

《シンポジウム》

外傷性脳損傷のリハビリテーション

座長/立野 勝彦・蜂須賀研二

損傷後の中枢神経軸索再生の分子機構—金魚視神経をモデルとして—

金沢大学大学院医学系研究科脳情報分子学

田中 聖之, 郡山 恵樹, 渡辺 雄太
塚原みゆき, 松川 通, 加藤 聖

はじめに

光情報は網膜視細胞で受容され、いくつかの介在性ニューロンで情報処理を受け、最終出力を網膜神経節細胞 (RGCs) の軸索である視神経線維から脳に送られる。網膜は発生学的にみると脳の前方部が突出してできたものであり、いわば脳の出先器官である。この中枢神経である視神経が損傷を負った場合、ラットでは損傷後1週間くらいから急速なRGCsの変性脱落が起こる¹⁾。一方、金魚は損傷後においてもRGCsの変性は起こらず、1週間後くらいから軸索の再伸長が始まる²⁾。

1950年代、Sperryらのグループが初めて魚類や両生類などの下等脊椎動物における中枢神経系の再生を見出してから、視神経損傷後のRGCsにおける形態学的変化や突起伸展作用を促進させる因子の発見など多くの事実が明らかにされ、その応用として哺乳類の中枢神経系の再生が試みられるようになってきた。

では、なぜ成体哺乳類の中枢神経系は再生能力がない、あるいは低いのか？ これは、神経細胞

に分裂能がないことやミエリンなどに由来する軸索伸長阻害因子が存在するために、中枢神経系内は軸索再生に対して非許容的な環境になっているためと考えられている。しかし、最近の神経生物学や幹細胞生物学の進展に伴って中枢神経の再生を可能にする重要な研究成果が蓄積されつつある。

そこで本稿ではまず、哺乳類における中枢神経軸索再生に関する従来の戦略を述べ、次いで新たな戦略の1つとして期待したい、金魚視神経再生モデルから見出した再生関連分子について解説したい。

末梢神経の移植による再生

1981年にAguayoらが、末梢神経の架橋移植によって中枢神経伝導路の再生が強く促進されることを明らかにし、末梢神経の旺盛な再生能力の本体がシュワン細胞の産生する種々の因子によって形成される環境にあることを示した³⁾。損傷の遠位におけるシュワン細胞が軸索の変性(ワラー変性)を受けてミエリンを形成する分化状態から未分化状態に変化し、さまざまなサイトカインや促進因子を産生し、再生に適切な環境を作り出すことで再生を可能にしている。

胎生細胞, 胚性幹細胞 (ES細胞) の移植による再生

1982年にBjörklundが、損傷を受けた哺乳類成体の脳内に胎生神経組織を移植すると、移植組織は発達・分化して、宿主神経細胞とシナプスを形成し、神経回路の再構築が起こりうることを明

らかにした⁴⁾。このことから成体脳組織も、損傷後において軸索の発芽・再生、シナプスの再形成能力が発現しうることを明確に示した。このような基本的概念の確立により現在では、多分化機能を持ったES細胞を用いた移植治療の実験なども行われるようになってきている⁵⁾。また失われた脳の機能回復を図るという点で、特定の神経細胞群の変性により欠落した、神経伝達物質あるいは神経栄養因子のような液性因子を補うため、これらの因子を産生する細胞を移植することにより、機能の改善を図る試みも行われている⁶⁾。

中枢神経ミエリンの再生抑制分子

末梢神経と中枢神経では神経線維を取り巻くグリア細胞の種類が大きく異なっている。末梢神経はシュワン細胞が主たるグリア組織でミエリン形成を行っているのに対して、中枢神経はオリゴデンドロサイトが担う。シュワン細胞由来のミエリンはオリゴデンドロサイトのそれに比べてはるかに阻害作用が少なく、その組成自体が末梢と中枢で異なっている。最近の研究でオリゴデンドロサイトにはNogo-Aやミエリン由来糖タンパク質(MAG)、オリゴデンドロサイトミエリン糖タン

パク質(OMgp)などの伸長阻害因子が報告され、それらが変性組織に置き換わってアストロサイトの肥大増殖、グリオーシス(癩痕)の形成、そして中枢神経再生を阻害するということが知られるようになった^{7,8)}。また、これら中枢ミエリン由来軸索阻害因子のシグナル経路も少しずつではあるが明らかになってきた(図1)。これら3種類の阻害因子はいずれも、Nogo受容体(NgR)とニューロトロフィン(NT)受容体のp75^{NTR}を含む神経細胞受容体複合体に結合し、低分子量GTP結合タンパク質を介することで阻害活性を発揮する。現在では中和抗体を用いての阻害因子の抑制やRhoキナーゼ阻害剤による神経再生が報告されるようになり、より詳細なシグナル経路解明など注目を集めている。

金魚における視神経再生

我々は金魚視神経再生モデルを利用して、視神経再生中に発現が増加する遺伝子を見出し、視神経再生における役割を調べ哺乳類の中枢神経再生への応用を試みるべく取り組んでいる。

1. 形態学的、行動学的な再生

視神経切断後7日ほどで軸索の再伸長が起こり、その再生線維は14~18日で脳の標的部位である視蓋の全域で観察され始める。そして、20~40日で大雑把な網膜-視蓋間の連絡路(投射)が形成されるが、この段階では連絡路の精密化は完成しておらず、この精密化の終了には切断後150~180日と長時間を要する⁹⁾。また、RGCsの細胞体の肥大化が視神経切断後10日前後から始まり、60日でピークとなり、4~5カ月くらいで元の大きさに戻る¹⁰⁾。この肥大化は神経再生に必要なRNA合成やタンパク質合成の活性化を反映している結果であると考えられる。

次いで機能的な再生を評価するために、視覚依存性行動の1つと考えられる群れ行動を定量化し、再生過程における行動の変化を解析した。2尾の金魚の2点間距離を測定したところ、未処理群では一方の金魚がもう一方を追うような行動をとり、2点間距離も非常に短いのに対して、両眼視神経切断群では各々が自由勝手に遊泳し、2点

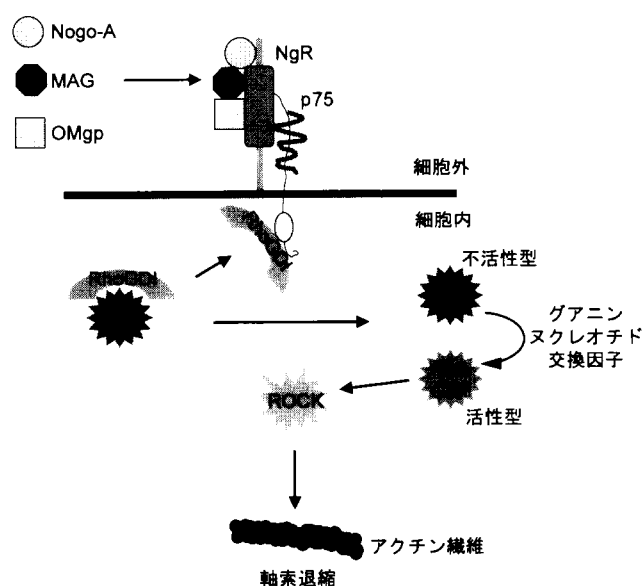


図1 ミエリン関連抑制因子のシグナル経路
中枢ミエリン由来軸索阻害因子は同じ受容体を介する。Rhoは不活性型(Rho-GDP)から活性型(Rho-GTP)に変化すると、RhoキナーゼのROCKを活性化させる。その結果、軸索の退縮が誘発される(文献7,8より改変)。

損傷後の中枢神経軸索再生の分子機構—金魚視神経をモデルとして—

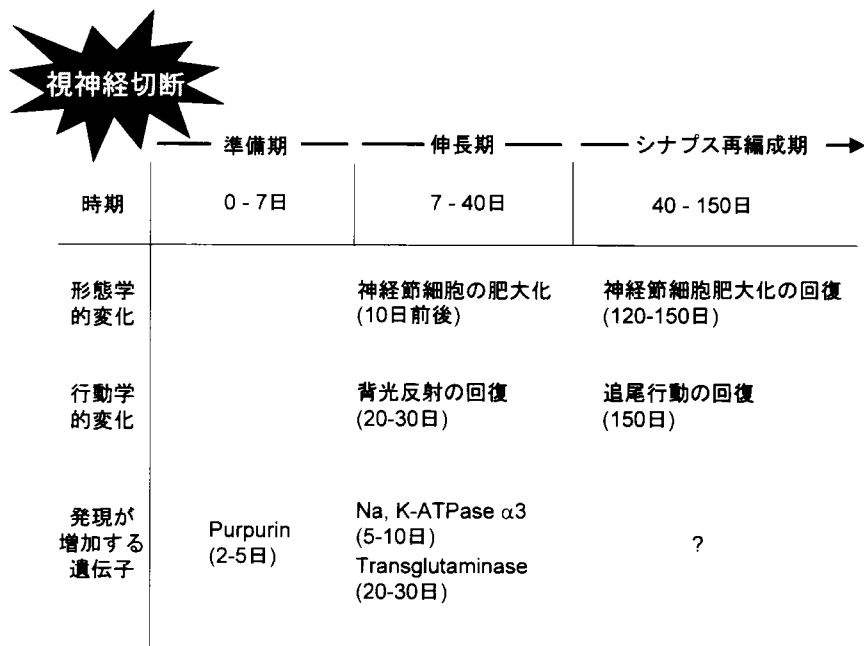


図2 金魚視神経再生過程における3つのステージ

準備期に視神経損傷に対する細胞応答や軸索伸長の準備が行われ、伸長期では軸索が伸長し始め、視蓋に到達し軸索線維の再接続が成される。再編成期になると不要な軸索の退縮やシナプス増強によるシナプス終末の精密化が行われる。

間距離も長くなった。この状態は少なくとも2カ月は持続し、未処理群の状態に戻るまでには4～6カ月を要する¹¹⁾。

以上から視神経切断後における再生過程は1) 視神経切断後0～7日ほどの早期にあたる準備期、2) 視神経切断後7～40日の中期にあたる伸長期、3) 視神経切断後40～150日の後期にあたるシナプス再編成期の3ステージに分けた(図2)¹²⁾。

2. 再生関連分子の探索

神経突起伸展に関する総説は多くあり^{13,14)}、視神経損傷後に発現が増加する分子も多く知られている¹⁵⁻¹⁷⁾。我々も視神経再生のメカニズムをより包括的に理解し哺乳類に応用するため、切断後5日目の網膜cDNAライブラリーを作製し、そこから視神経損傷後に発現が増加する分子をクローニングした。うち1つは分泌型レチノール結合タンパク質ファミリーであるpurpurinであった。このpurpurinのmRNAとタンパク質の局在を調べたところ、切断後5日目でmRNAは外顆粒層で劇的に増加していたのに対し(図3)、タンパク質はすべての層、特に視細胞の外節部、内顆

粒層およびRGCsに広く発現していた¹⁸⁾。神経再生における機能的な役割を調べるため網膜の組織片培養を行いpurpurinの作用を調べた。未処理網膜(図4A)やpurpurin(図4B)やretinol(図4C)の単独処理では非常に弱い神経突起伸展しかみられなかったが、purpurinとretinolの共存下で劇的な突起伸展を誘発した(図4D)。purpurinは分泌型タンパク質であるということ、またタンパク質の局在からRGCsへの効果が示唆され、purpurinがRGCsの軸索伸長の開始に重要な役割を担っていることが予想される。その他、再生中期に発現が増加した分子としてNa, K-ATPase $\alpha 3$ subunit¹⁹⁾や神経再生の関与が知られているtransglutaminase²⁰⁾がクローニングできた。

中枢神経系再生と リハビリテーション医学

中枢神経系の再生医療の戦略(図5)に、今までの知見として、1) 末梢神経の移植、2) 胎生細胞およびES細胞の移植、3) 中枢ミエリン由来

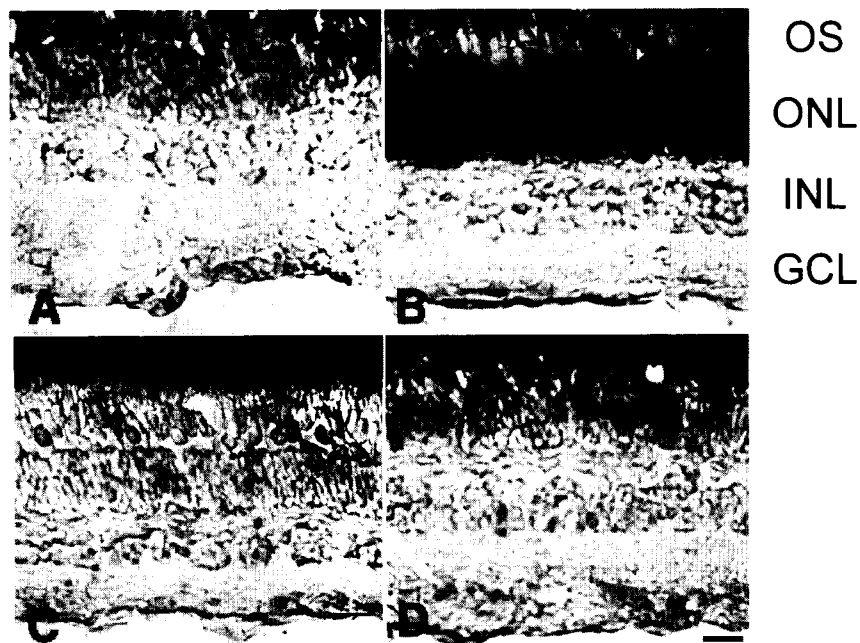


図3 *in situ* ハイブリダイゼーション法による purpurin mRNA の局在 (A) 未処理網膜 (アンチセンス鎖プローブ), (B) 視神経切断後5日目の網膜 (アンチセンス鎖プローブ), (C) 視神経切断後5日目の網膜 (センス鎖プローブ), (D) 視神経切断後10日目の網膜 (アンチセンス鎖プローブ). OS: 外節部, ONL: 外顆粒層, INL: 内顆粒層, GCL: 神経節細胞層, scale bar=20 μ m.

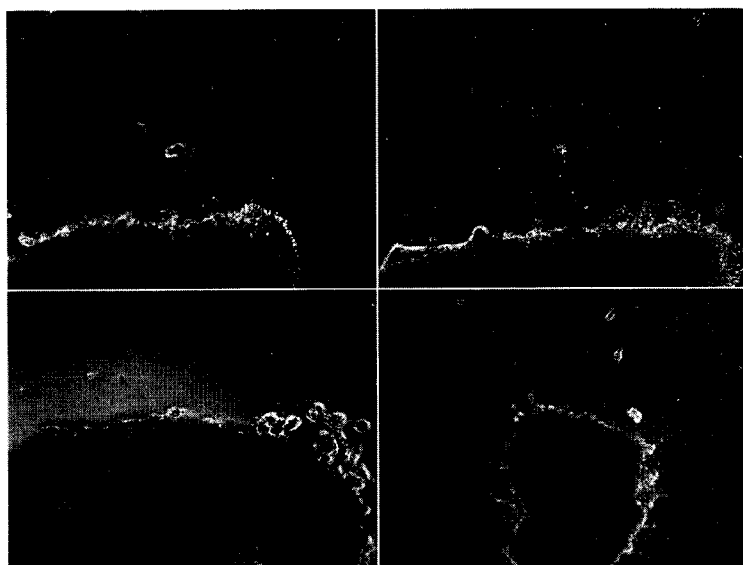


図4 網膜組織片培養からの神経突起伸展 (A) 未処理網膜, (B) purpurin 添加, (C) retinol 添加, (D) purpurin および retinol 添加 (purpurin: 1 μ g/ml, retinol: 1 μ M), scale bar=200 μ m

軸索伸展阻害因子の抑制などがあるが、我々はこちらに新たな神経再生の戦略として、4) 金魚視神経再生関連分子の応用を提案したい。金魚視神経再生モデルは、完全に視機能まで回復することか

ら非常に適した実験系といえ、そこから得られた分子の利用や補充療法が哺乳類の中枢神経再生に有効であると確信している。今後、外傷性脳損傷に対して、機能訓練と共にこれら分子や遺伝子に

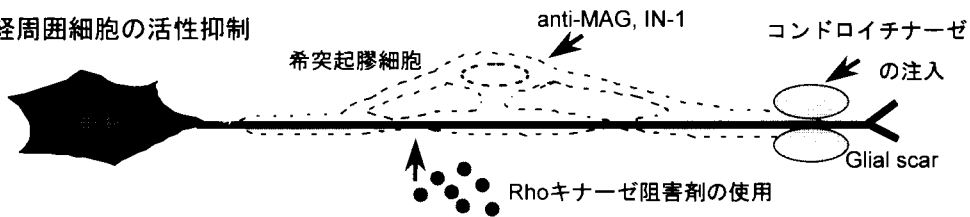
1) 末梢神経自家移植



2) 神経細胞に分化誘導させたES細胞, 骨髄間質細胞の移植



3) 視神経周囲細胞の活性抑制



4) 金魚視神経再生関連分子の投与?

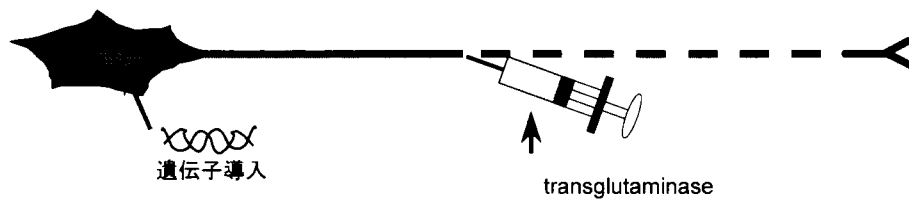


図5 中枢神経再生のストラテジー

よる療法を組み合わせ、損傷された神経組織の神経再生や機能回復を目指すことにより、リハビリテーション医学にも大いに貢献できると期待して、この稿を終えたい。

文 献

- 1) Garcia-Valenzuela E, Gorczyca W, Darzynkiewicz Z, Sharma SC: Apoptosis in adult retinal ganglion cells after axotomy. *J Neurobiol* 1994; **25**: 431-438
- 2) Stuermer CA, Bastmeyer M, Bahr M, Strobel G, Paschke K: Trying to understand axonal regeneration in the CNS of fish. *J Neurobiol* 1992; **23**: 537-550
- 3) David S, Aguayo AJ: Axonal elongation into PNS "bridges" after CNS injury in adult rats. *Science* 1981; **214**: 931-933
- 4) Björklund A: Reconstruction of neuronal connections in the mammalian brain by means of intracerebral neural transplants. *Neuroscience* 1982; **7**: S28-S29
- 5) Hara A, Niwa M, Kunisada T, Yoshimura N, Katayama M, Kozawa O, Mori H: Embryonic stem cells are capable of generating a neuronal network in the adult mouse retina. *Brain Res* 2004; **999**: 216-221
- 6) Morizane A, Takahashi J, Takagi Y, Sasai Y,

- Hashimoto N: Optimal conditions for in vivo induction of dopaminergic neurons from ES cells through stromal cell-derived inducing activity. *J Neurosci Res* 2002; **69**: 934-939
- 7) Kwon BK, Borisoff JF, Tetzlaff W: Molecular targets for therapeutic intervention after spinal cord injury. *Mol Intervent* 2002; **2**: 244-258
- 8) Yiu G, He Z: Signaling mechanisms of the myelin inhibitors of axon regeneration. *Curr Opin Neurobiol* 2003; **13**: 545-551
- 9) Meyer RL: Mapping the normal and regenerating retinotectal projection of goldfish with autoradiographic methods. *J Comp Neurol* 1980; **189**: 273-289
- 10) Devadas M, Sugawara K, Shimada Y, Sugitani K, Liu ZW, Matsukawa T, Kato S: Slow recovery of goldfish retinal ganglion cells' soma size during regeneration. *Neurosci Res* 2000; **37**: 289-297
- 11) Kato S, Devadas M, Okada K, Shimada Y, Ohkawa M, Muramoto K, Takizawa N, Matsukawa T: Fast and slow recovery phases of goldfish behavior after transection of the optic nerve revealed by a computer image processing system. *Neuroscience* 1999; **93**: 907-914
- 12) Matsukawa T, Arai K, Koriyama Y, Liu ZW, Kato S: Axonal regeneration of fish optic nerve after injury. *Biol Pharm Bull* 2004; **27**: 445-451

- 13) Oster SF, Sretavan DW: Connecting the eye to the brain: the molecular basis of ganglion cell axon guidance. *Br J Ophthalmol.* 2003; **87**: 639-645
- 14) Goldberg JL: How does an axon grow? *Genes Dev* 2003; **17**: 941-958
- 15) Turner JE, Schwab ME, Thoenen H: Nerve growth factor stimulates neurite outgrowth from goldfish retinal explants: the influence of a prior lesion. *Dev Brain Res* 1982; **4**: 59-66
- 16) Caminos E, Becker E, Martin-Zanca D, Vecino E: Neurotrophins and their receptors in the tench retina during optic nerve regeneration. *J Comp Neurol* 1999; **404**: 321-331
- 17) Devadas M, Liu ZW, Kaneda M, Arai K, Matsukawa T, Kato S: Changes in NADPH diaphorase expression in the fish visual system during optic nerve regeneration and retinal development. *Neurosci Res* 2001; **40**: 359-365
- 18) Matsukawa T, Sugitani K, Mawatari K, Koriyama Y, Liu Z, Tanaka M, Kato S: Role of purpurin as a retinal-binding protein in goldfish retina during the early stage of optic nerve regeneration: its priming action on neurite outgrowth. *J Neurosci* 2004; **24**: 8346-8353
- 19) Liu ZW, Matsukawa T, Arai K, Devadas M, Nakashima H, Tanaka M, Kato S: Na,K-ATPase $\alpha 3$ subunit in the goldfish retina during optic nerve regeneration. *J Neurochem* 2002; **80**: 763-770
- 20) Eitan S, Solomon A, Lavie V, Yoles E, Hirschberg DL, Belkin M, Schwartz M: Recovery of visual response of injured adult rat optic nerves treated with transglutaminase. *Science* 1994; **264**: 1764-1768

わが国における頭部外傷に関する臨床研究の現状

頭部外傷データバンク検討委員会 (日本神経外傷学会)/東京慈恵会医科大学救急部

小川 武希

東京慈恵会医科大学救急部

平沼 浩一, 松本 孝嗣

はじめに

わが国では、頭部外傷の原因として交通外傷が最も多い。また、多発外傷における予後決定因子として、脳損傷が最も重要であると考えられている。脳損傷に関して救急医療機構の充実、リハビリテーション医学の充実、予後調査は、少子高齢化する本邦においては、人的資源の確保として極めて重要な課題であると考えられる。本稿では日本神経外傷学会に所属する頭部外傷データバンク検討委員会、重症頭部外傷の治療管理に関するガイドライン作成委員会のこれまでの報告を中心に、本邦における頭部外傷に関する臨床研究の現状を概説する。

目的・背景

不慮の事故に分類される“外傷死”は、わが国の1歳から29歳における若年者の死亡原因の第1位を占める(厚生労働省「平成9年度人口動態統計」による)。また“外傷死”の半数に頭部外傷が関与すると考えられる。外傷死の50%以上を占める交通事故死者数(事故後24時間以内)は年々減少し、現在年間約8,000人強であるが、事故後24時間以降には、この1.5倍以上が死亡し、死亡者数の2~10倍以上の外傷後遺症者が存在すると推測されている。また、外傷の治療においては脳損傷だけに注目するのではなく、常にそのメカニズム、多発外傷を念頭におき対応する必要がある。現在、“回避できたと予測される外傷死(preventable trauma death)”は、救命救急センターにおいても、約50%存在するという衝