

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19500276

研究課題名（和文）末梢神経損傷後の回復過程における分子機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of Regenerative Process after Peripheral Nerve Injury.

研究代表者

芝田 晋介（Shinsuke SHIBATA）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：70407089

研究成果の概要：

RNA 結合蛋白質 Musashi2(Msi2)の遺伝子欠損マウスは、知覚神経障害をきたし、その原因が標的遺伝子の一つである神経軸索進展促進因子 Pleiotrophin(Ptn)の減少によることが明らかになった。また末梢神経損傷後の回復過程で、Msi2 遺伝子欠損マウスは標的の Ptn の発現上昇が少なく、機能回復が遅延することが分かった。末梢神経障害後に上昇する Msi2 は Ptn の発現を促進し、触覚や運動機能回復のために重要な役割を担っていることが示された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：末梢神経, 再生医学, Musashi, RNA 結合タンパク質

1. 研究開始当初の背景

RNA 結合蛋白質の Musashi(Msi)は、最初にショウジョウバエで同定され(Nakamura M et al. Neuron 1994)、のちに、標的遺伝子である *ttk69* を翻訳レベルで抑制して神経系の細胞の運命を決定することが明らかとなった(Okabe M et al. Nature 2001)。マウスにおいても相同性の高い Msi ファミリー蛋白質が 2 つ

(Msi1, Msi2)発見され、神経幹細胞に強く発現していることが明らかとなった(Sakakibara S et al. J. of Neurosci 1997)。

マウス Msi1 は標的遺伝子 *m-numb* の翻訳抑制を介して、神経発生や分化を制御する Notch シグナルを促進的に調節し、神経細胞の分化抑制に関与している(Imai T et al. Mol Cell Biol 2001)。神経系以外にも広範囲に発現

する Msi 蛋白質として Msi2 が同定されたが (Sakakibara S et al. J. of Neurosci 2002)、その機能はこれまで不明であった。

2. 研究の目的

神経系における Msi2 の機能を明らかにするため Msi2 欠損マウスを作成し、我々が新規に同定した Msi 蛋白質の標的因子の発現と機能回復の程度を、末梢神経障害などの神経損傷モデルにおいて詳細に解析する。回復を調節し、RNA 結合蛋白質による哺乳類の発生・分化・再生の制御メカニズムを解明することを目的としている。

3. 研究の方法

Msi2 欠損マウスの感覚神経投射異常の解析に加え、Msi2 および Ptn の、末梢神経傷害からの回復過程における役割を明らかにするため、以下の3つの実験を行った。

- (1) Msi2 の標的因子として我々が同定した Ptn の感覚神経に対する作用特異性を調べた。
- (2) 神経損傷後の回復過程における Ptn の役割とその発現調節メカニズムについて解析した。
- (3) 機能回復と関連した再生軸索の可視化を試みた。

4. 研究成果

神経系における機能を明らかにするため Msi2 欠損マウスを作成し、解析を行ったところ、Msi2 欠損マウスは有意な感覚神経障害を伴っていた。中枢から末梢神経系まで詳細な組織学的解析を行ったところ、背側神経節から脊髄への感覚神経線維の投射が減少していた。Msi2 に結合する標的因子をスクリーニングしたところ Ptn が同定された。Msi2 は Ptn の mRNA の 3' 非翻訳領域に特異的に結合し、その発現を転写後レベルで促進していた。また、in vitro においても神経軸索進展促進作用を担う Ptn が下流調節因子であるか確認するため、背側神経節由来の細胞の初代培養系を用いた軸索進展作用を定量化し、遺伝子欠損マウスでその進展作用が低下していることを発見すると共に、電気穿孔法にて導入した Msi2 によってその機能が回復すること、および、Ptn に対する siRNA によって機能回復が再び失われることを確認した。

次に、この解析結果を基に、末梢神経傷害

からの回復過程で Msi2 がどのような役割を担うか、以下の三点の解析を試みた。

(1) 軸索伸展促進因子 Ptn の感覚神経に対する作用特異性の解明

3 種類存在する感覚神経 (TrkC 陽性=A β 線維=触覚、TrkB 陽性=A δ 線維=関節位置覚、TrkA 陽性=C 線維=温痛覚) それぞれへの Ptn の作用特異性を in vivo および in vitro で解明するためにまず、Ptn 上流制御因子 Msi2 の欠損マウスを用い、温痛覚・触覚の軸索投射異常の解析を in vivo にて行い、発生過程における感覚神経への作用特異性を調べた。その結果、TrkC 陽性の触覚を担う感覚神経の投射異常のみ観察され、その他の痛覚や関節位置覚の異常は観察されなかった。この特異性は、胎生早期のきわめて限られた期間のみ、非常に強い Msi2 の発現がすべての感覚神経細胞で見られ、同じ時期に、その下流にある Ptn の受容体の発現が触覚を担う TrkC 陽性の感覚細胞だけに発現していたことによって担われていた。

in vivo における軸索伸展メカニズムの解析では、これまでの解析で 3 種類存在する感覚神経に対して、Ptn はそれぞれ異なる作用を示すことが示唆されていた。そこで、培養感覚神経を用いた Ptn による軸索進展作用を定量化したところ、触覚や運動機能の回復を促す効果が観察されたが、培養細胞の場合には疼痛を伝達する神経線維に対しても軸索進展作用を持っていることが明らかになった。発生段階で観察された特異性は、成体における外傷後などでは維持されていないことが示された。

(2) 神経損傷後の回復過程における Ptn の役割と発現調節メカニズム

末梢神経障害後の神経で Ptn が上昇し、機能回復を促進することから、野生型および Msi2 の遺伝子欠損マウスで Ptn の発現量の変化と機能回復の程度を解析した。その結果、Msi2 遺伝子欠損マウスで Ptn の上昇が少なく、機能回復も有意に遅延した。このことから、Msi2 および Ptn が特異的な感覚神経のネットワーク形成および末梢神経障害後の回復過程に重要な役割を果たしていることが示された。

(3) 再生軸索可視化のための技術開発

軸索再生の可視化の試みでは、すでに当教室では特殊 MRI 撮像法である、拡散テンソルイメージングによる軸索再生の可視化技術を確立し、脊髄損傷にて良好な成果を得てい

た(Fujiyoshi K et al. J. of Neurosci 2007)。これを末梢神経損傷後の軸索再生に応用し、組織学的にも機能的にも回復に違いのあるマウスの再生軸索を経時的に可視化することができた。

今後、この技術を用いて Msi2 遺伝子欠損マウスの機能回復遅延を可視化し、再生軸索の経時的な in vivo イメージング技術を確立したいと考えている。

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5件)

全て査読有

1. Takagi T, Nakamura M, Yamada M, Hikishima K, Momoshima S, Fujiyoshi K, Shibata S, Okano HJ, Toyama Y, Okano H. "Visualization of peripheral nerve degeneration and regeneration: Monitoring with diffusion tensor tractography." *Neuroimage*. 2009 Feb 1;44(3):884-892.
2. Susaki K, Kaneko J, Yamano Y, Nakamura K, Inami W, Yoshikawa T, Ozawa Y, Shibata S, Matsuzaki O, Okano H, Chiba C, "Musashi-1, an RNA binding protein, is indispensable for survival of photoreceptors" *Experimental Eye Research* 2009 Mar;88(3):347-355.
3. Renault Mihara F, Okada S, Shibata S, Nakamura M, Toyama Y, Okano H. "Spinal cord injury: emerging beneficial role of reactive astrocytes' migration." *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40(9):1649-1653.
4. Nagoshi N, Shibata S, Kubota Y, Nakamura M, Nagai Y, Satoh E, Morikawa S, Okada Y, Mabuchi Y, Katoh H, Okada S, Fukuda K, Suda T, Matsuzaki Y, Toyama Y, Okano H. "Ontogeny and multipotency of neural crest derived stem cells in mouse bone marrow, dorsal root ganglia, and whisker pad."

Cell Stem Cell. 2008 Apr 10;2(4):392-403.

5. Kitamuta K., Iwanami A., Nakamura M., Yamane J., Kota W., Suzuki Y., Miyakawa D., Shibata S., Funakoshi H., Miyatake S., Coffin R., Nakamura T., Toyama Y., Okano H.: "Hepatocyte growth factor promotes endogenous repair and functional recovery after spinal cord injury." *J. Neurosci Res*. 2007 Aug 15;85(11):2332-2342.

[学会発表](計4件)

1. SHIBATA S; SAKAKIBARA SI; OKANO HJ; OKANO H "Analysis of RNA binding protein Musashi-2 in mammalian nervous system development." Cold Spring Harbor Laboratory Meeting "Axon Guidance, Synaptogenesis & Neural Plasticity" (New York, USA) September 10-14, 2008 (September 13th Poster presentation)
2. SHIBATA S; SAKAKIBARA SI; OKANO HJ; OKANO H "Analysis of RNA binding protein Musashi2 in mammalian nervous system development." 第31回日本神経科学大会(東京都千代田区) 2008年7月9-11日(ポスター発表)
3. SHIBATA S; SAKAKIBARA SI; OKANO HJ; OKANO H "In vivo and in vitro analysis of Musashi family in mammalian CNS and PNS development" Society for Neuroscience 2007 (San Diego CA, USA) November 3-7, 2007 (November 5th Poster presentation)
4. SHIBATA S; SAKAKIBARA SI; IMAI T; OKANO HJ; OKANO H "In vivo and in vitro analysis of Musashi family in mammalian CNS and PNS development and regeneration." 第30回日本神経科学大会・第50回日本神経化学学会大会・第17回日本神経回路学会大会合同年会(神奈川県横浜市) 2007年9月10-12日(ワークショップにて口頭発表)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

芝田 晋介 (Shinsuke SHIBATA)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：70407089

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし