

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	山田理大
<p>学位論文題目</p> <p>腹部交感神経系における神経再生に関する研究</p> <p>共著者名 寺山 隆司、板東 良雄、吉田 成孝 未公表</p> <p>研究目的</p> <p>消化器外科手術などによる腹腔内神経系の損傷は、術後に起きる下痢、便秘あるいは麻痺性イレウスなどの腸管機能障害の原因の一つとして挙げられる。消化管を支配する神経系は交感神経および副交感神経と腸管壁内の壁内神経系から構成され、筋層間や粘膜下層に網目状に自律神経ネットワークを形成し、Cajal 介在細胞あるいは内分泌系などとの相互作用により、消化管全体の運動を高度に制御している。消化管を支配する交感神経は、下部胸髄の中間外側細胞柱 (IML) に起始し、腹腔神経節 (CG) もしくは上腸間膜動脈神経節 (SMG) でシナプスを介した後に、胃から口側結腸に分布する経路と、腰髄 IML に起始し、下腸間動脈神経節 (IMG) あるいは骨盤神経節 (PG) でシナプスを介し結腸から直腸に分布する経路がある。ラットで CG/SMG 切除を行うと、消化管での tyrosine hydroxylase (TH) 発現が消失し、norepinephrine 量が顕著に減少することから、CG/SMG が消化管への交感神経支配の中心である。交感神経の発生、分化あるいは生存に深く関与する神経栄養因子 (NGF) は、成体における神経可塑性および再生過程においても重要な働きを示す。上頸神経節 (SCG) を用いた研究では、損傷後に、標的器官から逆行性輸送ルートによって運ばれる NGF の濃度が減少し、TH のようなシナプス伝達に関連する分子の発現は減少する一方、GAP-43 などの再生に関連する因子の発現は増加するという報告がある。しかし、交感神経系の再生、特に腹部交感神経系損傷後の再生に関わる研究は非常に少ない。</p> <p>本研究では、腹部交感神経系に着目し、CG/SMG 切除および CG/SMG 節後軸索損傷後の、交感神経系の節前、節後ニューロンおよび消化管における細胞の反応および変化を、TH と GAP-43 の発現変化を通して長期間にわたり観察し、その再生および再支配の有無を検討した。さらに CG/SMG 節後軸索損傷後の交感神経節における神経細胞死の有無および NGF の影響について検討した。</p>			

材 料 ・ 方 法

腹腔-上腸間膜動脈神経節 (CG/SMG) 切除およびCG/SMG 節後軸索損傷 : 全ての実験に、BALB/C 雌性マウス (7-9 週齢、15-20g) を用いた。pentobarbital を腹腔内投与、深麻酔下に上腹部正中切開にて開腹し、消化管および脾臓を腹腔外右側へ移動した。CG/SMG 切除は、腹部大動脈に沿って付着する腹腔内交感神経節を腹腔動脈分岐部上方から腎動脈分岐部上縁まで周囲組織ごと切除した。切除した組織は凍結切片作成後、Nissle 染色を行い、全例において CG/SMG を確認した。CG/SMG 節後軸索損傷は、CG/SMG の周囲組織のみを剥離し、腹腔および上腸間膜動脈壁に沿って走行する交感神経節後線維を、鋭利なピンセットを用いて動脈ごと 1 回/1 秒、15~20 秒つまみ、交感神経節後線維を圧挫損傷させた。

組織および切片作成 : 手術 12, 18 時間, 1, 2, 4, 7, 14, 30, 90, 180 日後に、過剰の pentobarbital を腹腔内投与し、4 % パラホルムアルデヒド液で灌流固定を行い、腹腔内交感神経節、胃、十二指腸、空腸、回腸、結腸および脊髄を摘出し、14 μ m 厚の凍結切片を作成した。

Fluorogold injection : control および CG/SMG 切除 180 日後のマウスの胃壁に、5 μ l の生理食塩水に溶解した 4 % fluorogold を注入した。2 日後に灌流固定し、腹腔内交感神経節を摘出し、凍結切片を作成した。

NGF injection : CG/SMG 節後軸索損傷 2 時間前に NGF を 5 mg/kg 皮下に注入した。損傷 24 時間後に灌流固定を行い、腹腔内交感神経節を摘出し、上記の方法で切片を作成した。

免疫組織化学 : 一次抗体として抗 TH、抗 GAP-43 および抗 BAX 抗体を用い、二次抗体として Alexa-488 および Alexa-594 を使用し、蛍光免疫染色を行った。

In situ hybridization : GAP-43 cDNA を in vitro transcription により digoxigenin 標識した cRNA プローブを作成し、組織切片を 55°C で一晩 hybridization し、Anti DIG-AP 抗体を反応させ、BCIP/NBT にて発色させた。免疫組織化学との二重染色を行う場合は、BCIP/NBT による発色の直前で行った。

TUNEL staining : CG/SMG 節後軸索損傷 12, 18 時間, 1, 2, 4, 7, 14 日後および NGF 投与マウスに対して、DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (Promega) を使用し、TUNEL 染色を行った。50 μ l の TdT incubation buffer で 37°C, 1 時間反応後、DAPI にて 10 分間染色を行った。

Western blotting : CG/SMG 切除 1, 2, 4, 7, 14, 180 日後に、胃から総蛋白を抽出した。30 μ g の蛋白試料を 10 % polyacrylamide にて展開し、PVDF paper (Millipore) に転写した。一次抗体として抗 TH および抗 actin 抗体を用い、アルカリフォスファターゼ標識した 2 次抗体と反応させ、BCIP/NBT にて発色させた。

成 績

CG/SMG 切除後の消化管における交感神経分布の変化 : CG/SMG 切除直後から 30 日後頃まで顕著な下痢あるいは軟便が見られ、手術 14 日後で平均体重はおおよそ 30 % 減少した。control および CG/SMG 切除 1, 2, 4, 7, 14, 30, 90, 180 日後の十二指腸切片に対して、抗 TH 抗体による免疫組織化学および western

blotting を行った。control では筋層間、粘膜下、血管壁およびその周囲に豊富に TH の免疫反応が見られたが、CG/SMG 切除 1 日後より TH の発現は顕著に減少し、90 日後までその発現はほとんど見られなかった。しかし切除 180 日後には筋層間、粘膜下、血管壁および周囲に TH の再発現が見られ、交感神経の再生が考えられた。また western blotting によって同様の再発現を確認した。

CG/SMG 切除後の腸管から腹腔内交感神経節への逆行性トレーサー標識：CG/SMG 切除 180 日後のマウスの胃壁に fluorogold を注入した結果、下腸間膜動脈神経節 (IMG) に fluorogold で強く標識されたニューロンが多数見られ、IMG から上部消化管への交感神経再支配が考えられた。

CG/SMG 節後軸索損傷後の消化管における交感神経分布の変化：control および損傷 1, 2, 4, 7, 14, 30, 90 日後の十二指腸切片に対して、抗 TH 抗体による免疫組織化学を行った。軸索損傷 1 日後より TH の発現は顕著に減少し、30 日後まで TH の発現はほとんど見られなかったが、手術 90 日後では筋層間、粘膜下、血管壁およびその周囲に TH の再発現が見られ、交感神経の再生が考えられた。

CG/SMG 節後軸索損傷後の CG/SMG における TH および GAP-43 の発現：TH および GAP-43 の発現変化を、免疫組織化学法および in situ hybridization 法で検討した。control 動物では、TH 免疫反応陽性交感神経細胞が豊富に存在するが、損傷後、顕著に減少した。しかし 90 日後には再び TH 陽性交感神経細胞が多数発現した。GAP-43 蛋白および mRNA は、control 動物では神経節内に中等度の発現が見られ、恒常的な GAP-43 蛋白合成が示唆される。軸索損傷後、GAP-43 の発現は徐々に増加し、7 日後から 14 日後でピークを示したが、90 日後にはほぼ control のレベルまで減少した。これらの結果から、軸索損傷後の CG/SMG における GAP-43 発現の増加は、交感神経節後細胞による GAP-43 産生によるものと考えられた。GAP-43 mRNA と TH 免疫組織化学との二重染色で検討したところ、軸索損傷 7 日後において GAP-43 mRNA を強く発現する細胞のほとんどが TH 免疫反応陰性であった。また control と比較して、軸索損傷 90 日後において、TH 蛋白と GAP-43 mRNA を共発現する細胞数には明らかな減少が見られた。

CG/SMG 節後軸索損傷後の第 10-12 胸椎中間外側柱 (IML) における GAP-43 の発現：control 動物において GAP-43 mRNA および蛋白は、第 10-12 胸髄 IML に中等度に発現しているが、軸索損傷 1, 2, 4, 7, 14, 30, 90 日後において、GAP-43 mRNA および蛋白に発現の変化は見られなかった。

CG/SMG 節後軸索損傷後の CG/SMG における神経細胞死：CG/SMG 節後軸索損傷 12, 18 時間, 1, 2, 4, 7, 14 日後に対して、TUNEL 染色を行った結果、control および軸索損傷 12 時間後では神経節内に TUNEL 陽性の細胞は見られなかったが、18 時間後より 2 日後まで神経節内に TUNEL 陽性細胞が出現し、軸索損傷による神経細胞死の誘導が考えられた。4 日目以降、TUNEL 陽性細胞は見られなかった。

CG/SMG 節後軸索損傷後の CG/SMG における神経細胞死に対する NGF の影響：NGF 非投与マウスでは、軸索損傷 18 時間後から 2 日後までの神経節には TUNEL 陽性細胞が見られたが、NGF 投与マウスでは、軸索損傷 1 日後において TUNEL 陽性細胞は見られず、NGF 投与が、神経細胞死を抑制あるいは遅延させた可能性が考えられた。細胞死関連蛋白のひとつ BAX の発現を免疫組織化学により観察した結果、control では、交感神経細胞の細胞質に弱い発現が見られるが、軸索損傷 12 時間後より BAX を比較

的強く発現する細胞が出現し、その後細胞数が増加する傾向があった。一方、NGF 投与マウスの軸索損傷 1 日後では NGF 非投与マウスの損傷 1 日後と同程度に BAX の発現が見られた。

考 案

成熟動物の交感神経系における損傷と再生に関する研究は多方面から数多く行われているが、神経損傷後の標的器官における神経再支配に関しては、一部の器官で明らかにされてきたのみである。本研究では、標的器官として腸管に注目し、その支配神経節である CG/SMG の摘出を行い、一旦消失した TH 免疫陽性反応が再び出現したことより、腹部交感神経支配除去後の標的器官における再支配の証拠を初めて得た。次に、fluorogold を用いて胃を再支配した神経節の局在を検索したところ、IMG に fluorogold の強い取り込みが見られ、IMG から胃への神経再支配が起こった可能性が高いと考えられた。

CG/SMG の節後線維は、腹腔動脈、上腸間膜動脈および派生する細血管に沿って消化管へその線維を伸ばすため、その軸索を周囲組織から完全に遊離することは困難であるが、本研究では、腹腔および上腸間膜動脈壁に沿って走行する交感神経線維を血管ごと圧挫損傷させるというまったく新しい手技を用い、CG/SMG 節後軸索損傷後に、標的器官における腹部交感神経支配除去と再支配が起こることを示した。CG/SMG 節後軸索損傷後と比較して、CG/SMG 切除後の消化管における神経再支配には、より長い期間を要することが判明したが、交感神経節を摘出した場合の標的器官における交感神経再支配の期間を報告したものは、知る限りにおいては本研究が最初である。

本研究における軸索損傷の手技により、CG/SMG 節後細胞の細胞体を直接傷害することなく軸索のみを損傷後、神経節における神経細胞の機能および形態変化を検討することが可能となった。CG/SMG 節後軸索損傷後、CG/SMG での TH の発現は顕著な減少を示したが、更に長期間の観察により、CG/SMG 節後軸索損傷 90 日後に、CG/SMG での TH の再発現が起こった。また CG/SMG での TH 再発現の時間経過は、標的器官である消化管での TH 再発現と同様の変化を示すことを明らかにした。一方、軸索損傷、再生あるいは突起伸長時に重要な役割を果たす GAP-43 は、損傷後より増加が見られ、4 日後から 14 日後にピークを示した。この時期、GAP-43 を強く発現するものの TH の発現が見られない神経細胞が多く見られるようになったが、この変化は神経細胞の軸索再生への細胞変化と推測される。交感神経の再支配が起こった損傷 90 日後の GAP-43 の発現は、control 動物とほぼ同程度であったが、その発現細胞数には明らかな減少が見られ、細胞死の誘導が考えられた。これは TH の発現でも同傾向を示し、さらに GAP-43 mRNA と TH が同一細胞に発現していることがわかった。TUNEL 染色の結果、損傷後 18 時間から 2 日にかけて、TUNEL 陽性細胞の出現が見られ、細胞死の誘導が考えられたが、TUNEL 陽性細胞数は神経節の全細胞数と比較してわずかなものでしかなく、90 日後の細胞数の減少が顕著なものであったことを考えると、軸索損傷により、apoptosis の他に壊死性の細胞死が起こったと考えられた。

本研究では、軸索損傷後に起こった apoptotic な細胞死が、NGF の剥奪によって誘導されたのではないかと考え、NGF 全身投与下に軸索損傷を行った。その結果、損傷 1 日後では、NGF 非投与群と比較し

て、TUNEL 陽性細胞の発現が少ないことを確認し、NGF が軸索損傷によって誘導される神経細胞死を抑制あるいは遅延させた可能性が考えられた。次に、幼若交感神経細胞における NGF 剥奪による細胞死に促進的に働くことがわかっている細胞死関連蛋白 BAX が、成熟交感神経細胞における軸索損傷、神経栄養因子除去および細胞死に関連して発現変化を示すかを検討した。その結果、軸索損傷 12 時間後から 2 日後にかけて、BAX を強く発現する細胞が増加する傾向が見られ、細胞死関連シグナルの増強の可能性を示したが、TUNEL および BAX の二重染色では、TUNEL 陽性細胞と BAX を強く発現する細胞の一致は見られず、成熟交感神経細胞における細胞死と BAX を結びつける直接の根拠は得られなかった。しかし、成熟交感神経細胞に起こる NGF の剥奪によって誘導される細胞死は、幼若細胞と比較して漸進的に起こることが報告されており、その現象を捉えるのは困難が予想され、今後の研究の課題となった。一方、NGF 投与マウスは、非投与マウスと比較して BAX の発現に差は見られず、NGF 投与による BAX 発現に対する影響を評価するには、さらに長期的な観察が必要であると考えられた。

結 論

1. CG/SMG 切除による腸管での交感神経支配除去後、IMG からの交感神経再支配の可能性が示された。
2. 外科的に CG/SMG 節後軸索損傷を行う手技を確立し、CG/SMG 節後細胞の細胞体を傷害することなく軸索のみを損傷後、神経節における神経細胞の機能および形態変化を検討することが可能となった。
3. CG/SMG 節後軸索損傷後、神経節での TH の顕著な減少と再発現、および GAP-43 の増加が見られ、神経細胞の軸索再生への細胞変化が推測されたが、細胞数には明らかな減少が見られた。
4. CG/SMG 節後軸索損傷後、神経節において細胞死が誘導されることが示されたが、NGF 全身投与が、軸索損傷によって誘導される神経細胞死を抑制あるいは遅延させる可能性が示された。

引 用 文 献

1. Ruit KG, Osborne PA, Schmidt RE, Johnson EM Jr, Snider WD. Nerve growth factor regulates sympathetic ganglion cell morphology and survival in the adult mouse. *J Neurosci.* 10: 2412-2419, 1990
2. Hou XE, Lundmark K, Dahlstrom AB. Cellular reactions to axotomy in rat superior cervical ganglia includes apoptotic cell death. *J Neurocytol.* 27: 441-451, 1998

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏名	山田 理大
<p>審査委員長 葛西 眞一 ㊞</p> <p>審査委員 吉田 成孝 ㊞</p> <p>審査委員 坂本 尚志 ㊞</p>			
<h3>学位論文題目</h3> <p style="text-align: center; margin-top: 10px;">腹部交感神経系における神経再生に関する研究</p>			
<p>消化器外科手術などによる腹腔内神経系の損傷は、術後に起きる腸管機能障害の原因として挙げられる。消化管を支配する交感神経節はおもに、腹腔神経節 (CG) と上腸間膜動脈神経節 (SMG) であるが、これらの経路における神経再生に関わる研究はほとんど行われていない。本論文では腹部交感神経系に注目し、マウス CG/SMG の切除および節後軸索損傷を行い、消化管および腹部交感神経節における細胞の反応を長期にわたり観察し、再生および再支配の有無を明らかにすると共に、軸索損傷に伴う神経細胞死と神経栄養因子 (NGF) の影響を検討した。</p> <p>CG/SMG 切除後、上部消化管において交感神経節後線維のマーカであるチロシン水酸化酵素 (TH) が消失し、交感神経の脱支配が起きたが、切除から 180 日後には TH の再発現が見られ、交感神経の再支配が示された。またこの時、胃を再支配した節後ニューロンは下腸間膜動脈神経節からのものであった。CG/SMG 節後軸索損傷では、CG/SMG 切除と同様に、上部消化管において TH が消失し、交感神経の脱支配が起きたが、CG/SMG 切除時よりも早期である損傷 90 日後に、交感神経の再支配が起きた。一方、神経再生に重要な役割を果たす、ギャップ 43 (GAP-43) の発現は損傷後より増加が見られ、交感神経の再支配が起こった損傷 90 日後には control 動物と同程度まで減少</p>			

した。この時期の TH および GAP-43 発現細胞数には明らかな減少が見られ、神経細胞死の誘導が示されたが、NGF 全身投与のもとに軸索損傷を行った結果、損傷によって誘導される神経細胞死が、NGF によって抑制あるいは遅延される可能性が示された。

本論文では以上の事から、腹部交感神経系は成体においても卓越した再生能を発揮し、また NGF が腹部交感神経節後細胞の生存および再生に深く関わっていることが明らかになり、腹部交感神経系再生のメカニズム解明における重要な新知見をもたらした。

論文提出者に対する試問審査においても、適切かつ論理的回答がなされ、関連分野に関する十分な知識を有していることが認められた。以上の結果から、本審査委員会は本論文が医学博士の学位に値すると判定した。