

財団法人 日中医学協会

2009 年度共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

2009 年 3 月 11 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 川野 仁
所属機関名： 東京都神経科学総合研究所
所属部署名：発生形態研究部門 職名：副参事研究員
所在地： 府中市武蔵台 2－6
電 話： 042-325-3881 内線：4507



1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

脊髄損傷の治療のための損傷後の中枢神経系における神経再生に関する研究

3. 成果の概要

昨年5月に李助教授を招へいし、また9月には中国医科大学を訪れ、共同研究を進めるとともに、中国医科大学の若手研究者を指導した。協同研究の成果は欧文原著論文として投稿し、Neural Regeneration Research に受理された。

※発表論文等

Teng X, Yoshioka N, Kimura-Kuroda Junko, Kawamura Koki, Kawano H, Li HP: Neur. Regener. Res. 2010 印刷中

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 川野 仁	職名：副参事研究員
所属機関名：東京都神経科学総合研究所	部署名：発生形態研究部門
中国側研究者氏名： 李 洪鵬	職名： 助教授
所属機関名： 中国医科大学	部署名：解剖学教室

脊髄損傷の治療のための損傷後の中枢神経系における神経再生に関する研究

研究者氏名	川野 仁
日本所属機関	東京都神経科学総合研究所
共同研究者名	李 洪鵬
中国所属機関	中国医科大学解剖学

要 旨

脊髄損傷患者は日本に約10万人おり、毎年新たに5000人の受傷者が生じている。しかし、その治療法が確立されていないために、多くの患者が寝たきりや車いすの生活を強いられている。中国でも日本の10倍に及ぶ脊髄損傷患者がいるが、脊髄損傷に関する研究は欧米や日本に比べて遅れている。本事業では、①日本と中国の研究者による脊髄損傷に関する共同研究を推進することと、②中国の医育研究機関において技術の習得や研究者の育成を進めること、の二つに焦点を当てた。その成果は以下の通りである。

- ① 日中共同研究の推進：脊髄損傷の治療法として有望視されている嗅神経被覆細胞（OEC）の移植の再生促進の機序を中国医科大学と協同して研究し、細胞移植が損傷部に形成される再生阻害因子である線維性瘢痕の形成を抑制することで神経再生と運動機能回復を促進することを見いだした（Neural Regeneration Research, 2010, 印刷中）。
- ② 中国の研究者の育成と技術の指導：李助教授は昨年5月に3週間神経研に滞在し、細胞移植や標本作成などの技術を習得し、帰国後、中国医科大学の教員や大学院生にその技術を教えている。さらに、昨年9月には川野研究員が中国医科大学を訪れ、神経再生に関する講習を行い、脊髄損傷の治療法の研究について指導した。

以上のように、当事業は所期の目的通りの成果を上げたと言える。

Key Words 脊髄損傷, 神経再生, 線維性瘢痕, グリア瘢痕, ラット

緒 言：

スポーツ事故や転落事故などにより脊髄が損傷を受けると、損傷部より下位の運動・知覚機能に重篤な障害が生じる。現在のところ脊髄損傷の有効な治療法は確立されておらず、多くの患者が車椅子や寝たきりの生活を余儀なくされている。脊髄損傷の治療が困難な理由は、損傷を受けた神経線維がほとんど再生せず、失われた機能を回復できないからである。神経再生が起こりにくい理由として、神経細胞自身の再生能の欠如に加えて、グリア瘢痕やコンドロイチン硫酸プロテオグリカンなど、再生軸索の伸長を阻害する種々の環境因子の存在が挙げられてきた。しかし脳や脊髄の損傷部でそれら阻害因子の働きを抑制し、神経再生を実現させようという試みが繰り返し行われてきたが、多くの場合予想外に小さな効果しか得られていない。

われわれは再生阻害因子として、線維性瘢痕に注目してきた。線維性瘢痕は損傷後、線維芽細胞が損傷部に侵入し、コラーゲンなどの細胞外マトリックスを分泌して形成する、いわば「カサブタ」のようなものである。これまでに、①マウス新生仔(Kawano et al., 2005)、②IV型コラーゲンの合成阻害(Kawano et al., 2005)、③視床下部弓状核(Homma et al., 2006)、④コンドロイチン硫酸の酵素的分解(Li et al., 2007)などの損傷脳のモデルを解析したところ、いずれのモデルにおいても、線維性瘢痕が形成されない状況で、神経再生が起こっていた。この一連の研究成果は、線維性瘢痕が強力な再生阻害因子であることを示している。

動物の脊髄損傷モデルにおいては、様々な細胞を損傷部に移植することで神経再生と機能回復を促進する試みが多数報告されている。とくに嗅神経被覆細胞（OEC）は患者自身から採取し、培養した後に移植することが可能なため、すでにいくつかの国では患者を対象にした移植手術も行われている。しかし、細胞移植による神経再生促進のメカニズムはいまだに不明であり、患者への移植手術も動物で見られたほどの運動機能の改善は起こっていない。われわれは最近、脳損傷モデルマウスの損傷部へOECを移植すると、線維性瘢痕の形成が抑制され神経再生が促進することを見出している（Teng et al., 2008）。

本研究は、ラットの脊髄損傷部へOECを移植し、その神経再生促進のメカニズムを明らかにすることを目的として計画された。もし、OEC移植群で損傷部における線維性瘢痕の形成が抑制され、神経再生が促進されていけば、線維性瘢痕が主要な再生阻害因子であるという、われわれの仮説が脊髄損傷においても証明されることになる。

対象と方法：

1. 嗅球グリア細胞の調整

生後4週齢のSD系雄ラットの嗅神経と嗅球の糸球体層をイソフルラン吸入麻酔下で取り出し、小片にして10%胎仔牛血清を含むEagle/F12培養液中で4-6日間培養した。組織片から細胞が十分に遊走したら、遊走した細胞だけを集め、さらに約2週間培養した。細胞を蛍光色素であるHoechst33342で標識した後、トリプシン処理によりディッシュから剥がし、培養液で約 $5-8 \times 10^7/\text{ml}$ の濃度に調整した。それぞれの細胞マーカーで確かめたところ、培養細胞に含まれるOECと線維芽細胞の割合はそれぞれ、40%と60%であった。

2. 嗅球グリア細胞の移植

生後8週齢のSD系雄ラットをペントバルビタールNa（50mg/kg体重）で麻酔し、背部の皮膚と筋を切開した後、下部胸椎の椎弓と棘突起を切除し、幅2mmのナイフで脊髄を完全に切断した。マイクロシリンジを用いて $2 \mu\text{l}$ （約 1×10^5 個）のOECと線維芽細胞の懸濁液を脊髄損傷部に注入した。術後、術部を縫合し、抗生物質を注射した。Shamコントロールは脊髄を露出するだけで、ナイフは挿入しなかった。

3. 標本作製と免疫組織化学

術後1週あるいは2週に、ラットはイソフルラン麻酔下で、心臓より4%パラフォルムアルデヒド液を用いて灌流を行い、脊髄を固定した。脊髄を取り出し、さらに一晩固定した後、ドライアイス中で凍結し、 $40 \mu\text{m}$ 厚の連続矢状断切片を作成した。

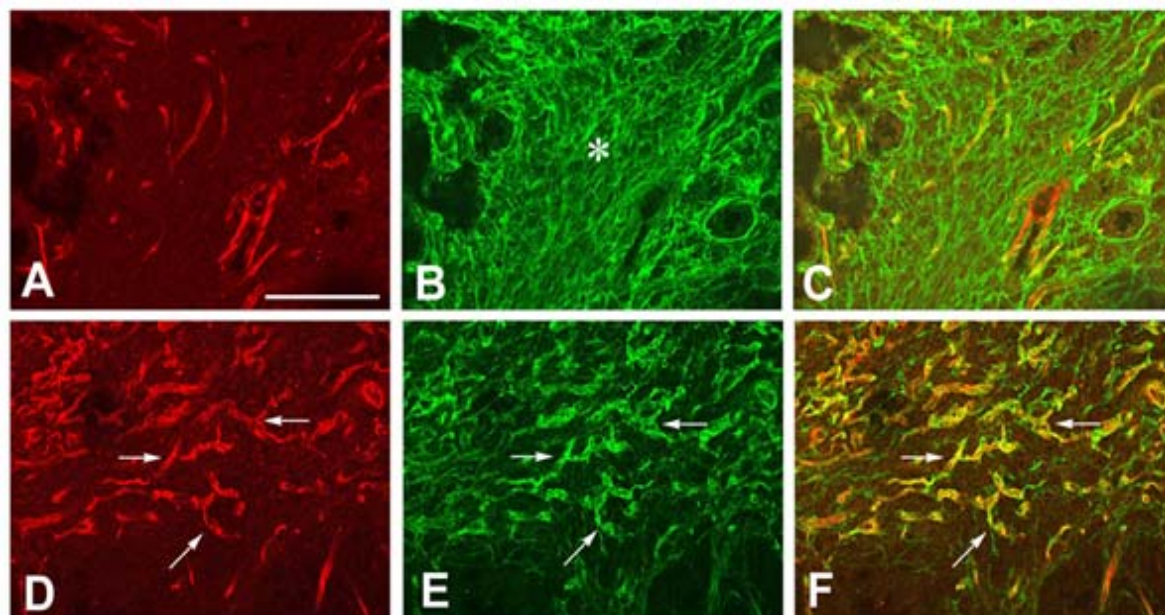
免疫組織化学的染色には、GFAP、IV型コラーゲン、RECA-1、セロトニン、CGRPに対する各抗体を用いた。単染色はABC法を行い、DABで褐色に発色した。また2重免疫染色は異なる蛍光色素で標識した抗体を用いた。セロトニン線維については、KS400（Ziess社、ドイツ）を用いて画像解析を行い、再生線維の数を計測した。

結 果：

使用したラットは、損傷のみが9匹（1週間5匹、2週間4匹）、OEC移植が11匹（1週間5匹、2週間6匹）、sham手術群（脊髄を切断しないコントロール）が3匹であった。下位胸髄を微小ナイフにより切断すると、下肢の運動は麻痺し、2週間後までほとんど回復しなかった。組織学的に観察すると、損傷部にはIV型コラーゲン陽性の線維性瘢痕が形成されており、その周囲にはGFAP強陽性を示す反応性アストロサイトが集積してグリア瘢痕を形成していた。上行性（知覚性）のカリトニン遺伝子関連ペプチド（CGRP）を含む線維と、下行性（運動性）のセロトニン線維はいずれも損傷部を越えて再生することはなかった。

一方、OECを移植したラットは術直後では下肢の麻痺が見られたが、徐々に回復する傾向を示した。OEC移植群の損傷部を組織学的に解析すると、グリア瘢痕も線維性瘢痕も損傷のみの場合と変わりなく存在しているように見えた。それにもかかわらず、多数のセロトニン線維とCGRP線維が移植組織内を伸長し、損傷部を越

えて再生する線維も有意に増加していた。線維性瘢痕の有無についてさらに詳しく調べてみた。IV 型コラーゲンは線維性瘢痕の他に血管にも発現しているため、血管に特異的な RECA-1 と蛍光二重免疫染色を行い両者の局在を比較した。損傷のみの群では、血管以外にも線維状の IV 型コラーゲンの沈着が豊富に見られ、線維性瘢痕が明らかに認められた（図 1 A-C）。それに対し、OEC 移植群では、損傷のみに比べ血管が明らかに増加していたが、血管以外の IV 型コラーゲンの沈着は少なく、線維性瘢痕の形成が抑制されていることが分か



った（図 1 D-F）。

図 1．損傷のみ（上段）と OEC 移植（下段）の損傷部における RECA-1 陽性の血管（A, D、赤色）と Col IV（B, E、緑色）の局在。損傷のみでは血管以外に Col IV の沈着（C、緑色）が豊富に存在し、線維性瘢痕が形成されているが、OEC 移植では線維性瘢痕の形成はほとんどない（F）

考 察

現在、OEC の損傷部への移植は、脊髄損傷の治療法としてもっとも有望視されているが、その再生促進のメカニズムは明かでなかった。脊髄損傷部には種々の再生阻害因子が存在する。それらの中で、OEC 移植により、線維性瘢痕の形成が抑制されていることを見出した（図 1）。私たちは最近、OEC をラット中脳ドーパミン線維の切断部に移植し、OEC 移植 2 週後で有意に神経再生が促進されることを見出している（Teng et al., 2008）。

本研究では、ラット脊髄損傷部への OEC の移植により、下行性のセロトニン線維と上行性の CGRP 線維が損傷部を越えて再生し、同時に運動機能回復も促進した。このような効果は、再生を阻害する線維性瘢痕の形成が OEC 移植により抑制されたことによると結論された（図 2）。本研究の成果は、現在、欧文原著論文として印刷中である（Teng et al., 2010）

損傷後の脊髄には様々な軸索伸長阻害因子が存在し、これが神経再生が起こりにくい理由であると考えられてきた。これまで多くの研究者は反応性アストロサイトが形成するグリア瘢痕が主要な阻害因子であると考えてきたが、OEC 移植により、グリア瘢痕の形成が抑制されるという結果は得られていない。今回の結果でもグリア瘢痕に変化は見られなかった。

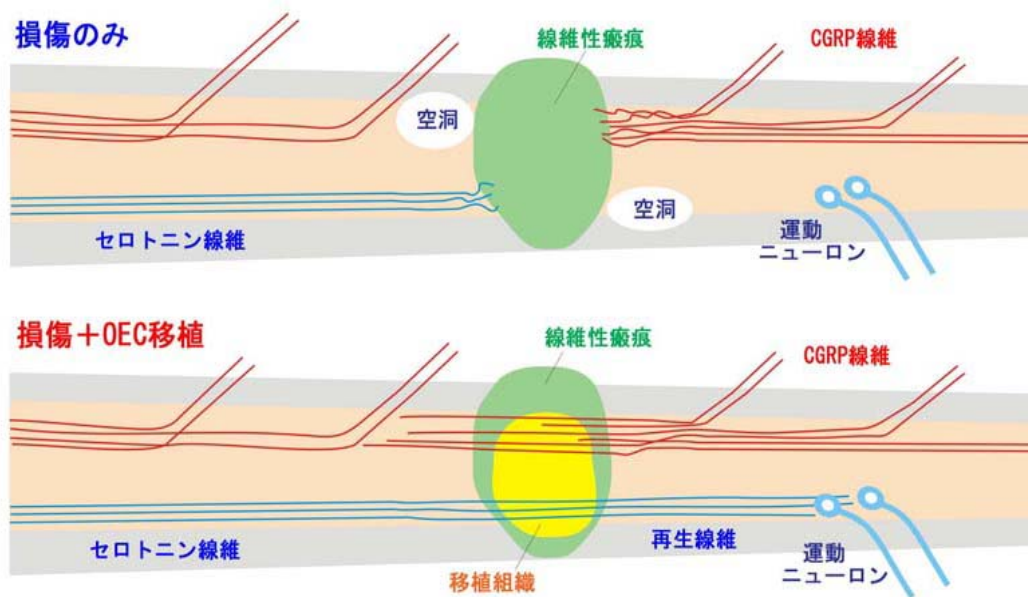


図2. 本研究のまとめ。損傷のみの場合（上）は脊髄の損傷部には線維性瘢痕が形成され、切断された下行性のセロトニン線維と上行性の CGRP 線維は再生しない。OEC 移植群（下）では移植により線維性瘢痕の形成が抑制され、再生線維が損傷部を越えて伸長する。

以上の研究のうち、損傷と OEC 移植の手術は共同研究員である李洪鵬（中国医科大学・解剖学教室・助教授）と昨年 7 月まで神経研の流動研究員であった膝錫川（現遼東医学院大学・病理学教室・助教授）が、OEC の培養は東京都神経研の黒田純子技術員がそれぞれ担当し、川野が研究の統括を行った。

今後、脊髄損傷の治療法の確立を目指してさらに研究を進めていく予定である。具体的には、OEC 移植に加え、線維性瘢痕の形成を阻害する処置（IV 型コラーゲンの合成阻害やコンドロイチン硫酸の分解）の併用や、軸索伸長を促進する神経栄養因子の投与なども考えている。

参考文献（下線は代表研究者と共同研究者）：

- Kawano H, Li HP, Sango K, Kawamura K, Raisman G: Inhibition of collagen synthesis overrides the age-related failure of regeneration of nigrostriatal dopaminergic axons. J. Neurosci. Res., 80 (2): 191-202, 2005.
- Homma A, Li HP, Hayashi K, Kawano Y, Kawano H: Differential response of arcuate proopiomelanocortin- and neuropeptide Y-containing neurons to the lesion produced by gold thioglucose administration. J Comp Neurol., 499: 120-131, 2006.
- Li HP, Homma A, Sango K, Kawamura H, Raisman G, Kawano H: Regeneration of nigrostriatal dopaminergic axons by degradation of chondroitin sulfate is accompanied by elimination of the fibrotic scar and glia limitans in the lesion site. J. Neurosci. Res., 85: 536-547, 2007.
- Teng X, Nagata I, Li HP, Kimura-Kuroda J, Sango K, Kawamura K, Raisman G, Kawano H: Regeneration of nigrostriatal dopaminergic axons after transplantation of olfactory ensheathing cells and fibroblasts prevents fibrotic scar formation in the lesion site. J. Neurosci. Res. 86(14):3140-3150, 2008.

注：本研究は以下に掲載された。Teng X, Yoshioka N, Kimura-Kuroda Junko, Kawamura Koki, Kawano H, Li HP: Transplantation of olfactory ensheathing cells promotes axonal regeneration in a rat model of spinal cord injury. Neur. Regener. Res. 2010 印刷中。 作成日：2010 年 3 月 12 日