

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02524

研究課題名（和文）上皮組織損傷をスイッチとして稼働する神経依存性の新たな創傷治癒メカニズム

研究課題名（英文）Nerve-dependent tissue repair mechanism after damage

研究代表者

桐生 寿美子（瀬尾寿美子）（Sumiko, Kiryu-Seo）

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：70311529

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,200,000円

研究成果の概要（和文）：神経損傷応答遺伝子探索の中から発見した分子DINE（Damage-induced neuronal endopeptidase）は、中枢・末梢神経系の様々な神経損傷に応答し発現誘導されるユニークな特徴を持つ。皮膚などの上皮組織損傷はそこに豊富に分布する知覚神経を同時に障害する。組織損傷をスイッチとして傷ついた神経で発現誘導されるDINEは、ペプチド切断を介して周囲の損傷微小環境を神経制御し組織修復を促すことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経精神疾患や生活習慣病など多くの疾患研究から脳・神経と臓器とが密接に関係することが近年次第に明らかになりつつあるが、組織・臓器の修復がいかにより神経によって制御されるのかそのメカニズムは不明である。神経損傷応答性を利用したDINEによる神経依存性創傷治癒機構は組織修復時に問題となる瘢痕形成を回避するための新たなメカニズムと考えられ、この分子を標的とした創薬や再生医療への発展が期待される。

研究成果の概要（英文）：Damage-induced neuronal endopeptidase (DINE) is a unique molecule which responds to various kinds of neuronal injuries both in CNS and PNS. Tissue injury such as skin injury is accompanied by the damage of sensory nerves, which abundantly distributed in skin. After tissue damage, injury-induced DINE might regulate the microenvironment through its cleaved peptide to promote tissue repair in a nerve-dependent manner.

研究分野：神経科学

キーワード：組織修復 神経再生 ペプチド プロテアーゼ 神経制御

様式 C-19、F-19-1、Z-19(共通)

1. 研究開始当初の背景

神経損傷応答遺伝子探索の中から我々が独自に単離・同定し命名した分子 DINE (Damage-induced neuronal endopeptidase)は、中枢・末梢神経系の様々な損傷に応答し発現誘導されるユニークな特徴を持つ。DINE は神経細胞特異的な膜一回貫通型のメタロプロテアーゼであり、脳内アミロイドβの分解酵素である neprilysin と同じファミリーに属することからニューロペプチドの分解・生成を介して損傷神経細胞の修復を担う可能性が高い。ここ数年の我々の研究で DINE は損傷神経細胞の軸索再生を促す高いポテンシャルを有することが次第に明らかになってきた。こうした従来の古典的な損傷神経修復に加えて、DINE はその神経損傷応答性を利用して損傷組織・臓器の修復にも関与するのではないかと考えた。これまで皮膚など創傷治癒のメカニズムは免疫学や皮膚科学分野を中心に精力的に研究されてきた。しかし、神経依存性に創傷部位微小環境を局所あるいは全身性に制御するという考えに基づいたアプローチはほとんど行われていなかった。近年神経精神疾患や生活習慣病など多くの疾患は脳・臓器間クロストークの破綻と密接に関わることが明らかになっており、このクロストークのメディエーターとしてニューロペプチドが注目されている。我々はニューロペプチド生成・分解酵素である DINE が上皮組織損傷をスイッチとして神経依存性に創傷治癒を制御するメカニズムが存在するのではないかと考えた。神経損傷応答という従来とは全く異なる切り口からのアプローチが組織・臓器修復を神経制御するメカニズム解明の突破口となると期待されることから本研究を計画した。

2. 研究の目的

様々な神経損傷に応答し発現誘導される DINE は神経細胞特異的膜一回貫通型メタロプロテアーゼとして我々が単離・同定した分子である。我々が作製した DINE 欠損(KO)マウスは加齢とともに角膜白濁や皮膚創傷脱毛を高い頻度で示し、それら組織で顕著な繊維化や免疫細胞浸潤を示した。角膜や皮膚などの上皮組織は外界との境界を構成する生体バリアであり、日常的な刺激や外傷などの損傷を受けると免疫応答ネットワークの活性化、続いて幹細胞ニッチから新たな角質細胞形成が促進され整然とオーガナイズされた損傷治癒プロセスを進行させる。DINE の発現は元来上皮組織およびここに豊富に分布する知覚神経では認められない。しかし、上皮組織損傷に伴い損傷を受けた知覚神経で DINE の発現が誘導される。従って DINE KO マウスでは日常的な上皮損傷に対し創傷治癒を制御する神経調節機構が破綻しており、加齢に伴い損傷に対する脆弱性が表面化し結果として角膜炎や皮膚創傷増悪へ至ると考えられた。このことから“上皮組織損傷をスイッチとして損傷知覚神経で発現誘導した DINE は切断したペプチドを介して損傷環境を神経依存性に制御するのではないか”というアイデアが浮上し、本研究はこうした仮説を検証し神経損傷応答分子 DINE による新たな創傷治癒メカニズムの理解を目指した。

3. 研究の方法

これまでの研究から、DINE を培養細胞で過剰発現あるいはノックアウトしても明らかな表現系が認められないが、DINE 遺伝子組換えマウスでは認められることが明らかになっている。そこで本研究では *in vivo* での解析を優先的に進めるためのツールとして複数の遺伝子組換えマウスを作製し実験に用いた。

(1) 各種遺伝子組換えマウスの作製

① 成熟型コンベンショナル DINE ノックアウトマウス(DINE KO)マウス

コンベンショナル DINE KO マウスは胎児期運動ニューロンの発達不全により生直後死に至る。これを回避するため Hb9 プロモーターを用いて胎児期運動ニューロンで一過性に DINE を過剰発現するマウスを作製し、この DINE トランスジェニックマウスとコンベンショナル DINE KO マウスとを交配し成熟可能な DINE KO マウスを得た。

② 成熟型 DINE 変異マウス

損傷神経細胞で発現誘導する DINE が細胞体、軸索末端いずれで機能するのか明らかにするため DINE 変異マウスを作製した。DINE の C 末アミノ酸変異は、DINE を発現するものの軸索輸送が阻害されることを我々のグループは以前突き止めた。この変異を有するマウスはコンベンショナル DINE ノックアウトマウス同様に生直後に死に至る。このため DINE 変異マウスと胎児期運動ニューロンで一過性に DINE を過剰発現するトランスジェニックマウスとを交配し成熟型 DINE 変異マウスを得た。

③ 神経損傷特異的 DINE ノックアウト(DINE CKO)マウス

損傷神経細胞特異的 cre マウスである *Atf3*:BAC Tg マウスと CRISPR-Cas9 を用いて作製した DINE-flox マウスを交配し損傷応答性を有する DINE CKO マウスを作製した。このマウスを用いることで、損傷を受けた神経細胞のみで DINE の発現を OFF することが可能となった。*Atf3*:BAC Tg マウスは cre recombinase 発現と同時にミトコンドリアを GFP 標識するマウスであり本実験のコントロールマウスとして使用した。

(2) 皮膚損傷モデル

耳介に穴を開け、その閉塞や穴周囲組織の神経再生の速度を定量した。

(3) 損傷知覚神経培養

Atf3:BAC Tg マウスと DINE CKO マウスの坐骨神経損傷後、神経再生へ向けてのポテンシャルが上昇した後根神経節 (DRG) ニューロンを回収し数日間培養し、神経突起の伸展および分岐パターンを測定した。共培養実験では、損傷微小環境に局在する代表的な細胞であるマクロファージや好中球を DRG ニューロンに加え培養を行った。

(4) 損傷神経断端の三次元可視化

Atf3:BAC Tg および DINE CKO マウスでは損傷神経細胞およびその軸索のみが GFP で標識される。これを利用し損傷神経を摘出し組織切片を作製することなく損傷神経断端を3次元で観察した。

(5) シングルセル RNA 解析

Atf3:BAC Tg マウスと DINE CKO マウスの坐骨神経損傷後、損傷神経末端の微小領域を回収しシングルセルを調整した。神経組織はミエリンデブリスを含む煩雑物が極めて多いことから FACS AriaII セルーターを用いて生細胞を選別しシングルセル RNA 解析を行った。

4. 研究成果

(1) DINE は損傷神経末端で機能し組織修復を促す

DINE KO マウスでは、加齢に伴い損傷に対する脆弱性が表面化し結果として角膜炎や皮膚創傷が認められる。このことから DINE の神経損傷応答性が神経依存性の組織修復に関与するのではないかと考えられた。そこでまず、上皮組織損傷に対する組織修復能を野生型マウスと DINE KO マウスとで比較検討した。その結果、DINE KO マウスでは組織修復が遅延することが明らかになった。KO マウスでは組織損傷によって傷つけられた感覚神経の再生が遅延することから、DINE は損傷神経再生を促すことで組織修復を促すことが示唆された。次に、損傷を受けた神経で発現誘導された DINE が損傷神経細胞内のどの部位で機能するか明らかにする必要があった。このため、1アミノ酸置換により DINE タンパクは発現するにも関わらず細胞体に留まり軸索末端へ輸送されない変異 DINE ノックアウトマウスを作製した。共同研究により、この DINE 変異タンパクの活性部位についてコンピューターモデリング解析を行ったところ、構造的に野生型 DINE タンパクとほぼ同様の活性中心を保持することが明らかになった。この DINE 変異マウスではノックアウトマウスと同様に組織修復に必要な感覚神経再生が遅延することが明らかになった。従って損傷に応答して発現誘導された DINE は損傷軸索末端で機能し神経再生・組織修復を促すと考えられた。

(2) 損傷神経細胞で発現誘導される DINE が組織修復に貢献する

これまで実験に使用してきたコンベンショナル DINE KO マウスは発生過程や通常の神経活動に何らかの影響を及ぼす可能性が否定できないため、損傷神経細胞特異的 DINE CKO マウスの作製に踏み切った。損傷神経細胞特異的 cre マウスである *Atf3*:BAC Tg マウスと CRISPR-Cas9 を用いて作製した DINE-flox マウスを交配し損傷応答性を有する DINE CKO マウスを作製した。*Atf3*:BAC Tg マウスおよび DINE flox マウスいずれも独自に我々が作製したマウスであることから、まず DINE CKO マウスの損傷応答性について確認した。神経損傷後時間経過を追って損傷ニューロンでの DINE の発現および GFP 発現を免疫染色にて確認した結果、損傷後比較的早い時期から DINE 発現が OFF されはじめ、様々な遺伝子や細胞動態に変化の認められる損傷後 5-7 日目には DINE 発現はほとんど認められなかった。組織修復に関しても従ってこのマウスが本実験計画に極めて有用なマウスであることが明らかになった。他の神経や他の組織ではなく、損傷知覚神経で発現誘導された DINE が組織修復を促すことがクリアに証明された。

(3) DINE を欠損した損傷神経断端は周囲損傷微小環境との適切な相互作用を構築できない

これまでの神経再生研究から、損傷神経細胞が再生するためには神経細胞自身の潜在的再生能力と周囲細胞により形成される supportive な環境が必要と考えられている。損傷神経末端で基質となるペプチドを切断することで DINE がオートクライン様に損傷神経自身に作用し再生を促すのか、あるいは周囲細胞と相互作用して軸索周囲の損傷環境を整備し再生を促すのかを明らかにしたいと考えた。まず DINE が発現誘導された損傷感覚神経細胞を回収し非神経細胞との相互作用のない神経細胞単独での培養を行い、神経突起の伸展や分岐を野生型マウスと DINE CKO マウスとで比較検討した。その結果いずれのマウス由来の損傷感覚神経細胞も同様に神経突起伸展や分岐を示しており、損傷神経細胞自身の軸索伸展能力は CKO でも保たれていることが明らかになった。一方、マウス個体では損傷神経断端の形態が野生型マウスと DINE CKO マウスとでは明らかに異なっていた。通常再生する軸索断端には成長円錐が認められるが、CKO マウスの損傷軸索断端では再生できない損傷中枢神経の特徴として知られる retraction bulb 様の構造が認められ、軸索伸展の方向が乱れることが明らかになった。DINE が損傷微小環境では発現せず損傷神経細胞でのみ発現することを考慮すると、CKO では損傷軸索断端に局在する DINE によるペプチド切断が起こらないため、軸索を伸展させる適切な微小環境が整備されない可能性が示唆された(図1)。

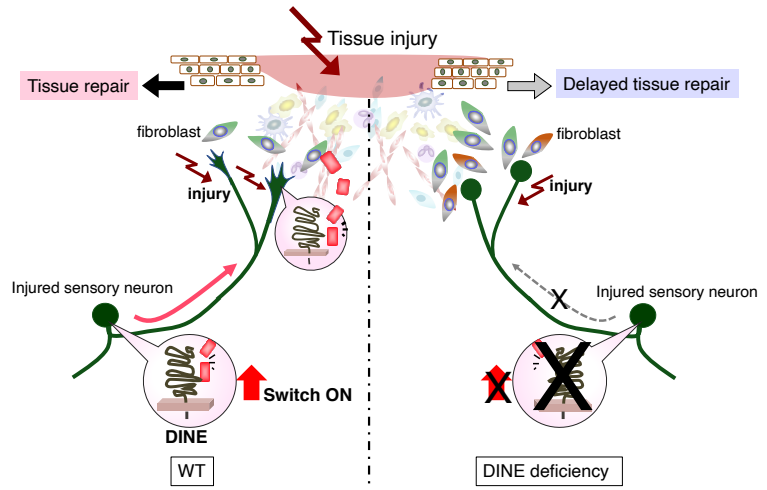


図 1. DINE は神経依存性組織修復を促す

(4) DINE による損傷微小環境制御

次に、DINE が損傷微小環境のどの細胞集団に影響を及ぼすのか明らかにしたいと考えた。実験開始当初、好中球などの免疫細胞が標的細胞ではないかと考え、損傷知覚神経細胞との共培養実験を進めていた。しかし損傷微小環境は免疫細胞以外にも多くの複雑な細胞集団から構成されている。そこでこれら細胞を個別に探索・解析するためコントロールマウスと損傷特異的 DINE 欠損マウスの損傷神経断端から損傷微小環境の細胞を回収しシングルセル RNA seq を行った。その結果、損傷軸索断端に輸送される DINE は、そこで新たに誘導されるタイプの fibroblast の動態を制御する可能性が示唆された。fibroblast は組織修復を阻害する瘢痕形成の主要細胞である。このことは、組織損傷により傷ついた神経で発現誘導される DINE は、損傷微小環境で fibroblast の細胞動態を適切に制御し組織修復を促すことを示唆する。従って神経損傷に応答する DINE を介した神経依存性創傷治癒メカニズムは中枢神経損傷を含めた組織修復の際に問題となる瘢痕形成を回避するための巧妙なメカニズムである可能性が明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tamada H, Kiryu-Seo S, Sawada S, Kiyama H.	4. 巻 529
2. 論文標題 Axonal injury alters the extracellular glial environment of the axon initial segment and allows substantial mitochondrial influx into axon initial segment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Comp Neurol	6. 最初と最後の頁 3621-3632
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cne.25212	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Koinuma S, Negishi R, Nomura R, Sato K, Kojima T, Segi-Nishida E, Goitsuka R, Iwakura Y, Wada N, Koriyama Y, Kiryu-Seo S, Kiyama H, Nakamura T.	4. 巻 157
2. 論文標題 TC10, a Rho family GTPase, is required for efficient axon regeneration in a neuron-autonomous manner.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Neurochem	6. 最初と最後の頁 1196-1206
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.15235	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Koshimizu H, Ohkawara B, Nakashima H, Ota K, Kanbara S, Inoue T, Tomita H, Sayo A, Kiryu-Seo S, Konishi H, Ito M, Masuda A, Ishiguro N, Imagama S, Kiyama H, Ohno K.	4. 巻 263
2. 論文標題 Zonisamide ameliorates neuropathic pain partly by suppressing microglial activation in the spinal cord in a mouse model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Life Sci	6. 最初と最後の頁 118577
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lfs.2020.118577	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kiryu-Seo S, Nagata K, Saido TC, Kiyama H.	4. 巻 -
2. 論文標題 New Insights of a Neuronal Peptidase DINE/ECEL1: Nerve Development, Nerve Regeneration and Neurogenic Pathogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurochem Res	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11064-018-2665-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kiryu-Seo S, Kiyama H.	4. 巻 139
2. 論文標題 Mitochondrial behavior during axon regeneration/degeneration in vivo	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurosci Res	6. 最初と最後の頁 42-47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2018.08.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Sumiko Kiryu-Seo, Reika Matsushita, Yoshitaka Tashiro, Ryosuke Takahashi, Takeshi Yoshimura, Yohei Iguchi, Masahisa Katsuno, Hiroshi Kiyama
2. 発表標題 Injured motor neurons lose polarity in a proteasome-dependent manner to increase the mitochondrial transport into regenerative axons
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会・第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Koji Wakatsuki, Masaya Yasui, Sumiko Kiryu-Seo, Hiroshi Kiyama
2. 発表標題 Analysis of pain mechanism in an animal model for the fibromyalgia induced by repeated cold stress
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会・第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長谷川将暉、桐生寿美子、永田健一、木山博資
2. 発表標題 様々な神経損傷に応答するプロテアーゼDINEの損傷運動ニューロン軸索再生効果
3. 学会等名 日本解剖学会第81回中部支部学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 桐生寿美子、木山博資
2. 発表標題 神経損傷に应答した軸索起始部のダイナミクス
3. 学会等名 第64回日本神経化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sumiko Kiryu-Seo, Reika Matsushita, Yoshitaka Tashiro, Ryosuke Takahashi, Takeshi Yoshimura, Yohei Iguchi, Masahisa Katsuno, Hiroshi Kiyama
2. 発表標題 The proteasome-mediated AIS plasticity contributes to the increased transport of mitochondria in damaged motor axon
3. 学会等名 第63回日本神経化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 桐生寿美子、松下鈴佳、田代善崇、高橋良輔、吉村武、井口洋平、勝野雅央、木山博資
2. 発表標題 損傷運動ニューロンの軸索再生・変性に関わるプロテアソーム依存性ストレス応答
3. 学会等名 第10回名古屋大学医学系研究科・生理学研究所合同シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sumiko Kiryu-Seo, Reika Matsushita, Yoshitaka Tashiro, Ryosuke Takahash, Takeshi Yoshimura, Yohei Iguchi, Masahisa Katsuno, Hiroshi Kiyama
2. 発表標題 Injured motor neurons lose polarity in a proteasome dependent manner to increase the mitochondrial transport into regenerative axons
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会/ 第98回日本生理学会大会合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Koji Wakatsuki, Masaya Yasui, Sumiko Kiryu-Seo, Hiroshi Kiyama
2. 発表標題 Analysis of pain mechanism in an animal model for the fibromyalgia induced by repeated cold stress
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会/ 第98回日本生理学会大会合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 桐生寿美子、松下鈴佳、島村徹平、高岡裕、木山博資
2. 発表標題 組織損傷にตอบสนองして発現誘導するプロテアーゼDINEは神経依存性に組織修復を促す
3. 学会等名 Neuro2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 桐生寿美子、木山博資
2. 発表標題 神経再生プログラムにより賦活化されるプロテアーゼDINEの新たな可能性
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 桐生寿美子、松下鈴佳、田代善崇、高橋良輔、吉村武、木山博資
2. 発表標題 損傷運動ニューロンにおいてプロテアソームが関わる新たな神経再生メカニズム
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sumiko Kiryu-Seo, Hiroshi Kiyama
2. 発表標題 Mitochondria in the regenerating and degenerating neurons after nerve injury
3. 学会等名 Thr 8th Asia Pacific International Congress of Anatomists (APICA) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 桐生寿美子
2. 発表標題 神経損傷をスイッチとして働く分子DINEが関わる神経再生現象
3. 学会等名 神経発達・再生研究会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------