

令和 3 年 6 月 21 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：18K09061

研究課題名（和文）CCKBRの神経再生における役割

研究課題名（英文）The role of CCKBR in nerve regeneration

研究代表者

大和 雄（Yamato, Yu）

浜松医科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30397377

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）：末梢神経損傷後に中枢側の神経は神経再生能が励起されるConditioning effectという現象は中枢神経再生の鍵と考えられている重要な現象である。遺伝子解析でConditioning effectと関係していると報告されているcckbr遺伝子の神経再生への関与を検査することは重要である。そこでcckbr遺伝子をノックアウトしたマウスで正常のマウスとの比較試験を行った。マウス後根神経節神経細胞を培養して神経の再生能を比較したが有意な差は見られなかった。その後、cckbr遺伝子の骨配向性への関与について検討しcckbr遺伝子は良好な骨配向性の形成に重要であるという結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中枢神経の再生は困難であり有効な治療法が無いことが現状である。脊髄損傷に対する有効な治療法はなく、損傷が起こりその後2次的に損傷が拡大することを抑制することすら難しいことが現状で、再生を促すということになると手段は皆無と言っても過言ではない。

動物実験においてはあるがConditioning effectは中枢神経再生に有効な現象として報告されている。ゆえにConditioning effectに関与するcckbr遺伝子について研究することは医学発展のために大きな影響があると考えられる。また今回研究したcckbr遺伝子の骨配向性への関与の研究は超高齢社会の日本における骨粗鬆症治療発展に意義がある。

研究成果の概要（英文）：The phenomenon called the Conditioning effect, in which the nerve regeneration ability of the central nerve is excited after peripheral nerve injury, is an important phenomenon considered to be the key to central nerve regeneration. It is important to examine the involvement of the cckbr gene in nerve regeneration, which has been reported to be associated with the Conditioning effect in genetic analysis. Therefore, a comparative test was conducted with mice in which the cckbr knocked out and normal mice. The dorsal root ganglion neurons of mice were cultured and the nerve regeneration ability was compared, but no significant difference was observed. After that, the involvement of the cckbr gene in bone orientation was examined, and the result was obtained that the cckbr gene is important for the formation of good bone orientation.

研究分野：神経再生

キーワード：cckbr nerve regeneration bone orientation

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Conditioning effect は中枢神経再生の鍵と考えられている重要な現象である。9種類の遺伝的に最も異なる近交系マウスを用いて conditioning 後にその上流である後根神経節で発現する遺伝子の網羅的解析を行い、その発現量が10倍以上に上昇し現時点で神経再生への関与が未知である遺伝子として cckbr が挙がる(Omura T et al, Neuron, 2015). cckbr はコレシストキニン B 受容体(CCKBR)をコードしており、当科ではマウス後根神経節単離培養神経細胞を用いた in vitro 実験系において CCKBR アンタゴニスト投与によりに神経発芽および軸索伸長が著明に抑制されることを報告した。

2. 研究の目的

本研究では CCKBR ノックアウトマウス(KO マウス)を作製し、CCKBR の神経再生における役割を検討することとした。

3. 研究の方法

7~12週齢のKOマウスおよびWild typeマウスを用いた(n=4, respectively計8匹)。左坐骨神経損傷後5

日に同側の L3-5 の DRG を摘出し、損傷していない対側 L3~5 の DRG も摘出し、コラゲナーゼ処理をして初代培養神経細胞を作製した。PDL コートプレートにて 24 時間の培養し、抗 tubulin 抗体を用いて神経細胞と軸索を染色した。KO マウスの坐骨神経損傷あり群となし群、W マウスの坐骨神経損傷あり群となし群の 4 群間で神経発芽率および軸索伸長距離を計測した。計測には Weizmann Institute より提供されているソフトウェア NeuroMath を用いた。

4. 研究成果

4群において軸索伸長および神経細胞発芽率に有意差はみられなかった。

Cckbr遺伝子の神経再生への関与は否定的という結果であった。

一方でCCKBRはG蛋白共役型受容体で、ペプチドであるコレシストキニン(CCK)の受容体であり、主に神経系に分布している。CCKBRノックアウトマウスの表現型は抗不安、疼痛および機械受容の閾値上昇など複数報告されているが、骨配向性についての報告は皆無であった。そこでCCKBR遺伝子ノックアウトマウスにおける骨配向性について調査した。

【方法】

理研の凍結胚バンクを用いた近交系交配によってCCKBR遺伝子ノックアウトマウス(B6.129S4-Cckbr < tm1Tom >)およびそのワイルドタイプを作成した。9週齢および18週齢の雌を各5匹ずつ用いて比較検討した。各マウスを70%エタノール固定後に右大腿骨を全摘出し、定量的複屈折測定システム(WPA-micro, Photonic lattice)を用いたコラーゲン配向性の解析を行った。配向性の解析は大腿骨を長軸方向に10等分した各点において行った。

【結果】

CCKBR 遺伝子ノックアウトマウスの大腿骨骨幹部において骨配向性が 9 週齢および 18 週齢とも有意に低下しており、骨幹部中央で最も差が大きかった(図1)。また 18 週齢において大腿骨周囲径がノックアウトマウスで有意に小さかつ

た(図2)。しかし、骨密度については両群間で9週および18週において有意な差は無かった。

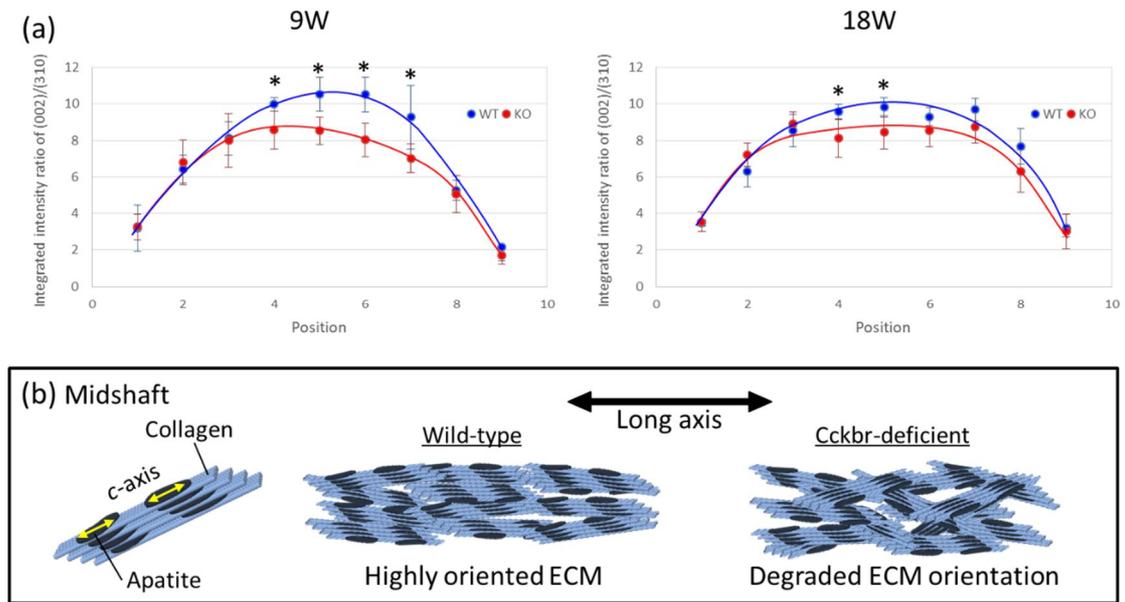


図 1

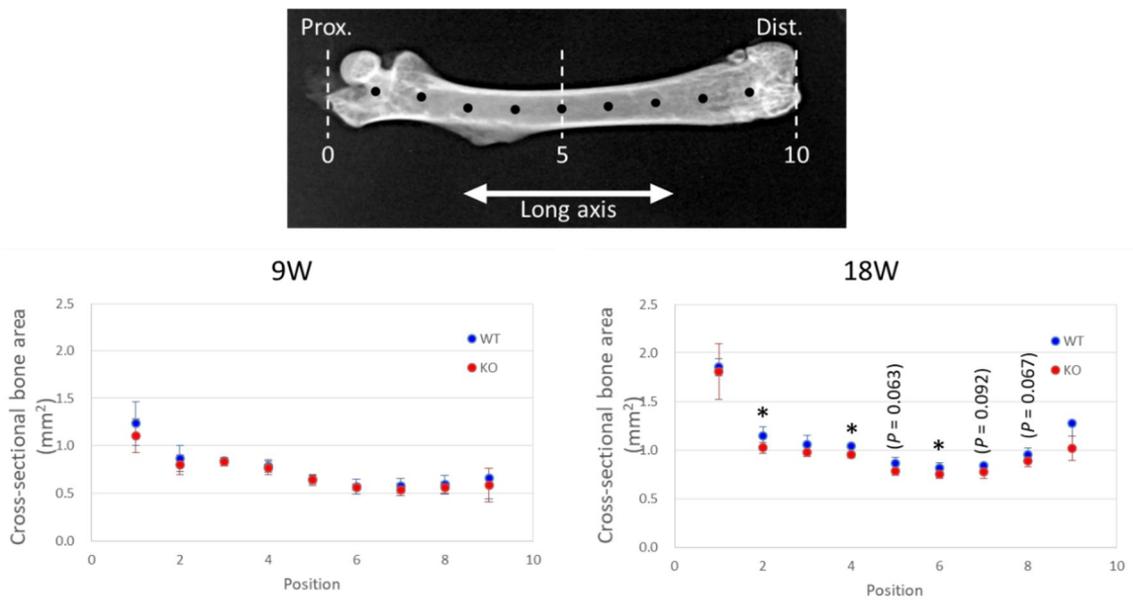


図 2

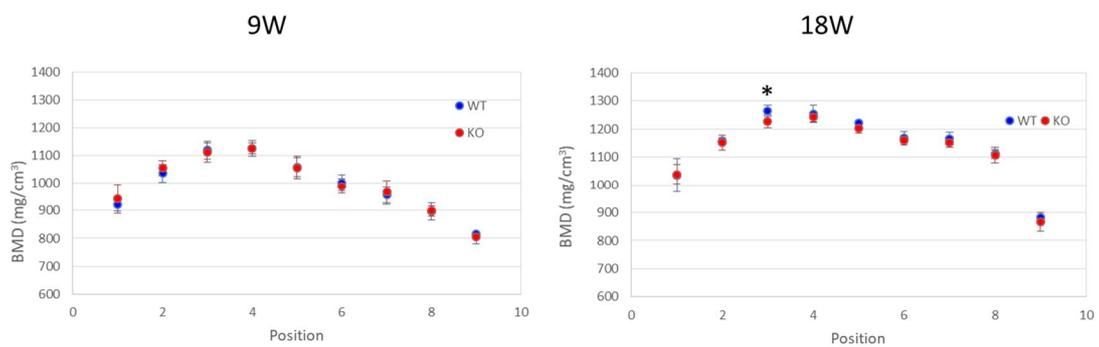


図 3

【結語】

骨配向性は骨密度とは異なった骨強度の評価尺度であり、骨質評価の一つと考えられている。CCKBR は末梢神経において機械受容の伝達を調節しており、そのノックアウトマウスでは機械受容の感受性が著しく低下する。今回 CCKBR のノックアウトによって骨配向性の形成が有意に障害されていたことから、機械受容は良好な骨配向性形成において重要な働きをすると考える。この結果を BONE に投稿するも Reject されている。

今後は

- (1) コラーゲンの配向性マッピングと定量解析
- (2) 力学試験による骨折リスク評価
- (3) ナノインデンテーション法によるヤング率の解析と骨密度と配向性による多重相関解析
- (4) Histology
- (5) μ CT による骨粗鬆症に関する BV/TV 解析、さらには OCY の配列などを予定していた。

しかし、新型コロナウイルスの影響で共同研究を行っていた施設に実験の制限が出てしまったため、骨配向性の評価機材が実質使用出来ない状況となってしまった。

Conditioning 後の後根神経節での脂質変化を、当科では報告している(2019 年度報告)。そこで Imaging Mass Spectrometry(IMS)では無い質量顕微鏡である Desi を用いて Conditioning 後の後根神経節での変化を検討していく方針としている。IMS は 600-1000 程度のオーダーで主にリン脂質などの解析に適しているが一方で Desi はより低分子量(100-600 も測定可能)の脂質解析が可能のため疼痛関連因子として有名なプロスタグランジンなどの解析が可能である。現状は比較的処理が簡便である黄色靱帯の組織を用いて下記のように Desi による質量解析を行っている。

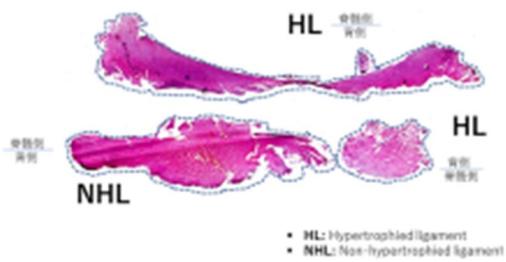
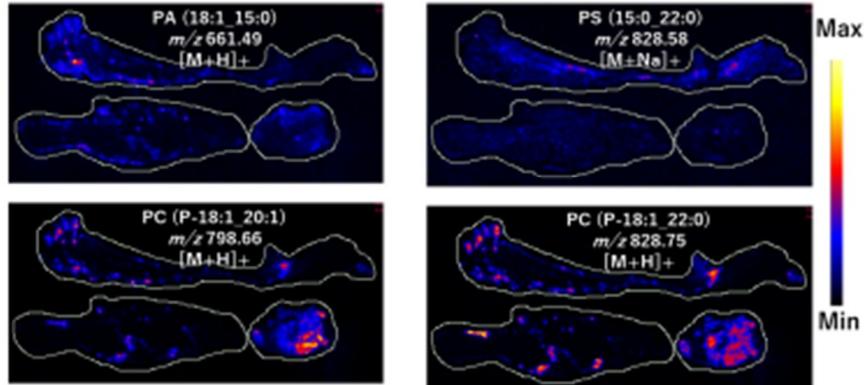


Fig: H&E images of yellow ligament

DESI-MSI Conditions

- Solvent : 98% Methanol, 2% Water
- Solvent flow rate : 3 μ L/min
- Nitrogen gas pressure : 0.4 MPa
- Capillary Voltage : 4 kV
- Inlet temperature : 120 °C
- Spray impact angle : 80°
- Mass range: m/z 100 – 1000 Pixel size: 100 μ m \times 100 μ m
- Scan rate: 200 μ m/sec

Molecular Assignment
Human metabolome database (Tolerance: 0.05Da)



共同研究施設の1日も早い活動再開を待ちつつ、新たに Desi による脂質の解析も進めていく方針である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yuki Mihara, Makoto Horikawa, Shumpei Sato, Fumihiro Eto, Mitsuru Hanada, Tomohiro Banno, Hideyuki Arima, Hiroki Ushirozako, Tomohiro Yamada, Dongmin Xu, Ayako Okamoto, Fumiyooshi Yamazaki, Shiro Takei, Takao Omura, Ikuko Yao, Yukihiko Matsuyama, Mitsutoshi Setou	4. 巻 17
2. 論文標題 Lysophosphatidic Acid Precursor Levels Decrease and an Arachidonic Acid-Containing Phosphatidylcholine Level Increases in the Dorsal Root Ganglion of Mice After Peripheral Nerve Injury	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroscience letters	6. 最初と最後の頁 69-75
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neulet.2018.12.035	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔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 三原唯暉 石本卓也 大村威夫 後迫宏紀 中野貴由 松山幸弘
2. 発表標題 コレシストキニンB受容体(CCKBR)は骨配向形成に必要である
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会
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
---------	---------