

## 人工移植片および遺伝子導入の開発による視神経回路網再構築の研究

横浜市立大学医学部講師 出澤真理  
千葉大学医学部眼科 根岸久也、忍足俊幸  
横山暁子、莫 暁芬

### 【研究の目的】

中枢神経系における障害は、ほぼ不可逆的であり最終的には変性という過程を辿る。網膜神経節細胞は細胞体が眼球内に存在するものの中枢神経としての組織構成の中にあり、しかも中枢投射が上丘・外側膝状体へ一方向である。従って再生の機能評価において有利である。本研究では網膜神経節細胞に対する生存・再生作用のあるシュワン細胞を用いて人工移植片を作成し、視覚中枢投射である上丘と視神経間を架橋することによって、視覚回路網再建を形態学的・電気生理学的に評価する。また、網膜神経節細胞体への遺伝子導入を合わせ、生存率の向上を図ることを目的とする。

### 【これまでの経過】

1. シュワン細胞培養を行い、人工移植片の作成及び至適条件の設定を行った。その結果、通常の末梢神経における含有量の 100 倍に相当する培養シュワン細胞を用いることによって有効な再生を誘導可能であることを見出した。さらに人工移植片内に NGF, BDNF, NT-4 等の neurotrophin を加え、眼球側の条件としては硝子体内に網膜神経節細胞の生存を促進する BDNF を投与することによって約 40%前後の再生を認めるに至った。これは末梢神経を用いた移植での再生が 10%、多くても 20%以下である現状と比較すると高率の再生誘導であり、大きな前進であると思われる。また本実験によって、視神経を含めた中枢神経は人工的環境において再生誘導が可能であることも明らかとなった。

2. 上記の条件を用いて人工移植片による視神経-上丘架橋移植を実施した。その結果、再生視神経が数センチにわたる移植片内を伸長し、上丘に到達し侵入することをコレラトキシンを用いた順行性標識によって確認した。またシナプス形成に関わるとされているシナプトファイシンとの二重染色によって上丘内へ侵入した線維の一部においてその発現が認められた。さらに逆行性標識を行うために上丘へ Dil 蛍光標識物を投与し、中枢に軸索伸長した網膜神経節細

胞の確認を行ったところ、15-18%の再生を認めた。

3．視機能の回復を検討するために移植 3 か月後において行動生理学的解析として Prepulse experiment を行った（大阪大学大学院医学研究科 情報生理学との共同研究）。一部のラットにおいて光刺激を感知している傾向があったが、統計的有意差を認めるには至らなかった。移植後 6 か月程経過したものでの解析を検討している。

4．細胞体である網膜神経節細胞の生存維持を目的として *in vivo* electroporation 法を独自に改良し、生体レベルにおける網膜神経節細胞への遺伝子導入方法を考案した。実際の生体における導入は現在、lipofection やウイルスを用いたものが多く用いられている。しかし網膜神経節細胞を標的とした遺伝子導入方法は現時点での導入率が 20%前後と低く、副作用などの問題点がある。そこで培養細胞の遺伝子導入に用いられてきた従来の *in vivo* electroporation 法を独自に改良し、50%前後の網膜神経節細胞に導入可能な方法を見出した。この方法を用いて虚血網膜における Hsp27 蛋白の導入による網膜神経節細胞の rescue や、視神経切断モデルにおける BDNF cDNA 導入による細胞死抑制を確認している。

#### 【研究の特徴・独創性、世界的状況】

哺乳動物の視神経が末梢神経移植によって再生することが 1985 年に So と Aguayo によって報告されて以来、カナダ、アメリカなどの各国の研究グループが盛んに研究を続けている。これまでの多くの研究では、末梢神経移植による再生や阻害物質の中和、サイトカインの調節などのアプローチが行なわれてきた。しかし、いずれも再生率が 10%以下という低い率に留まっている。本研究では、従来の末梢神経移植からさらに一歩踏み出し、人為的に高密度のシュワン細胞環境を作り有効な視神経再生を導こうとするところに独創性がある。また臨床治療を究極の目的とし、視神経の中樞投射である網膜-上丘間移植によって、人為的環境による再生経路の制御および視神経回路網の再建を図るところに本研究の実用性のみならず先駆性がある。

#### 【論文および研究発表、研究費取得状況】

[ 原著 ]

1. M. Dezawa, M. Takano, H. Negishi, X. Mo, T. Oshitari, H. Sawada. Gene transfer into retinal ganglion cells by in vivo electroporation: a new approach. *Micron* (in press)
2. M. Dezawa, X. Mo, T. Oshitari, M. Takano, E. B. Meyer-Rochow, H. Sawada, E. Eguchi. Effects of light and darkness on cell deaths in damaged retinal ganglion cells of the carp retina. *Acta Neurobiol. Exp.* (in press)
3. M. Dezawa and E. Adachi-Usami. The interaction and adhesive mechanisms between axon and Schwann cell during central and peripheral nerve regeneration (review). *Prog. Retin. Eye Res.* 75: p.255 –p.265, 2000.
4. M. Dezawa. Role of Schwann cells in retinal ganglion cell axon regeneration (review). *Acta Anat. Nipp.* 19(2): p.171 –p.204, 2000.
5. Dezawa M, Fujii K, Kita K, Nomura J, Sugita K, Adachi-Usami E, Suzuki N. Increase in nucleoli following X-radiation of fibroblasts of Gorlin syndrome patients. *J. Lab. Clin. Med.*, 134: 585-591, 1999.
6. Dezawa M, Kawana K, Negishi H and Adachi-Usami E. Glial cells in degenerating and regenerating optic nerve of the adult rat. *Brain Res. Bull.*, 48: 573-579, 1999.
7. Mori M, Kuwabara S, Miyake M, Dezawa M, Adachi-Usami E, Kuroki H, Noda M, Hattori T. Haemophilus influenzae has a GM1 ganglioside-like structure and elicits Guillain-Barre syndrome. *Neurology*, 52: 1282-1284, 1999.
8. Dezawa M, Mutoh T, Dezawa A and Adachi-Usami E. Putative gap junctional communication between axon and regenerating Schwann cells during mammalian peripheral nerve regeneration. *Neuroscience*, 85: 663-667, 1998.

9. Dezawa M, Ohtsuka A, Shimoda Y, Adachi-Usami E, Steeves J D and Eguchi E. Effects of light and dark environment on regeneration of carp optic nerves. Exp. Eye Res., 66: 681-684, 1998.

10. Kobayashi N, Dezawa M, Nagata H, Yuasa S and Konno A. Immunohistochemical study of E-cadherin and ZO-1 in allergic nasal epithelium of the guinea pig. Int. Arch. Allergy Immunol., 116: 196-205, 1998.

#### [ 和文総説 ]

1. 忍足俊幸、横山暁子、出沢真理、(1999) 網膜神経節細胞の生存維持と分子メカニズム. 神経眼科、16: 402—412.

2. 出沢真理、安達恵美子 (1999) 接着機構の異常における神経機能—神経再生とグリア. 脳の科学、21: 971—975.

3. 出沢真理、忍足俊幸. (1999) 視神経のグリア細胞とその機能. 神経眼科、16: 47—57.

#### [ 著書 ]

1. 出沢真理、根岸久也 (1999) 視神経移植の現状と問題点、  
田野保雄編、Practical Ophthalmology、文光堂、44: 132—139.

#### [ 特別講演、シンポジウム ]

1. 出沢真理、(2000) Schwann 細胞移植による視神経回路網再構築の試み (シンポジスト及び座長). 第23回日本神経科学大会・第10回日本神経回路学会大会合同大会、横浜

2. 出沢真理、(2000) 中枢神経再生軸索における Tight junction と Gap junction の意義 (シンポジスト及び座長). 第56回日本電子顕微鏡学会、東京

3. 出沢真理、(2000) 中枢及び末梢神経再生における神経線維とシュワン細胞

間の接着機構と相互作用．（日本解剖学会奨励賞受賞者講演）第 105 回日本解剖学会総会、横浜、

4. M.Dezawa. (1999) Multiple approaches to generation of retinal ganglion cells. Vision Science Forum (the 3rd meeting), Tsukuba.

5. M.Dezawa. (1999) Direct and dynamic communication between the axon and Schwann cell during mammalian nerve regeneration. International Symposium on Electron Microscopy in Medicine and Biology, Korea.

6. 出沢真理. (1999) 視神経軸索の再生機構．第 19 回日本眼薬理学会・第 12 回国際眼研究会議合同会議、広島

7. 出沢真理. (1999) シュワン細胞移植による視神経の再生誘導．第 103 回 日本眼科学会、千葉

#### [ 一般講演 ]

1. M. Dezawa, H. Negishi, T. Oshitari, E. Adachi-Usami. (2000) Direct gene transfer into retinal ganglion cells by usage of electroporation. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Fort Lauderdale, Florida.

2. E. Adachi-Usami, H. Negishi, T. Oshitari, M.Dezawa. (2000) Retinal ganglion cell regeneration into superior colliculus by usage of artificial Schwann cell graft. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Fort Lauderdale, Florida.

3. 出澤真理、高野雅彦、澤田元、(2000) 細胞移植による視神経回路網再建の試み．第 1 回網膜の発生・分化・再生研究会 岡崎

4. 出澤真理、高野雅彦、堀江秀典、飯島康仁、大野重昭、澤田元、(2000) In vivo

electroporation 法を用いた分子・遺伝子導入による網膜神経節細胞の生存保護 .  
第 4 回覚科学フォーラム 岡崎

5. 根岸久也、出沢真理、忍足俊幸、安達恵美子 . (1999) 培養シュワン細胞を用いた人工移植片による視神経再生率評価 . 第 103 回日本眼科学会、千葉

6. 出沢真理 . (1999) 培養シュワン細胞を用いた移植片による視神経再生 .  
第 104 回日本解剖学会、東京 .

7. 出沢真理、根岸久也、忍足俊幸、安達恵美子 . (1999) 培養シュワン細胞を用いた視神経の再生誘導 . 第 22 回日本神経科学学会、大阪 .

8. 忍足俊幸、出沢真理、根岸久也、安達恵美子 . (1999) 網膜神経節細胞の再生における c-fos の影響 . 第 103 回日本眼科学会、千葉 .

9. M. Dezawa, T. Oshitari, H. Negishi, E. Adachi-Usami. Effects of light and dark environment on cell death and regeneration of carp retinal ganglion cells. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Fort Lauderdale, Florida, 1999.

10. H. Negishi, M. Dezawa, T. Oshitari, E. Adachi-Usami. Optic nerve regeneration into the artificial Schwann cell graft in adult rats. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Fort Lauderdale, Florida, 1999.

11. T. Oshitari, M. Dezawa, H. Negishi, E. Adachi-Usami. Effect of c-fos on retinal ganglion cell regeneration. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Fort Lauderdale, Florida, 1999.

#### [ 研究費取得状況 ]

文部省 :

1 . 奨励研究(A) 遺伝子導入シュワン細胞移植を用いた人工移植片開発による

視神経再生、 研究代表者、 1999-2000 .

2 . 基盤研究(A) 培養シュワン細胞を用いた人工移植片開発による視神経再生とその機能解析、研究分担者、(研究代表者、千葉大学医学部教授 安達恵美子) 1998-2000 .

**科学技術庁：**

1 . 科学技術振興調整費、目的達成型脳科学研究推進制度  
「網膜神経回路網・視神経の再生における制御因子に関する研究」、  
研究項目代表者、(総括、大阪大学大学院 福田淳教授)  
1997-2001 .

**厚生省：**

1 . 厚生省特定疾患網膜脈絡膜視神経萎縮症研究調査班、班員、(研究代表者、東北大学大学院 玉井信教授) 1999-2001 .

**その他財団等：**

1 . 東京生化学研究会研究助成金 「テロメラーゼ導入シュワン細胞移植による視神経再生」 研究代表者、 2000-2001 .

2 . テルモ財団一般研究助成金 「人工神経伝導路の開発による視覚回路網の再建と人為的制御」 研究代表者、 2001 .

3 . 難病医学研究財団 「遺伝子導入シュワン細胞を用いた人工移植片開発による視神経再生」 研究代表者 1999 .