

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H05989

研究課題名(和文) 中枢神経の再生関連遺伝子の同定:皮質脊髄路の軸索再生

研究課題名(英文) Identification of regeneration associated gene of central nervous system: axon regeneration of corticospinal tract

研究代表者

角家 健 (KADOYA, KEN)

北海道大学・医学研究科・特任研究助教

研究者番号：30374276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：末梢神経では、いくつかの再生関連遺伝子が同定されているが、中枢神経で同様の報告はない。本研究は、転写因子cJunが末梢神経と同様に、中枢神経でも再生関連遺伝子であるか検討した。中枢神経である皮質脊髄路軸索が移植細胞内へと再生するモデルを使用し、cJunの発現を操作したが、軸索再生の程度は変化しなかった。このことは、cJunは皮質脊髄路の再生関連遺伝子ではなく、また、中枢神経の再生メカニズムは、末梢神経と異なることを示している。

研究成果の概要(英文)：Regeneration associated genes are identified in peripheral but not central nervous system. The purpose of the current study is to determine whether transcription factor cJun is the regeneration associated gene of central nervous system. cJun expressions were manipulated in the experimental model, in which corticospinal tract axons regenerated into grafted cells. Regulation of cJun did not affect the extent of regeneration of corticospinal axons at all, indicating that cJun is not the regeneration associated gene of corticospinal axons and that the central nervous system does not share the mechanism of regeneration with peripheral nervous system.

研究分野：整形外科

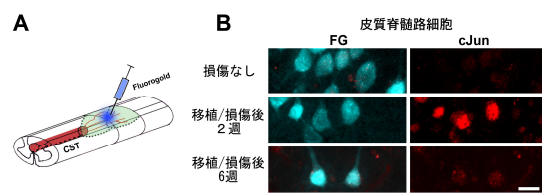
キーワード：軸索 脊髄損傷 再生

1. 研究開始当初の背景

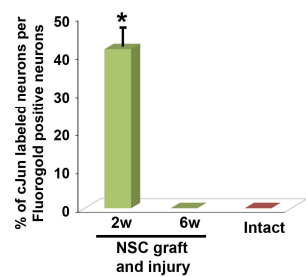
(1) 末梢神経と比較して、中枢神経の軸索再生能力は著しく乏しい。末梢神経では、いくつかの再生関連遺伝子が同定されているが、中枢神経での同様の報告はない。中枢神経の再生関連遺伝子が同定できれば、中枢神経の再生能を向上させる方法の開発につながる。

(2) 申請者は最近、脊髄由来の神経幹細胞を脊髄損傷部に移植することで、中枢神経である皮質脊髄路軸索が、旺盛に再生することを発見した。また、その軸索再生に関連する遺伝子の候補として、転写因子 cJun が同定された(図1)。

図1: CST 細胞は軸索再生の際に cJun を発現



C cJun labeled CST neurons



している (A) 移植した神経幹細胞に Fluoro-gold (FG) を注入し、再生中の CST 細胞を逆行性に標識した。(B) 大脳皮質の cJun 免疫染色。損傷が無い場合、CST 細胞に cJun の発現を認めないが、細胞移植後 2 週時のみ、多くの CST 細胞が cJun の発現を上昇させた。(C) cJun 陽性細胞の定量結果。*, P<0.05

(3) cJun は末梢神経の再生関連遺伝子であり、中枢でも同様の役割を担っていると仮説を立てた。本研究の目的は、転写因子 cJun の皮質脊髄路の軸索再生に関する役割を解明し、その発現を操作することで、脊髄損傷後の皮質脊髄路の軸索再生を促進させることである。

2. 研究の目的

(1) 転写因子 cJun は皮質脊髄路の軸索再生に必要な明らかにする。

(2) 転写因子 cJun の活性亢進は皮質脊髄路の軸索再生を促進するか明らかにする。

3. 研究の方法

(1) cJun の発現を抑制する、dominant-negative form (DN-cJun) と

control の 2 種類の遺伝子に、赤色蛍光蛋白 (RFP) を reporter-gene として有する adeno-associated virus 8 (AAV8) を作成した。これら AAV をラット大脳運動野に注入し、皮質脊髄路神経細胞に遺伝子導入を行ったのち、1 週間後に第 4 頸髄の部分損傷部に GFP 陽性の胚性脊髄から作成した神経幹細胞を移植した。移植後約 8 週で還流固定し、GFP 陽性細胞内にある RFP 陽性軸索を再生軸索として定義し、軸索再生の程度を定量した。(図 2)

(2) wild type (WT-cJun)、constitutively active form (CA-cJun)、control の 3 種類の遺伝子に、RFP を reporter-gene として有する AAV8 を作成した。第 4 頸髄の部分損傷部に GFP 陽性の胚性脊髄から作成した神経幹細胞を移植し、1 週間後に、AAV をラット大脳運動野に注入して、皮質脊髄路神経細胞の cJun 発現を上昇させた。細胞移植後約 8 週で還流固定し、GFP 陽性細胞内にある RFP 陽性軸索を再生軸索として定義し、軸索再生の程度を定量した。

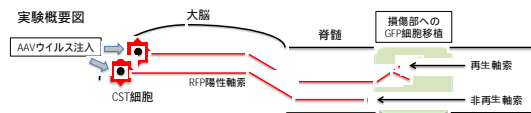


図2: 実験概要

4. 研究成果

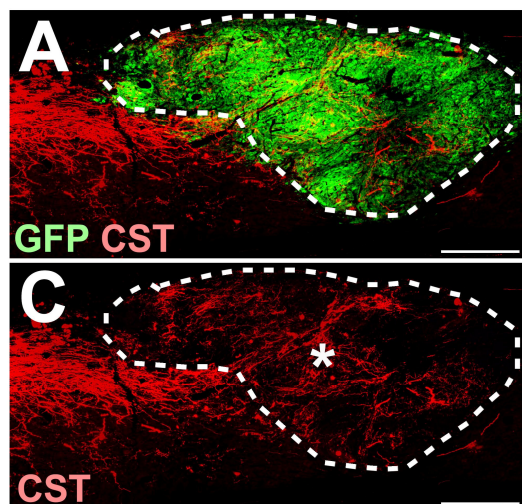
(1) AAV 注入 1 週間後の大脳皮質を cJun に対する免疫染色で評価すると、DN-cJun 群は control 群と比較して、RFP 陽性神経細胞の cJun の発現を有意に低下させていた。しかし、皮質脊髄路軸索の移植細胞内への軸索再生量は control と比較して、有意な差を認めなかった(図3)。

(2) 移植後 8 週の大脳皮質を cJun に対する免疫染色で評価すると、control 群では、RFP 陽性神経細胞における cJun の発現をほとんど認めなかったにも関わらず、WT-cJun 群と CA-cJun 群では、ほとんどの RFP 陽性神経細胞は cJun の発現を認めた。しかし、WT-cJun と CA-cJun 群の皮質脊髄路軸索の移植細胞内への軸索再生量は control 群と比較して、有意な差を認めなかった。

(3) まとめと考察

本研究において、皮質脊髄路神経細胞の転写因子 cJun の発現を、AAV の使用により制御することができた。軸索損傷後 1 週で cJun の発現は上昇するが、AAV による DN-cJun の遺伝子導入によって、抑制することができた。また、軸索損傷後 8 週で cJun の発現は低下しているが、WT-cJun と CA-cJun によって、上昇を維持することができた。

図3 : RFP で標識された皮質脊髄路軸索(CST) が GFP 陽性の移植細胞内へと再生する様子。



しかし、これらの cJun の発現制御にも関わらず、皮質脊髄路軸索の移植細胞内への軸索再生量はまったく影響を受けなかった。これらのことより、当初の仮説と異なり、cJun は中枢神経の再生関連遺伝子ではないことが判明した。

これらの結果は、末梢神経の再生関連遺伝子は、必ずしも中枢神経の再生関連遺伝子ではなく、末梢神経と中枢神経の軸索再生機序は大きく異なることが示唆された。今後、中枢神経の再生方法の確立のためには、末梢神経の再生方法を中枢神経に応用するよりも、中枢神経が再生するモデルの詳細な検討が重要と考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Adler A, Lee-kubli C, Kumamaru H, Kadoya K, M Tuszynski. Comprehensive monosynaptic rabies virus mapping of host connectivity with neural progenitor grafts after spinal cord injury. Stem Cell Rep. 2017 April. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.04.004. 査読有り

Iwata A, Takahata M, Kadoya K, Sudo H, Kokabu T, Yamada K, Iwasaki N. Effective Repair of Dural Tear Using Bioabsorbable Sheet with Fibrin Glue. Spine 2017 Jan 31. doi: 10.1097/BRS.0000000000002095. 査読有り

Kadoya K, Lu P, Nguyen K, Lee-Kubli C, Yao L, Poplawski G, Dulin J, Takashima Y, Biane J, Conner J, Zhang S, Tuszynski MH. Robust corticospinal regeneration enabled by spinal cord reconstitution with homologous neural grafts. Nat Med. 2016, May;22(5):479-87. doi: 10.1038/nm.4066.

査読有り

〔学会発表〕(計16件)

Kadoya K, Neural Progenitor Cells Overcome Extrinsic Inhibitors and Extend Axons in Chronically Injured Spinal Cord The annual meeting of the Orthopaedic Research Society, March 21 in 2017, San Diego, U.S.A

角家健、脊髄損傷の実験モデルについて、第6回脊髄再生と疼痛を語る夕べ、2017年2月17日、東京都、ホテルニューオータニ東京

Kadoya K, Axon Regeneration by Homologous Tissue Reconstitution. RIES-Hokudai International symposium, December 14 in 2016, Hokkaido Sapporo, Chateraise Gateaux Kingdom Sapporo

角家健、慢性期の脊髄損傷部に移植された神経幹細胞からの旺盛な軸索伸展 第51回日本脊髄障害医学会、2016年11月10日、千葉県・幕張市、幕張メッセ

角家健、神経幹細胞移植による脊髄損傷治療、第31回日本整形外科学会基礎学術集会、2016年10月14日、福岡県・福岡市、福岡国際会議場

角家健、慢性期脊髄損傷への神経幹細胞移植 第131回北海道整形災害外科学会、2016年6月5日、北海道・函館市、函館アリーナ

角家健、神経幹細胞移植による脊髄損傷後の巧緻運動機能回復、第89回日本整形外科学会学術集会、2016年5月12日、神奈川県・横浜市、パシフィコ横浜

角家健、脊髄損傷・末梢神経損傷に関する最近の知見 Monday Orthopedics Seminar、2016年4月18日、北海道・札幌市、京王プラザホテル札幌

Kadoya K, Spinal cord derived neural progenitor cell grafts induce corticospinal regeneration and improve forelimb function after spinal cord injury, 第45回日本脊椎脊髄病学会学術集会、2016年4月14日、千葉県・幕張市、幕張メッセ

Kadoya K, Spinal cord reconstitution with homologous neural grafts enables robust corticospinal regeneration. CiRA / ISSCR International Symposium, March 23 in 2016, Kyoto, Kyoto University Clock Tower Centennial Hall

角家健、神経幹細胞移植による脊髄損傷後の巧緻運動機能回復、第130回北海道整形災害外科学会、2016年2月6日、北海道・旭川市、大雪アリーナ

角家健、神経幹細胞移植による皮質脊髄路軸索再生、第50回日本脊髄障害医学会、2015年11月20日、東京都、グランドプリンスホテル高輪

角家健、神経幹細胞移植による皮質脊髄路

軸索再生 第 30 回日本整形外科基礎学術集会、2015年10月22日、富山県・富山市、富山国際会議場

Kadoya K, Corticospinal axon regeneration by neural progenitor cell grafts. The 38th Annual meeting of the Japan Neuroscience Society. 2015年7月30日、兵庫県・神戸市、神戸国際会議場

角家健、神経幹細胞移植による皮質脊髄路軸索再生 第129回北海道整形災害外科学会 2015年6月13日、北海道・札幌市、北海道大学学術交流会館

角家健、脊髄損傷に関する最近の知見：基礎研究から臨床応用まで Current Topics in Spine Surgery、2015年4月24日、北海道・札幌市、ロイトン札幌ホテル

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

〔その他〕
とくになし

6. 研究組織

(1)研究代表者

角家 健 (KADOYA, Ken)
北海道大学・医学研究科・特任研究助教
研究者番号：30374276

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者

Daniel Gibbs
Dept. of Neurosciences, University of California, San Diego

Mark Tuszynski
Dept. of Neurosciences, University of California, San Diego

Hans Stobl
Dept. of Neurosciences, University of California, San Diego

遠藤 健 (ENDO, Takeshi)
北海道大学・医学研究科・大学院生