1 で 4.6mm、Group2 で 4.69mm、Group3 で

5.2mm であり、刺激 2 週後では Group1 で 6.68mm (図 4) Group2 で 7.08mm (図 5) Group3 で 7.38mm (図 6) であった。



(図 4) Group1 電気刺激 2 週後



(図 5) Group2 電気刺激 2 週後

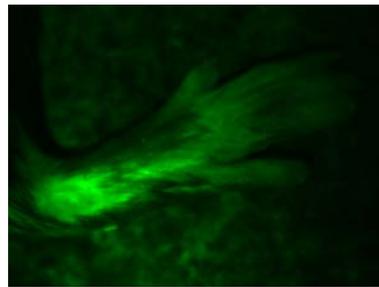


(図 6) Group3 電気刺激 2 週後

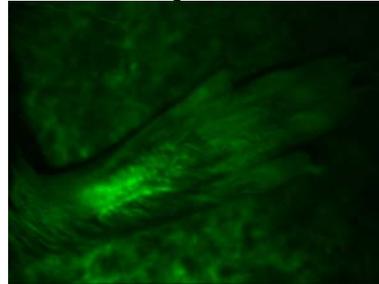
1 週後と同様に Group3.2.1 の順で遠位まで蛍光発色が達していた。1 から 2 週後の伸長距離を比較すると Group1 で 2.08mm Group2 で 2.39mm Group3 で 2.18mm となり各群間で差は見られなかった。

③ 知覚神経評価

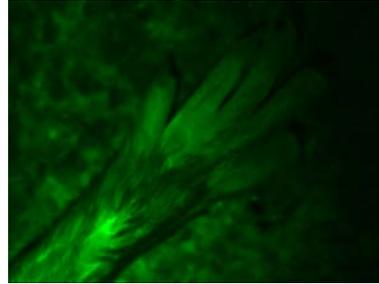
患側の閾値は Group1 で 8.36g Group2 で 7.97g Group3 で 5.39g
健側との比は Group1 で 0.531 Group2 で 0.635 Group3 で 0.834
経皮的な蛍光発色の評価では、健側との比を求めると Group1 では 0.398 (図 7) Group2 0.316 (図 8) Group3 0.584 (図 9) であった。



(図 7) Group1 : 挫滅側足背外側皮膚



(図 8) Group2 : 挫滅側足背外側皮膚



(図 9) Group3 : 挫滅側足背外側皮膚

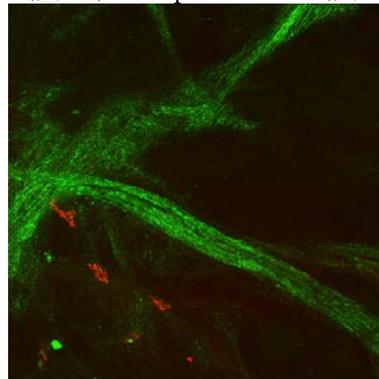
Group3 で最も明瞭に指神経の描出が行えた。

④ 運動神経評価

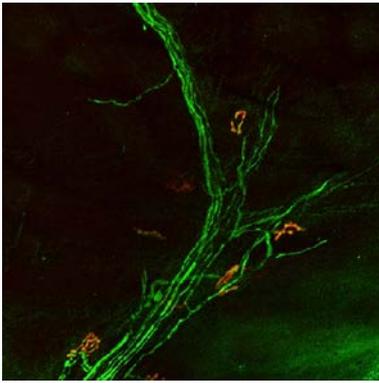
α -バングラトキシンを用いた再支配の評価で、再支配率が各々

Group1 で 91.2% (図 10) Group2 で 92.4%

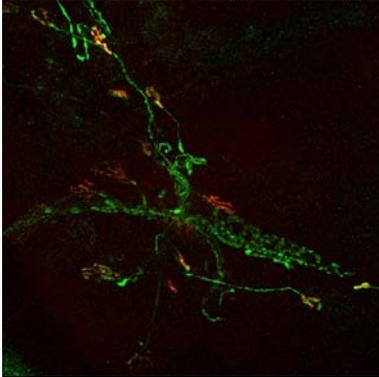
(図 11) Group3 で 96.9% (図 12) であった。



(図 10) Group1 : 末梢神経と神経終末



(図 11) Group2 : 末梢神経と神経終末



(図 12) Group3 : 末梢神経と神経終末

t 検定を行い Group1-2 間では統計学的有意差を認めなかったが、Group1-3 間と Group2-3 で統計学的有意差 ($P < 0.01$) を認め電気刺激群ではコントロール群に比べ優位に運動神経の再生が得られた。

(3) ①軸索伸長距離

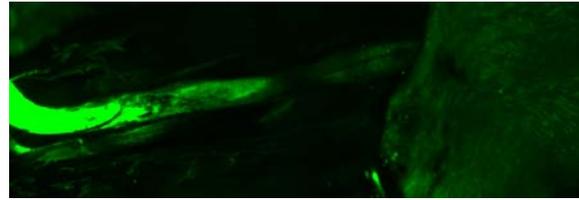
軸索伸長距離の平均は Group1 では刺激 1 週後で 0mm、刺激 2 週後で 2.4mm、刺激 3 週後で 4.13mm、刺激 4W 後で 5.87mm (図 13) であった。



(図 13) Group1 : 4 週後移植神経軸索伸長 Group2 では刺激 1 週後で 0mm、刺激 2 週後で 2.67mm、刺激 3 週後で 5.08mm、刺激 4 週後で 5.405mm (図 14)



(図 14) Group2 : 4 週後移植神経軸索伸長 Group3 では刺激 1 週後で 0mm、刺激 2 週後で 3.68mm、刺激 3 週後で 8.82mm、刺激 4 週後 8.97mm (図 15) であった。



(図 15) Group3 : 4 週後移植神経軸索伸長 軸索伸長は Group3.2.1 の順に遠位まで伸長していた。

② 組織学的評価

平均ミエリン厚は Group1 では移植神経の中央で $318.2 \mu\text{m}$ 、移植神経の 3mm 末梢で $307.9 \mu\text{m}$ であった。Group2 で移植神経の中枢では $360.2 \mu\text{m}$ 移植神経の 3mm 末梢で $402.2 \mu\text{m}$ であった。Group3 では移植神経の中央で $381.9 \mu\text{m}$ 移植神経の 3mm 末梢で $478.8 \mu\text{m}$ であった。Group3.2.1 の順で平均ミエリン厚が厚い傾向にあった。

移植神経においても電気刺激はコントロール群で神経再生を促進し、60 分刺激群は 30 分刺激群に比べ神経再生促進作用があると考えられた。

軸索再生を蛍光顕微鏡下で観察できるトランスジェニックマウスは軸索再生を評価するのに当たり有用であった。その蛍光発色を数値化する事で再生の程度を評価する事ができたが、知覚神経再生の評価で、経皮的に神経再生を観察する際には他実験データとの整合性がとれず、皮膚や体毛の影響なども考慮する必要があると考えられる。そのため経皮的に観察した発色強度を数値化する事では神経再生の程度を評価するのは困難である可能性がある。

短期的電気刺激は知覚・運動神経共に神経再生を促進すると考えられた。知覚運動神経の再生は特に 60 分刺激群で再生促進がみられたが、30 分刺激群でも 60 分刺激群程ではないがコントロール群に比べ再生促進が得られた。挫滅群における軸索伸長速度に結果より神経刺激群とくに 60 分神経刺激群で軸索伸長速度が速い傾向にあり、その後の軸索伸長速度の差がなかった事から、再生軸索が挫滅部を乗り越える期間を主に短縮するのではないかと考えられた。

神経移植群での軸索伸長、平均ミエリン厚が共に再生が促進されており移植神経の再生促進にも効果があると考えられる。短期的電気刺激は挫滅モデルや神経移植モデルなど様々な状況において神経再生促進作用が期待できると考える。

今回の研究において糖尿病マウスへの応用については結果の発表に至らなかったが、今後も研究を継続し検討を行っていきたいと考えている。

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 1 件)

Yuhei Natori, Hidehiko Yoshizawa, Daiki

Senda, Hiroshi Mizuno, Ayato Hayashi. The fluorescent intensity from the transgenic Thy1-YFP 16 mouse correlates with the amount of regenerated axons, Plastic and Reconstructive Surgery Global Open impress , 査読有 , Acceptance date 04-27-2016

[学会発表] (計 1 件)

名取悠平 神経再生における短期的神経刺激の有用性とLive imagingの妥当性について 第 22 回日本形成外科学会基礎学術集会 2013 年 11 月 8 日 朱鷺メッセコンベンションセンター (新潟県新潟市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

名取 悠平 (NATORI, Yuhei)
順天堂大学・医学部・非常勤助手
研究者番号：80445478

(2) 研究分担者

水野 博司 (MIZUNO, Hiroshi)
順天堂大学・医学部・教授
研究番号：80343606

(3) 研究分担者

林 礼人 (AYATO, Hayashi)
順天堂大学・医学部・前任准教授
研究者番号：10365645

(4) 研究協力者

吉澤 秀和 (YOSHIZAWA, Hidekazu)
順天堂大学・医学部・助手
研究者番号：10512593

(5) 研究協力者

千田 大貴 (SENDA, Daiki)
順天堂大学・大学院生