

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18791319

研究課題名 (和文) p21 遺伝子のシュワン細胞における役割、及び治療への応用

研究課題名 (英文) A role of p21cip1/waf1 in Schwann cell-application to the treatment of peripheral nerve injury.

研究代表者

富田 興一 (TOMITA KOICHI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：90423178

研究成果の概要：

末梢神経軸索が損傷を受けた際、様々な neuronal regeneration-associated genes (RAG) の誘導がニューロン、シュワン細胞においておこり、軸索再生を制御していることが明らかになってきた。我々は過去に cDNA microarray にて p21 遺伝子 (p21) を RAG 候補としてピックアップし、その再生神経軸索径拡大への関与を報告した。しかし、今回の p21KO マウスを用いた研究で再ミエリン化に関しては有意な関与を認めなかったため、p21 と同様に Rho kinase シグナル系に属する p75 遺伝子 (p75) に着目した。p75 のミエリン化における働きを in vivo において解析する目的で、p75 欠損マウスより採取したシュワン細胞を同種移植したモデルを作成した。このモデルの利点として、p75 欠損神経細胞からの影響を排除し、シュワン細胞のみにおける p75 の解析ができる事が挙げられる。p75 欠損神経移植群における移植神経内平均再生軸索径及びミエリンの厚さの評価では、p75 欠損神経において有意に小さい値を示した。また神経伝導速度の評価においても p75 欠損神経移植群においてコントロール群と比較してその回復は有意に阻害された。また、足跡分析による坐骨神経機能評価 (SFI) においても同様に p75 欠損神経移植群においてその回復が有意に阻害された。これらの結果よりシュワン細胞における p75 は、軸索径やミエリンの厚みの増大、すなわち再生軸索の成熟に関わっている可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,400,000	0	1,400,000
2007年度	1,000,000	0	1,000,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	300,000	3,700,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：神経再生、シュワン細胞、p21、p75、坐骨神経、同種移植

## 1. 研究開始当初の背景

末梢神経系は中枢神経系に比べて比較的良好な再生を示す。しかしながら、末梢神経損傷後の機能回復は現在のマイクロサージャリーの技術を以ってしても依然満足のものではない。更なる治療成績向上のためには技術的な改良のみでは限界があると考えられ、今後は分子生物学的アプローチが必須となってゆくと思われる。最近の研究により神経軸索が損傷を受けた際、その軸索再生の程度はニューロトロフィン等の細胞外因子の変化によりある程度制御されることが知られている。近年、それらの他に様々な細胞内因子 neuronal regeneration-associated genes (RAG) の誘導がニューロン、グリア細胞においておこり、軸索再生を制御していることが明らかになってきた。これら因子を同定、機能解析していくことが新たな治療法、創薬へとつながっていくと考えられる。

## 2. 研究の目的

これまでの研究で RAG として候補に挙げられている p21 遺伝子 (p21) と同様に Rho-kinase シグナル系に属する p75 遺伝子 (p75) の RAG としての機能、特に末梢神経系グリア細胞であるシュワン細胞における機能を、p75 欠損マウス、及び我々が独自に開発した同種神経移植モデルを用いて in vivo にて解析する。

## 3. 研究の方法

約 8 週齢の雄 p75 欠損マウス及び野生型マウスそれぞれより約 1 センチの坐骨神経を採取した。その後ヌードマウスの片側坐骨神経において約 1 センチの欠損を作成し、それぞれの神経グラフトを欠損部へ移植した。術後経時的に足跡分析 (SFI) による坐骨神経機能回復の評価を行った。術後 10 週目において再生神経の刺激伝導速度を測定し、グラフト遠位部を採取。同時に近位部断端より逆行性神経トレーサーであるフルオロゴールドを注入後、48 時間目に還流固定し、脊髄を採取。脊髄前角細胞においてラベルされた神経細胞を蛍光顕微鏡下観察した。グラフトより採取した神経は抗 S100 抗体、抗 p75 抗体免疫染色にて p75 欠損マウス及び野生型マウス由来シュワン細胞をそれぞれ観察し、さらにト

ルイジンブルー染色にて形態組織学的に評価を行った。

## 4. 研究成果

移植神経内におけるシュワン細胞の数を抗 S100 抗体による免疫染色にて評価したところ、p75 欠損神経とコントロール神経間に有意な差を認めなかった。この結果より、移植時における移植神経内シュワン細胞数は p75 欠損神経移植群、コントロール群において同等であると考えた。p75 欠損神経移植群における移植神経内再生軸索数の評価では p75 欠損神経移植群、コントロール群の間において有意差を認めなかった。しかしながら、平均軸索径及びミエリンの厚さにおいては p75 欠損神経において有意に小さい値を示した。またこれらの結果を裏付けるように、神経伝導速度の評価においても p75 欠損神経移植群においてコントロール群と比してその回復は有意に阻害された。また、足跡分析による坐骨神経機能評価においても同様に p75 欠損神経移植群においてその回復が有意に阻害された。これらの結果よりシュワン細胞における p75 遺伝子は、軸索径やミエリンの厚みの増大、すなわち再生軸索の成熟に関わっている可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Matsuda Ken. Kakibuchi Masao. Kubo Tateki. Tomita Koichi. Fujiwara Toshihiro. Hattori Ryo. Yano Kenji. Hosokawa Ko., A new model of end-to-side nerve graft for multiple branch reconstruction: end-to-side cross-face nerve graft in rats, Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery, 61(11), 1357-1367, 2008, 査読有
- ② Fujiwara Toshihiro. Kubo Tateki. Koyama Yoshihisa. Tomita Koichi. Yano Kenji. Tohyama Masaya. Hosokawa Ko., mRNA expression changes of slit proteins

following peripheral nerve injury in the rat model, *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 36(3-4), 170-176, 2008, 査読有

③ Koyama Yoshihisa. Fujiwara Toshihiro. Kubo Tateki. Tomita Koichi. Yano Kenji. Hosokawa Ko. Tohyama Masaya., Reduction of oligodendrocyte myelin glycoprotein expression following facial nerve transection, *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 36(3-4), 209-215, 2008, 査読有

④ 富田興一、久保盾貴、細川互、ミエリン関連蛋白質 MAG は軸索分枝を抑制し末梢神経再生の質を向上させる、日本形成外科学会誌、28 巻 5 号、307~314、2008、査読有

⑤ 久保盾貴、松田健、藤原敏宏、富田興一、矢野健二、細川互、【神経端側縫合】神経端側縫合の基礎研究 端側縫合を用いた神経移植と axonal supercharging technique への応用、日本マイクロサージャリー学会誌、21 巻 3 号、249~255、2008、査読有

⑥ Tomita Koichi. Kubo Tateki. Matsuda Ken. Fujiwara Toshihiro. Kawai Kenichiro. Masuoka Takeshi. Yano Kenji. Hosokawa Ko., Nerve bypass grafting for the treatment of neuroma-in-continuity: an experimental study on the rat, *Journal of Reconstructive Microsurgery.*, 23(3), 163-171, 2007, 査読有

⑦ Tomita Koichi. Kubo Tateki. Matsuda Ken. Hattori Ryo. Fujiwara Toshihiro. Yano Kenji. Hosokawa Ko., Effect of conduit repair on aberrant motor axon growth within the nerve graft in rats, *Microsurgery.*, 27(5), 500-509, 2007, 査読有

⑧ Tomita Koichi. Kubo Tateki. Matsuda Ken. Fujiwara Toshihiro. Yano Kenji. Winograd Jonathan M. Tohyama Masaya. Hosokawa Ko., The neurotrophin receptor p75NTR in Schwann cells is implicated in remyelination and motor recovery after peripheral nerve injury, *Glia*, 15:55(11), 1199-1208, 2007, 査読有

⑨ Fujiwara Toshihiro. Matsuda Ken. Kubo Tateki. Tomita Koichi. Hattori Ryo. Masuoka Takeshi. Yano Kenji. Hosokawa Ko., Axonal supercharging technique using reverse end-to-side neuroorrhaphy in peripheral nerve repair: an experimental study in the rat model, *Journal of Neurosurgery*, 107(4), 821-829, 2007, 査読有

⑩ Tomita Koichi. Kubo Tateki. Matsuda Ken. Yano Kenji. Tohyama Masaya. Hosokawa Ko., Myelin-associated glycoprotein reduces axonal branching and enhances functional recovery after sciatic nerve transection in rats, *Glia*, 55(14), 1498-507, 2007, 査読有

[学会発表] (計 5 件)

① 富田興一、久保盾貴、波多祐紀、藤山浩、藤原敏宏、矢野健二、細川互、Nerve predegeneration におけるシュワン細胞遊走能の検討—侵入マクロファージとの関連、第 17 回日本形成外科学会基礎学術集会、東京、2008 年 10 月 2 日

② 富田興一、久保盾貴、藤原敏宏、波多祐紀、矢野健二、細川互、神経系特異的蛍光マウスを用いた損傷後末梢神経再生動態の解析、第 17 回日本形成外科学会基礎学術集会、東京、2008 年 10 月 3 日

③ 富田興一、久保盾貴、服部亮、波多祐紀、藤原敏宏、矢野健二、細川互、過剰軸索分枝抑制による混合神経損傷後機能回復の促進、第 16 回日本形成外科学会基礎学術集会、神戸、2007 年 10 月 12 日

④ 富田興一、久保盾貴、松田健、藤原敏宏、矢野健二、細川互、シュワン細胞 p75 遺伝子は末梢神経再生における再ミエリン化及び運動機能回復を促進する、第 15 回日本形成外科学会基礎学術集会、埼玉、2006 年 10 月 13 日

⑤ 富田興一、松田健、久保盾貴、升岡健、服部亮、矢野健二、細川互、自家神経バイパスグラフトによる神経腫の治療：ラットモデルを用いた研究、第 15 回日本形成外科学会基礎学術集会、埼玉、2006 年 10 月 13 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富田 興一 (TOMITA KOICHI)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：90423178

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし