

中枢神経系の病巣修復：シナプス再生

新潟大学脳研究所病理学分野

山田光則

Lesion Repair of the Central Nervous System :
Synaptic Regeneration

Mitsunori YAMADA

*Department of Pathology, Brain Research Institute,
Niigata University*

To elucidate the regenerative profile of synapses, we investigated immunohistochemically the repair process of cold lesion formed in the adult rat cerebrum. The expression of presynaptic molecules, such as synaptophysin and growth-associated protein 43 (GAP-43), was up-regulated around the lesions in a coarse-granular pattern, beginning 5 days after injury and lasting for about 10 days. The appearance of many growth cones was clearly demonstrated in this border zone by GAP-43-immunohistochemistry on 5 and 7 days after the lesioning procedure. In this region, postsynaptic molecules such as IP₃ kinase, postsynaptic density 95 and drebrin temporarily lost their punctate immunostaining from 3 days after injury, but reappeared in a finely granular pattern at around 2 weeks after the lesioning. Synaptic number in this border zone decreased to 43.3% of normal control on 5 days after injury, but was rapidly recovered to 66.7% on 14 days and reached to 85.6% on 21 days. This dynamic change of synaptic number was largely dependent on disappearance and following regeneration of spine synapses.

Key words: lesion repair, synaptic regeneration, central nervous system

病巣修復, シナプス再生, 中枢神経系

Reprint requests to: Mitsunori YAMADA,
Department of Pathology, Brain research
Institute, Niigata university, Niigata City,
951-8585, JAPAN.

別刷請求先: 〒951-8585 新潟市旭町通1番町
新潟大学脳研究所病理学分野 山田光則

はじめに

中枢神経系の機能修復は古くからの願いであり、今から100年も昔のラモニ・カハールの時代にはすでに活発な形態学的研究が為されていた。しかしながら、その多くで再生現象が認められず、中枢神経系の機能回復には悲観的考えが支配的となった。ところが近年、新たな研究方法の開発によって、幼若動物における神経軸索やシナプスの活発な再生現象が明らかにされ、様々な神経栄養因子が発見されるに至って、中枢神経系の機能再生が再び注目されるようになった。しかしながらこれまでのところ、中枢神経系の再生を示す実験系の多くが未熟な神経組織を必要としており、成熟した中枢神経系における組織修復は今後の重要な研究課題となっている。

in vivo の実験系は、ヒト脳障害の実際的なモデルとして必要不可欠な研究体系であるが、組織の破壊と修復が同時に進行するため、病態解析が特に困難な状況にあった。私共はこれまで中枢神経系の病巣修復機構の解明を目的として、再現性のある凍結脳外傷実験動物モデルを考案し、脳浮腫と反応性アストロサイトの機能的役割、神経成長因子量の経時的変化などを明らかにしてきた。これらの観察過程で、成熟大脳皮質にもかかわらず、病巣辺縁の限局した領域でシナプスが活発に再生する可能性が得られた。本研究では、この特定領域に焦点をしばり、超微形態学的、免疫組織化学的に脳障害後のシナプス再生機構を解析した。

対象と方法

実験には生後8週齢(雌)のWistar ratを用いた。麻酔下に左前頭部に皮切を加え頭蓋骨を露出し、低温循環装置によって先端を -28°C に持続冷却したメタルチップを7分間密着させ、大脳皮質に一定の大きさの凍結外傷を作成した。

シナプス数の定量的解析には、病巣作成後5, 14, 21日目に3%グルタルアルデヒド・1%パラフォルムアルドヒド・リン酸緩衝液でラットを経心的に灌流固定した。病巣中心部を通る冠状面で脳を切り出し、各時期の大脳皮質第5層の壊死巣辺縁部を電顕的に観察した。無作為に最低9視野以上撮影し、17,000倍に拡大した写真を用いて、 $100\mu\text{m}^2$ に含まれるシナプス数を樹状突起の棘(spine)部と幹部に分けて算出した。

シナプスの再生機構を詳細に解析する為、病巣作成後3, 3.5, 4, 4.5, 5, 6, 7, 9, 10, 14, 21, 35日目に4%パラフォルムアルデヒド・リン酸緩衝液でラッ

トを経心的に灌流固定後、病巣中心部を通る冠状面で脳を切り出し、パラフィン切片およびビブラトーム切片を作製した。シナプス再生をシナプス前領域(神経終末)の再生とシナプス後領域(主に樹状突起棘)の再生の両面から解析するため、前者のマーカーに synaptophysin (SVP), growth-associated protein 43 (GAP-43) と neurexin を、後者のマーカーに IP_3 kinase, postsynaptic density 95 (PSD-95) と drebrin を用い、免疫組織化学的にそれぞれの機能分子の発現動態を観察した。免疫染色には avidin-biotin-peroxidase complex 法(ABC キット, ベクター社)を用いた。一次抗体は、SVP を小幡邦彦教授(岡崎国立生理学研究所)より、GAP-43, neurexin, PSD-95, drebrin を那波宏之教授(脳研究所・細胞生物学分野)より、 IP_3 kinase を Dr. S. G. Rhee (米国, NIH) より供与を受けた。ビブラトーム切片は浮遊法で免疫染色したのち、病巣辺縁部をエポソ包埋し、電顕下に観察した。また、シナプス再生へのアストロサイトの関与を、抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体(DAKO 社)と抗 glutamate transporter (GLT-1) 抗体(Wako 社)を使用し免疫組織化学的に観察した。

結 果

凍結外傷により、ラットの左大脳皮質に最深部が第5層に達する半球状の壊死巣が形成された。

シナプス数は正常皮質第5層では、 $100\mu\text{m}^2$ あたり平均24.7個認められ、その78.3%が樹状突起棘部に、残りが幹部あるいは神経細胞体に存在していた。円形シナプス小胞を有するシナプスは94.6%であった。病巣作成後のシナプス数の経時変化を図1に示した。病巣辺縁部のシナプス総数は、病巣作成後5日目に正常の43.3%にまで急激に減少したが、その後増加し14日目には66.7%、21日目には85.6%にまで回復した。部位別では、棘部シナプス数が病巣作成後5, 14, 21日目にそれぞれ正常の18.6%, 47.1%, 72.1%と変化したのに対し、幹部シナプス数に有意な変化は見られなかった。

シナプス前および後領域のマーカーを利用したシナプス再生に関する免疫組織化学的解析では、受傷後5日から2週程の間、SVP 強陽性のやや粗大な顆粒状構造が病巣辺縁部に認められ、それ以降縮小する傾向が見られた。受傷後3~7日目、正常皮質で見られる GAP-43 および neurexin の微細顆粒状の陽性像が病巣辺縁部で減少し不明瞭となったが、GAP-43 強陽性の growth cone を同部に多数認めることができた。7日目以降、

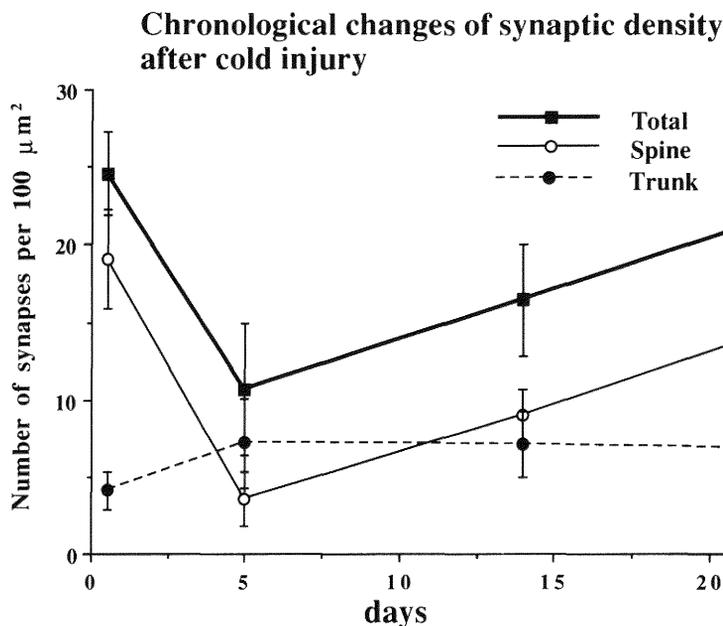


図1 ラット大脳皮質の凍結外傷辺縁部におけるシナプス数の経時的変化

growth cone は認められなくなり微細顆粒状の染色性が同部に次第に増加した。PSD-95 は、受傷後5日目、病巣辺縁部で腫大した樹状突起に強陽性となったが、同部の neuropil では逆に淡く不明瞭となった。この後、樹状突起の染色性は次第に減弱し、14日目には病巣辺縁部の neuropil が再び瀰漫性に染色されるようになった。IP₃ kinase, drebrin の微細顆粒状の陽性像も、受傷後2週間程の間、病巣辺縁部で不明瞭となったが、その後次第に増加した。反応性アストロサイトの細胞分裂は、病巣作成後3.5から4.5日にかけて病巣周囲で見られ、GFAP 強陽性の突起が比較的広範囲に多数認められた。GFAP 陽性の反応性アストロサイトは、病巣作成後7日以降、次第に病巣辺縁部に集積するようになったが、GLT-1 陽性の突起は病巣作成後14日でも、病巣辺縁部には少数であった。

考 察

本実験系の凍結外傷部は完全な壊死巣になることから、壊死巣近傍に存在する神経細胞の樹状突起でも、病巣に含まれる部分は壊死に至る。従って、今回注目した病巣辺縁部では、部分的に障害を受けながらも残存し得た神経細胞樹状突起におけるシナプス再生を観察できたものと考えられる。

成熟脳におけるシナプス再生は、かなり長期の観察を要するが、quinolic acid 注入によるラット尾状核の破壊実験で報告されている¹⁾。我々の脳外傷実験動物モデルにおけるシナプス数の変化は、成熟した大脳皮質でもシナプスが再生し、かつ、それが急速に生じうることを明瞭に示している。さらに注目すべきは、このシナプス総数の変化が棘部シナプスの減少と再生に大きく依存していることが判明した点にある。樹状突起棘は特殊に発達したシナプス特異構造の1つであり、大脳皮質では主として興奮性刺激を伝えるとされているが²⁾、その生物学的機能は未だ不明な点が多い。発達期の中枢神経系における樹状突起棘の可塑性は良く知られており³⁾、今回の観察から成熟脳におけるシナプス再生への棘の密接な関与がさらに明らかとなった。

シナプスは、神経終末であるシナプス前領域と樹状突起側のシナプス後領域から構成される。シナプス形成に果たす両者の相互的連関は未だ明確にされていないことから、病巣修復ではそれぞれの動態を個別に分析する必要がある。SVP, GAP-43 および neurexin の免疫染色の結果から、障害された神経終末は受傷後わずか1週間の間に活発に再生し、それ以降次第にシナプス前領域部を形作ることが示唆された。他方、IP₃ kinase, PSD-95 と drebrin の染色結果から、樹状突起側の再生（特に

樹状突起棘の再生)は、軸索の反応より遅れて受傷後2週目ほどから次第に明瞭となることが示された。この時期的な差異が、単に両者の再生能力の違いによるのか、あるいは相互に関連する生物学的な意味を有しているのか、今後明らかにすべき課題である。中枢神経系の修復に関する研究はこれまで軸索の再生に主眼が置かれてきたが、本研究結果は樹状突起側の再生に関する解析の必要性を示している。

病巣修復に果たすアストロサイトの機能的役割は極めて多岐にわたっており、病初期のサイトカインを介した種々の細胞反応の誘導などは、障害された組織の清掃や除去への関与の一部と理解されている。さらに近年、種々の神経栄養因子の発現・分泌などがアストロサイトに報告され^{4)~6)}、組織再生にも積極的に関与している可能性が示された。我々の脳外傷実験モデルでは、病初期に比較的広範囲に認められた反応性アストロサイトが、時間の経過とともに病巣辺縁部に集積する傾向が見られた。この動態は同時に観察されたシナプス再生の経時的変化によく一致していることから、両者間の密接な関連性が示めされ、その分子メカニズムの解明が今後の問題である。さらに、GLT-1の免疫染色の結果は、初期の再生シナプスが機能的には未完成であることを示唆しており、シナプス再生に関わるアストロサイトの機能的役割の解明が急務である。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、生田房弘名誉教授、高

橋 均教授にご指導を戴くとともに、教室の諸先生方、技術員の方々に多くのご協力を戴きました。ここに深謝申し上げます。

参 考 文 献

- 1) **Roberts, R.C. and Difiglia, M.:** Evidence for synaptic proliferation, reorganization, and growth in the excitotoxic lesioned adult rat caudate nucleus. *Experimental Neurology*, **107**: 1~10, 1990.
- 2) **Peters, A. et al:** in *The Fine Structure of the Nervous System*, Oxford University Press, New York, 1991.
- 3) **Jacobson, M.:** in *Developmental Neurobiology*, Third Ed., Plenum Press, New York, 1991.
- 4) **Murphy, S.:** *Astrocytes*, Academic Press, San Diego, 1933.
- 5) **Yamada, M. et al.:** Subcellular localization of growth inhibitory factor in rat brain: light and electron microscopic immunohistochemical studies. *Brain Research*, **735**: 257~264, 1996.
- 6) **Hozumi, I. et al.:** Immunoreactivity of growth inhibitory factor in normal rat brain and after stab wounds-an immunocytochemical study using confocal laser scan microscope. *Brain Research*, **741**: 197~204, 1996.