

# 脊髄神経損傷後の軸索変性-再生過程に与える酸化型 ガレクチン-1の効果

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/4562">http://hdl.handle.net/2297/4562</a>

## 脊髄神経損傷後の軸索変性 - 再生過程に与える 酸化型ガレクチン-1の効果

金沢大学大学院医学系研究科脳医科学専攻脳機能制御学  
(旧講座名: 脳神経外科学)  
(主任: 山下純宏教授)

深 谷 賢 司

本研究の目的は、酸化型ガレクチン-1の軸索再生促進効果とその作用機序をグリア細胞の反応に注目して検討することにある。自家あるいは同種坐骨神経を凍結処理、あるいは化学処理により生細胞除去神経組織、あるいは細胞膜成分除去神経組織とし、ヒト組換え酸化型ガレクチン-1 (rh-gal-1ox), あるいは抗ガレクチン-1中和抗体を添加することで移植神経組織を作成した。これをラット坐骨神経切断部位に移植、縫合したのちに、術後14日目における神経組織内への再生軸索伸長とグリア細胞の動向を免疫組織化学的に検索した。また、同日に移植片内の軸索を再度切断し、Fluorogold (FG) を投与することにより逆行性に再生軸索を標識することで、脊髄内、脊髄後根神経節内の再生軸索起始細胞を同定した。加えて、正常組織内における内因性ガレクチン-1の局在を生化学的ならびに免疫組織化学的に検討した。内因性ガレクチン-1は、正常神経組織内では後根神経節細胞、脊髄前角細胞、坐骨神経組織内の軸索およびシュワン細胞に存在した。rh-gal-1ox投与により、後根神経節、脊髄前角の両者からの移植片内への軸索伸長が促進された ( $p < 0.05$ )。中和抗体投与により、それぞれからの軸索伸長は抑制された ( $p < 0.05$ )。またrh-gal-1oxの投与により、神経切断近位端からのみならず遠位端からもシュワン細胞の移植片への遊走が促進され ( $p < 0.05$ )、中和抗体の投与により、両端からのシュワン細胞の遊走は抑制された ( $p < 0.05$ )。移植片内マクロファージの細胞数に差はみられなかった。近位端からのシュワン細胞の遊走距離は軸索伸長距離を上回っていた。以上より、rh-gal-1oxは、末梢神経損傷後早期に遊走能を含めシュワン細胞の機能を活性化させることにより、感覚ならびに運動神経軸索の再生を促進しているものと考えられた。

**Key words** oxidized galectin-1, growth factor, Schwann cell migration, axonal regeneration

末梢神経軸索損傷後の高い再生能力のメカニズムの詳細を検討することは、再生困難な中枢神経の再生をめざす上で必要不可欠な戦略の一つである<sup>1)</sup>。最近の研究により末梢神経損傷後に神経線維内におこる様々な過程が蛋白から分子レベルにいたるまで次第に明らかにされてきている。損傷後の軸索伸長過程には、発芽軸索を取り囲む神経以外の細胞が産生する各種神経成長因子、接着因子、細胞外マトリックス等の神経再生促進因子、シュワン細胞、線維芽細胞、遊走性マクロファージ等の相互関係が大きく関わっている<sup>1)~3)</sup>。最近、COS-1培養細胞より得られた培養上清が、神経線維束を伴った後根神経節組織からの軸索の伸長を促進し、この軸索伸長促進物質がガレクチン-1であることが判明した<sup>4)</sup>。このことはガレクチン-1が、これまで不明であった末梢神経損傷後早期における神経再生の引き金のひとつとして重要な役割を担っている可能性を示唆しており、その機構を解明することは神経再生の初期過程を明らかにするために重要と思われる。

ガレクチンは $\beta$ ガラクトシドに特異的に結合するレクチン群

のファミリーに属し、*Caenorhabditis elegans*からヒトに至るまで広い種にわたり存在する<sup>5)~8)</sup>。現在までに10種類のガレクチンが同定されている<sup>8)</sup>。ガレクチンファミリーの中でガレクチン-1は分子量14.5 kDaで2量体を形成し、還元条件下でのみ $\beta$ ガラクトシド結合活性を有する<sup>7)</sup>。ガレクチン-1は、骨格筋、平滑筋、肝臓、肺、心臓、皮膚、脾臓、腸など様々な組織に存在し<sup>8)</sup>、リンパ球、胸腺細胞の細胞接着、細胞増殖の調節、アポトーシスなどの様々な働きに関与することが報告されている<sup>9)</sup>。神経系においては、マウス嗅神経の発生段階において神経伸長を促進し、その正確なターゲッティングに関与しているとされる<sup>9)10)</sup>。しかしながら、これらの働きはラクトース投与によって阻害されるので<sup>8)</sup>、 $\beta$ ガラクトシド結合活性を有する還元型ガレクチン-1でのみにみられる。ガレクチン-1は6個のシステインを有するが、このシステインが酸化されることにより分子をひずませるようにジスルフィド結合が作られるために酸化型ガレクチン-1には糖結合活性はないものと考えられている<sup>11)12)</sup>。我々が用いた組換えヒトガレクチン-1は分子内に3箇

平成13年6月25日受付、平成13年9月3日受理

Abbreviations: BDNF, brain-derived neurotrophic factor; DRG, dorsal root ganglion; FG, Fluorogold; HPLC, high performance liquid chromatography; IGF, insulin-like growth factor; NGF, nerve growth factor; PFA, paraformaldehyde; rh-gal-1ox, oxidized recombinant human galectin-1; TBS-T, Tris-buffered saline-Tween20

所のジスルフィド結合を持つ酸化型であることが報告されている<sup>13)</sup>。

酸化型ガレクチン-1は、単離した後根神経節 (dorsal root ganglion, DRG) ニューロンにはなんら活性を示さず、神経束を伴った場合に高い神経再生促進作用を示すことから神経線維を取り巻く神経以外の細胞を刺激し、神経再生を促進する条件を作り出していると想像されている<sup>14)</sup>。しかしながら、酸化型ガレクチン-1の作用する細胞、レセプターはいまだ特定されていない。

本研究において、内因性の神経再生促進因子の影響を最小限とするため、凍結処理自己神経移植モデルと、化学処理同種神経組織移植モデルの2種類のモデルを用いた。凍結処理自己神経移植モデルでは、移植神経束に凍結処理を施し生存細胞がない状態とした。化学処理同種神経組織移植モデルでは、移植神経束に化学処理を施し基底膜以外の細胞成分を除去した。これら2種類のモデルに酸化型組換えヒトガレクチン-1 (oxidized recombinant human galectin-1, rh-gal-1ox) あるいは抗ガレクチン-1中和抗体を作用させ、酸化型ガレクチン-1の末梢神経損傷後における神経再生促進効果とその機序について検討した。

## 材料および方法

### I. 実験動物

実験動物として体重200 gから250 gの雌性ウィスターラット60匹を用いた。実験動物の使用は金沢大学宝町地区動物実験指針に従った。ラットはステンレスゲージに1匹ずつ入れ、実験時以外は水と餌を自由に摂取できるようにした。手術および標本摘出はすべて5%抱水クロラール (0.01 ml/g) の腹腔内投与による麻酔下に行った。

### II. 試薬

#### 1. 試薬

rh-gal-1ox, ウサギ抗ヒトガレクチン-1ポリクローナル中和抗体, ウサギIgGはキリンビール株式会社医薬探索研究所 (高崎) より供与された。rh-gal-1oxはPBSで溶解し、5 ng/mlとなるよう調整した。rh-gal-1oxの対照として、PBSを用いた。ウサギ抗ヒトガレクチン-1ポリクローナル中和抗体はPBSで溶解し、30  $\mu$ g/mlとなるよう調整し、その対照としてウサギIgG 30  $\mu$ g/mlを用いた。

#### 2. rh-gal-1oxの作製

大腸菌発現ベクターであるpET-3d (Stratagene, Southern California, USA) にヒトガレクチン-1のcDNAを組み込んだ。このプラスミドをEpicurian Coli BL21 (DE3) Competent Cells (Stratagene) に組み込み形質転換大腸菌を作製した。この形質転換大腸菌を培養し、ガレクチン-1の発現を誘導した。菌体を収集し破砕後ガレクチン-1を抽出した。抽出液をイオン交換 high performance liquid chromatography (HPLC) にて精製後、酸化剤として硫酸銅を添加し、ジスルフィド結合を誘導した。反応液を逆相HPLCで抽出し、rh-gal-1oxを得た。

### III. 実験モデルの作成

#### 1. 凍結処理自己神経移植モデル

神経圧挫凍結法<sup>15)~17)</sup>に若干の変更を加えた。つまり、左側の大腿部で坐骨神経を露出し、10 mm長に渡り神経を摘出した。摘出した神経組織の遠位端は、6-0ナイロンにて結紮した。これを液体窒素中に10秒間凍結後、室温にて融解した。これを5

回繰り返し、摘出神経近位端を坐骨神経断端と9-0ナイロンにて3針縫合した。吻合部には、あらかじめ試薬 rh-gal-1ox 5 ng/ml, PBS, ウサギ抗ヒトガレクチン-1ポリクローナル中和抗体 30  $\mu$ g/ml, ウサギIgG 30  $\mu$ g/mlを満たした浸透圧ポンプ (Alza Corporation, Palo Alto, USA) に接続したポリエチレンチューブを結合させた。このポンプは背部皮下に埋め込んだ<sup>18)</sup>。この条件下でポンプは、0.5  $\mu$ l/時間の速度で14日間ポンプ内の薬剤を送るように設計されていた。各試薬につき6匹ずつ (計24匹) 作成した。手術後14日後に抱水クロラール麻酔下を開胸し、左心室より灌流固定を行った。灌流液には10倍希釈PBS (0.1 $\times$ PBS) (pH7.4) で溶解した4%パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde, PFA) 溶液を用いた。灌流固定後直ちに坐骨神経組織を取り出し、4%PFA-PBS 中に入れ、4 $^{\circ}$ Cにて浸透させ、パラフィンに包埋して厚さ5  $\mu$ mの縦切片を作成し、ポリ-L-リジン (和光純薬, 大阪) 処理スライドガラス上に貼り付け乾燥させた。

#### 2. トレーサー実験

##### 1) トレーサーの注入

逆行性トレーサー法<sup>19)</sup>による起始ニューロンの標識は凍結処理自己移植モデル作成後14日後に行った。各試薬 (rh-gal-1ox 5 ng/ml, PBS, ウサギ抗ヒトガレクチン-1ポリクローナル中和抗体 30  $\mu$ g/ml, ウサギIgG 30  $\mu$ g/ml) につき3匹ずつ (計12匹) 行った。抱水クロラール麻酔下に、吻合した神経を露出し、吻合部より7mmの部分で切断し、中枢端はFluorogold (FG) (Fluorochrome, Inc. Denver, USA) で満たしたシリコンチューブ内に留置した。FGは0.9%生理的食塩水に解かし4%溶液とした。トレーサーの注入時には、十分チューブ内を4%FG液で満たし、神経断端をFGに接するようにした。

##### 2) トレーサー注入動物の固定

トレーサー注入後48時間の生存期間をおき抱水クロラール麻酔下を開胸後、左心室より灌流固定を行った。灌流液には4%PFA-PBSを用いた。灌流固定後ただちに第4腰椎脊髄後根神経節と、その分節となる脊髄組織を取り出し、20%ショ糖-0.1 $\times$ PBS (pH7.4) 中に入れ、4 $^{\circ}$ Cにて24時間浸透させた。その後標本をTissue-Tek O.C.T.コンパウンド (Miles, Elkhart, USA) に包埋後、液体窒素で凍結し、Cryostat (Miles) にて20  $\mu$ mの厚さの切片を作成し、ポリ-L-リジンを塗布したスライドガラスに貼付した。自然乾燥させ、脱水、キシレン透徹し、封入剤を用いてカバーガラスをかけたあと、ニコン社製蛍光顕微鏡下に観察した。

#### 3. 化学処理同種神経移植モデルの作成

##### 1) 化学処理同種神経組織移植片の作成

同種神経組織移植片の作成はSondell ら<sup>20)</sup>の方法に従った。すなわち、ラットを5%抱水クロラール麻酔下に両側坐骨神経を10 mm長摘出した。摘出した神経組織片を室温にて蒸留水に7時間浸し、その間に蒸留水を数回変えた。次に3%Triton-Xに室温にて一晩曝した。その後、4%デオキシコール酸ナトリウム (Sigma, St. Louis, USA) 中にて室温で24時間振揺した。この過程を再度繰り返した。終了後に蒸留水にて洗浄し、4 $^{\circ}$ C, PBS (pH7.4) 内に保存した。

##### 2) 神経組織移植片の処理

作成された神経組織移植片は、移植前に各試薬 (rh-gal-1ox 5 ng/ml, PBS, ウサギ抗ヒトガレクチン-1ポリクローナル中和抗体30  $\mu$ g/ml, ウサギIgG 30  $\mu$ g/ml) に4 $^{\circ}$ Cにて24時間曝し

た。

### 3) 移植方法

ラットを抱水クロラル麻酔下に左側坐骨神経を露出し、これを8 mm長に渡り摘出した。ここに、前処理した10 mm長の神経組織移植片を9-0ナイロンにて、中枢部、遠位部、ともに2針づつ縫合した。各試薬 (rh-gal-1-ox 5 ng/ml, PBS, ウサギ抗ヒトガレクチン-1ポリクローナル中和抗体30  $\mu$ g/ml, ウサギIgG 30  $\mu$ g/ml) につき6匹ずつ (計24匹) 作成した。神経組織移植手術後14日に、抱水クロラル麻酔下に開胸後、左心室より灌流固定を行った。灌流液には4%PFA-PBSを用いた。ただちに移植神経組織片を摘出し、4%PFA-PBS 中に入れ、4℃にて浸透させ、パラフィン包埋の後、厚さ5  $\mu$ mの縦割切片を作成し、ポリ-L-リジン処理スライドガラス上に貼り付け乾燥させ以下の免疫組織化学の後、光学顕微鏡にて観察した。

### IV. 免疫組織化学

免疫染色はアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体 (avidine-biotin-peroxidase complex) 法にて行った<sup>21)</sup>。キシレン (和光純薬) を用いて脱パラフィン後、連続希釈のエタノールにて親水化し、0.1×PBS (pH7.4) で洗浄し、0.3%過酸化水素加メタノールで内因性ペルオキシダーゼを失活させた。PBSで洗浄後、非特異的反応抑制のため5%スキムミルク (Difco Laboratories, Detroit, USA) を室温で1時間作用させた。一次抗体としてマウス抗ヒトニューロフィラメント抗体 (Dako, Glostrup, Denmark) を100倍、ウサギ抗ウシS100抗体 (Dako) を200倍、ウサギ抗ED-1抗体 (Dako) を100倍、ウサギ抗ヒトガレクチン-1抗体を100倍にそれぞれ希釈して使用した。抗ニューロフィラメント抗体、抗ED-1抗体は室温で2時間反応させ、抗S100抗体、抗ガレクチン-1抗体は、4℃で一晩反応させた。対応するビオチン化二次抗体 (Dako) は10分間反応させた。各反応後に0.1×PBS (pH7.4) で洗浄し、発色はアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体法と0.005%過酸化水素加0.02%ジアミノベンチジン (Sigma) 処置にて行った。核染色はヘマトキシリンにて行った。

### V. 再生軸索、シュワン細胞遊走、マクロファージの評価

凍結処理自己坐骨神経移植モデルにおいて、軸索の数をDailey<sup>22)</sup>らの方法に従い、吻合部から7 mmの部位における抗ニューロフィラメント抗体陽性、かつ25  $\mu$ m以上の軸索を倍率400倍にてカウントした。すべてのカウントはそれぞれ3回ずつ行い、その平均値を出した。また、マクロファージのカウントもDailey<sup>22)</sup>らの方法に従い、0.1 mm<sup>2</sup>あたりの抗ED-1抗体陽性細胞を倍率200倍にてカウントした。吻合部から3 mmの部位において任意に3視野を選出し、各視野における抗ED-1抗体陽性細胞数の平均値を出した。化学処理同種神経組織移植モデルにおいて、軸索再生距離は、近位の吻合部位から移植神経組織内にみられる最も離れたニューロフィラメント陽性軸索先端までの距離を計測した。同様にシュワン細胞の遊走距離は、近位、また遠位の吻合部位から移植神経組織内S100陽性細胞までの最大距離を計測した<sup>20)</sup>。

### VI. FG 標識神経細胞のカウント

ニコン社製蛍光顕微鏡下に脊髄後根神経節、脊髄前角を観察し、FG標識神経細胞の数を検討した。各モデルにつき4スライスづつ検討した。後根神経節は0.4 mm<sup>2</sup>あたりのFG標識神経細胞数をカウントし、また脊髄前角全体のFG標識神経細胞数をカウントした。すべてのカウントは3回ずつ行いその平均

値を求めた

### VII. ガレクチン-1の局在

正常ラット3匹を抱水クロラル麻酔下に開胸後、左心室より灌流固定を行った。灌流液には4%PFA-PBSを用いた。ただちに後根神経節、脊髄、坐骨神経、を摘出し、4%PFA-PBS 中に入れ4℃にて浸透させ、パラフィン包埋後、厚さ5  $\mu$ mの縦割切片を作成し、ポリ-L-リジン (和光純薬、大阪) 処理スライドガラス上に貼り付け乾燥させ、抗ガレクチン-1抗体による免疫組織化学後、光学顕微鏡にて観察した。ポジティブコントロールには十二指腸<sup>23)</sup>を用いた。

### VIII. イムノブロット解析

ラットより坐骨神経、後根神経節、脊髄、十二指腸を採取した。採取後、5% 2-メルカプトエタノールを含むSDS緩衝液に溶解し、超音波破砕器にてホモジナイズした後に、95℃で5分間温浴させた。これらの試料をSDS-PAGEで分離し、イモブリンPVDFメンブレン (Millipore, Bedford, USA) に転写した。ゲルをクーマシーブリリアントブルー (coomassie brilliant blue) にて染色を行い、タンパク量がほぼ一定であることを確認した。このメンブレンを0.5%のゼラチン (Bio-Rad, Hercules, USA) を加えた1%Tween20 (和光純薬) を含むトリス塩酸緩衝液 (Tris-buffered saline-Tween20, TBS-T) にて1時間ブロッキングした。一次抗体はウサギ抗ヒトガレクチン-1抗体を1000倍にTBS-Tで希釈して、4時間反応させた。TBS-Tにて3回洗浄後、アルカリホスファターゼ結合ウサギIgG抗体 (American Qualex, San Clement, USA) と1時間反応させた後、再びTBS-Tにて3回洗浄し、アルカリホスファターゼ基質キット (Vector Laboratories, Burlingame, USA) を用いて発色反応を行った。

### IX. 統計学的検討

統計学的有意差はF検定による等分散の検定を行い、分散が等しいときにはStudentのt検定を行い、等しくないときにはWelchのt検定を行った。危険率5%未満をもって有意差ありと判定した。数値は平均±標準偏差で表記した。

## 成 績

### I. ガレクチン-1のイムノブロット

坐骨神経、脊髄、後根神経節、十二指腸に分子量14.5 kDaにおいて、抗ガレクチン-1抗体による単一バンドを認めた。化学処理同種神経組織移植片には、バンドは認められなかった (図1)。

### II. ガレクチン-1の局在

抗ガレクチン-1抗体による免疫染色にて、坐骨神経内軸索に、また、軸索を取り囲むようにシュワン細胞に陽性反応を認めた (図2A, 2B)。さらに、ほぼすべての後根神経節神経細胞、脊髄内前角細胞にもガレクチン-1の免疫反応性が確認された (図2C, 2D)。すべての陽性細胞は細胞質にびまん性に染色性を示した。

### III. 凍結処理自己坐骨神経移植モデル

吻合部から7 mmにおける抗ニューロフィラメント抗体陽性再生軸索の数はrh-gal-1ox投与群、対照群 (PBS投与群) それぞれ31.0±9.0, 15.0±5.4であった (図3A, 3B, 3E)。抗ガレクチン-1中和抗体投与群、対照群 (ウサギIgG投与群) はそれぞれ2.8±2.8, 15.5±6.3であった (図3C, 3D, 3E)。rh-gal-1ox投与群では対照群に対し有意差をもって再生軸索の増加を示し (p<0.05)、抗ガレクチン-1中和抗体投与群では対照群に対し、有意

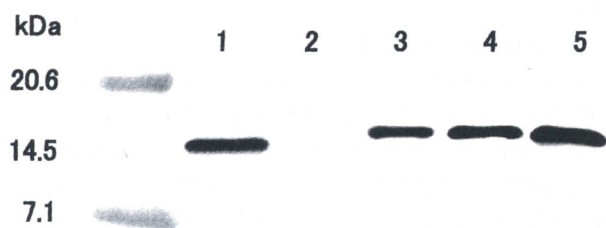


Fig. 1. Galectin-1 immunoreactivity on Western blots of electrophoretically separated homogenates of the rat duodenum (lane1), acellular allograft (lane2), sciatic nerve (lane3), DRG (lane4), and spinal cord (lane5).

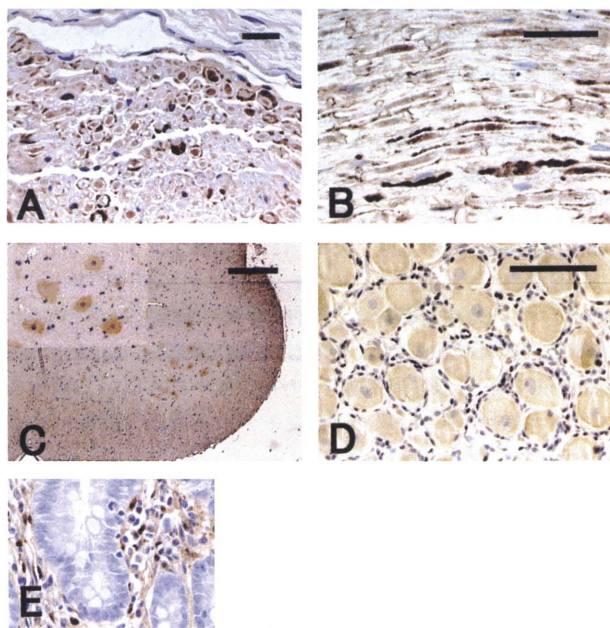


Fig. 2. Immunohistochemical staining of galectin-1. (A) Sciatic nerve on cross section. (B) Sciatic nerve on longitudinal section. (C) Spinal cord. (D) DRG. (A, B) Axons and surrounding Schwann cells are immunostained with anti-galectin-1 antibody. (C) Motoneurons in the anterior horn of spinal cord are immunostained. Enlarged picture in the anterior horn was shown in the top left corner. (D) Most DRG neurons are immunostained. (E) Positive control. Scale bar 50  $\mu$ m.

差をもって再生軸索の減少を示した ( $p < 0.05$ ). 吻合部位から3 mmにおける抗ED-1抗体陽性細胞数は、rh-gal-1ox投与群と対照群 (PBS投与群), 抗ガレクチン-1中和抗体投与群と対照群 (ウサギIgG投与群) に有意差は見られなかった。

#### Ⅳ. FG標識神経細胞

第4腰髄後根神経節におけるFG標識神経細胞の数は、rh-gal-1ox投与群, 対照群 (PBS投与群) それぞれ  $66.6 \pm 11.3$ ,  $40.4 \pm 9.1$ であった (図4A, 4B, 4E). 抗ガレクチン-1中和抗体投与群, 対照群 (ウサギIgG投与群) はそれぞれ  $20.2 \pm 7.2$ ,  $38.2 \pm 9.9$ であった (図4C, 4D, 4E). rh-gal-1ox投与群におけるFG標識神経細胞数は、対照群に対し有意差をもって増加を示し ( $p < 0.05$ ), 抗ガレクチン-1中和抗体投与群は対照群に対し有意差をもって減少を示した ( $p < 0.05$ ). 第4腰髄レベルにおけるFG標

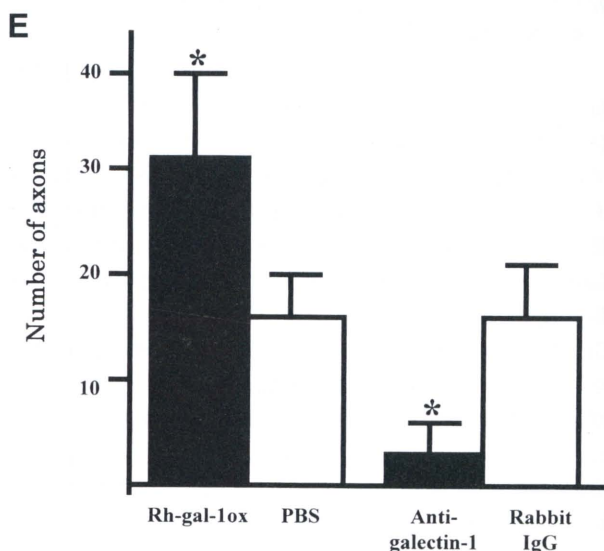
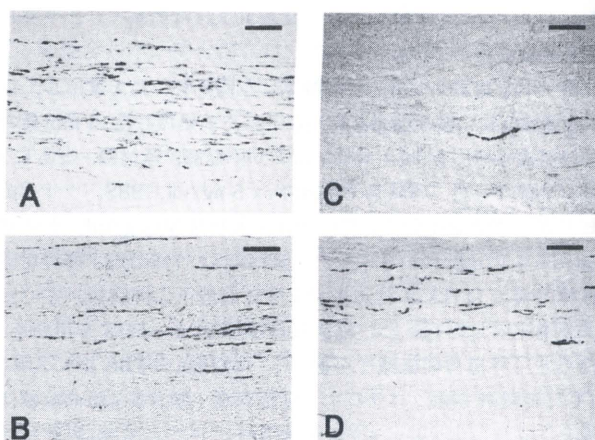


Fig. 3. Longitudinal sections of grafts stained for regenerating axons with anti-neurofilament antibody in the freeze/thaw acellular autograft model at 14 days after operation. These sections were taken 7mm distal to the proximal stump. The rh-gal-1ox administered rat (A) shows a greater number of regenerating axons than the control (PBS) rat (B), and the anti-galectin-1 administered rat (C) shows fewer than the control (rabbit IgG) rat (D). Scale bar, 100  $\mu$ m. (E) Graph showing the counts of neurofilament-stained regenerating axons at 7mm distal point from proximal stump. Data are  $\bar{x} \pm$  SD. \* $p < 0.05$  indicates a significant differences.

識脊髄前角細胞の数は、rh-gal-1ox投与群, 対照群 (PBS投与群) それぞれ  $15.3 \pm 2.7$ ,  $11.4 \pm 2.9$ であった (図5A, 5B, 5E). 抗ガレクチン-1中和抗体投与群, 対照群 (ウサギIgG投与群) はそれぞれ  $3.3 \pm 1.4$ ,  $10.3 \pm 3.6$ であった (図5C, 5D, 5E). rh-gal-1ox投与群におけるFG標識神経細胞数は、対照群に対し、有意差をもって増加を示し ( $p < 0.05$ ), 抗ガレクチン-1抗体投与群は対照群に対し有意差をもって減少を示した ( $p < 0.05$ ).

#### Ⅴ. 化学処理同種神経移植モデル

吻合部からの再生軸索伸長距離は、rh-gal-1ox投与群, 対照群 (PBS投与群) それぞれ  $2.62 \pm 0.43$  mm,  $1.92 \pm 0.52$  mmであった (図6B, 6C, 6F). 抗ガレクチン-1中和抗体投与群, 対照群 (ウサギIgG投与群) はそれぞれ  $0.46 \pm 0.31$  mm,  $1.78 \pm 0.39$  mmであった (図6D, 6E, 6F). rh-gal-1ox投与群における再生軸



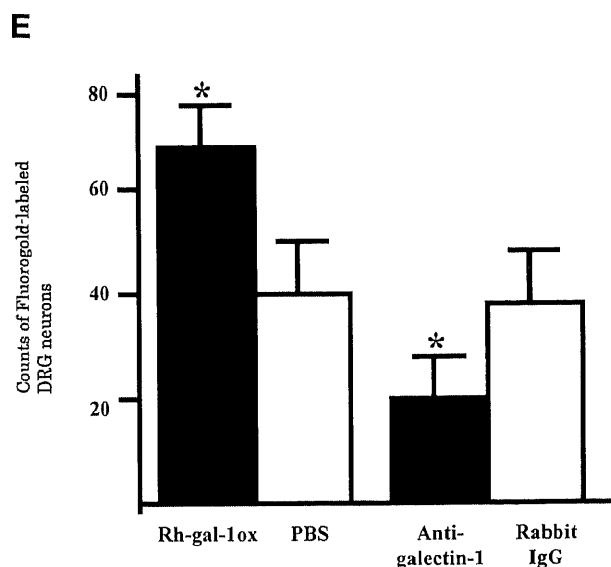
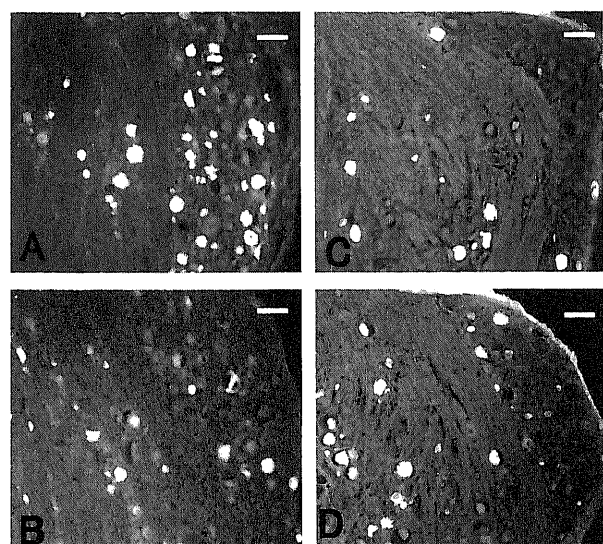


Fig. 4. Fluorogold (FG) labeled neurons of L4 dorsal root ganglion (DRG) in the freeze/thaw autograft model. The rh-gal-1ox administered rat (A) shows a greater number of FG-labeled neurons than the control (PBS) rat (B), and the anti-galectin-1 administered rat shows fewer than the control (rabbit IgG) rat (D). Scale bar, 50  $\mu$ m. (E) Graph showing the counts of FG-labeled DRG neurons. Data are  $\bar{x} \pm$  SD. \* $p < 0.05$  indicates a significant differences.

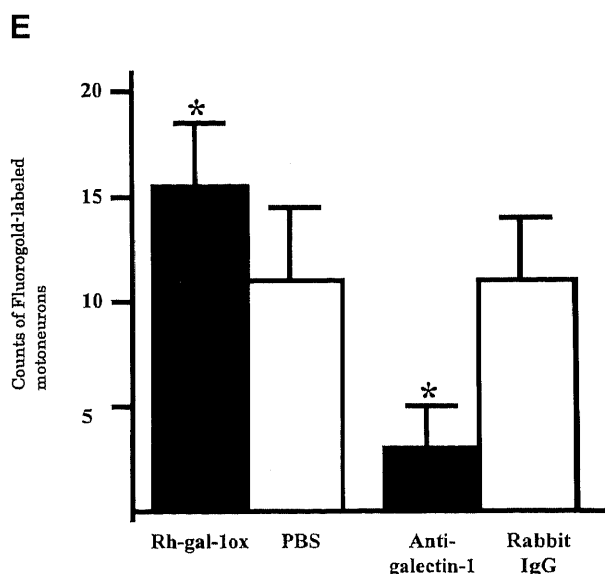
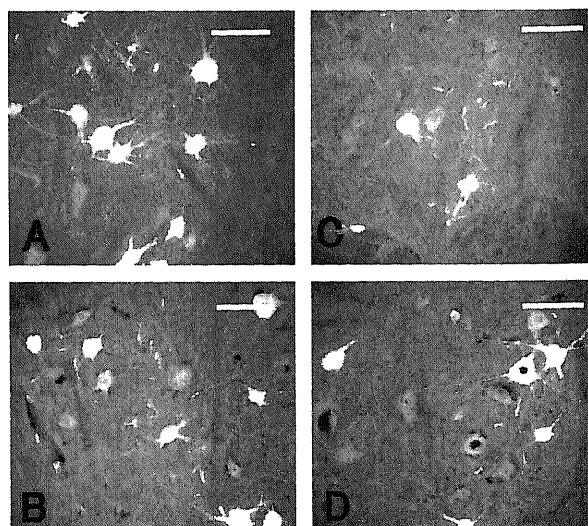


Fig. 5. Fluorogold labeled motoneurons of anterior horn in L4 spinal cord in the freeze/thaw autograft model. The rh-gal-1ox administered rat (A) shows a greater number of FG-labeled neurons than the control (PBS) rat (B), and the anti-galectin-1 administered rat shows fewer than the control (rabbit IgG) rat (D). Scale bar, 50  $\mu$ m. (E) Graph showing the counts of Fluorogold-labeled motoneurons. Data are  $\bar{x} \pm$  SD. \* $p < 0.05$  indicates a significant differences.

索伸長距離は、対照群に対し有意差をもって増加を示し ( $p < 0.05$ )、抗ガレクチン-1中和抗体投与群は対照群に対し有意差をもって減少を示した ( $p < 0.05$ )。神経移植片近位部における吻合部からのシュワン細胞 (近位シュワン細胞) の遊走距離は、rh-gal-1ox投与群、対照群 (PBS投与群) それぞれ  $3.26 \pm 0.81$  mm,  $1.73 \pm 0.48$  mm (図7B, 7C, 7F)、抗ガレクチン-1中和抗体投与群、対照群 (ウサギIgG投与群) はそれぞれ  $0.25 \pm 0.25$  mm,  $1.57 \pm 0.29$  mmであった (図7D, 7E, 7F)。rh-gal-1ox投与群における近位シュワン細胞遊走距離は、対照群に対し有意差をもって増加を示し ( $p < 0.05$ )、抗ガレクチン-1中和抗体投与群は対照群に対し有意差をもって減少を示した ( $p < 0.05$ )。神経移植

片遠位部における吻合部からのシュワン細胞 (遠位シュワン細胞) の遊走距離はrh-gal-1ox投与群、対照群 (PBS投与群) それぞれ  $2.21 \pm 0.46$  mm,  $1.22 \pm 0.41$  mm (図8A, 8B, 8E)、抗ガレクチン-1中和抗体投与群、対照群 (ウサギIgG投与群) はそれぞれ  $0.37 \pm 0.41$  mm,  $1.12 \pm 0.35$  mmであった (図8C, 8D, 8E)。rh-gal-1ox投与群における遠位シュワン細胞遊走距離は、対照群に対し、有意差をもって増加を示し ( $p < 0.05$ )、抗ガレクチン-1中和抗体投与群は対照群に対し有意差をもって減少を示した ( $p < 0.05$ )。rh-gal-1ox投与群では近位部において、シュワン細胞の遊走距離が軸索再生距離を上回っていた (図6F, 7F)。

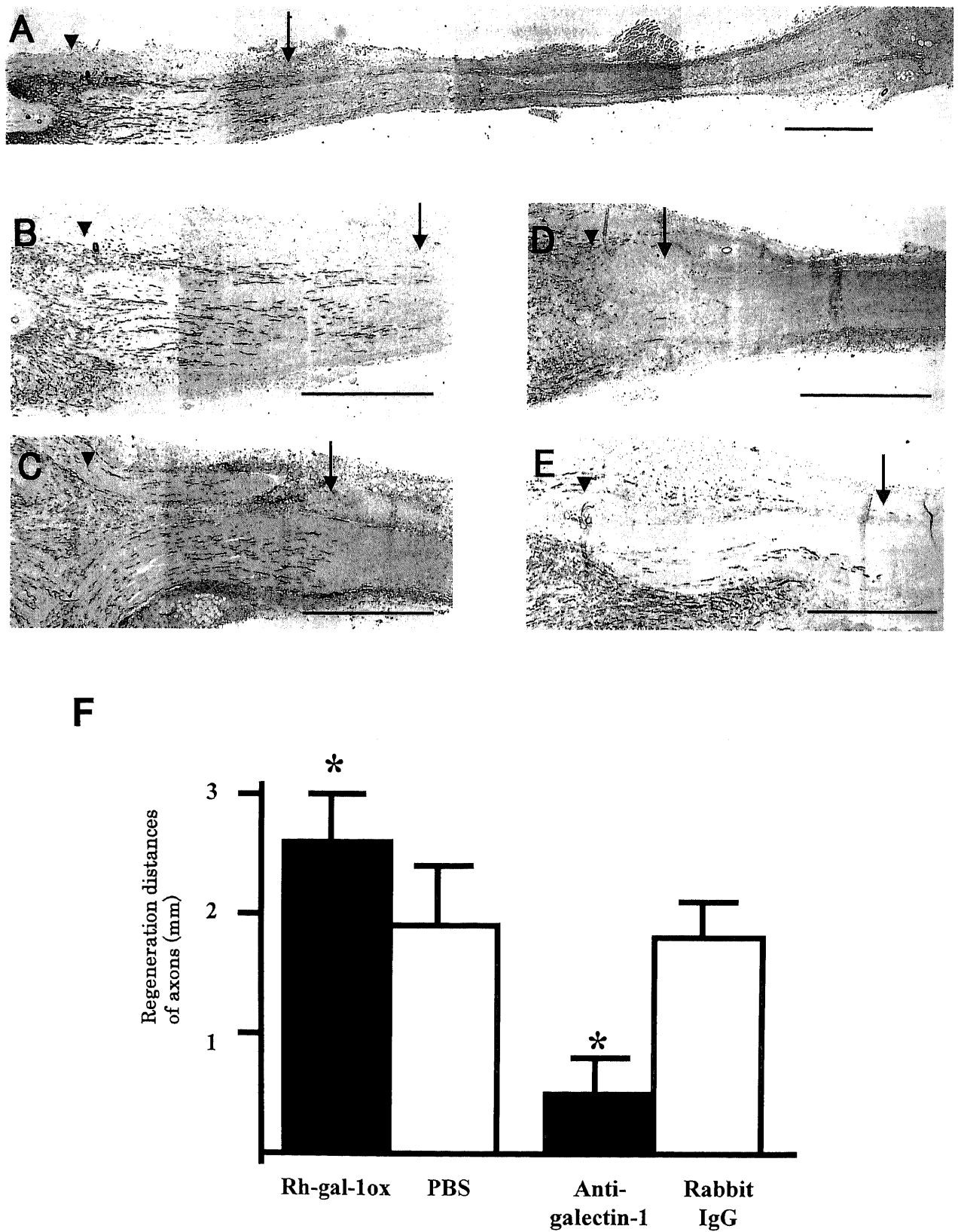


Fig. 6. Longitudinal sections of grafts stained for regenerating axons with anti-neurofilament antibody in the acellular allograft model at 10 days after operation. (A) Whole section of the rh-gal-1ox-treated graft. (B, C, D, E) Proximal part of the grafts. The rh-gal-1ox-treated graft (B) has longer regenerating distances than the control (PBS) graft (C), and the anti-galactin-1-treated graft (D) has shorter than control (rabbit IgG) graft (E). The arrow indicates how far the regenerating axons have grown. Proximal stump of the graft (arrowhead). Scale bar, 100  $\mu$ m. (F) Graph showing the regeneration distances of axons from proximal stump of the graft. Data are  $\bar{x} \pm$  SD. \*p < 0.05 indicates a significant differences.

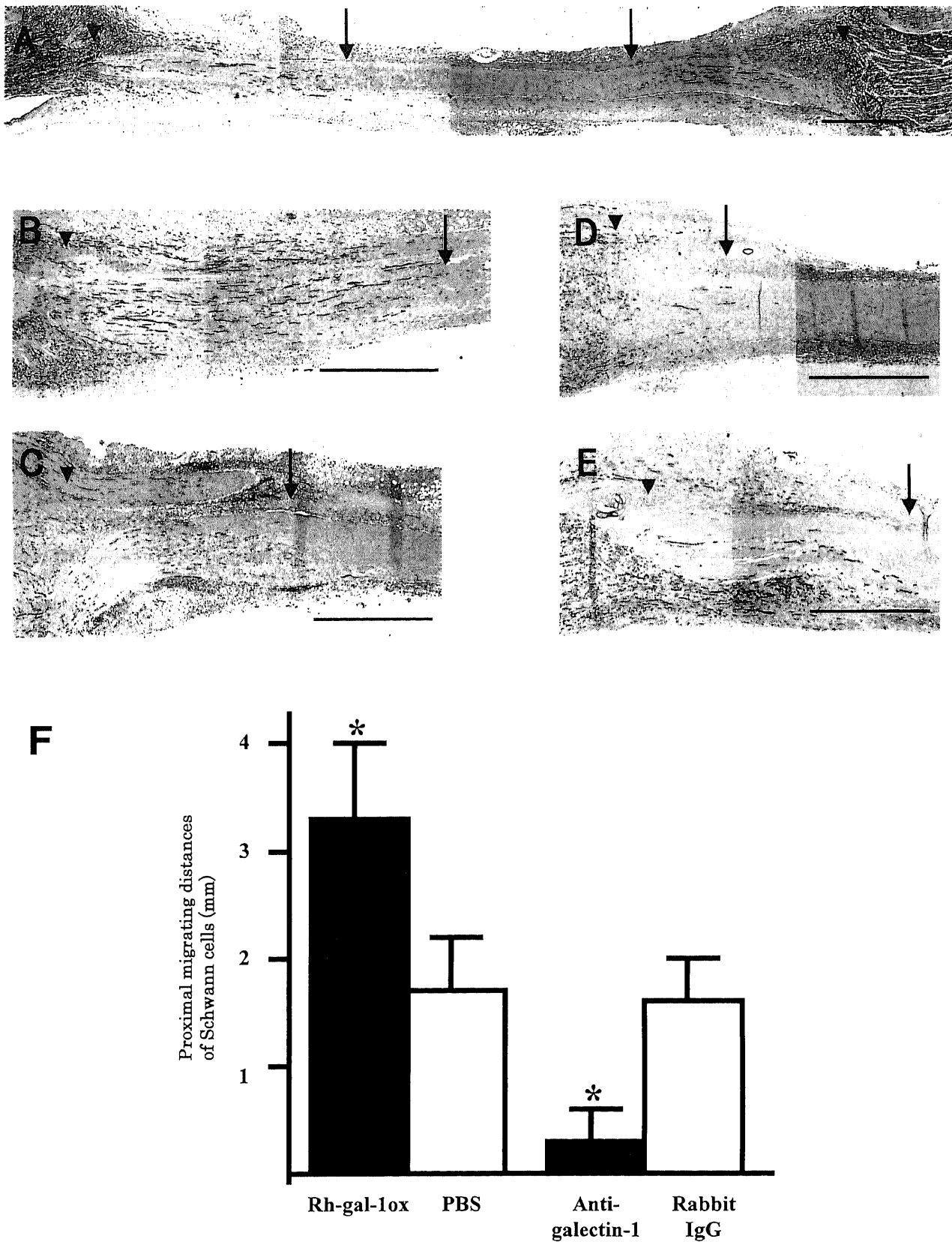


Fig. 7. Longitudinal sections of the grafts stained for migrating Schwann cells with anti-S-100 antibody in the acellular allograft model at 10 days after operation. The sections are obtained by the same procedure in Figure 6. The rh-gal-1ox-treated graft (B) has longer migrating distances of proximal Schwann cells than the control (PBS) graft (C), and the anti-gal-1-treated graft has shorter than the control (rabbit IgG) graft (E). The arrow indicates how far the proximal Schwann cells have grown. Proximal stump of the graft (arrowhead). Scale bar, 100  $\mu$ m. (F) Graph showing the migrating distances of Schwann cells from proximal stump of the graft. Data are  $\bar{x} \pm$  SD. \* $p < 0.05$  indicates a significant differences.



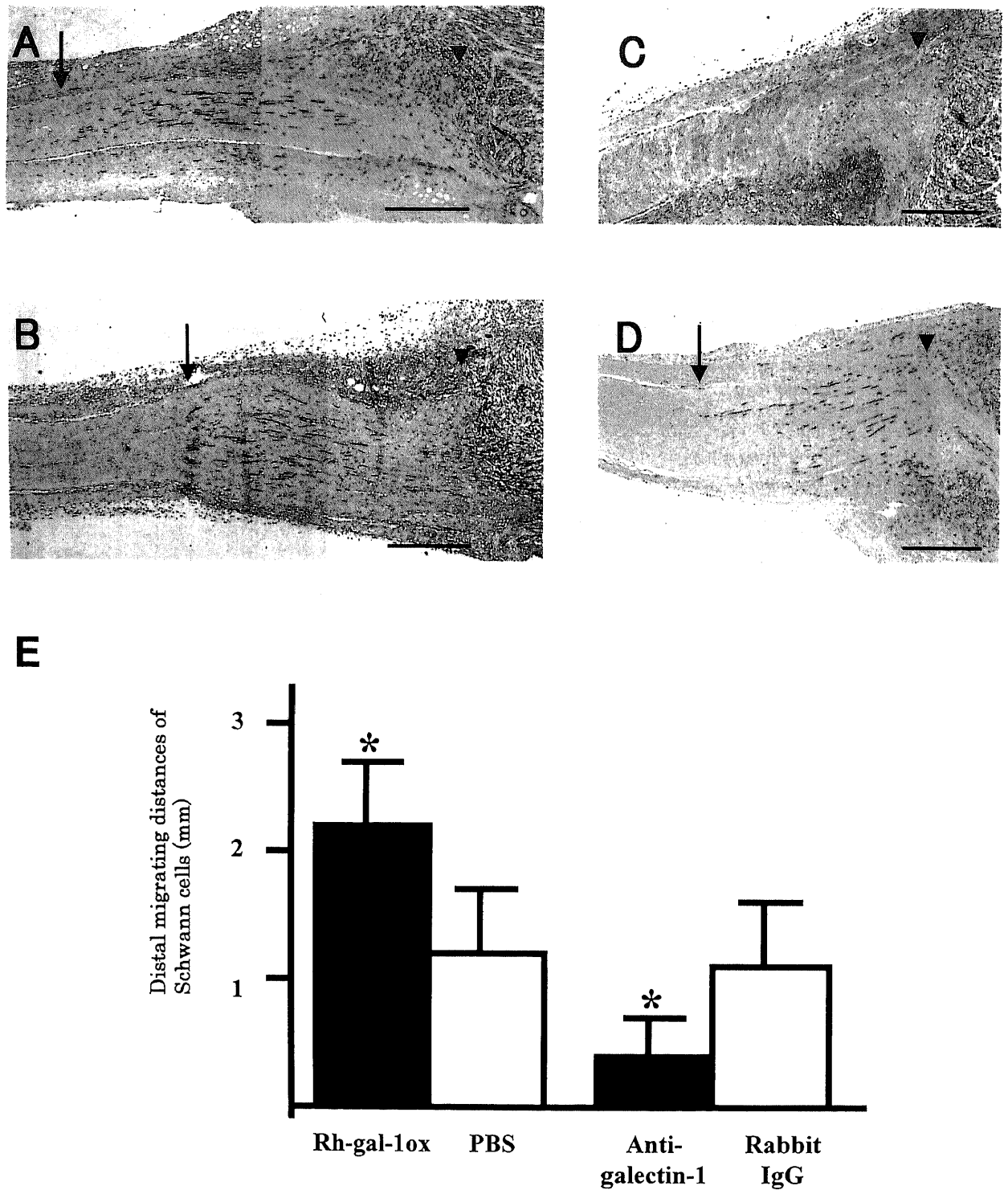


Fig. 8. Longitudinal sections of the distal part of the grafts stained for migrating Schwann cells with anti-S-100 antibody in the acellular allograft model at 10 days after operation. The rh-gal-1ox-treated graft (A) has longer migrating distances of distal Schwann cells than the control (PBS) graft (B), and anti-galectin-1-treated graft (C) has shorter than the control (rabbit IgG) graft (D). The arrow indicates how far the distal Schwann cells have grown. Distal stump of the graft (arrowhead). Scale bar, 100  $\mu$ m. (E) Graph showing the migrating distances of Schwann cells from the distal stump of graft. Data are  $\bar{x} \pm$  SD. \* $p < 0.05$  indicates a significant differences.

## 考 察

ガレクチン-1は、還元状態で $\beta$ -ガラクトシドに特異的に結合する動物レクチンのひとつである。最近、COS-1培養細胞上清より抽出された神経軸索伸長促進物質である組換えヒトガレクチン-1が末梢神経損傷後早期修復過程に重要な働きを担っていることが報告された<sup>4)</sup>。一方で、このガレクチン-1は分子内に3箇所のジスルフィド結合が作られている酸化型であることが示された<sup>13)</sup>。本研究において、これまで作用の不明な酸化型ガレクチン-1の神経再生促進効果を示す機序を解明するために、2種類の生体内実験モデル、すなわち凍結処理自己坐骨神経移植モデルと化学処理同種神経組織移植モデルを用いた。

軸索傷害部から遠位側の神経束においてはビュグナー束が形成され、束内では各種神経成長因子、細胞接着因子、細胞外マトリックスが産生されることが知られている<sup>3)</sup>。このため内因性の神経再生促進因子の影響を最小限とするため、切断摘出した遠位神経束に凍結処理を施し、生存細胞がない凍結処理自己坐骨神経移植モデルとした。このモデルにおいて、rh-gal-1oxの持続投与により有意に再生神経が増加し、抗ガレクチン-1中和抗体の持続投与により抑制された。FGを用いた逆行性トレーサー法による再生軸索の細胞由来の検討では、rh-gal-1oxは感覚神経軸索、ならびに運動神経軸索の再生を促進し、抗ガレクチン-1中和抗体は両者の再生を抑制した。BDNF (brain-derived neurotrophic factor) は運動神経細胞の生存維持に関与すること、坐骨神経損傷後の一過性NGF (nerve growth factor) mRNAの増加により、BDNFの発現が刺激されることが知られているが<sup>8)</sup>、その神経再生促進作用は認められていない<sup>24)~27)</sup>。インスリン様成長因子 (insulin like growth factor, IGF) は、感覚神経軸索、運動神経軸索、共に再生促進効果があることが報告されている<sup>17)27)~32)</sup>。また、IGFに対する抗血清の作用により神経再生が抑制される<sup>17)32)</sup>ことから、坐骨神経損傷後の神経再生には重要な役割を果たしていることが示唆されている。一方、損傷部位におけるIGF mRNAは損傷後4~6日後になって上昇する<sup>33)</sup>。本研究で酸化型ガレクチン-1が感覚神経軸索のみならず、運動神経軸索をも再生させ得る作用を持つことが明らかとなった。酸化型ガレクチン-1は、神経線維束を伴った後根神経節神経細胞からの神経再生に促進効果を示すが、単離した後根神経節神経細胞には再生促進効果を示さないことが報告されている<sup>14)</sup>。このことは、酸化型ガレクチン-1が、神経細胞体に直接作用するのではなく、神経線維を取り囲む神経以外の細胞に作用し間接的に軸索再生を促進していることを示唆する。本研究でも酸化型ガレクチン-1は、少なくとも感覚神経細胞体には直接作用するのではなく、むしろ神経損傷部位局所ではたつき、破壊髄鞘の除去を含めて、感覚神経、運動神経の両者共に軸索伸長が促進される環境を作り出していると考えられた。

化学処理を行った神経組織片内では、髄鞘や各種細胞の細胞膜は取り除かれ、基底膜成分でできた円柱状のコラーゲンチューブのみが無傷で残り、再生軸索、そしてシュワン細胞の道しるべとなる<sup>20)</sup>。本研究では、このモデルにおいてシュワン細胞をはじめとした細胞移動の動態が明確に観察された。神経切断後、近位側の神経と遠位側の神経との間にシリコンチューブや平坦なフィルムを置くと再生軸索の伸長に続いて、まず近位神経よりシュワン細胞 (近位シュワン細胞) が遊走してくる<sup>34)</sup>。シュワン細胞の遊走が妨げられると再生軸索の数は著明に減少

することより、シュワン細胞は末梢神経再生に必要な不可欠であることが理解できる<sup>35)</sup>。傷害部から遠位側の神経束 (遠位神経束) においては、軸索は中枢との連絡が途絶えるためにワーラー変性に陥り、マクロファージによって分解処理される<sup>36)37)</sup>。一方、残存したシュワン細胞はマクロファージの助けを借りて髄鞘を処理した後<sup>37)~39)</sup>、増殖肥大してビュグナー束と呼ばれる細胞索を形成する<sup>40)</sup>。近位シュワン細胞の遊走から数日遅れて、遠位神経からもシュワン細胞 (遠位シュワン細胞) が遊走を開始する。やがて切断神経の両端は遠近両シュワン細胞によって架橋されるので、再生神経はこの橋を通路にして遠位神経組織へ進入する<sup>34)</sup>。また再生神経の伸長速度は、近位シュワン細胞の出現以降には再生軸索単独での伸長速度と比較して3~4倍上昇するが、これは近位シュワン細胞が再生軸索に対して伸長を促進させるからである<sup>34)</sup>。遠位シュワン細胞の伸長促進作用は近位シュワン細胞よりも強力であり、再生軸索が遠位シュワン細胞にまで到達すると、その伸長はさらに1.5倍に飛躍するとされている<sup>34)</sup>。シュワン細胞が軸索伸長を促進することは、シュワン細胞が様々な神経成長因子、基底膜を産生することからも支持される<sup>3)</sup>。近位シュワン細胞は1~2本の突起が細胞体から伸び、さらに突起からは4~5本の分枝が広がる<sup>41)</sup>。これに対し、遠位シュワン細胞は単極もしくは双極の短い突起をもつ紡錘形の細胞である<sup>41)</sup>。化学処理同種神経移植モデルにおいて、rh-gal-1oxの存在下に近位シュワン細胞の遊走、遠位シュワン細胞の遊走は共に促進された。近位シュワン細胞、遠位シュワン細胞は形態、性状が異なるにもかかわらず、酸化型ガレクチン-1によって遠近両シュワン細胞の遊走が促進され、中和抗体により抑制されたことは興味深い。シュワン細胞は、軸索の伸長と関係なしに遊走しうるとされる<sup>42)43)</sup>。したがって、酸化型ガレクチン-1は再生軸索との接触とは独立してシュワン細胞の遊走を促進していると考えられる。これらは、rh-gal-1oxの存在下に近位端からのシュワン細胞の遊走距離が、軸索伸長距離を上回っていたことから裏づけられる。

ガレクチン-1と結合する基質としてファイブロネクチン<sup>44)</sup>、ラミニン<sup>45)</sup>がある。これらは、細胞外マトリックスを構成する糖タンパクであり、ガレクチン-1が、細胞と細胞外マトリックスの接着を媒介している。Moiseevaら<sup>46)</sup>は、平滑筋細胞とその細胞外マトリックスの接着にガレクチン-1が介在することを報告している。しかし、この働きはガレクチン-1が還元型の状態でのみみられる。一方、ガレクチン-1の軸索再生促進効果は酸化型でのみみられる<sup>13)</sup>。本研究において免疫組織化学、イムノプロットで正常ラット坐骨神経内軸索とシュワン細胞、また、後根神経節細胞、脊髄運動神経細胞にガレクチン-1の免疫活性が見られた。加えて、再生軸索にもガレクチン-1の免疫活性があることが報告されている<sup>4)</sup>。本研究で用いた抗ガレクチン-1抗体は酸化型、還元型の違いを認識することはできない。細胞内は還元的状態であるため<sup>7)</sup>、軸索内、シュワン細胞内に存在するガレクチン-1は還元型であると推測される。傷害が加わると壊れた軸索やシュワン細胞から、放出、もしくは分泌されることにより<sup>47)</sup>、生理的に酸化的状態である細胞外に出たガレクチン-1は、酸化型に形を変え、サイトカインのようにオートクライン、もしくはパラクライン的に働き、シュワン細胞の遊走を促進させ軸索再生を促すものと思われる。シュワン細胞が、酸化型ガレクチン-1のターゲットのひとつであることは判明したが、酸化型ガレクチン-1のレセプターに関して

は、現在のところ全く詳細は判明しておらず更なる検討が必要である。

現在、臨床的には神経欠損後の機能回復に対し、さかんに神経移植が行われている。その治療法の1つに自己腓腹神経の移植がある。しかし、これは正常な神経を犠牲にする必要があり、欠損が多量であるときには量的に不十分である。今回我々は、化学処理を行い、細胞成分を完全に除去した同種神経移植片を作製、これにrh-gal-1oxで処理後、神経の欠損部位に移植することにより、軸索の伸長が促進された。今後、神経損傷、神経欠損に対して化学処理後の同種神経にrh-gal-1oxを添加することにより、より早い神経再生と機能回復が期待され、その臨床応用が待たれるところである。

## 結 論

末梢神経損傷後における酸化型ガレクチン-1の軸索再生促進効果の機序を明らかにするために、まず、正常末梢神経におけるgal-1の発現を免疫組織化学、イムノブロットにて検討し、次にラットを用いて軸索損傷モデルを作成し、再生軸索、遊走シュワン細胞の動態を検索し以下の結果を得た。

1. ガレクチン-1はラット坐骨神経内、軸索、シュワン細胞、後根神経節細胞、脊髄前角運動神経細胞に発現していた。
  2. rh-gal-1ox投与にて感覚神経および運動神経の軸索再生が共に促進され ( $p < 0.05$ )、抗ガレクチン-1中和抗体にて両者よりの軸索再生が共に抑制された ( $p < 0.05$ )。
  3. 近位シュワン細胞、遠位シュワン細胞の遊走は共にrh-gal-1ox投与にて促進され ( $p < 0.05$ )、抗ガレクチン-1中和抗体投与にて両者の遊走は抑制された ( $p < 0.05$ )。
  4. 酸化型ガレクチン-1は、再生軸索との接触に関係なくシュワン細胞の遊走を促進していることが示唆された。
- 以上の結果より末梢神経損傷後、酸化型ガレクチン-1は、シュワン細胞の遊走促進効果を介して感覚神経軸索、運動神経軸索の再生を促進していると考えられた。今後、神経損傷、神経欠損に対してrh-gal-1oxを用いた化学処理同種神経組織移植の臨床応用が期待されるものである。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました金沢大学大学院医学系研究科脳科学専攻脳機能制御学山下純宏教授に深甚なる謝辞を表します。また、直接のご指導を賜りました同講座の長谷川光広助教授と、貴重な試薬、抗体を頂いた横浜市立大学生理学の堀江秀典助教授、キリン医薬探索研究所の門屋利彦氏に心から感謝いたします。さらに、実験手技の御指導を賜りました金沢大学大学院医学系研究科脳科学専攻感覚運動病態学の伊藤真助手と、病理標本作成に御協力頂いた今村明子文部技官に感謝の意を捧げます。さらに、御支援と御協力を頂きました金沢大学大学院医学系研究科脳科学専攻脳機能制御学の皆様に深く感謝いたします。

本論文の要旨は第15回神経組織の成長・再生・移植研究会学術集会(2000, 岡山)において発表した。

## 文 献

- 1) Fawcett JW, Keynes RJ. Peripheral nerve regeneration. *Annu Rev Neurosci* 13: 43-60, 1990
- 2) Bunge RP. Expanding roles for the Schwann cell: ensheathment, myelination, trophism and regeneration. *Curr Opin Neurobiol* 3: 805-809, 1993
- 3) Ide C. Peripheral nerve regeneration. *Neurosci Res* 25(2): 101-21, 1996

101-21, 1996

- 4) Horie H, Inagaki Y, Sohma Y, Nozawa R, Okawa K, Hasegawa M, Muramatsu N, Kawano H, Horie M, Koyama H, Sakai I, Takeshita K, Kowada Y, Takano M, Kadoya T. Galectin-1 regulates initial axonal growth in peripheral nerves after axotomy. *J Neurosci* 19: 9964-9974, 1999
- 5) Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, Gitt MA, Hirabayashi J, Hughes C, Kasai K, et al. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell* 25; 76(4): 597-8, 1994
- 6) Harrison FL. Soluble vertebrate lectins: ubiquitous but inscrutable proteins. *J Cell Sci* 100: 9-14, 1991
- 7) Kasai K, Hirabayashi J. Galectins: a family of animal lectins that decipher glycocodes. *J Biochem* 119(1): 1-8, 1996
- 8) Perillo NL, Marcus ME, Baum LG. Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. *J Mol Med* 76:402-412, 1998
- 9) Puche AC, Key B. Identification of cells expressing galectin-1, a galactose-binding receptor, in the rat olfactory system. *J Comp Neurol* 357: 513-523, 1995
- 10) Puche AC, Poirier F, Hair M, Bartlett PF, Key B. Role of galectin-1 in the developing mouse olfactory system. *Dev Biol* 179: 274-287, 1996
- 11) Hirabayashi J, Kasai K. Effect of amino acid substitution by site-directed mutagenesis on the carbohydrate recognition and stability of human 14-kDa beta-galactoside-binding lectin. *J Biol Chem* 266(35): 23648-53, 1991
- 12) Hirabayashi J, Kasai K. Further evidence by site-directed mutagenesis that conserved hydrophilic residues form a carbohydrate-binding site of human galectin-1. *Glycoconj J* 11(5): 437-42, 1994
- 13) Inagaki Y, Sohma Y, Horie H, Nozawa R, Kadoya T. Oxidized galectin-1 promotes axonal regeneration in peripheral nerves but does not possess lectin properties. *Eur J Biochem* 267: 2955-2964, 2000
- 14) Horie H, Fukuda N, Bando Y. Hepatocytes enhance neurite regeneration and survival from transected nerve terminals. *Neuroreport* 2: 521-524, 1991b
- 15) Sjöberg J, Kanje M. Insulin-like growth factor (IGF-1) as a stimulator of regeneration in the freeze-injured rat sciatic nerve. *Brain Res* 485: 102-108, 1989
- 16) Rosenbluth J, Hasegawa M, Shirasaki N, Rosen CL, Liu Z. Myelin formation following transplantation of normal fetal glia into myelin-deficient rat spinal cord. *J Neurocytol* 19: 718-730, 1990
- 17) Glazner GW, Lupien S, Miller JA, Ishii DN. Insulin-like growth factor II increases the rate of sciatic nerve regeneration in rats. *Neuroscience* 54: 791-797, 1993
- 18) Seto A, Hasegawa M, Uchiyama N, Yamashita T, Yamashita J. Alteration of E-cadherin and alpha N-catenin immunoreactivity in the mouse spinal cord following peripheral axotomy. *J Neuropathol Exp Neurol* 56: 1182-1190, 1997
- 19) Ito M, B. van Andel, Jack B. Kelly. Sound localization after transection of the commissure of proboscis in the albino rat. *J*

- Neurophysiol 76(5): 3493-3502, 1996
- 20) Sondell M, Lundborg G, Kanje M. Regeneration of the rat sciatic nerve into allografts made acellular through chemical extraction. *Brain Res* 8; 795(1-2): 44-54, 1998
  - 21) Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in an immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedure. *J Histochem Cytochem* 1981 29:577-580
  - 22) Dailey AT, Avellino AM, Benthem L, Silver J, Kliot M. Complement depletion reduces macrophage infiltration and activation during Wallerian degeneration and axonal regeneration. *J Neurosci* 18(17): 6713-22, 1998
  - 23) Wasano K, Hirakawa Y, Yamamoto T. Immunohistochemical localization of 14kDa  $\beta$ -galactoside-binding lectin in various organs of rat. *Cell Tissue Res* 259: 43-49, 1990
  - 24) Yan Q, Elliott J, Snider WD. Brain-derived neurotrophic factor rescues spinal motor neurons from axotomy-induced cell death. *Nature* 360(6406): 753-5, 1992
  - 25) Koliatsos VE, Clatterbuck RE, Winslow JW, Cayouette MH, Price DL. Evidence that brain-derived neurotrophic factor is a trophic factor for motor neurons in vivo. *Neuron* 10(3): 359-67, 1993
  - 26) Funakoshi H, Frisen J, Barbany G, Timmusk T, Zachrisson O, Verge VMK, Persson H. Differential expression of messenger RNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of the sciatic nerve. *J Cell Biol* 123: 455-465, 1993
  - 27) Apfel SC, Wright DE, Wiideman AM, Dormia C, Snider WD, Kessler JA. Nerve growth factor regulates the expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the peripheral nervous system. *Mol Cell Neurosci* 7(2): 134-42, 1996
  - 28) Hansson HA, Dahlin LB, Danielsen N, Fryklund L, Nachemson AK, Polleryd P, Rozell B, Skottner A, Stemme S, Lundborg G. Evidence indicating trophic importance of IGF-I in regenerating peripheral nerves. *Acta Physiol Scand* 126(4): 609-14, 1986
  - 29) Kanje M, Skottner A, Sjoberg J, Lundborg G. Insulin-like growth factor I (IGF-I) stimulates regeneration of the rat sciatic nerve. *Brain Res* 486(2): 396-8, 1989
  - 30) Akahori Y, Horie H. IGF-I enhances neurite regeneration but is not required for its survival in adult DRG explant. *Neuroreport* 8(9-10): 2265-9, 1997
  - 31) Near SL, Whalen LR, Miller JA, Ishii DN. Insulin-like growth factor II stimulates motor nerve regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(24): 11716-20, 1992
  - 32) Ishii DN, Glazner GW, Pu SF. Role of insulin-like growth factors in peripheral nerve regeneration. *Pharmacol Ther* 62(1-2): 125-44, 1994
  - 33) Pu SF, Zhuang HX, Ishii DN. Differential spatio-temporal expression of the insulin-like growth factor genes in regenerating sciatic nerve. *Brain Res Mol Brain Res* 34(1): 18-28, 1995
  - 34) Torigoe K., Tanaka H, Hashimoto K. Basic behavior of migratory Schwann cells in peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol* 137: 301-308, 1996
  - 35) Hall SM. Regeneration in cellular and acellular autografts in the peripheral nervous system. *Neuropathol Appl Neurobiol* 12(1): 27-46, 1986
  - 36) Lunn ER, Brown MC, Perry VH. The pattern of axonal degeneration in the peripheral nervous system varies with different types of lesion. *Neurosci* 35: 157-165, 1990
  - 37) Lunn ER, Perry VH, Brown MC, Rosen H, Gordon S. Absence of Wallerian degeneration does not hinder regeneration in peripheral nerve. *Eur J Neurosci* 1: 27-33, 1989
  - 38) Fernandez-Valle C, Bunge RP, Bunge MB. Schwann cells degrade myelin and proliferate in the absence of macrophages: evidence from in vitro studies of Wallerian degeneration. *J Neurocytol* 25: 667-679, 1995
  - 39) Reichert F, Saada A, Rotshenker S. Peripheral nerve injury induces Schwann cells to express two macrophage phenotypes: phagocytosis and the galactose-specific lectin MAC-2. *J Neurosci* 14: 3231-3245, 1994
  - 40) Bradely WG, Asbury AK. Duration of synthesis phase in neurilemma cells in mouse sciatic nerve during degeneration. *Exp Neurol* 26: 275-282, 1970
  - 41) Torigoe K. The role of migratory Schwann cells in nerve regeneration as studied by the film model. *J Per Nerv System* 2: 227-231, 1997
  - 42) Crang AJ, Blakemore WF. Observations on the migratory behavior of Schwann cells from adult peripheral nerve explant cultures. *J Neurocytol* 16: 423-431, 1987
  - 43) Williams LR, Azzam NA, Zalewski AA, Azzam RN. Regenerating axons are not required to induce the formation of a Schwann cell cable in a silicone chamber. *Exp Neurol* 120: 49-59, 1993
  - 44) Ozeki Y, Matsui T, Yamamoto Y, Funahashi M, Hamako J, Titani K. Tissue fibronectin is an endogeneous ligand for galectin-1. *Glycobiology* 5: 255-261, 1995
  - 45) Zhou Q, Cummings RD. The S-type lectin from calf heart tissue binds selectively to the carbohydrate chains of laminin. *Arch Biochem Biophys* 281: 27-35, 1990
  - 46) Moiseeva EP, Spring EL, Baron JH, de Bono DP. Galectin-1 modulates attachment, spreading and migration of cultured vascular smooth muscle cells via interactions with cellular receptors and components of extracellular matrix. *J Vasc Res* 36: 47-58, 1999
  - 47) Cooper DNW, Barondes SH. Evidence for export of a muscle lectin from cytosol to extracellular matrix and for a novel secretory mechanism. *J Cell Biol* 110:1681-1691. 1990

**The Effect of Oxidized Galectin-1 in Axonal Regeneration After Peripheral Nerve Injury** Kenji Fukaya,  
Department of Neurosurgery, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. J. J. J.  
Med Soc., **110**, 283 — 294 (2001)

**Key words** oxidized galectin-1, growth factor, Schwann cell migration, axonal regeneration

#### **Abstract**

Oxidized galectin-1 has recently been identified as a factor that plays important role in initial axonal growth of injured peripheral nerves. However, the details of the precise mechanism are still remain unknown. The aim of this study was to investigate the cellular effects of oxidized galectin-1 on regeneration of rat spinal nerves using the freeze/thaw acellular autograft model and the acellular allograft model. Immunohistochemically, endogenous galectin-1 was expressed in axons and Schwann cells in sciatic nerves, DRG neurons, and spinal cord motoneurons of normal rat. Administration of oxidized recombinant human galectin-1 (rh-gal-1ox, 5 ng/ml) promoted axonal regeneration from motoneurons as well as DRG neurons, which was confirmed by fluorogold tracer study ( $p < 0.05$ ). Anti-galectin-1 antibody (30  $\mu$ g/ml) strongly inhibited axonal regrowth ( $p < 0.05$ ). Pretreatment of allograft with rh-gal-1ox stimulated the migration of Schwann cells not only from the proximal but also from the distal stump of the grafts, resulting in accelerated axonal regeneration ( $p < 0.05$ ). Moreover, Schwann cell migration preceded the axonal growth in the presence of exogenous rh-gal-1ox in the grafts. These results strongly suggest that local application of exogenous rh-gal-1ox promotes the migration of Schwann cells without contact axons followed by axonal regeneration from both motor and sensory neurons, and that oxidized galectin-1 is a key factor of initial stage of neuronal regeneration.