

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640008

研究課題名(和文) 脊髄損傷後の感覚神経線維再生促進の新しい試み

研究課題名(英文) Regeneration of motor and sensory neurons in zebrafish spinal cord after injury.

研究代表者

加藤 聖 (KATO, Satoru)

金沢大学・健康増進科学センター・研究協力員

研究者番号：10019614

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄損傷後の運動神経ニューロン、感覚神経ニューロンの生死、再生について調べることを目的とし、ゼブラフィッシュの脊髄切断モデルを作製し、経過観察を行った。まず運動神経系に関しては、脳内の上位運動神経は損傷後も生存し、2-3ヵ月で再生軸索を下位脊髄に伸長することが分かった。また、下位脊髄内の運動神経は、中心管近くの上皮細胞から分化されることが分かった。その際、Sox2の発現が早期に上昇することが証明された。感覚神経系については切断後6週までの観察であるが、死滅せず生存することは判明したが、軸索が上位脊髄を再伸長する証拠は得られなかった。

研究成果の概要(英文)：In the transected zebrafish spinal cord model, upper motor neurons in the brain can survive and regrow their axon after spinal cord injury. The regenerative axons from upper motor neurons in the brain were accompanied with upregulation of IGF-1 expression in their soma. While lower appeared to be neurons were newly synthesized from ependymal cells nearly located near in the central canal of the spinal cord. Sensory neuron in the dorsal root ganglion can survive but not regrow their axons after spinal cord injury.

研究分野：神経化学

キーワード：脊髄損傷 感覚神経 運動神経 再生 細胞生存 zebrafish Sox2 IGF-

1. 研究開始当初の背景

ゼブラフィッシュは脊髄を損傷しても約2ヵ月で泳ぎが回復することが知られていた。それに伴い、脳幹内の運動神経から再生繊維が下降することを報告した。その際に抗アポトーシス因子が運動神経に発現上昇することを報告した (Ogai et al, 2012)。そこで、脊髄損傷後の神経再生を、運動神経、感覚神経に分けて詳細に調べることを思いついた。

2. 研究の目的

我々は先行研究 (Ogai et al, 2012) により、ゼブラフィッシュの脊髄を切断しても約2ヵ月でサカナの遊泳行動はほぼ損傷前に戻ること、また視神経を切断しても視覚が完全に回復することを報告してきた (Kato et al, 2007)。そこでこの脊髄損傷後の運動神経系の再生を上位運動神経 (脳内) と下位運動神経 (脊髄) に分けて、その生存・軸索伸長についてニューロトレーシング法や免疫組織化学法を使って詳細に検討することを企画した。また、感覚神経については後根神経節 (DRG) にある直接脊髄を上向する感覚神経に限って、損傷後の生存再生について調べることを目的とする。形態学的に再生繊維の伸長を利用した逆行性トレーシングと生存因子の発現について精査する。

3. 研究の方法

(1) 脊髄損傷後の運動、感覚神経の生存再生の確認方法

脊髄損傷後すぐに逆行性のニューロトレーサーを損傷部位に注入し、上位運動神経の細胞体と DRG 内の感覚神経の細胞体を確認する。次に、損傷後の時間経過により消失する細胞数を調べる。更に、上位運動神経では最初の切断部位より更に下位で一定期間の後二度目の切断を行ってトレーシングを実施し、神経がトレーシングされれば再生と判断する。感覚神経では更に上位の脊髄で切断し、DRG 内の感覚神経がトレーシング出来れば再生したものと判断することとする。

(2) 生存の判定は、TUNEL 染色陰性を確認すること、また、抗アポトーシス因子 BCL-2 や phospho-Bad などの発現上昇を確認することで行った。軸索伸長のマーカーとしては、GAP-43 や各種のグロソファクターの測定を mRNA レベル、タンパクレベルで精査した。また、細胞局在については、免疫組織染色や *in situ* hybridization 法で確認した。

(3) 行動学的解析は、自作のコンピュータ画像解析装置を用い、自由に遊泳中のサカナの行動を定量化し再生度を確認することとした。

4. 研究成果

(1) 上位運動神経

ニューロトレーサーにより一週過ぎても標

識できることにより、上位運動神経は生存することが確認できた。また、脊髄を上位レベルで1回目の切断をした後、更に下位レベルで2回目の切断をし、トレーシングをした結果、上位ニューロンが標識できたことにより確実に約8週で軸索が再伸長し、行動学的に泳ぎが回復していることを見出した (図1)。

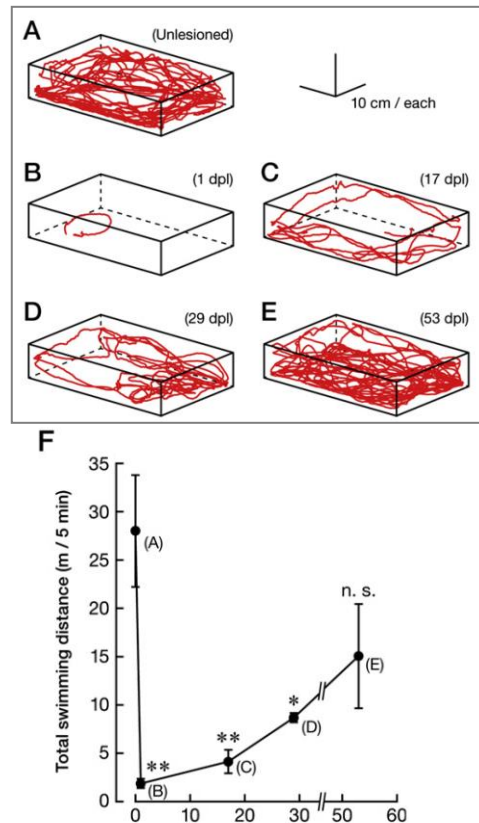
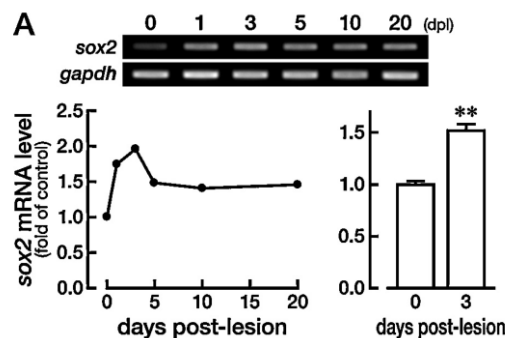


図1 脊髄損傷後のゼブラフィッシュ行動解析
A) 無処置 B-E)脊髄損傷群 dpi は損傷後の日数を示す。F) 5 分間に泳いだ距離の変化

(2) 下位運動神経

脊髄損傷後、神経幹細胞のマーカーである Sox2 の発現が早期に上昇した (図2)。その局在は中心管周囲の上皮細胞であることが判明した。また、細胞増殖のマーカーである PCNA も染め出された。これら Sox2 陽性細胞は次第に前根の方へ移動する様に見えた。このことより下位運動神経は、新たに上位細胞から作られ増殖分化し、移動する様に見えた。



ニューロトレーサーにより一週過ぎても標

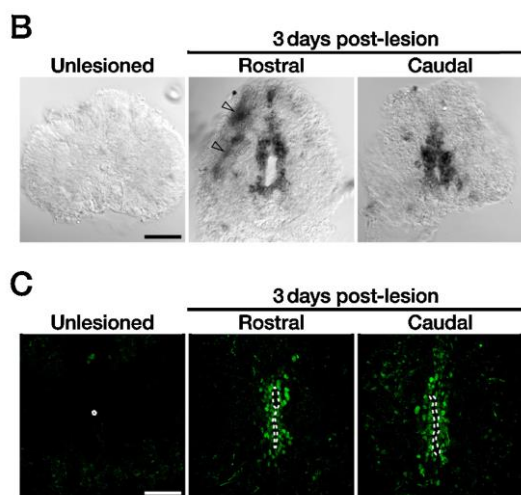


図2 Zebrafish 脊髄損傷後の脊髄中心管での *sox2* mRNA (B)および Sox2 タンパク(C)の変化。切断部位より頭側(rostral)と尾側(caudal)

(3) 感覚神経

脊髄を比較的上位で切断してトレーサーを注入し、脊髄後根神経節中のトレーサーポジティブな感覚神経が存在することを確認した。この感覚神経は、少なくとも1週間経過しても消失しなかったことにより、生存することが確認された。このことは、TUNEL ポジティブ細胞が DRG 中に見られないことから確認できた (図3)。

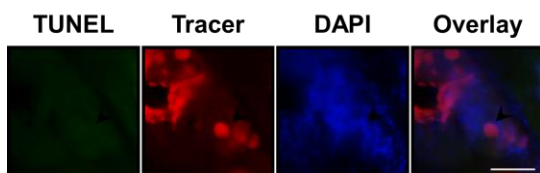


図3 Zebrafish 脊髄損傷後6日目 TUNEL 染色
TUNEL 陽性細胞は観察されない。

(4) 感覚神経の再生

脊髄を比較的高いレベルで切断し、8週間後に上位脊髄で2回目の切断を行ってトレーサーの注入を行い DRG を観察した所、標識される感覚神経が見当たらなかったことより、感覚神経の標識はなかった。このことより、感覚神経は6~8週では上位に向かって再生していないと推測された (図4)。

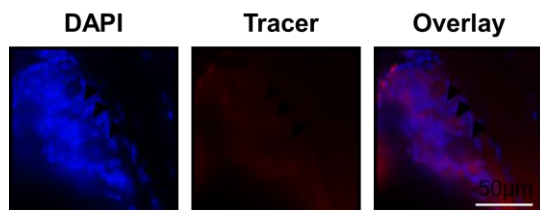


図4 Zebrafish 脊髄損傷7週後の軸索再伸長の有無をトレーサーで確認。DRG 領域において、陽性の細胞は見られなかった。

またこれを裏付けるデータとして、流水中にゼブラフィッシュを入れると、流れに抗せずに泳ぐことが不可能であった。運動神経に比べて现阶段では感覚神経の再生が起これず、その様な結果になったのではないかと考えている。

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 10 件)

- 1) Ogai K, Kuwana A, Hisano S, Nagashima M, Koriyama Y, Sugitani K, Mawatari K, Nakashima H, Kato S. (2014) Upregulation of leukemia inhibitory factor (LIF) during the early stage of optic nerve regeneration in zebrafish. *PLoS One*. 27;9(8):e106010. 査読有
DOI: 10.1016/j.neures.2014.07.010.
- 2) Sugitani K, Ogai K, Koriyama Y, Kato S. (2014) Reciprocal changes in factor XIII and retinal transglutaminase expressions in the fish retina during optic nerve regeneration. *Adv Exp Med Biol*. 801:759-764. 査読無
DOI: 10.1007/978-1-4614-3209-8_95.
- 3) Ogai K, Nakatani K, Hisano S, Sugitani K, Koriyama Y, Kato S. (2014) Function of Sox2 in ependymal cells of lesioned spinal cords in adult zebrafish. *Neurosci Res*. 88:84-87. 査読有
DOI: 10.1016/j.neures.2013.07.001
- 4) Koriyama Y, Sugitani K, Ogai K, Kato S. (2014) Heat shock protein 70 induction by valproic acid delays photoreceptor cell death by N-methyl-N-nitrosourea in mice. *J Neurochem*. 130:707-719. 査読有
DOI: 10.1111/jnc.12750.
- 5) Koriyama Y, Kamiya M, Arai K, Sugitani K, Ogai K, Kato S. (2014) Nipradilol promotes axon regeneration through S-nitrosylation of PTEN in retinal ganglion cells. *Adv Exp Med Biol*. 801: 751-757. 査読無
DOI: 10.1007/978-1-4614-3209-8_94.
- 6) Ogai K, Nishitani M, Kuwana A, Mawatari K, Koriyama Y, Sugitani K, Nakashima H, Kato S. (2014) Regeneration-associated genes on optic nerve regeneration in fish retina. *Adv Exp Med Biol*. 801: 441-446. 査読無
DOI: 10.1007/978-1-4614-3209-8_56.
- 7) Koriyama Y, Sugitani K, Ogai K, Kato S. (2014) Neuritogenic activity of trichostatin A in adult rat retinal ganglion cells through acetylation of histone H3 lysine 9 and RAR β induction. *J Pharmacol Sci*. 124:112-116. 査読有
DOI: org/10.1016/j.jphs.2015.02.008

- 8) Kato S., Matsukawa T, Koriyama Y, Sugitani K., Ogai K. (2013) A molecular mechanism of optic nerve regeneration in fish: the retinoid signaling pathway. *Prog Retin Eye Res.* 37:13-30. 査読有 DOI: 10.1016/j.preteyeres.2013.07.004.
- 9) Koriyama Y, Takagi Y, Chiba K, Yamazaki M, Sugitani K., Arai K, Suzuki H, Kato S. (2013) Requirement of retinoic acid receptor β for genipin derivative-induced optic nerve regeneration in adult rat retina. *PLoS One.* e71252. 査読有 DOI:10.1371/journal.pone.0071252.
- 10) Koriyama Y, Nakayama Y, Matsugo S, Sugitani K., Ogai K, Takadera T, Kato S. (2013) Anti-inflammatory effects of lipoic acid through inhibition of GSK-3 β in lipopolysaccharide-induced BV-2 microglial cells. *Neurisci Res.* 査読有 DOI:10.1371/journal.pone.0071252.
- [学会発表] (計 8 件)
- 1) Sugitani K., Koriyama Y, Ogai K, Wakasugi K, Kato S. A comparative study of Neuroglobin expression in mouse and zebrafish retina after optic nerve injury. XV International Symposium on Retinal Degeneration RD2014, Asilomar Conference Center Pacific Grove, California, U S, July 13-18, 2014.
- 2) Koriyama Y, Ogai K, Sugitani K., Hisano S, Kato S. Heat shock protein 70 induction delays photoreceptor cell death by N - methyl - Nitrosourea in mice. XV International Symposium on Retinal Degeneration RD2014, Asilomar Conference Center Pacific Grove, California, U S, July 13-18, 2014.
- 3) Hisano S, Koriyama Y, Ogai K, Sugitani K., Kato S. nNOS/NO as a trigger of the MNU - induced photoreceptor cell death. XV International Symposium on Retinal Degeneration RD2014, Asilomar Conference Center Pacific Grove, California, U S, July 13-18, 2014.
- 4) Ogai K, Hisano S, Sugitani K., Koriyama Y, Kato S. Changes of EGF and HB - EGF during photoreceptor regeneration in MNU - induced retinal degeneration model using zebrafish. XV International Symposium on Retinal Degeneration RD2014, Asilomar Conference Center Pacific Grove, California, U S, July 13-18, 2014.
- 5) 久野 優, 大貝和裕, 馬渡一浩, 郡山恵樹, 杉谷加代, 加藤 聖 脊髄損傷後ゼブラフィッシュの脳における上位運動ニューロンにて IGF-1 およびリン酸化 S6 タンパク質が増加する. 第91回日本生理学会大会 鹿児島大学群元キャンパス (鹿児島県鹿児島市) 2014年3月16日
- 6) 杉谷加代, 世良真悠子, 大貝和裕, 郡山恵

樹, 若杉 桂輔, 加藤 聖 酸化的ストレス条件下でのマウス網膜におけるニューログロビンの発現とその機能に関する検討. 第91回日本生理学会大会 鹿児島大学群元キャンパス (鹿児島県鹿児島市) 2014年3月16日

- 7) 杉谷加代 Factor XIII as a regeneration associated molecules in fish retina after optic nerve injury. 第86回日本生化学会大会 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市) 2013年9月11日
- 8) 郡山恵樹, 千葉賢三, 加藤 聖. 成熟哺乳類における RAR beta 再発現機構による視神経再生, 日本レチノイド研究会 第24回学術集会. 星薬科大学百年記念館 (東京都品川区) 2013年8月30日~8月31日.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
 発明者 :
 権利者 :
 種類 :
 番号 :
 出願年月日 :
 国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
 発明者 :
 権利者 :
 種類 :
 番号 :
 出願年月日 :
 取得年月日 :
 国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

<http://neuro.w3.kanazawa-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 聖 (KATO, Satoru)

金沢大学・健康増進科学センター・研究協力員
 研究者番号 : 10019614

(2) 研究分担者

杉谷 加代 (SUGITANI, Kayo)

金沢大学・保健学系・助教
 研究者番号 : 20162258

(3) 連携研究者

なし