

Title	Bcl-2 Overexpression Does Not Enhance In Vivo Axonal Regeneration of Retinal Ganglion Cells after Peripheral Nerve Transplantation in Adult Mice
Author(s)	井上, 徹
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44469
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	井上徹
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 17362 号
学位授与年月日	平成14年12月3日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	<i>Bcl-2</i> Overexpression Does Not Enhance <i>In Vivo</i> Axonal Regeneration of Retinal Ganglion Cells after Peripheral Nerve Transplantation in Adult Mice (<i>Bcl-2</i> 遺伝子が強制発現されても、成体網膜神経節細胞の軸索再生は増大しない)
論文審査委員	(主査) 教授 福田 淳 (副査) 教授 津本 忠治 教授 不二門 尚

論文内容の要旨

〔目的〕

成体哺乳動物の中樞神経細胞では、損傷を受けた軸索の再生は極めて難しい。網膜神経節細胞でも、軸索再生はおろかその生存すら困難である (Barkelaar et al., 1994)。この問題は、生存・軸索再生を支持する環境因子 (末梢神経) を視神経の近位切断端へ移植することによって克服されたが、それでもなお大量の細胞が失われ、その一部が軸索再生するに過ぎない (Villegas-Pérez et al., 1988)。そこで「生存細胞数を増加させれば、軸索再生も増大するのではないか。」という予測に基づき研究が行われてきたが、十分な軸索再生は未だ得られていない。

網膜神経節細胞は軸索損傷後アポトーシス死に陥る。それはアポトーシス抑制因子 *bcl-2* 遺伝子の強制発現によって劇的に阻止され (Cenni et al., 1996)、さらに損傷部位では顕著な軸索発芽が見られるという (Chierzi et al., 1999)。これに続いて軸索再生が成立するかどうかという問題は、*bcl-2* 遺伝子の強制発現が幼齢ラット網膜神経節細胞の軸索再生を直接促進するという報告 (Chen et al., 1997) 以来、*in vitro*、*in vivo* 両面から議論されてきた。しかし、この遺伝子の成熟個体内での軸索再生の促進効果に関しては、未だ明確な結論が得られていない。本研究ではこの疑問を解明する。

〔方法ならびに成績〕

Martinou ら (1994) が作製した成体 *bcl-2* トランスジェニックマウス (*bcl-2* マウス) および野生型マウスを用いた。手術的処置には、60 g/kg BW のペントバルビタールナトリウム水溶液を腹腔内投与した。

まず、Vidal-Sanz (1987) らによる視神経への坐骨神経移植がマウスでも可能なことを組織学的に示した。即ち移植4週後、移植側の眼球の長軸切片上で、視神経断端と移植神経とが良好に接着していた。

次に蛍光物質の逆行性標識により、非移植網膜での正常網膜神経節細胞の全数、移植4週後の生存細胞数および移植神経内を軸索再生した細胞の数を求めた。これらより移植後の生存率および軸索再生率を算出し、*bcl-2* マウスと野生型マウスの間で比較した。生存率は Cenni ら (1996) の報告どおり、*bcl-2* マウスの方が10倍以上も高値だった。しかし生存細胞の軸索再生率の方は、野生型マウスの僅か 1/10 未満に過ぎず、*bcl-2* マウスでの軸索再生は全く促進

されなかった。さらに、正常網膜神経節細胞全数に占める軸索再生細胞の割合は、野生型と *bcl-2* マウスの間で差がなかったことより (0.4% vs. 0.3%)、*bcl-2* マウスでは生存細胞数の増加にかかわらず、軸索再生数は全く増大しなかったといえる。

移植4週後に RT97 で軸索を免疫染色した伸展網膜標本では、視神経乳頭周辺で伸展の方向を細胞体側へ反転させた軸索が、野生型のみならず *bcl-2* マウスでも観察された。これより、“軸索切断→軸索退縮→網膜内での軸索再伸展→乳頭付近での軸索伸展の抑制→伸展軸索の反転”という過程により一部の軸索再生が成立しないため (Sawai et al., 1996)、軸索再生数を過小評価する可能性が残った。そこで、*bcl-2* マウスでの軸索再生が増大しないのは、このような軸索伸展抑制等によるものではないことを示すために、次に視神経乳頭をバイパスする末梢神経移植を行い、軸索再生能を評価した。すなわち、傷つけた網膜へ坐骨神経片を直接接触させ、4週後に伸展網膜標本の RT97 免疫染色を行い、上述のような軸索の反転がなく、全ての生存軸索が移植神経まで到達している網膜標本のみを選ぶことによって、抑制因子の影響を最大限排除した。そこで逆行性標識に基いた Inoue ら (2000) の方法に従い、軸索再生率を評価した。それでもやはり、軸索切断した領域内にある網膜神経節細胞全数に占める軸索再生細胞の数の比率は、野生型マウスと *bcl-2* マウスの間に差がなかった。

[総括]

bcl-2 遺伝子を強制発現した成体網膜神経節細胞では、軸索再生にとって好適な環境を提供したにもかかわらず、生存細胞の軸索再生率は向上しなかった。従って Chen ら (1997) の結論に反し、*bcl-2* 遺伝子の強制発現による成体網膜神経節細胞の *in vivo* での軸索再生は、促進されないことが分かった。さらに、生存数が増加しても軸索再生の数が全く増加しなかったことより、成体網膜神経節細胞の軸索再生能は元来低く、単に生存のみを促進しても軸索再生を増大させることはできないことが強く示唆された。

論文審査の結果の要旨

中枢神経ニューロンの一つである網膜神経節細胞は、損傷後の軸索再生能が極めて低い。最近の研究によれば、視神経の切断端に末梢神経を移植することによって、切断された網膜神経節細胞の軸索が再生できるようになる。しかしその軸索再生率は、種々の栄養因子などの眼球内添加にもかかわらず、高々20・30%である。この低い軸索再生率の大きな原因の一つは、大部分の網膜神経節細胞が軸索切断後に逆行性の細胞死に陥る事にある。そこで逆行性の細胞死を何らかの方法で阻止すれば、軸索再生率を飛躍的に向上させることができると期待された。この考えに沿って、これまで幾つかの研究がなされてきたが、明確な結論は得られていない。

そこで本研究では、神経細胞のアポトーシスを抑制すると報告されている *bcl-2* 遺伝子産物を強制発現したトランスジェニックマウス (*bcl-2* マウス) を用い、視神経近位切断端と網膜内への二種類の 방법으로末梢神経移植を行い、4週後の網膜神経節細胞の生存率、軸索再生率を定量的に解析し、そのデータを野生型マウスの場合と比較した。その結果、(1)視神経近位切断端への末梢神経移植での網膜神経節細胞の生存率は、野生型に比べ *bcl-2* マウスで約10倍と高かった。(2)同様の末梢神経移植法による生存細胞に対する軸索再生率は、*bcl-2* マウスでは、野生型の約10分の1と低かった。(3)(2)と同じ実験で、網膜神経節細胞の総数に対する軸索再生率を比較すると、野生型と *bcl-2* マウスの間で有意差がなかった。(4)軸索伸展抑制因子が存在するといわれる視神経乳頭付近を回避するため、末梢神経片を網膜損傷部へ直接挿入移植した場合にも、4週後の網膜神経節細胞の軸索再生率は、両マウスの間で有意差がなかった。

本研究により、軸索切断された網膜神経節細胞の生存を維持させただけでは、軸索再生が増大しないことが明らかになった。この事実は、網膜神経節細胞の軸索伸展を特異的に促進させる新たな因子・遺伝子の探索が必要であることを強く示唆している。一方、本研究によって、中枢神経ニューロンの軸索再生能の定量的評価法が確立され、今後、この実験方法は様々な遺伝子改変マウスを用いた軸索再生促進因子・遺伝子の機能解析にとって、強力な研究手段となるであろう。以上より、本研究は博士 (医学) の学位授与に値すると判断された。