

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06825

研究課題名(和文) 神経欠損による運動ニューロン細胞死の定量解析と再生促進要因の解明

研究課題名(英文) Neuronal cell death and nerve regeneration in the nerve-resected rats

研究代表者

福島 菜奈恵 (Fukushima, Nanae)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：90334888

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：神経損傷および損傷後の再生に関するこれまでの研究は、圧迫損傷や切断に関するものが多く、さらに重度の傷害である神経欠損についての報告は少ない。そこで本研究では、ラットの舌下神経を対象とした神経切除実験を行い、神経切除(欠損)後のニューロンの細胞死や舌内への神経線維の再生(舌下神経は舌筋を支配する運動神経である)について、損傷の程度(欠損の長さ)を変えてその影響を調べる実験を行った。その結果、神経切除後のニューロン生存率は切除幅と負の相関関係があること、神経切除後のニューロン細胞死は徐々に進行することが明らかとなった。また、神経切除後に舌内への神経線維の自然再生が起こる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経損傷および損傷後の再生に関する研究は、様々な神経系を対象として数多く行われている。しかし、その多くは圧迫損傷や切断に関する実験が多く、実際の神経損傷時に高頻度で起こりうる損傷である神経欠損に関する研究は少ない。本研究は、神経欠損により軸索を損傷されたニューロンの細胞死や神経欠損後の神経線維の再生について、損傷の程度(欠損した神経の長さ)と関連させて評価を行った研究であり、本研究の結果は神経欠損後の神経再生に向けた基礎的データとして非常に重要である。

研究成果の概要(英文)：We investigated neuronal cell death and nerve regeneration after the varying degrees of resection of the XII nerve in adult rats. Total number of XII neurons decreased after nerve resection and the survival rates of XII neurons were related to distances between resected nerve stumps. Moreover, the number of XII neurons after extensive XII nerve resection declined gradually over a relatively long time period. Furthermore, by injection of retrograde tracer into the tongue after nerve resection, the possibility was suggested that spontaneous neural regeneration occur after nerve resection with a relatively long gap.

研究分野：神経解剖学

キーワード：神経欠損 神経細胞死 神経再生

## 1. 研究開始当初の背景

事故や災害等によって怪我を負った場合には、末梢神経にまで損傷が及ぶことも稀ではない。末梢神経の損傷では、神経挫滅・神経切断といった傷害が生じることが多いが、それよりも重度の傷害である神経欠損が生じることもしばしばある。これまでに神経損傷および損傷後の神経再生に関する研究は数多く報告されているが、それらの研究の多くは神経の圧迫損傷や切断に関するものであり、神経欠損に関する研究は少ない。また、神経の欠損の程度を考慮した研究はほとんどない。そこで、これまでに行ってきた実験から、研究に適していると考えられる舌下神経を対象として神経切除実験を行い、神経切除後のニューロンの細胞死や神経切除後の軸索再生に関して、神経の欠損程度と関連させて評価することを目的として本研究を開始した。対象とした舌下神経は、舌の運動を支配する運動線維のみで構成されている点、ニューロンが存在する脳幹部の舌下神経核と周囲の組織との境界が明瞭である点、舌内の神経線維が可視化できる点でこの研究の対象として適していると考えた。

## 2. 研究の目的

### (1) 神経切除後のニューロン細胞死

一般的に、成熟したニューロンでは軸索が損傷されても細胞死を起さないと考えられているが、成熟ニューロンでも重度の損傷を受けた場合には細胞死が生じるとの報告がある。しかし、その程度については報告によって様々である。そこで、成熟ラットの舌下神経を対象として神経切除実験を行い、舌下神経の切除によって軸索を損傷された舌下神経核ニューロンに生じる細胞死について定量的・経時的に評価し、切除された神経の長さ(切除幅)の違いが、ニューロンの細胞死に対して与える影響について調べることを目的として研究を計画した。

### (2) 神経切除後の軸索再生

末梢神経では、神経の圧迫損傷や切断によって軸索を損傷されたニューロンが、軸索損傷部より遠位に神経線維を伸長させることが知られている。そこで、成熟ラットの舌下神経を対象として神経切除実験を行い、圧迫損傷や切断よりも重度の傷害である神経欠損後の軸索伸長(再生)の可能性について検討することを目的として研究を計画した。

## 3. 研究の方法

### (1) ニューロンの細胞死

成熟ラットを使用し、麻酔下で片側舌下神経を露出後、様々な切除幅で舌下神経を切除した。神経露出のみの動物をコントロールラットとし、また、神経切断後に断端を縫合した動物を切除幅 0 mm の神経切除ラットとした。片側舌下神経切除を行った 12 週後に、固定液(4%パラホルムアルデヒド溶液)でラットを灌流固定し、舌下神経核を含む脳を採取した。採取した脳は、固定液に 1 日間、30%スクロース溶液に 2 日間浸漬し、前額断で 50  $\mu$ m 厚の連続凍結切片を作成した。150  $\mu$ m 間隔の切片において、舌下神経核ニューロンを可視化するためにニッスル染色を施し、舌下神経損傷側と非損傷側の両側において、舌下神経核内に存在する運動ニューロンの数をステレオロジー解析装置(ランダムに選択された領域の細胞数を数えることによって含まれる細胞総数を概算することができる)を用いて計測した。舌下神経核ニューロンの生存率(損傷側のニューロン総数/非損傷側のニューロン総数(%))を算出し、神経欠損の程度(切除幅)とニューロンの生存率(% )との関係を調べた。また、ニューロンの細胞死を経時的に評価するため、9 mm 幅で成熟ラットの片側舌下神経を切除後、4 週、8 週、12 週で灌流固定し、舌下神経核を含む脳を採取した。採取した脳から前額断で 50  $\mu$ m 厚の連続凍結切片を作成後、150  $\mu$ m 間隔のニッスル染色切片を用いて舌下神経核ニューロンの数を損傷側・非損傷側で計測し、舌下神経核ニューロンの生存率(% )の経時変化を調べた。

### (2) 再生軸索の伸長

成熟ラットを使用し、麻酔下で片側舌下神経を露出後、0 mm、3 mm、6 mm、9 mm、12 mm の切除幅で舌下神経を切除した。切除幅 0 mm の神経切除ラットでは、神経切断後に断端を縫合した。また、神経露出のみの動物をコントロールラットとした。片側舌下神経切除を行った 12 週後に、舌内へと再生線維を伸長させた舌下神経核ニューロンを標識する目的で、舌内へ逆行性の蛍光神経トレーサーである Dil を注入した。Dil の注入部位は舌根部付近の舌中央部から損傷側にかけて複数か所とした。また、非損傷側の舌下神経にトレーサーが取り込まれ舌下神経核へ運ばれることを遮断するため、舌へ Dil を注入する直前に非損傷側の舌下神経を 9 mm 幅で切除した。Dil を注入した 1 週後に、固定液でラットを灌流固定し、舌下神経核を含む脳と舌を採取した。採取した脳と舌は、固定液に 1 日間浸漬し、ピプラトームを用いて前額断で連続切片を作成し、一定間隔の切片(脳は 100  $\mu$ m 厚の切片を 300  $\mu$ m 間隔で、舌は 200  $\mu$ m 厚の切片を 1200  $\mu$ m 間隔で)を蛍光顕微鏡で観察した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 神経欠損の程度（切除幅の違い）がニューロン細胞死に与える影響

舌下神経の切除実験では、片側舌下神経を 0.0~13.2 mm 幅で切除することができた。神経切除により軸索を損傷されたラットの脳切片を用いて、12 週後の損傷側の舌下神経核内のニューロン数を計測したところ、様々な程度にニューロンの細胞死が確認された（核内のニューロンの細胞数が減少していた）。計測した損傷側と非損傷側の舌下神経核ニューロン数から生存率を算出した結果、様々な幅で舌下神経を切除したラットの舌下神経核ニューロンの生存率は 34.4%~87.1%であった。また、0 mm 幅で舌下神経を切除したラット（神経切断ラット）におけるニューロンの生存率は、 $81.0\% \pm 1.8\%$ であった。

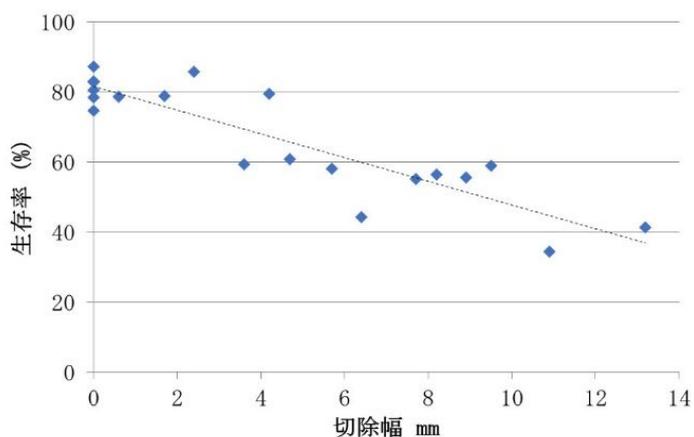


図1 切除幅とニューロン生存率の関係

統計的検定の結果、神経欠損の程度（切除幅）とニューロンの生存率（%）には負の相関関係が認められ、神経欠損の長さが長い（切除幅が大きい）ほど、ニューロンの生存率が低い、つまり、神経の欠損部が大きいほど、よりニューロンの細胞死が起こりやすいということが明らかとなった（図1）。

##### (2) 神経切除後のニューロン細胞死の経時的変化

9 mm 幅で舌下神経を切除したラットの脳切片を用いて、切除 4 週後、8 週後、12 週後の舌下神経核内のニューロン数を計測したところ、時間とともに徐々にニューロンの細胞死が進行する（細胞数が減少する）ことが確認された。損傷側と非損傷側の舌下神経核ニューロン数から算出したニューロンの生存率（%）は、4 週後では  $83.5\% \pm 4.8\%$ 、8 週後では  $73.9\% \pm 6.1\%$ 、12 週後では  $61.1\% \pm 2.5\%$ であった。また、コントロールラット（神経露出のみ）におけるニューロンの生存率は  $99.9\% \pm 2.3\%$ であった。一定幅で舌下神経を切除したラットにおける舌下神経核ニューロンの生存率は、統計学的に時間経過とともに有意に減少することが確認され、軸索を損傷された舌下神経核ニューロンの細胞死は、切除 12 週後まで徐々に進行することが明らかとなった（図2）。

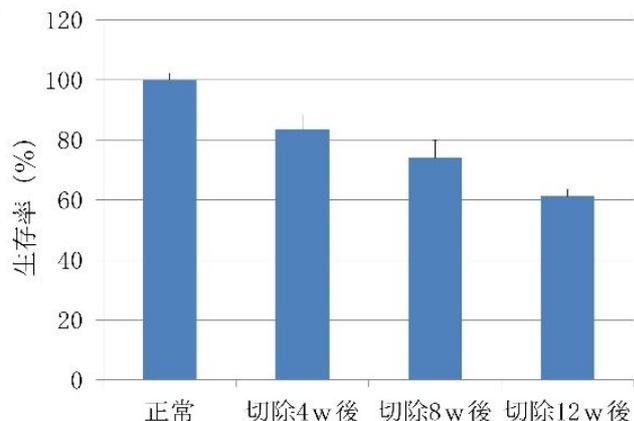


図2 神経切除後のニューロン生存率

##### (3) 神経切除後の軸索再生の可能性

片側舌下神経を 0 mm、3 mm、6 mm、9 mm、12 mm の幅で切除したラットにおいて、舌下神経切除の 12 週後に舌内へ注入された Dil は、蛍光顕微鏡で観察したところ、舌の中央部~切除側にかけて十分に拡散していることが確認された。Dil は逆行性の神経トレーサーで、再生神経線維が舌内へ到達していれば軸索終末から取り込まれ、脳幹部に存在する舌下神経核ニューロンが標識されるが、舌内へ Dil を注入する直前に非損傷側の舌下神経を切除したことによって、非損傷側の舌下神経終末からの Dil の取り込みと輸送は阻止されており、非損傷側の舌下神経核内には標識されたニューロンは確認されなかった。一方、損傷側の舌下神経核内では、切除幅 9 mm までの動物において、Dil で標識されたニューロンの存在が確認され、またその Dil 陽性ニューロンの数は、欠損の程度が大きいほど（切除幅が長いほど）その数が減少する傾向が確認された。舌内への Dil 注入前に非損傷側の舌下神経を切除したことから、損傷側で標識された舌下神経ニューロンは直前に切除された非損傷側の神経線維によって運ばれた可能性はないため、損傷側の神経が自然に再生し、舌内へ軸索を伸長させたことを示唆する結果が得られた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fukushima N, Sumitomo N, Nagira A, Ichinose Y, Kakegawa A	4. 巻 -
2. 論文標題 Spontaneous regeneration after hypoglossal nerve injury with long nerve resection in rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurophysiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fukushima N, Kobayashi T, Kakegawa A, Sumitomo N, Nagira A, Moriizumi T	4. 巻 715
2. 論文標題 Hypoglossal nerve injury with long nerve resection leading to slow motoneuron death	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 134668
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neulet.2019.134668	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Karasawa M, Yokouchi K, Kawagishi K, Moriizumi T, Fukushima N	4. 巻 60
2. 論文標題 Effects of various lengths of hypoglossal nerve resection on motoneuron survival	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 128 ~ 131
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jocn.2018.11.020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福島菜奈恵、住友憲深、柳樂彩太、一之瀬優子、掛川晃
2. 発表標題 舌下神経切除が運動ニューロン細胞死に与える影響について
3. 学会等名 第126回日本解剖学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福島菜奈恵、住友憲深、柳樂彩太、掛川晃、森泉哲次
2. 発表標題 神経切除後のニューロン細胞死 - 切除幅と生存率 -
3. 学会等名 第125回日本解剖学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福島菜奈恵、小林竜哉、横内久美子、森泉哲次
2. 発表標題 舌下神経切除後のニューロン細胞死
3. 学会等名 第124回日本解剖学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	住友 憲深  (Sumitomo Norimi)		
研究協力者	柳樂 彩太  (Nagira Ayata)		
研究協力者	小林 竜哉  (Kobayashi Tatsuya)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	掛川 晃  (Kakegawa Akira)		
研究協力者	一之瀬 優子  (Ichinose Yuko)		
研究協力者	森泉 哲次  (Moriizumi Tetsuji)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関