

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591738

研究課題名（和文）末梢神経損傷に対する低分子 G タンパク質発現制御を標的とした遺伝子治療法の確立

研究課題名（英文）Establishment of the treatment of peripheral nerve injury using adenoviruses expressing small G proteins

若林 良明（WAKABAYASHI YOSHIAKI）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：00431916

研究成果の概要（和文）：本研究では、細胞死や軸索伸長に關与する低分子 G タンパク質の Rho および Rac 活性を組換えアデノウイルスを用いて制御することで末梢神経再生の促進を細胞培養と動物モデルで検討した。ラット後根神経節を用いた培養実験では、Rho と Rac 活性の両者を抑制する dominant negative type の組換えアデノウイルスを感染させることで神経突起の伸長を認めた。また、ラット坐骨神経切断モデルを用いて神経近位断端に同ウイルスを感染させて人工チューブで架橋すると、8 週後にはチューブ内に電気生理学的に機能を有する再生神経を認め組織学的にも確認できた。ウイルスは、神経線維よりもミエリンを作るシュワン細胞に多く局在しており神経再生にシュワン細胞での Rho、Rac の働きが重要であることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：It is known that Rho family small GTPases activate a number of signal transduction pathways involved in cell cycle progression, gene expression, and cell survival. These small G proteins play an important role in neuronal survival and axon regeneration in neural injury. In this study, we tested whether the activity of RhoA or Rac1 regulates neurite extension in dorsal root ganglia (DRGs) in vitro and nerve regeneration in injured sciatic nerves. Regeneration of neurites from explanted DRGs was accelerated by combined suppression of RhoA and Rac1 activity using adenoviruses expressing dominant negative (DN) forms of both RhoA and Rac1 (Ad-Rho/RacDN) in vitro. Rat sciatic nerves were cut and Ad-Rho/RacDN was injected into the proximal stumps. After bridge grafting with chitosan mesh tubes, muscle evoked potentials induced by transcranial electrical stimulation were recorded eight weeks postoperatively. The terminal latencies were shorter in the Ad-Rho/RacDN group than in the control group. Histological analysis revealed extensive regrowth of neurofilament-positive and myelinated axons within the tubes in the group that received Ad-Rho/RacDN. These findings suggest that combined regulation of RhoA and Rac1 using DN adenoviral transgenic methods has the potential to modify injured peripheral nerve tissues directly.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科

キーワード：神経再生、低分子 G 蛋白質、末梢神経、組換えアデノウイルス

1. 研究開始当初の背景

整形外科領域において末梢神経再生は、脊髄再生と並ぶ大きな目標である。過去にさまざまな工夫がなされ微小手術外科手技の発展によって神経束縫合が行われ比較的良好な成績が得られるようになった。しかし、高エネルギー損傷や創挫滅の強い症例では神経欠損部位が広く、神経断端が短縮してしまうために一次縫合できない症例がある。断端を架橋するためにさまざまな方法が開発されている。連携研究者である伊藤は、甲殻類から得られるキチンから構成された加工しやすく安全な生体材料であるキトサンチューブを開発し応用している。動物実験では、神経再生能力が良好な人工神経として報告している。しかし、人工神経単独では、神経再生に時間がかかるため再生促進治療としてチューブ内に培養シュワン細胞を入れて架橋したり、ラミニンなどの接着因子や神経栄養因子の併用を行っている。最近、再生軸索のメカニズムが成長円錐で詳細な細胞外シグナルが明らかになっている。その中で注目されているのが低分子G蛋白質 rho familyの働きである。軸索再生因子と阻害因子は、Rho GTPaseの制御因子を介して Rac、Cdc、Rhoに作用する。特に rho 活性の上昇は、細胞骨格タンパクに作用し、成長円錐のコラプスを起こし伸長を停止させる。同因子以外にもさまざまな阻害因子が報告されているが、我々はこれら rho familyの制御が軸索再生の鍵になると考え、研究計画を立てた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、末梢神経再生に安定した結果を得ているキトサンチューブを使用して損傷部を架橋し、低分子Gタンパク質 rho familyの発現制御のために dominant negative タイプのアデノウイルスを導入し、末梢神経再生をより促進することである。

3. 研究の方法

1) 組み換えアデノウイルスの作製
細胞骨格・軸索伸長・細胞死などさまざまな制御機能をもつ Rho family small G protein に注目し、Rho と Rac の蛋白機能を抑制するための dominant negative type (DN) の遺伝子を作製した。同遺伝子と GFP を発現するような配列を作製してアデノウイルスベク

ターとに導入した (Ad-RhoDN と Ad-RacDN)、対照群として GFP のみのアデノウイルス (Ad-GFP) を用いた。

2) in vitroでの評価

ラット胎生 14 日の後根神経節 (DRG) を摘出し、神経節細胞の培養を行う。翌日、培養液に上記のアデノウイルスを感染させてさらに 1 日経過した時点でパラホルムアルデヒドで細胞を固定して神経線維のマーカーである Tuj1 の免疫染色を行った。Ad-GFP を用いた対照群と比較して DRG の直径と DRG 面積を解析した。

3) 坐骨神経損傷モデルの作製と損傷部位へのアデノウイルス注入

成ラットを用いて麻酔下に坐骨神経を露出して 10 mm の欠損を作製した。近位断端神経鞘膜内にアデノウイルス液 10 μ l を注入した後、10 mm のキトサンチューブで架橋した。Ad-RhoDN と Ad-RacDN を混合して注入した Rho/RacDN 群 (n=14) と Ad-GFP のみ注入した対照群 (n=14) を作製した。

4) 電気生理学的検査

麻酔下にニューロパックを用いてラット頭蓋の電気刺激を行い、下肢筋電図を導出した。筋波形の存在は、運動神経の再生を意味する。

5) 組織学的検査

8 週間後にラットの灌流固定をおこない坐骨神経との縫合部を含むキトサンチューブ内に再生した組織を摘出した。チューブ中央を切り出し薄切切片を作製してミエリン数を計測した。免疫染色法を用いて標識遺伝子である GFP の局在と神経線維のマーカーであるニューロフィラメント、シュワン細胞マーカーである S100 抗体を用いて再生組織を解析した。

4. 研究成果

1) 後根神経節は、Ad-RhoDN と Ad-RacDN の両方を感染させることで突起伸長を得た。

図 1A-D は、後根神経節の神経突起を免疫染色したもので D が両方感染させたもので直径、面積とも単独感染と比べて大きい (図 2)。

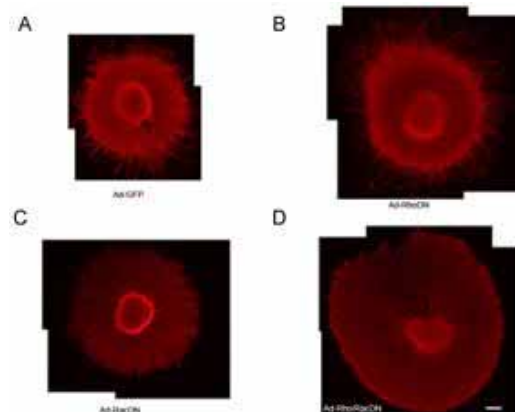
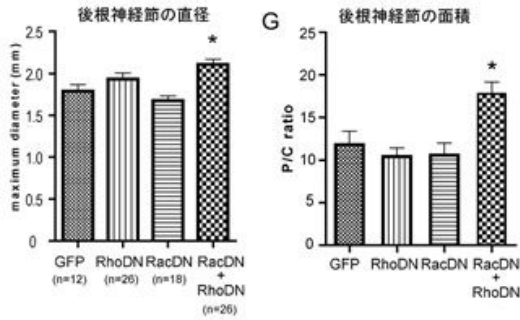
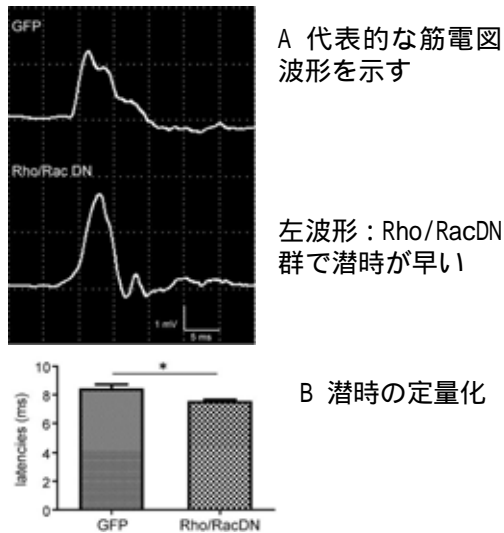


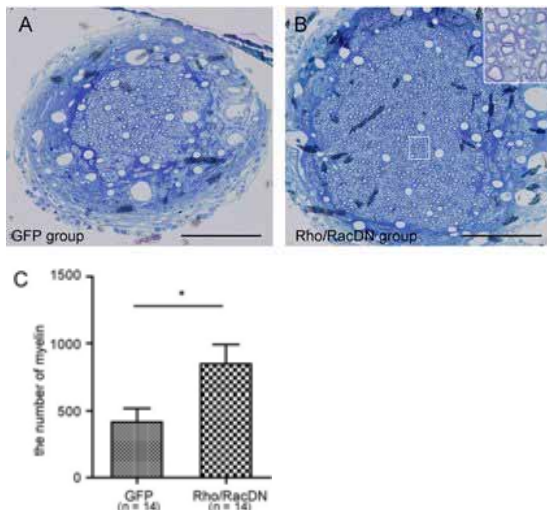
図2 後根神経節の定量化



2) ラット坐骨神経架橋後、8週での下肢導出筋電図は、対照群 14 肢中 7 肢 (50%)、Rho/RacDN 群 14 肢中 11 肢 (79%) で導出可能であった。振幅に有意差はなかったが、潜時は対照群と比較して Rho/RacDN 群で早く有意差を認めた (図 3A, B)。

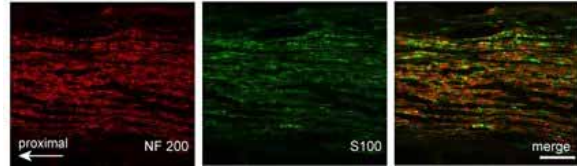


3) 人工チューブ中央で薄切標本を作製してミエリン数を定量化した。図 4 トルイジンブルーで染色した薄切標本対照群 (A) と比較して Rho/RacDN 群 (B) でミエリン形成が有意に多い (C)。



4) 免疫染色を用いた再生神経線維とシュワン細胞の局在

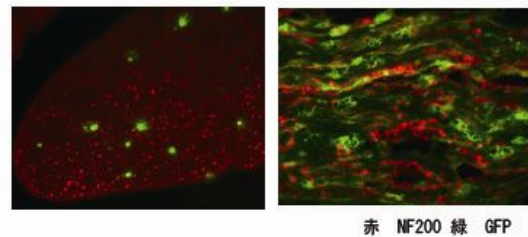
図 5 抗ニューロフィラメント抗体 (NF200) と S100 抗体を用いた 2 重蛍光免疫抗体染色を行った。NF200 陽性線維の周りに S100 陽性シュワン細胞が局在しており、再生神経線維のミエリン化が認められている。



6) 組換えアデノウイルスの局在

組換えアデノウイルスは、いずれも GFP が導入してあり、蛍光顕微鏡でその局在を確認することが可能である。ウイルス注入後、8 週では GFP は観察されなかった。しかし、2 週では、後根神経節とウイルス注入部位に GFP を認めた。ウイルス注入部位に多く GFP は局在しており神経線維周囲のシュワン細胞に多く感染していた (図 6)。

手術後2週での後根神経節 (左) とウイルス注入部位 (右)



7) まとめ

本研究では、ラット末梢神経損傷部に低分子 G タンパク質の発現を組換えアデノウイルスで導入することで神経再生の促進を得ることができた。過去の報告では、Rho や Rac 単独制御による効果が中心であり、両方の活性を抑制して再生促進を得た報告は初めてである。しかし、ウイルスの作用が、2 週間程度と短期的で再生初期における具体的な作用機序について明らかにするまでに至らなかった。ただしウイルスは、神経線維よりもミエリンを作るシュワン細胞に多く局在していることから神経再生を促進するにはシュワン細胞での Rho、Rac の制御が重要であることを示唆している。さらに低分子 G タンパク質の Cdc42 の関与も示唆される。今後は、神経再生領域でこれら低分子 G タンパク質の制御と作用機序の解明を進めていく予定である。また、軸索自身に作用する軸索再生因子を併用することでさらなる研究成果が得られると考えている。

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 1 件)

K. Kusano, M. Enomoto, T. Hirai, Y. Wakabayashi, S. Itoh, S. Ichinose, S. Okabe, K. Shinomiya, A. Okawa, Enhancement of sciatic nerve regeneration by adenovirus-mediated expression of dominant negative RhoA and Rac1, Neurosci Lett 492 64-69. 2011

[学会発表](計 3 件)

1) M. Enomoto, K. Kusano, T. Hirai, Y. Wakabayashi, S. Itoh, A. Okawa, K. Shinomiya Enhancement of sciatic nerve regeneration by adenovirus-mediated expression of dominant negative RhoA and Rac1.

The 40th annual meeting of the Society for Neuroscience 2010/11/16

2) 草野和生, 榎本光裕, 若林良明, 伊藤聡一郎, 岡部繁男, 四宮謙一

Rho family G protein 制御によるラット坐骨神経再生の促進 第 24 回日本整形外科学会基礎学術集会 2009/11/04

3) 草野和生, 榎本光裕, 伊藤聡一郎, 若林良明, 四宮謙一

Rho family small G protein 制御によるラット坐骨神経損傷治療の試み 第 27 回 日本運動器移植・再生医学研究会 2008/9/27

[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]

ホームページ等

東京医科歯科大学整形外科 HP

<http://www.tmd.ac.jp/med/orth/orth-J.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

若林 良明 (WAKABAYASHI YOSHIAKI)

東京医科歯科大学医歯学総合研究科講師

研究者番号: 00431916

(2)連携研究者

伊藤 聡一郎 (ITO SOICHIRO)

国際医療福祉大学保健医療学部教授

研究者番号: 10242190

榎本 光裕 (ENOMOTO MITSUHIRO)

東京医科歯科大学医歯学総合研究科寄付講座講師

研究者番号: 90451971

四宮 謙一 (SHINOMIYA KENICHI)
東京医科歯科大学医歯学総合研究科名誉教授

研究者番号: 20111594