

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06482

研究課題名(和文) PACを用いた神経再生の検討

研究課題名(英文) Axonal regeneration through Photoactivated adenylyl cyclase

研究代表者

大村 威夫 (Omura, Takao)

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70402295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マウス後根神経節培養神経細胞にPAC遺伝子を導入し細胞を青色LED(450 nm)を照射することにより、PACの活性化を行い、コントロールベクターと軸索伸長、発芽率について比較検討を行った所、PAC遺伝子導入群において有意な軸索伸長と発芽が見られた。続いて視神経損傷モデルを用い、マウス網膜神経節細胞にPAC遺伝子を、AAVベクターを用いて導入し、視神経損傷後の軸索再生をin vivoにて検討したところ、PAC遺伝子導入したマウスにのみじくさくさいせいが 見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳梗塞、脊髄損傷などの中枢神経損傷に対する有効な治療法は確立されておらず、これら疾患から回復することは極めて困難である。我々の研究ではPACを介し、中枢神経の損傷モデルである視神経損傷において軸索再生の促進が見られたことにより、今後中枢神経損傷患者に対する治療の一助となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We overexpressed Photoactivated adenylyl cyclase(PAC) in the DRG sensory neurons through AAV and analyzed axonal growth and neuronal sprouting in comparison with the control AAV. WE found that activation of PAC significantly increased axonal growth and sprouting in the DRG neurons. We next used in vivo optic nerve injury model to see whether PAC was able to promote axonal growth in the CNS. WE discovered that activation of PAC though AAV induced axonal growth after optic nerve injury, when no growth was observed in the control virus group/

研究分野：整形外科

キーワード：神経再生 中枢神経損傷 PAC

1. 研究開始当初の背景

20世紀初頭の神経解剖学の最高権威であるカハールは成人哺乳類の中枢神経(脳・脊髄)再生は非常に困難であると述べている(Cajal S et al, Oxford University Press, 1928)。それから90年近く経った現在においても中枢神経損傷に対する有効な治療法は確立されていないのが現状である。その原因として損傷した中枢神経の再生を困難にする外的、内的要因があることが分かっている。外的要因としては軸索再生阻害因子(オリゴデンドロサイトの細胞膜表面のリン脂質からなるミエリンに由来する)。反応性アストロサイトが集積し形成されたグリア瘢痕、炎症反応による組織障害などが挙げられる(Fibin M T, Nat. Rev. Neurosci, 2003, Bradbury E J et al, Nature, 2002, Fitch M T, Silver J, Exp. Neurol, 2008)。内的要因としては intrinsic growth capacity の低下などが挙げられる(Sun F and He Z, Neurobiol, 2010)。この外的内的要因の解消が中枢神経再生を促進すると考えられている(Benowitz L I and Yin Y, Dev Neurobiol, 2007)。我々は intrinsic growth capacity を向上させることにより、中枢神経における軸索再生を促進し、将来的には脳梗塞や脊髄損傷をはじめとする中枢神経損傷の治療の一助として研究を試みた。

2. 研究の目的

光活性化アデニル酸シクラーゼ(Photoactivated Adenylyl Cyclase: PAC)は光刺激により生体内での cAMP 産生を制御可能な分子でミドリムシの光応答から発見された(Iseki M et al, Nature, 2002)。浜松ホトニクス社はアデノ随伴ウイルスベクターを用いて PAC 遺伝子を導入することで細胞内 cAMP 濃度を高精度に調整することを可能にした。cAMP アナログ投与により脊髄再生が促進することは知られているが(Neumann S et al, Neuron, 2002)、cAMP アナログ投与は生体内での cAMP 濃度コントロールは困難である。一方、PAC は光制御のため時間的、空間的な cAMP 濃度調整が可能となり、より至適な生体内 cAMP 濃度を再現、維持することが可能である。今回の目的は PAC 遺伝子導入による神経再生効果の検討をすることと。

3. 研究の方法

8週齢 C57BL/6J マウスから後根神経節を採取し、M-Cherry により tag されたアデノウイルスベクターを用いて PAC 遺伝子を導入した。5日後、トリプシン処理後に後根神経節細胞を PDL コートされたプレート上に replating を行い、細胞を青色 LED(450 nm)を照射した。照射条件は1分光照射、4分インターバルの5分サイクルを17時間継続とした。抗βチューブリン抗体を用いて免疫染色を行った後、NeuroMath software を用いて軸索伸長、軸索発芽をコントロール群(未導入 AAV ベクター)と比較検討した。

また視神経損傷モデルを用い、in vivo における PAC の機能解析を開始した。
マウス網膜神経節細胞に PAC 遺伝子を、AAV ベクターを用いて導入した。
導入後 5 日目に視神経損傷を実施し、BL : Blue Light を照射 (30 分×14 日) した。
固定 5 日前に軸索トレーサーとして CTB : cholera toxin subunit B を硝子体内投与した。
PAC 遺伝子を組み込んでいない AAV をコントロールベクターとして用いた。

4. 研究成果

後根神経節初代培養細胞における PAC 導入率は 70%であった。

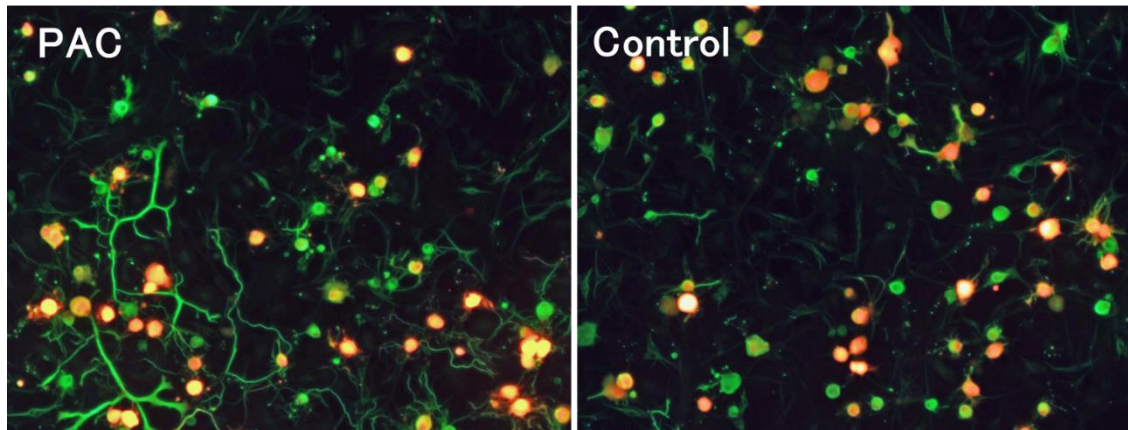


Fig. 1 PAC, Control 遺伝子導入後 (M-Cherry により tag)

後根神経節細胞の軸索伸長、軸索発芽は PAC 導入群でそれぞれ、28.4 μm 、11.5%とコントロール群の 14.6 μm 、3.4%と比して有意に増加を認した。

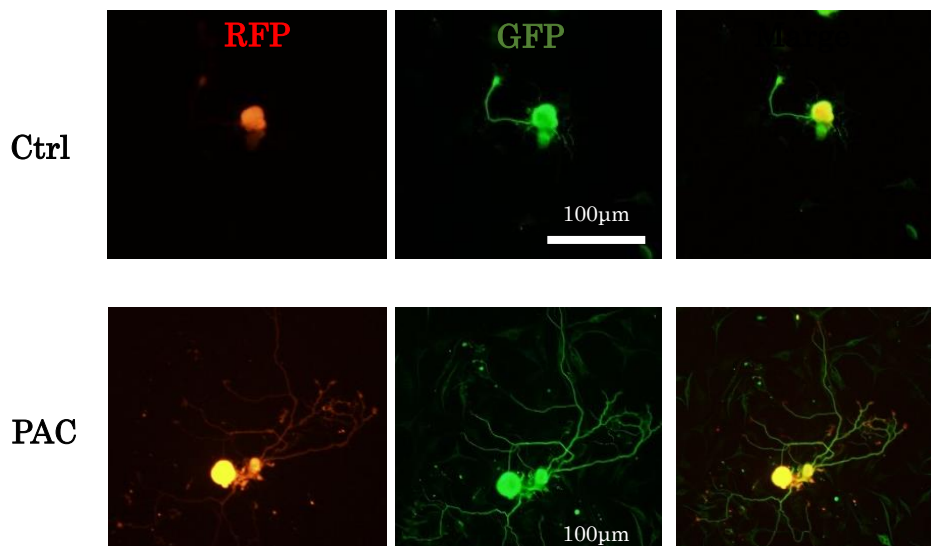


Fig. LED 照射から 17 時間後、PAC 導入群では軸索伸長が大きい

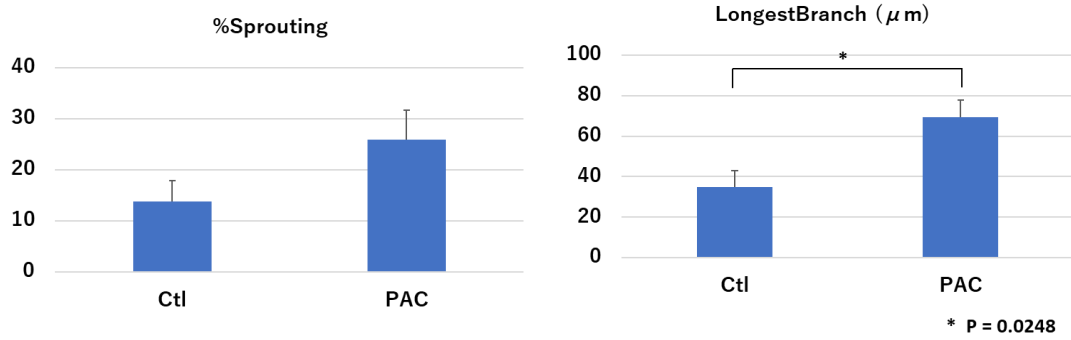


Fig. 3 定量評価(n=3)では、PAC 導入群において有意に軸索伸長が増加していた。

これらの結果を踏まえ、視神経損傷モデルを用い、in vivo の実験を行った。

Ctrl + BL (-)、Ctrl + BL (+)、PAC + BL (-)、PAC + BL (+)の4群間で軸索再生を比較した。

PAC + BL (+)では軸索再生が確認され、他の3群では軸索再生は確認されなかった。今後症例を増やし、最終的な統計学的処理を行う予定。

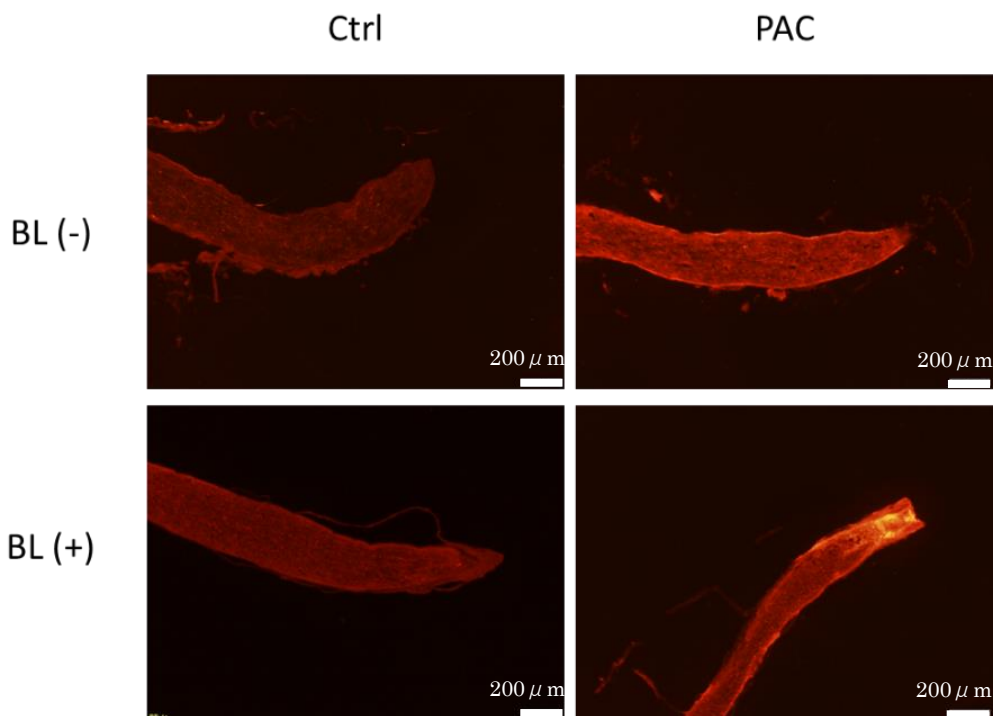


Fig 4. LED 照射を 30 分×14 日持続、PAC + BL (+) 群のみで軸索伸長を認めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山田智裕
2. 発表標題 光刺激アデニル酸シクラーゼを介した末梢神経再生の促進
3. 学会等名 日本整形外科基礎学術集会
4. 発表年 2020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
---------	---------