

令和 3 年 5 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K10776

研究課題名(和文) 神経損傷後の加齢に伴う機能回復阻害因子を克服する薬理的アプローチ

研究課題名(英文) Pharmacological Approaches to Overcoming Age-Related Inhibitors of Functional Recovery after Peripheral Nerve Injury

研究代表者

栗本 秀 (Kurimoto, Shigeru)

名古屋大学・医学系研究科・特任講師

研究者番号：70597856

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：高齢者で末梢神経損傷後の神経再支配が不良になる一因として、加齢に伴う後シナプス構造の変性が関与している可能性がある。本研究では、高齢マウスの末梢神経を損傷した長期脱神経筋に、神経移行による神経修復術を行った。脱神経筋内にWntアンタゴニストを筋注しWnt/カテニンシグナル伝達経路を抑制することで、脱神経筋の神経再支配を改善できることがわかった。後シナプス構造の変化が顕著な高齢者の神経損傷治療にWntアンタゴニストを用いることで、神経損傷後のアセチルコリン受容体のさらなる変性を防ぎ、神経修復後の運動機能回復を改善できる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

末梢神経損傷後の運動機能回復は、高齢になるにしたがい理想的な外科的治療が行われても、十分な機能回復が得られない。これまでの末梢神経損傷の研究において、良好な運動機能回復にはアセチルコリン受容体凝集の維持が重要であることがわかっている。後シナプス構造の変化が顕著な高齢者の神経損傷治療時にWnt/カテニンシグナル伝達経路を抑制することで、アセチルコリン受容体凝集のさらなる断片化を防ぎ、運動機能回復を改善できる可能性が示された。薬理的アプローチは外科的治療成績がプラトーに達した末梢神経損傷治療のブレイクスルーとなり、神経損傷に対する外科的治療を補完する新しい治療法を確立する重要な成果である。

研究成果の概要(英文)：In the elderly, functional recovery after peripheral nerve injury is insufficient, in part because of age-related degeneration of postsynaptic structures. In this study, the nerve transfer was performed for the long-term denervation muscle of the aged mouse. By injecting the Wnt antagonist intramuscularly into the denervated muscle and suppressing the Wnt/catenin signal pathway, we found that the reinnervation of the denervated muscle was improved. By using the Wnt antagonist for the nerve injury treatment of the elderly in which the change of the postsynaptic structure is remarkable, the possibility of preventing further degeneration of the acetylcholine receptor after the nerve injury and improving motor function recovery after the nerve repair was suggested.

研究分野：末梢神経

キーワード：神経筋接合部 末梢神経損傷 高齢

### 1. 研究開始当初の背景

末梢神経系は、損傷後の神経再生能力は比較的高いと考えられているが、神経縫合や神経移行などの外科的治療技術や人工神経などの補填材料が発展しても、成人での主要な神経損傷後の運動機能回復には限界があり、受傷前と同じ筋力や巧緻性を獲得することは未だに困難である。神経損傷後の運動機能回復は、損傷後の経過時間に大きく依存することがわかっている。また、若年者に比べ高齢で、理想的な外科的治療がおこなわれたとしても十分な機能回復が得られないことも知られている。その要因として、神経栄養因子の減少やワラー変性の遅延等による軸索再生速度の減少や神経やミエリンの debris 残存など前シナプス構造の要因が主に報告されている。しかし近年、高齢化に伴う後シナプス構造の変性が神経再支配に与える影響も注目されてきており、この加齢変化は受傷年齢が神経損傷後の機能回復に影響を与える因子となりえる。依然議論の多いところであるが、高齢化にともない運動機能低下をおこすサルコペニアの病因として、神経筋接合部の変性が生じた後に、筋線維が脱神経により萎縮・変性していくメカニズムが示唆されている。特に後シナプス構造におけるアセチルコリン受容体 (AChR) の凝集に断片化が顕著に起こり、脱神経につながる前段階の現象とみなされている。このような加齢変化にともなう後シナプス構造の変化は、高齢者の神経損傷時に、すでに脱神経筋内でおきており、神経筋接合部の構造を維持する能力も低下している。これまでの研究により神経損傷後の良好な運動機能回復には、AChR 凝集の維持が重要であることがわかっており、後シナプス構造の変性を薬理的に制御することができれば、高齢者における末梢神経修復後の運動機能回復を妨げる一因を克服できると考える。

### 2. 研究の目的

末梢神経損傷の外科的治療には critical time window があり、Woolf らは、その間は運動終板が神経再生に対して permissive な状態で、機能的な神経修復が可能であるとしている。後シナプス構造における AChR 凝集には Neural Agrin が必要とされ、脱神経の状態が遷延すると、運動神経終末からの Agrin の放出が減少し、AChR 凝集の断片化を引き起こす。神経損傷後の神経筋接合部の変性は、この critical time window を規定する重要な因子である。しかし、高齢者においては受傷時に AChR 凝集の断片化がすでに存在しており、軸索再生促進や欠損補填材料の開発のみに注力した現状の治療研究では十分な運動機能回復が得られない。これまでに、末梢神経損傷治療において、加齢変化にともなう後シナプス構造の変性に着目した治療研究はほとんどない。神経筋接合部では様々な正と負のシグナル因子が相互作用をすることでその適切な形態や機能を維持している。末梢神経の損傷を受けると、このバランスがくずれ経時的に AChR 凝集は断片化し、再神経支配を妨げる要因となる。我々のこれまでの研究で、坐骨神経切断マウスの脱神経筋内において、変性した運動神経終板帯にのみ限局して Wnt/ カテニンシグナル伝達経路が活性化することを報告した。Wnt/ カテニンシグナル伝達経路が脱神経後の AChR の分散に強く関与していることを示唆している。Wnt シグナルは生体の恒常性維持に重要な役割を果たしているが、市販されている薬剤の未知の効果を探索する drug repositioning によって発見された、fluoxetine や verapamil といった既存薬剤が Wnt/ カテニンシグナル伝達経路を抑制することが報告されており、これらの FDA 既認薬を用いることで、人体に対する安全性も担保しながら Wnt シグナルを制御できる。高齢マウスにおいて Wnt/ カテニンシグナル伝達経路が活性化され、Wnt シグナルが加齢に伴う AChR 凝集の断片化や運動機能低下の一因であると報告されている。Wnt/ カテニンシグナル伝達経路を抑制する FDA 既認薬を後シナプス構造の変化が顕著な高齢者の神経損傷治療時に用いることで、神経損傷後の AChR 凝集のさらなる断片化を防ぎ、神経損傷後の運動機能回復を改善できる可能性がある。薬理的なアプローチは外科的治療成績がプラトーに達した末梢神経損傷治療のブレークスルーとなり、神経損傷に対する外科的治療を補完する新しい治療法を確立する重要な成果が期待される。また、細胞移植を用いた神経再生医療においても、分化誘導や培養、安全性の担保などをおこなう時間確保が可能となる。さらに、薬物治療により末梢神経損傷後の神経筋接合部の変性を防ぐことができれば、超高齢化社会に突入しつつある現在の日本にとって解決すべき要請の強いサルコペニアによる運動機能低下の解決の一助ともなり得る。

### 3. 研究の方法

本研究では次のステップを用いて、Wnt/ カテニンシグナル伝達経路を抑制する Wnt アンタゴニストが神経損傷後の機能回復を妨げる加齢要因を薬物治療により克服できるかを検証する。まず、神経筋共培養系により Wnt/ カテニンシグナル伝達経路を抑制する Wnt アンタゴニストの IWR1 を用いて、神経支配を受けた AChR 凝集の plaque 数、蛍光強度、MuSK リン酸化、Rapsyn の発現量を定量評価する。次に in vivo で、高齢マウスの脱神経後の末梢神経再生モデルを用いて、既存薬剤もしくは Wnt アンタゴニスト投与群、placebo 投与群を用いて運動神経機能回復を組織学的検査・電気生理学的検査を用いて比較検討する。Chao (2013) らの方法に準じてマウスの長期脱神経後の末梢神経再生モデルを作製し薬剤の効果を調べる。総腓骨神経を切離して脱

神経筋を作製する。2ヶ月後に脛骨神経を切離し、総腓骨神経の遠位断端に縫合する神経移行術を施行する。これらの研究より、神経損傷後の加齢に伴い機能回復を妨げる因子を明らかにし、末梢神経損傷治療に対する新しい薬理的アプローチを確立する。臨床への展開が早期に期待できる極めて有意義なものと考えている。

#### 4. 研究成果

C2C12(murine myoblast cell line)を用いた神経筋共培養系により myotube 上に形成する AChR 凝集の plaque 数、蛍光強度を測定した。Wnt/ カテニンシグナル伝達経路を抑制する Wnt アンタゴニストの IWR1 を 1 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M 投与して control と比較した。Wnt アンタゴニスト IWR1 の濃度依存的に、AChR 凝集密度は増加することがわかった。Neural Agrin による AChR 凝集のメカニズムの一つとして、神経終末から分泌された Agrin が Lrp4 と結合し、複合体を形成している MuSK のリン酸化を亢進し、アダプタータンパク質を介しシグナルが伝達され最終的に Rapsyn に依存的な AChR 凝集が起こると考えられている。しかし、IWR1 が AChR 凝集を促進したにもかかわらず、Rapsyn の遺伝子発現はコントロールと比べ、全ての群で有意差を認めなかった。Rapsyn をはじめとする関連蛋白の動態をさらに検討する必要がある。

また、in vivo においても Wnt アンタゴニスト IWR1 が神経損傷後の AChR の断片化を抑制し、機能改善が得られるか高齢マウスを用いて実験した。24ヶ月齢のメス C57BL/6NcrSlc の右総腓骨神経を切断して前脛骨筋を脱神経した。脱神経した前脛骨筋内に1週間に2回の頻度で8週間の間、IWR1 (5 $\mu$ g/100 $\mu$ l) と生理食塩水を投与した(各群7匹)。その後、脛骨神経を切断し総腓骨神経に神経移行術を行い、さらに2ヶ月後に組織学的検査・電気生理学的検査により神経再生を確認した。神経移行術後の前脛骨筋内で神経筋接合部の形態や神経再支配率を検討した。IWR1 投与群では生理食塩水投与群に比べて有意に神経再支配率が高く(コントロール群; 21.3  $\pm$  5.9%, IWR1 群; 33.2  $\pm$  4.5%, p = 0.26) また、AChR 凝集の断片化が軽度で、萎縮変性した Plaquet-type endplate が少なかった(図1)。IWR1 投与により、脱神経後の AChR の変性が抑制され、神経修復後の AChR の神経再支配率が高くなった。

神経移行2ヶ月後に脱神経筋の電気生理学的検査を行った。前脛骨筋に対して Needle

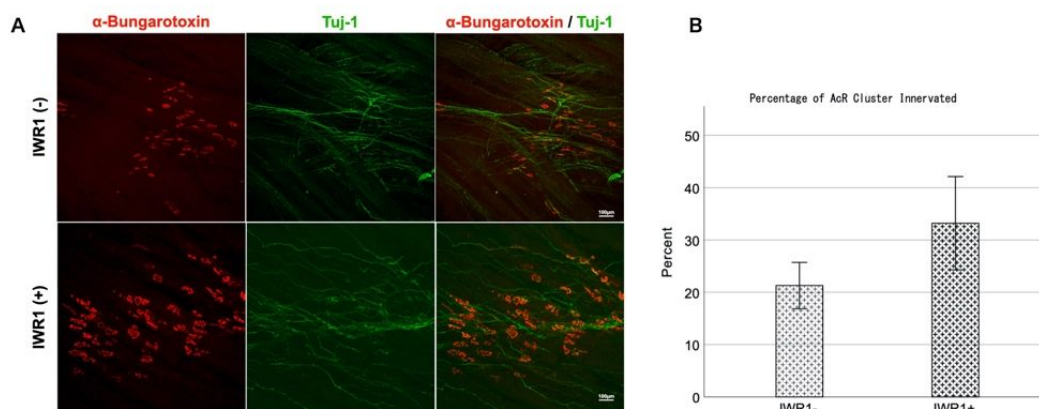


図1. 前脛骨筋内のAChR凝集と神経再支配。IWR1投与により脱神経後の変性が抑制された(A)。AChR凝集の神経再支配率の改善(B)。

electromyography (EMG)をおこない、Combined muscle action potential (CMAP)のAmplitude、Distal latency (DL)、Motor nerve conduction velocity (MNCV)を測定しコントロール群と比較した(図2)。AmplitudeはIWR1を投与することにより、生理食塩水投与群と比べて大きい傾向にあったが有意差はなかった(コントロール群; 9.1  $\pm$  5.5 mV、IWR1 群; 13.8  $\pm$  2.6 mV, p = 0.082)。

DLとMNCVについては、IWR1投与により有意な改善が得られなかった(コントロール群; 1.8  $\pm$  0.2 ms、IWR1 群; 1.6  $\pm$  0.1 ms, p = 0.114 / コントロール群; 27.6  $\pm$  3.3 ms、IWR1 群; 30.6  $\pm$  2.2 ms, p = 0.107)。

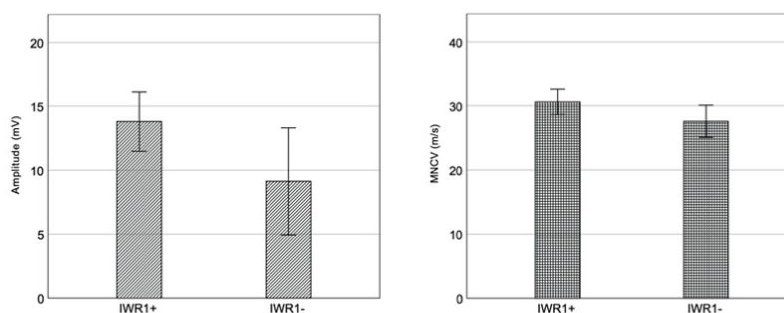


図2. 前脛骨筋の電気生理学的検査結果。IWR1投与群と生理食塩水投与群のAmplitude (A) と Motor nerve conduction velocity (B) の比較。

本研究において Wnt アンタゴニストの投与により、in vitro、in vivo とともに AChR 凝

集に改善が見られた。また、高齢の末梢神経損傷モデルの脱神経筋内に Wnt アンタゴニストを筋注することにより、神経修復後の神経再支配を改善することがわかった。我々の別の研究で、Wnt の機能発現や細胞外分泌に必要な Porcupine を抑制しほとんどの Wnt の発現を抑える porc inhibitor を用いると、IWR1 よりも AChR 凝集が改善することがわかっており、同様のモデルにおいて神経損傷後の機能改善が得られるか、さらに検討を継続していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7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 Asano Kenichi, Nakano Tomonori, Tokutake Katsuhiko, Ishii Hisao, Nishizuka Takano, Iwatsuki Katsuyuki, Onishi Tetsuro, Kurimoto Shigeru, Yamamoto Michiro, Tatebe Masahiro, Hirata Hitoshi	4. 巻 52
2. 論文標題 Muscle spindle reinnervation using transplanted embryonic dorsal root ganglion cells after peripheral nerve transection in rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Proliferation	6. 最初と最後の頁 e12660
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cpr.12660	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 栗本 秀, 大西 哲朗, 能登 公俊, 丹羽 智史, 佐伯 将臣, 徳武 克浩, 宮津 優, 澤田 英良, 三竹 辰徳, 浅野 研一, 中川 泰伸, 米田 英正, 石井 久雄, 岩月 克之, 山本 美知郎, 建部 将広, 平田 仁	4. 巻 29
2. 論文標題 末梢神経損傷治療の課題と将来展望 脱神経筋を治療ターゲットとした末梢神経損傷治療	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 末梢神経	6. 最初と最後の頁 166-168
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Asano Kenichi, Nakano Tomonori, Tokutake Katsuhiko, Ishii Hisao, Nishizuka Takano, Iwatsuki Katsuyuki, Onishi Tetsuro, Kurimoto Shigeru, Yamamoto Michiro, Tatebe Masahiro, Hirata Hitoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Innervation of Meissner's corpuscles and Merkel cells by transplantation of embryonic dorsal root ganglion cells after peripheral nerve section in rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine	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) 10.1002/term.3196	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 Kawamoto Hiroya, Iwatsuki Katsuyuki, Kurimoto Shigeru, Yamamoto Michiro, Tatebe Masahiro, Morita Akimasa, Kinoshita Fumie, Hirata Hitoshi	4. 巻 61
2. 論文標題 Interleukin 6 secretion by fibroblasts in carpal tunnel syndrome patients is associated with trigger finger and inhibited by tranilast	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Muscle & Nerve	6. 最初と最後の頁 408 ~ 415
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mus.26793	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 Nakano Tomonori, Kurimoto Shigeru, Kato Shuichi, Asano Kenichi, Hirata Takuma, Kiyama Hiroshi, Hirata Hitoshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Complete adult neurogenesis within a Wallerian degenerating nerve expressed as an ectopic ganglion	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine	6. 最初と最後の頁 1469 ~ 1480
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/term.2679	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 Takeuchi Masaru, Watanabe Keita, Ishihara Kanta, Miyamoto Taichi, Tokutake Katsuhiko, Saeki Sota, Aoyama Tadayoshi, Hasegawa Yasuhisa, Kurimoto Shigeru, Hirata Hitoshi	4. 巻 20
2. 論文標題 Visual Feedback Control of a Rat Ankle Angle Using a Wirelessly Powered Two-Channel Neurostimulator	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sensors	6. 最初と最後の頁 2210 ~ 2210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/s20082210	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 Yoshida Akihito, Kurimoto Shigeru, Iwatsuki Katsuyuki, Saeki Masaomi, Nishizuka Takanobu, Nakano Tomonori, Yoneda Hidemasa, Onishi Tetsuro, Yamamoto Michiro, Tatebe Masahiro, Hirata Hitoshi.	4. 巻 44
2. 論文標題 Upper extremity disability is associated with pain intensity and grip strength in women with bilateral idiopathic carpal tunnel syndrome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 NuroRehabilitation	6. 最初と最後の頁 199 ~ 205
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/NRE-182589.	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9件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 栗本 秀
2. 発表標題 ネットワークを俯瞰した末梢神経損傷の治療戦略
3. 学会等名 第 47 回日本マイクロサージャリー学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 栗本 秀, 平田 仁
2. 発表標題 末梢神経損傷の治療成績に影響を与える因子
3. 学会等名 第19回三重県上肢外科研修会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoshi Niwa, Masaomi Saeki, Hiroki Shinkai, Shigeru Kurimoto, Tomonori Nakano, Yohei Okada, Hitoshi Hirata
2. 発表標題 RECONSTRUCTION OF MOTOR FUNCTION IN PERIPHERAL NERVES BY TRANSPLANTATION OF HUMAN IPS CELLS-DERIVED MOTOR NEURON PROGENITORS
3. 学会等名 International Society for Stem Cell Research Annual Meeting
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丹羽智史, 佐伯将臣, 新海宏明, 栗本秀, 岡田洋平, 平田仁
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来運動神経前駆細胞の末梢神経移植における腫瘍化抑制への取り組み
3. 学会等名 第62回日本手外科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅野研一, 中野智則, 徳武克浩, 石井久雄, 西塚隆伸, 岩月克之, 栗本秀, 山本美知郎, 建部将広, 平田仁
2. 発表標題 末梢神経切断後のラットにおける後根神経節細胞移植による皮膚の固有受容体の神経再支配
3. 学会等名 第30回日本末梢神経学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平田仁
2. 発表標題 末梢神経再生について
3. 学会等名 第38回日本運動器再生・移植研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅野研一, 中野智則, 徳武克浩, 石井久雄, 西塚隆伸, 岩月克之, 栗本秀, 山本美知郎, 建部将広, 平田仁
2. 発表標題 末梢神経切断後のラットにおける後根神経節細胞移植による筋紡錘の神経再支配
3. 学会等名 第62回日本手外科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 栗本 秀, 大西 哲朗, 能登 公俊, 浅野 研一, 丹羽 智史, 中野 智則, 石井 久雄, 中川 泰伸, 岩月 克之, 建部 将広, 平田 仁
2. 発表標題 脱神経筋を治療ターゲットとした末梢神経損傷治療
3. 学会等名 第29回日本末梢神経学会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 栗本 秀, 中野 智則, 浅野 研一, 能登 公俊, 丹羽 智史, 佐伯 将臣, 徳武 克浩, 石井 久雄, 平田 仁
2. 発表標題 神経筋接合部の制御
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会(招待講演)
4. 発表年 2018年



〔図書〕 計1件

1. 著者名 尼子雅敏、多田薫、射場浩介、栗本秀、金谷貴子、長田龍介、山田真央、宇佐美聡、織田崇、吉田綾、加藤直樹	4. 発行年 2020年
2. 出版社 全日本病院出版会	5. 総ページ数 -
3. 書名 Monthly Book Orthopaedics 手根管症候群の治療トピックス	

〔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
研究分担者	石井 久雄 (Ishii Hisao) (30738349)	名古屋大学・医学系研究科・特任助教  (13901)	削除:2020年3月9日
研究分担者	建部 将広 (Tatebe Masahiro) (60420379)	名古屋大学・医学系研究科・特任准教授  (13901)	
研究分担者	平田 仁 (Hirata Hitoshi) (80173243)	名古屋大学・予防早期医療創成センター(医)・教授  (13901)	
研究分担者	山本 美知郎 (Yamamoto Michiro) (90528829)	名古屋大学・医学系研究科・特任講師  (13901)	
研究分担者	岩月 克之 (Katsuyuki Iwatsuki) (90635567)	名古屋大学・医学部附属病院・講師  (13901)	

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
---------	---------