

第100回 日本眼科学会総会 宿題報告II

網膜視神経移植

網膜神経節細胞の再生

高野 雅彦

横浜市立大学医学部眼科学教室

共同研究者

堀江 秀典, 樋川 直司, 船橋 利也, 中山 孝, 飯島 康仁, 宮田 信之
杉 央子, 伊藤 典彦, 佐藤真由美, 伊藤 昔子, 赤堀 良子, 酒井偉久子

研究協力者

竹中 敏文, 田中富久子, 加藤 尚彦, 大野 重昭

要 約

成熟網膜神経節細胞の神経再生を検討するために実験動物の網膜培養系を確立した。網膜培養により網膜神経節細胞から神経突起が再生し、成熟後も神経再生能を持つことが確認された。また、この網膜培養系により神経再生促進因子の検討を行い、インターロイキンや神経栄養因子が網膜神経節細胞からの神経再生を促進することを明らかにした。成人ヒト網膜も培養により神経突起を再生し、これら神経再生促進因子はヒト網膜の神経再生を促進することを明らかにした。さらに、肝実質細胞から分泌される新たな神経再生促進因子を見出し、この新規因子が網膜神経節細胞からの神経再生を促進し、さらに、加齢により低下した神経再生能を賦活する可能性を持つこ

とを実験により証明した。いったん、障害されると再生しないとされてきた網膜の神経細胞も軸索を再生し、この神経再生を促進する物質が次々と見出されてきたことから、今日まで回復困難とされてきた視神経疾患に対し、これら神経再生促進因子が治療効果を持つ可能性が開かれた。今後の神経科学の分野の進歩により、網膜視神経疾患の治療に向けて、また、将来の網膜視神経移植を目指して一層の研究進歩が期待される。(日眼会誌 100: 972-981, 1996)

キーワード：神経再生, 網膜神経節細胞, 網膜培養, 神経再生促進因子, 神経栄養因子

Axonal Regeneration of Retinal Ganglion Cells

Masahiko Takano

Department of Ophthalmology, Yokohama City University School of Medicine

Abstract

We have developed retinal culture system of adult mammals to investigate neural regeneration from adult retinal ganglion cells (RGC). In this culture system, neurites were regenerated from RGCs of adult retinal explants. Investigation of neurotrophic effects on the neural regeneration showed that some

interleukins and neurotrophins enhanced neurite regeneration from adult rat RGCs. We also found that the adult human retina had the ability of neural regeneration and that neurotrophins enhanced this ability. A novel neurotrophic factor secreted by adult rat hepatocytes also enhanced neurite

別刷請求先：236 神奈川県横浜市金沢区福浦3-9 横浜市立大学医学部眼科学教室 高野 雅彦
(平成8年10月17日受付, 平成8年10月29日改訂受理)

Reprint requests to: Masahiko Takano, M.D. Department of Ophthalmology, Yokohama City University School of Medicine, 3-9 Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama-shi, Kanagawa-ken 236, Japan

(Received October 17, 1996 and accepted in revised form October 29, 1996)

regeneration not only in adult mice but also in aged RGCs. This result indicated the novel hepatocyte secreted factor is an activator which enhances neural regeneration of the aged retina. We concluded that even adult aged RGCs had the ability of axonal regeneration after injury and that neurotrophic factors might enhanced these abilities. Therefore neurotrophic factors might have practicable applications in drug treatments for intractable

disease of the neural retina and optic nerve. Future progress of neuroscience is expected to rescue the retina from various diseases, and to render possible the transplantation of the retina and optic nerve. (J Jpn Ophthalmol Soc 100: 972—981, 1996)

Key words: Neural regeneration, Retinal ganglion cell, Retinal culture, Neurotrophic factor, Neurotrophin

I 緒 言

哺乳類においては中枢神経系の神経回路が完成するために、生下後ある一定の期間を要するとされている。中枢神経細胞は胎生期から新生期までに盛んに神経突起を発芽伸長し、神経細胞間のシナプス形成により成熟し、この神経間の連絡が完成した成熟期以降は軸索の障害を受けると軸索再生は困難であると考えられてきた¹⁾。しかし、近年は脊髄の神経細胞も軸索再生が可能であり、脳の神経細胞さえも成熟後にシナプスの可塑性を持っていることもわかってきた^{2,3)}。網膜神経節細胞も同じく、軸索再生能を有していることも最近の研究から明らかにされている⁴⁾。このことは、網膜神経節細胞の軸索の束である視神経が傷害されたとしても軸索を再生し、神経回路の再構築の可能性があることを意味している。しかし、視神経切断といった障害が再び回復するといった臨床例は報告されておらず、現実的には不可能であるとされている(図1)。さらに視神経、眼球の移植は未だ夢物語である。では、一体視神経の再生は本当に可能であるのか？ 網膜神経節細胞は軸索切断といった障害により、切断後にどのような挙動を示すかを我々の研究結果から明らかにされ

ている事実をあげていきたい。視神経が切断されると、網膜から脳への神経連絡が断たれるのみならず、網膜神経節細胞は急速に細胞死に至ることが知られている^{5)~11)}。実際にラットの網膜神経節細胞を蛍光色素による逆行性染色で標識し、視神経を切断して網膜神経節細胞の変性過程を検討した¹²⁾。その結果、切断後早期に急速な網膜神経節細胞の変性、細胞死が観察された。この変性した網膜神経節細胞は網膜内の microglia の活性化により速やかに除去され、結果として細胞数の著しい減少が起きると考えられている¹²⁾¹³⁾。切断された軸索の末梢側は Waller 変性により消失するが、軸索の中核側では逆行性変性が生じ、その変性はその細胞体まで及び網膜神経節細胞に不可逆的な細胞死をもたらす。このことから、網膜神経節細胞はいったん切断されると軸索を再生しないと考えられてきた。しかし、視神経切断後も一部の網膜神経節細胞は細胞死を逃れ、数か月にわたり生存し続けることが明らかになってきた¹¹⁾。また、軸索切断された網膜神経節細胞内では、 β -tubulin などの細胞骨格蛋白¹⁴⁾や GAP-43 (growth-associated protein-43) に代表される神経成長にかかわる物質の生合成が高まっていること¹⁵⁾などがわかってきた。こうした事実は、視神経切断後に網膜神経節細胞のほとんどが変性、細胞死に陥る一方で、軸索再生に向けての活動が網膜内でなされている可能性があることを示唆している。すなわち、網膜神経節細胞は成熟後も軸索再生の予備能は持っていると考えられるようになった。近年、軸索切断後の網膜神経節細胞を細胞死から救済する方法として、神経栄養因子といわれる一連の物質が注目されている¹⁶⁾。神経細胞は標的器官から軸索を通じてこの神経栄養因子の供給を常時受けていることが報告され、軸索切断後の神経細胞の変性、細胞死は軸索の切断により、この神経栄養因子の供給が停止し、細胞体の神経栄養因子が枯渇することによって考えられている(図2)。枯渇した神経栄養因子を補う目的で、視神経切断後に神経栄養因子を硝子体内に注入することにより、細胞変性のある程度くい止めることが出来たとの報告^{17)~19)}がされている。また、視神経の代わりに末梢神経である坐骨神経を用いて眼球と上丘をバイパスすることで、網膜神経節細胞の細胞数の減少をある程度くい止められることも報告²⁰⁾²¹⁾されている。さらに、驚くことにごく僅か

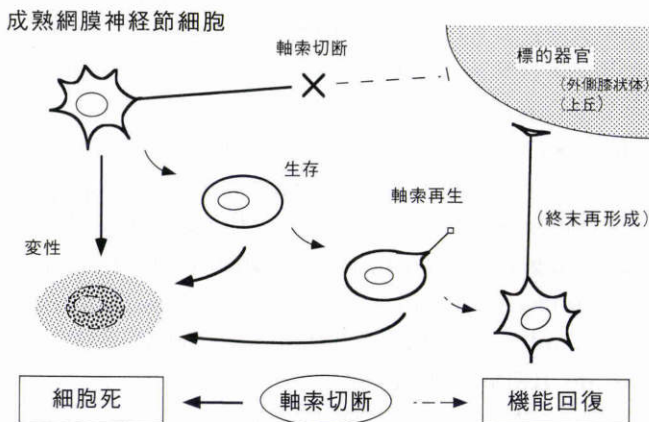


図1 軸索切断後の網膜神経節細胞の挙動の模式図。軸索切断された成熟網膜神経節細胞(左上)の多くは速やかに変性、細胞死に陥るが、少数の細胞は生存し続け、軸索を再生、標的器官に向かい軸索を伸長する。しかし、その過程においても細胞変性、細胞死に陥る。現在のところ、標的器官と神経終末をつくり、機能回復することは困難である。

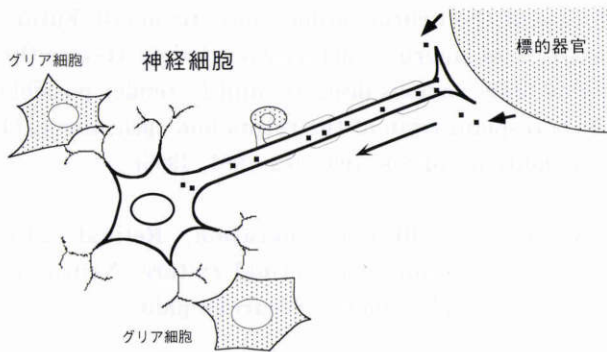


図2 成熟神経細胞(ニューロン)の模式図。

神経細胞は成熟後に標的器官(細胞)から常に神経栄養因子の供給を受けている。神経栄養因子は神経終末付近から取り込まれ、逆行性軸索輸送により細胞体に向かって運ばれる。

- ：神経栄養因子 NGF(nerve growth factor)など

はあるが、網膜神経節細胞の再生軸索が坐骨神経の中を伸長し、上丘とシナプス形成を生じることが観察されている^{22)~24)}。これらの実験事実から、いったん完成した視覚系においても、視神経が障害を受けたのちにも網膜神経節細胞が軸索を再生し、機能回復することが実現可能であると確信して、多くの研究者たちが中枢神経の軸索再生、機能回復という極めて困難なテーマに取り組んでいる。こうした動きの中で、我々のアプローチとして中枢神経細胞の初代培養、中でも網膜組織を培養する器官培養という方法を用いて神経再生を解析している。哺乳類においても、胎生もしくは生後極めて早い時期に網膜培養を行うと再生神経突起が容易に観察できる。この神経再生を促進する因子については、これまでに幼弱な個体を使った網膜培養の研究から細胞外基質である laminin にその効果がみられたとの報告²⁵⁾や、Schwann 細胞²⁶⁾、Müller 細胞の存在²⁵⁾が神経再生を促進したとの報告がされている。さらに、細胞死を抑制し得るとされている先の神経栄養因子が神経再生促進効果も持つことが報告されている。この神経栄養因子について同様に、幼弱な個体を使った培養研究から、これまでに basic-fibroblast growth factor (b-FGF)²⁷⁾、nerve growth factor (NGF)²⁸⁾、brain-derived neurotrophic factor (BDNF)²⁹⁾などが神経再生を促進するとの研究結果が報告されている。しかし、網膜培養そのものが幼若な個体を用いてのみ可能で、成熟した個体での網膜培養は依然困難であった。事実、我々は幼弱なマウスを用いた網膜培養により、生後2週間をすぎると網膜神経節細胞の神経突起再生能が著しく低下すること、神経再生能の低下は網膜の周辺部より中心部の方が早く観察されることを明らかにした³⁰⁾。この生後2週間という時期と網膜の部位による再生能の違いは視覚における神経回路の完成と密接な関係を持ち、生後、神経回路が完成すると神経細胞の軸索再生能が著しく低下するという従来の報告と一致していた³¹⁾³²⁾。成熟した個体

での神経再生促進因子の効果の解析は、網膜培養の困難さから十分になされていなかった。

我々は成熟動物を用いてあらかじめ視神経を切断、その後、一定期間飼育したのちに網膜を摘出、培養することによって再生神経突起の観察が可能であること、さらに、この再生した神経突起が網膜神経節細胞からの再生突起であることを報告¹²⁾した。培養下においても網膜神経節細胞は神経再生が可能で、成熟後も網膜神経節細胞は軸索再生能を持ち続けていることを明らかにした。また、この方法では神経再生能を再生突起の数で定量することが出来るため、この培養系は神経細胞の再生に影響を与える因子、神経再生促進因子(neurotrophic factor)の検索、解析に有用な方法と考えられた。

今回、我々は成熟哺乳動物の網膜培養系を確立し、この培養系を用いて様々な因子の網膜神経節細胞に対する神経再生促進効果を検討、さらに、新規の神経再生促進因子について検討を試みた。

II 成熟哺乳動物の網膜培養系と神経再生促進因子

1. 対象ならびに実験方法

Wistar 系の成熟ラット(9週齢、体重180~200g)を用いた。すべてのラットはペントバルビタールナトリウム(ネンプタル®)の腹腔内注射(40mg/kg)で麻酔の後、左の視神経を眼窩内、眼球から5mmの位置で、網膜循環に影響を与えないように切断した。視神経切断後、手術創を閉じ、動物飼育施設内で飼育した。7日後、動物をエーテルで屠殺、速やかに左眼球(視神経切断側)を摘出し、無菌下で網膜を単離した。視神経乳頭から1,000~1,500 μ mの部位の網膜を培養に用い、鋭利な剃刀の刃で16個の網膜片(約500 μ m四方)を作製した。この網膜片を4個ずつ poly-L-lysine(10 μ g/ml, Sigma)を塗布した培養皿の上で type I collagen の中に包埋した。Type I collagen はラット尾腱から調製し、包埋は我々が以前に報告した方法³⁰⁾に沿って行った。低温下に保持した collagen 混合液に網膜組織片を浸し、これを急速に37°Cに加温して collagen をゲル化し、組織片を包埋した。培養液は minimum essential medium (MEM, GIBCO BRL) に2.7 mg/ml glucose, 5 μ g/ml insulin, 16.1 μ g/ml putrescine, 792 μ g/ml bovine serum albumin (Sigma), 5.2 ng/ml Na₂SeO₃, 3.7 mg/ml NaHCO₃ および 3.6 mg/ml HEPES (DOJIN) を添加したのものを用いた。培養は37°Cに維持した5% CO₂/95% air インキュベータ内で行い、培養液は2日毎に新しい液と交換した。再生突起の観察は倒立位相差顕微鏡(TMD, NIKON 社製)を用いて行った。

1) インターロイキン

我々が先に報告した蛍光色素の逆行性標識による視神経切断後の網膜神経節細胞の変性・細胞死の過程の実験

において軸索切断約一週間後に網膜内でミクログリアが観察された¹²⁾。我々はこのミクログリアが神経再生に何らかの影響を与えているとの仮説を立てて、ミクログリアの主要生産物であるインターロイキン 1β (IL- 1β) およびインターロイキン6 (IL-6) を培養液に添加し、これらの神経再生効果を網膜培養系を用いて検討した。

約 9 週齢の成熟ラット (Wistar 系, 180~200 g), 18 匹 18 眼を用いた。網膜培養は同様にコラーゲン培養法を用い、無血清培養液に様々な濃度のヒト型合成 IL- 1β (GZM) (1~100 U/ml, 1 U=5 pg) とヒト型合成 IL-6 (GZM) (0.1~10 U/ml, 1 U=250 pg) を加えて培養した。さらに、インターロイキンの阻害実験のために、中和抗体として家兎ポリクローナル抗 IL- 1β 抗体 (GZM) と家兎ポリクローナル抗 IL-6 抗体 (GZM) を用いた。

2) 神経栄養因子

神経栄養因子として、NGF ファミリーの NGF, BDNF, NT-3 (neurotrophin-3), および NT-4 (neurotrophin-4) について、それぞれ我々の成熟網膜培養系を用いて、その神経再生促進効果の有無の検討を行った。約 9 週齢の成熟ラット (Wistar 系, 180~200 g), 24 匹 24 眼を用いた。網膜培養は同様にコラーゲンゲル培養法を用い、培養液に NGF, BDNF, NT-3 および NT-4 を、それぞれ 100 μ g/ml の濃度で添加し、神経突起の再生数を計測した。

2. 結 果

1) インターロイキン

培養翌日より培養網膜片から突起が再生してきた (図 3)。この突起はコラーゲンゲル中を三次元的に伸長し、日を追う毎にその数と長さを増して、長いものは 3.0 mm を越えるものも観察された (図 4)。この再生突起は抗 neurofilament 抗体に陽性であり、さらに、網膜内の神経節細胞に特異的である抗 Thy 1.1 抗体³³⁾³⁴⁾ に陽性であった (図 5)。このことから、観察された再生突起が神経突起

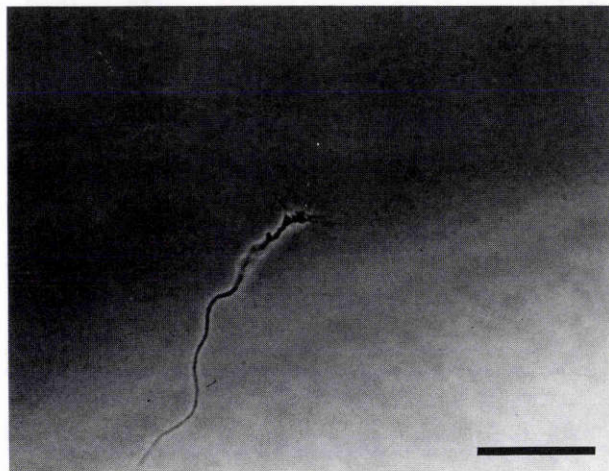


図 3 培養網膜組織片から再生した神経突起。

培養 1 日目の培養網膜の位相差顕微鏡像。再生突起は成長円錐と呼ばれる神経突起に特有の先端構造を持っていた。バーは 100 μ m

であり、網膜神経節細胞からの再生神経突起であることが確認された。培養液にインターロイキンを添加した場合には、これら再生突起が対照に比べより多く観察された。図 6 に IL- 1β を 1, 3, 10, 30 および 100 U/ml の濃度で添加した培養における再生突起数を対照に対する相対比で示した。神経突起再生は IL- 1β が 10 U/ml の濃度のとき最も強く促進され、この濃度では培養 3 日目の再生突起の本数は網膜組織片当たり平均 14.3 本、対照は

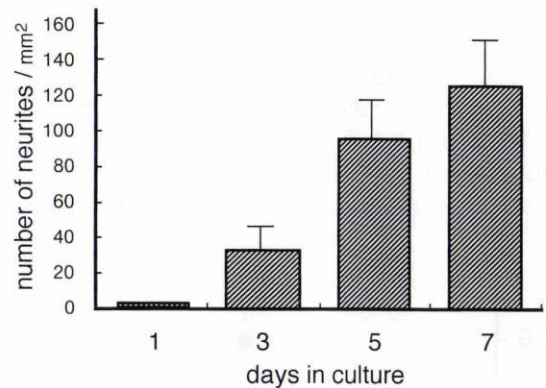


図 4 再生神経突起の本数。

培養網膜から再生した神経突起の本数を平均と標準誤差で示す。再生神経突起の本数は日を追うごとに増加した。

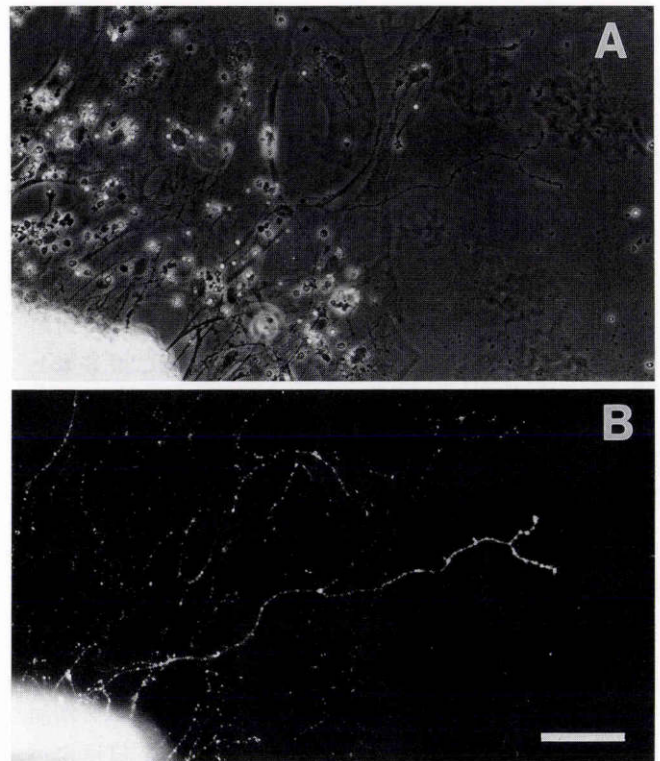


図 5 抗 Thy 1.1 抗体による蛍光染色像。

培養 9 日目の培養網膜の位相差顕微鏡像 (上図 A), 蛍光顕微鏡像 (上図 B)。抗 Thy 1.1 抗体による免疫組織染色により再生神経突起のみが染色された。再生神経突起は網膜神経節細胞由来であることを示している。バーは 50 μ m

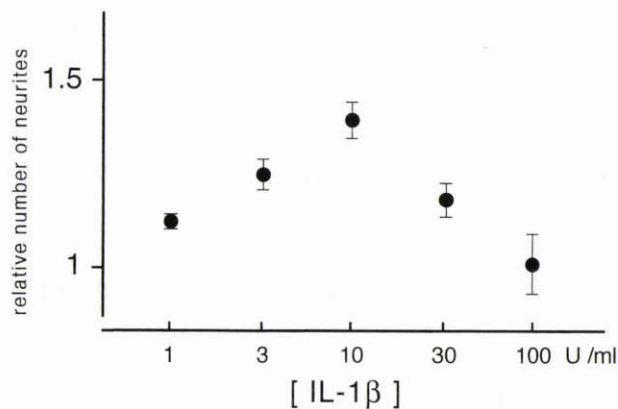


図6 IL-1βの効果.

IL-1βを添加した網膜培養の結果を示す.培養5日目におけるIL-1βの再生神経突起の本数について濃度毎に対照を1とした相対比をとり,平均と標準誤差で示す.IL-1βは10 U/mlで最大の効果を示した.

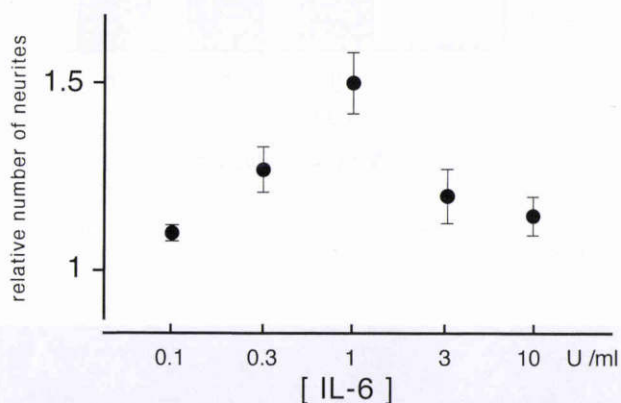


図7 IL-6の効果.

IL-6を添加した網膜培養の結果を示す.培養5日目におけるIL-6の再生神経突起の本数について濃度毎に対照を1とした相対比をとり,平均と標準偏差で示す.IL-6は1 U/mlで最大の効果を示した.

9.0本であった.培養5日目にはIL-1βが34.9本,対照は23.5本,培養7日目にはそれぞれ44.6本,29.6本と増加していた.培養3~7日目にかけてIL-1が10 U/mlの濃度で再生突起数は対照に比べ約40%増加した.

IL-6を0.1,0.3,1,3,および10 U/mlの濃度で添加した培養における再生突起数を対照に対する相対比で図7に示した.神経突起再生はIL-6が1 U/mlの濃度のとき最も強く促進され,この濃度では培養3日目の再生突起の本数は網膜組織片当たり平均30.8本,対照は24.4本であった.培養5日目にはIL-6が57.9本,対照は39.8本,培養7日目にはそれぞれ66.3本,47.5本と増加していた.IL-6 1 U/mlの濃度では培養3~7日目にかけて再生突起は対照に比べ約50%増加した.

IL-1βによる神経再生促進効果は家兎ポリクローナル抗IL-1β抗体(10 μg/ml)をIL-1β(10 U/ml)を含む培養液に添加することにより阻害された.同様に,IL-6による神経再生促進効果は,家兎ポリクローナル抗IL-6

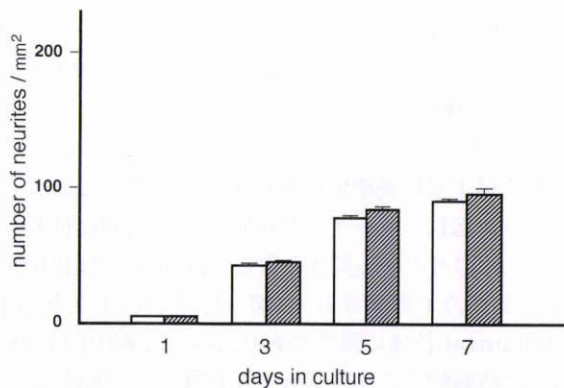
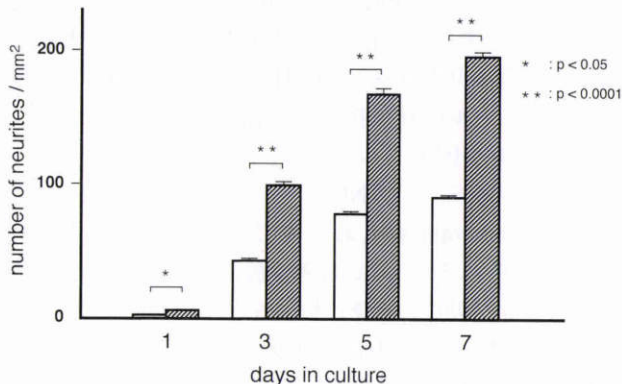
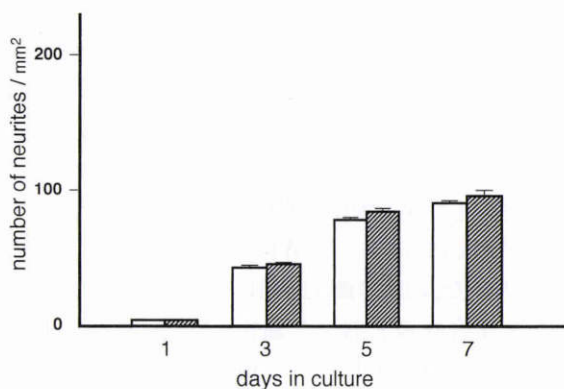


図8 神経栄養因子の効果.

上から■ NGF □対照, ■ BDNF □対照, ■ NT-3 □対照, ■ NT-4 □対照 を添加した網膜培養の結果を示す.各神経栄養因子の再生神経突起の本数を平均と標準誤差で示す.培養網膜からの再生神経突起数はBNDF, NT-4によりいずれの計測日においても約2倍に増加していた.

抗体(10 $\mu\text{g/ml}$)を IL-6(1 U/ml)を含む培養液に添加することにより阻害された。培養下における成熟ラット網膜からの IL-1 β および IL-6 による神経再生促進効果は、いずれもそれぞれの中和抗体により明らかに阻害された。

以上の結果から、培養下において軸索切断後の網膜神経節細胞からの神経再生は IL-1 β および IL-6 により促進されることが示唆された³⁵⁾。

2) 神経栄養因子

インターロイキンの場合と同様に、神経突起の再生は24時間以内に観察された。培養1, 3, 5および7日目に再生神経突起の本数を計測した。神経栄養因子を添加した培養でも添加していない培養のいずれにおいても、日を迫る毎に神経突起の本数は増加した。培養液に NGF を添加した場合、再生神経突起の本数は培養1, 3, 5および7日目のいずれの時点においても対照と有意な差はみられなかった(図8)。また、NT-3 を添加した場合も同様に、神経突起の本数に有意な差はみられなかった。しかし、BDNF, NT-4 を添加した場合、再生神経突起の本数は対照に比べ約2倍の増加を示した。この神経突起の増加は培養7日目まで観察され、いずれの時点においても対照と有意差があった($p < 0.01$)。これらの結果から、神経栄養因子の BDNF, NT-4 は網膜神経節細胞からの神経再生を促進する効果があることが明らかになった。しかし、NGF, NT-3 には神経再生促進効果がないと考えられた。

3. 考 按

1) インターロイキン

ミクログリアは感染、外傷、変性および脱髄など多くの中枢神経疾患で出現し、この炎症細胞は中枢神経系におけるサイトカインの供給源として神経組織の創傷治癒の調節に深く関わっているとされている³⁶⁾。実際、脳損傷後にこのミクログリアが分泌する IL-1 β および IL-6 の生体内における発現量は、他のサイトカインに比べてより急速に増加するとの報告³⁷⁾がされている。ミクログリアから分泌される IL-1 β は、さらにアストログリアを活性化し、アストログリアは NGF や他の神経栄養因子を分泌する³⁸⁾。これら神経栄養因子は、中枢神経細胞の生存と神経再生を誘導するとされている¹⁶⁾。同様に、IL-6 は直接アストログリアを活性化し、また、培養下において、IL-6 は神経細胞の生存維持効果を持つともされている³⁹⁾⁴⁰⁾。活性化されたアストログリア自身も障害を受けた神経の生存維持および軸索の再生を誘導すると考えられている⁴¹⁾⁴²⁾。このため、中枢神経の障害後に分泌されるインターロイキンは神経再生を促進する可能性があると考えられた。しかし、実際に神経再生におけるインターロイキンの役割は、生体内においても培養下においても未だ十分に解明されていない。我々の網膜神経再生モデルの研究結果では、IL-1 β および IL-6 は網膜神経節細胞か

らの神経再生を明らかに促進した。このモデルにおいて、培養網膜組織片は三次元的にコラーゲンゲル中に保持されることにより、その構造および神経-神経膠細胞の連関は培養期間を通して、十分に保存されている。それゆえ、我々はこの神経再生モデルは生体における軸索障害後のグリア系の活性化反応³⁹⁾をも再現しているものと考えている。この研究結果から、神経障害後のグリア系の活性化反応は単に創傷治癒だけではなく、軸索切断後の神経再生を促進する役割を果たしている可能性があると考えられた。

我々の神経再生モデルにおいて、IL-1 β では10 U/ml, IL-6 では1 U/ml が最も高い効果を示した。これより高い濃度では濃度依存性に再生促進効果は減弱し、高濃度のインターロイキンは神経再生において促進効果を示さなかった。今後、中枢神経の軸索再生に対するインターロイキンの役割と神経障害後のグリア系の活性化反応における詳細な機構については、さらなる検討が必要であると考えられた。

2) 神経栄養因子

末梢神経系の知覚神経である後根神経節細胞は NGF によく反応し、NGF を加えることにより、神経細胞の生存、軸索再生が促進されることがよく知られている⁴³⁾。また、運動神経も NGF および NT-3 の添加による応答が確認されている。NGF が中枢神経系である海馬の神経細胞の神経再生を促進するとも報告¹⁶⁾されている。しかし、一般的にいつて中枢神経系の神経細胞は BDNF および NT-4 に反応するといわれており、網膜神経節細胞も例外ではない。網膜培養系において BDNF が軸索障害後の網膜神経節細胞の生存率を高めることが報告⁴⁴⁾されている。また、生体系においても網膜内での軸索再生を促進していることも報告¹⁸⁾されている。NT-4 も同様の効果を示す可能性があることが報告⁴⁵⁾されている。今回の我々の検討においても BDNF および NT-4 に神経再生促進効果があることが確かめられた。この強力な神経再生促進作用は今後、神経疾患に対する臨床応用を期待させるに十分であると考えられた¹⁶⁾。しかし、これら神経栄養因子の作用機序は未だ詳細に解明されておらず、現状ではただ単に現象を観察しているだけにすぎないともいえる。近年、NGF の2種の receptor が発見され、低親和性 receptor⁴⁶⁾⁴⁷⁾である p75 と高親和性 receptor⁴⁸⁾の trk A であることが明らかになった。また、BDNF および NT-4 の高親和性 receptor⁴⁹⁾⁵⁰⁾は trk B, NT-3⁵¹⁾は trk B と trk C であり、いずれも低親和性 receptor の p75 の関与も考えられている。今後は網膜におけるこれら receptor の存在とその分布、さらには障害時における発現を検索し、これらと培養系で得られた神経再生促進因子との一致を確認する必要がある。さらに、未知の分野である receptor を介した細胞内情報伝達機構(signal transduction mechanism)と併せて、今後の検討課題で

ある。

III 新しい神経再生促進因子とヒトへの応用

1. 肝由来神経活性化因子

ここ数年来の研究から、我々は肝実質細胞の培養上清に神経の再生促進、生存維持にかかわる未知なる因子が含まれていることを見出した。また、この因子は末梢神経である脊髄後根神経節の神経再生促進、生存維持効果を示すことが判明した⁵²⁾。そして、この因子がこれまでに報告されている既知の因子とは異なる全く新しい神経栄養因子であることを突き止め、肝由来神経活性化因子(Liver-derived neural activator: LDNA)と命名した⁵³⁾。しかし、この因子の活性は末梢神経系の神経細胞で確認されたものであり、中枢神経系の神経細胞に対する効果は未知なるものであった。

そこで、我々は成熟マウスおよび老化マウスを用い、この新しい神経再生促進因子であるLDNAの網膜神経節細胞に対する再生促進効果を検討した。約3か月齢の成熟マウス(C57/BL系)2匹4眼、および我々の施設で長期飼育により作成した約24か月齢の老化マウス(C57/BL系)2匹4眼を用いた。網膜培養はコラーゲンゲル培養法を用い、培養液にLDNA粗分画を添加し、神経突起の再生数を計測した。その結果、LDNAを培養液に添加した培養では、成熟マウス網膜片から24時間以内に神経突起の再生が観察された。LDNAを培養液に添加していない成熟マウス網膜片では、培養3日目まで神経突起の再生は観察されなかった。老化マウスでも同様の傾向が観察された。成熟マウス網膜の再生突起の本数は、培養3日目にはLDNAを添加した培養とLDNAを添加していない対照の神経突起の再生数には有意差がなかった。培養6日目にはLDNAを添加した培養では、再生突起の本数は対照に比べ約20%増加し、培養10日目には約30%の増加が観察された。培養6,10日目において、LDNAを加えた培養では再生突起の本数は対照に比べ有意差があった。一方、老化マウス網膜の再生突起の本数は成熟マウスの場合と同様に、培養3日目には両者に差はなかったが、培養6日目には約30%、培養10日目には約20%の増加が観察された。老化マウスにおいても培養6,10日目において、LDNAを加えた培養では再生突起の本数は増加しており、この差は対照に比べ有意であった。また、培養3,6,10日目のいずれの時点においても老化マウス網膜からの神経再生突起数は成熟マウスに比べ約2分の1以下と有意な低下を示し、老化により網膜の神経再生能が低下している可能性が示唆された。これらの実験事実から、新しい神経栄養因子であるLDNAは成熟マウス網膜からの神経再生を明らかに促進し、さらに、老化により低下した神経の神経再生能をLDNAは活性化する働きがあることが示唆された。

2. ヒトへの応用

我々の実験により、神経栄養因子が培養下において軸索損傷後の成熟ラット網膜神経節細胞の神経再生促進効果を示すことが明らかになった。この強い神経再生促進効果から、神経栄養因子は実際にヒトの神経疾患の治療に応用出来る可能性が考えられた。これら神経再生促進因子は神経再生機構の解明のみならず、今後、神経損傷、変性疾患、緑内障などの各種神経疾患の治療に向けた臨床応用と、さらに将来の網膜視神経移植の実現への有力な手段として、その適用が期待されている。しかし、ラットといった実験動物で確認された効果もヒトで効果が確認できなければ、臨床応用は極めて厳しいと考えざるを得ない。成人ヒトの網膜は培養下で軸索再生が可能であることがすでに知られているが⁵⁴⁾、未だかつてヒト網膜に対してこの神経栄養因子の効果を検討されてはいなかった。我々は実際にヒト網膜を用いて培養下で神経突起の再生を観察、また、同時に神経栄養因子の効果を検討する機会を得た⁵⁵⁾。実験に用いたヒト網膜は、左眼窩悪性腫瘍の診断で横浜市大医学部附属病院脳神経外科で眼窩内容除去術を施行された70歳の男性から提供を受けた。網膜の提供に当たって術前に患者本人、家族に対し十分な説明をし、摘出眼球から網膜の一部をこの研究に用いることについて同意を得た。ヒト網膜の培養はラット網膜と同様に組織培養を行い、同時に神経栄養因子のうち、高い神経再生促進効果を示したBDNFを100 ng/mlの濃度で培養液に加え、その効果を検討した。その結果、BDNFを培養液に添加した培養では網膜片から24時間以内に神経突起の再生が観察された。BDNFを培養液に添加していない対照では培養3日目まで神経突起の再生は観察されなかった。再生神経突起の本数は培養3,6,9日目のいずれの時点においても対照に比べ神経栄養因子のBDNFを加えた培養では約10倍に増加し、それぞれの再生突起の本数には有意差があった。また、BDNFの神経再生促進効果は培養9日目以降も観察された。70歳と高齢のヒト網膜でも培養下で神経節細胞からの軸索再生が可能であり、BDNFはこの神経再生を明らかに促進していた。このことから、成人ヒト網膜においてもBDNFは神経再生の過程に有効であるとの結論を得た。これらの事実は、現在、有効な治療薬がない外傷などによる視神経の損傷や脱髄変性疾患などの薬物治療に際して、BDNFをはじめとする神経再生促進因子が新しい治療薬となり得る可能性をも示唆している。しかし、未だこれら神経再生促進因子の網膜神経節細胞への生存維持、軸索再生効果における詳細なメカニズムは明らかにされておらず、将来の神経再生促進因子の臨床応用については今後、さらなる検討が必要である。

稿を終るにあたり、宿題報告の機会を与えて下さいました日本眼科学会評議員各位、日本眼科学会会員ならびに第100回日本眼科学会総会長増田寛次郎先生、座長の労をお取

りいただいた安達恵美子先生に心から感謝申し上げます。この神経培養の研究を最初に指導して頂きました横浜市の湯田兼次博士、網膜組織の培養研究を終始指導して頂いた堀江秀典講師(横浜市大第一生理)に深く感謝いたします。本研究全般にわたり貴重な助言と多大な協力を下さいました大野重昭教授(横浜市大眼科)、ならびに諸先輩、教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。さらに、本研究は横浜市大第一生理、第二生理、第一生化、その他、多くの教室との共同研究により成されたことを付記して深謝いたします。

なお、本研究には文部省科学研究費補助金一般研究C(課題番号07671930)ならびに財団法人横浜総合医学振興財団から研究助成を受けたことを付記して謝意を表します。

文 献

- 1) **Kiernan JA**: An explanation of axonal regeneration in peripheral nerves and its failure in the central nervous system. *Med Hypoth* 4: 15—26, 1978.
- 2) **David S, Aguayo AJ**: Axonal elongation into peripheral nervous system "Bridge" after central nervous system injury in adult rats. *Science* 214: 931—933, 1981.
- 3) **Aguayo AJ**: Axonal regeneration from injured neurons in the adult mammalian central nervous system. In: CW Cotman (ed): *Synaptic Plasticity*. Guilford, New York, 457—484, 1985.
- 4) **So KF, Aguayo AJ**: Lengthy regrowth of cut axons from ganglion cells after peripheral nerve transplantation into the retina of adult rats. *Brain Res* 328: 349—354, 1985.
- 5) **Leinfelder PJ**: Retrograde degeneration in the optic nerves and retinal ganglion cells. *Trans Am Ophthalmol Soc* 36: 307—315, 1938.
- 6) **Allcutt D, Berry M, Sievers J**: A qualitative comparison of the reactions of retinal ganglion cell axons to optic nerve crush in neonatal and adult mice. *Dev Brain Res* 16: 231—240, 1984.
- 7) **Barron KD, Dentinger MP, Krohel G, Easton SK, Mankes R**: Qualitative and quantitative ultrastructural observations on retinal ganglion cell layer of rat after intraorbital optic nerve crush. *J Neurocytol* 15: 345—362, 1986.
- 8) **Grafstein B, Ingolia NA**: Intracranial transection of the optic nerve in adult mice: Preliminary observations. *Exp Neurol* 76: 318—330, 1982.
- 9) **Misantone LJ, Gershenbaum M, Murray M**: Viability of retinal ganglion cells after optic nerve crush in adult rats. *J Neurocytol* 13: 449—465, 1984.
- 10) **Muchnick-Miller N, Oberdorfer M**: Neuronal and neuroglial responses following retinal lesions in the neonatal rats. *J Comp Neurol* 202: 493—504, 1981.
- 11) **Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Rasminsky M, Bray GM, Aguayo AJ**: Rapid and protracted phases of retinal ganglion cell loss follow axotomy in the optic nerve of adult rats. *J Neurobiol* 24: 24—36, 1993.
- 12) **Takano M, Horie H**: Critical period for degradation of adult rat retinal ganglion cells and their regeneration capability. *Neurosci Lett* 175: 129—132, 1994.
- 13) **Thanos S, Mey J, Wild M**: Treatment of the adult retina with microglia-suppressing factors retards to axotomy-induced neuronal degradation and enhances axonal regeneration *in vivo* and *in vitro*. *J Neurosci* 13: 455—466, 1993.
- 14) **McKerrecher L, Essagian C, Aguayo AJ**: Marked increase in β -tubulin mRNA expression of axotomized retinal ganglion cells in adult mammals. *J Neurosci* 13: 5294—5300, 1993.
- 15) **Doster SK, Lozano AM, Aguayo AJ, Willard MB**: Expression of growth-associated protein GAP-43 in adult rat retinal ganglion cells following axon injury. *Neuron* 6: 635—647, 1991.
- 16) **Lindsay RM, Wiegand SJ, Altar CA, DiStefano PS**: Neurotrophic factors: From molecule to man. *Trends Neurosci* 17: 182—190, 1994.
- 17) **Mey J, Thanos S**: Intravitreal injection of neurotrophic factor support the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats *in vivo*. *Brain Res* 602: 304—317, 1993.
- 18) **Mansour-Robaey S, Cleake DB, Wang Y-C, Bray GM, Aguayo AJ**: Effects of ocular injury and the administration of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on the survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 449—465, 1994.
- 19) **Mey J, Thanos S**: Intravitreal injections of neurotrophic factors support the survival of axotomized retinal ganglion cells on adult rats *in vivo*. *Brain Res* 602: 304—317, 1993.
- 20) **Thanos S, Vanselow J**: Adult retinal ganglion cells retain the ability to regenerate their axons up to several weeks after axotomy. *J Neurosci Res* 22: 144—149, 1989.
- 21) **Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Bray GM, Aguayo AJ**: Influence of peripheral nerve grafts on the survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells in adult rats. *J Neurosci* 8: 265—280, 1988.
- 22) **Keirstead SA, Raminisky M, Fukuda Y, Carter DA, Aguayo AJ**: Electrophysiologic responses in hamster superior colliculus evoked by regenerating retinal axons. *Science* 246: 255—257, 1989.
- 23) **Vidal-Sanz M, Bray GM, Villegas-Pérez MP, Thanos S, Aguayo AJ**: Axonal regeneration and synapse formation in the superior colliculus by retinal ganglion cells in the adult rat. *J Neurosci* 7: 2894—2909, 1987.
- 24) **Carter DA, Bray GM, Aguayo AJ**: Regenerated retinal ganglion cell axons can form well-differentiate synapses in the superior colliculus of adult hamsters. *J Neurosci* 9: 4042—4050, 1989.
- 25) **Wakakura M, Foulds WS**: Laminin expressed by cultured Müller cells stimulates growth of

- retinal neurites. *Exp Eye Res* 48: 577—582, 1989.
- 26) **Kleitman N, Wood P, Johnson MI, Bunge RP**: Schwann cell surface but not extracellular matrix organized by Schwann cells support neurite outgrowth from embryonic rat retina. *J Neurosci* 8: 653—663, 1988.
 - 27) **Sievers J, Hausmann B, Unsicker K, Berry M**: Fibroblast growth factors promote the survival of adult rat retinal ganglion cells after transection of the optic nerve. *Neurosci Lett* 76: 157—162, 1987.
 - 28) **Carmignoto G, Maffei L, Candeo P, Canella R, Comelli C**: Effect of NGF on the survival of rat retinal ganglion cells following optic nerve section. *J Neurosci* 9: 1263—1272, 1989.
 - 29) **Johnson JE, Barde Y-A, Schwab M, Thoenen H**: Brain-derived neurotrophic factor supports the survival of cultured rat retinal ganglion cells. *J Neurosci* 6: 3031—3038, 1986.
 - 30) **Horie H, Ito S, Takano M**: Regional difference in neurite regeneration of postnatal mouse retinal explants. *Brain Res Bull* 34: 381—384, 1994.
 - 31) **Weidman TA, Kuwabara T**: Postnatal development of the rat retina. *Arch Ophthalmol* 79: 470—484, 1968.
 - 32) **Lam K, Jervie A, Bennett MR**: Loss of axons from the optic nerve of the rat during early postnatal development. *Dev Brain Res* 3: 487—491, 1982.
 - 33) **Beale R, Osborne N**: Localization of the Thy-1 antigen to the surfaces of rat retinal ganglion cells. *Neurochem Int* 4: 584—595, 1982.
 - 34) **Barnstale CJ, Drager UC**: Thy-1 antigen: A ganglion cell specific marker in rodent retina. *Neuroscience* 11: 847—855, 1984.
 - 35) **Takano M, Horie H, Takenaka T, Ohno S**: Interleukins enhanced neural regeneration of axotomized retinal ganglion cells in adult mammals. In: R.B. Nussenblatt, et al (Eds): *Adv Ocular Immunology*, Elsevier Science BV, New York: 25—26, 1994.
 - 36) **McMillian MK, Thai L, Hong J-S, O'Callaghan JP, Pennypacker KR**: Brain injury in a dish: A model for reactive gliosis. *Trends Neurosci* 17: 138—142, 1994.
 - 37) **Woodroffe MN, Sarna GS, Wadhwa M, Hayes GM, Loughlin AJ, Tinker A, et al**: Detection of interleukin-1 and interleukin-6 in adult rat brain, following mechanical injury, by *in vivo* microdialysis: Evidence of a role for microglia in cytokine production. *J Neuroimmunol* 33: 227—236, 1991.
 - 38) **Spranger M, Lindholm D, Bandtlow C, Heumann R, Gnahn H, Näher-Noé M, et al**: Regeneration of nerve growth factor (NGF) synthesis in the rat central nervous system: Comparison between the effects of interleukin-1 and various growth factors in astrocyte cultures and *in vivo*. *Eur J Neurosci* 2: 69—76, 1990.
 - 39) **Frei K, Malipiero UV, Leist TP, Zinkernagel RM, Schwab ME, Fontana A**: On the cellular source and function of interleukin-6 produced in central nervous system in viral diseases. *Eur J Immunol* 19: 689—694, 1989.
 - 40) **Kushima Y, Hama T, Hatanaka H**: Interleukin-6 as a neurotrophic factor for promoting the survival of cultured catecholaminergic neurons in a chemically defined medium from fetal and postnatal rat midbrains. *Neurosci Res* 13: 267—280, 1992.
 - 41) **Lindsay RM**: Adult rat brain astrocytes support survival of NGF-dependent and NGF-insensitive neurons. *Nature* 282: 80—82, 1979.
 - 42) **Gage F, Olejniczak P, Armstrong DM**: Astrocytes are important for sprouting in the septohippocampal circuit. *Exp Neurol* 102: 2—13, 1988.
 - 43) **Horie H, Bando Y, Chi H, Takenaka T**: NGF enhances neurite regeneration from nerve-transected terminals of young adult and aged mouse dorsal root ganglia *in vitro*. *Neurosci Lett* 121: 125—128, 1991.
 - 44) **Thanos S, Bähr M, Barde Y-A, Vanselow J**: Survival and axonal elongation of adult rat retinal ganglion cells: *In vitro* effects of lesioned sciatic nerve and brain derived neurotrophic factor. *Eur J Neurosci* 1: 19—26, 1989.
 - 45) **Cohen A, Bray GM, Aguayo AJ**: Neurotrophin-4/5 increases adult rat retinal ganglion cell survival and neurites outgrowth *in vitro*. *J Neurobiol* 25: 953—959, 1994.
 - 46) **Chao MV, Bothwell MA, Ross AH, Koprowski H, Lanahan AA, Buck CR, et al**: Gene transfer and molecular cloning of human NGF receptor. *Science* 232: 518—521, 1986.
 - 47) **Johnson D, Lanahan A, Buck CR, Sehgal A, Morgan C, Mercer E, et al**: Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell* 47: 545—554, 1986.
 - 48) **Klein R, Jing S, Nanduri V, O'Rourke E, Barbacid M**: The *trk* proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell* 65: 189—197, 1991.
 - 49) **Klein R, Nanduri V, Jing S, Lamballe F, Tapley P, Bryant S, et al**: The *trkB* tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and Neurotrophin-3. *Cell* 66: 395—403, 1991.
 - 50) **Ip NY, Ibáñez CF, Nye SH, McClain J, Jones PF, Gies DR, et al**: Mammalian neurotrophin-4: Structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 3060—3065, 1992.
 - 51) **Lamballe F, Klein R, Barbacid M**: *TrkC*, a new member of the *trk* family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell* 66: 967—979, 1991.

- 52) **Horie H, Fukuda N, Bando Y**: Hepatocytes enhance neurite regeneration and survival from transected nerve terminals. *Neuro Report* 2: 521—524, 1991.
- 53) **Horie H, Kadoya T, Inagaki Y, Takano M, Akahori Y, Sakai I**: Liver-derived neuronal activator (LDNA) is different from known neurotrophic factors. *Soc Neurosci Abstr* 21: 34, 1995.
- 54) **Thanos S, Theil H-J**: Regenerative and proliferative capacity of adult human retinal cells *in vitro*. *Graefes Arch Ophthalmol* 228: 369—376, 1990.
- 55) **Takano M, Horie H, Miyata N, Takenaka T, Ohno S**: BDNF enhanced neural regeneration in an aged human retina *in vitro*. *Soc Neurosci Abstr* 21: 547, 1995.
-