

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2012

課題番号：20591790

研究課題名（和文）

骨代謝における神経制御機構の解明：転写因子 Pax6 を介したシグナル伝達について

研究課題名（英文）

Regulatory mechanisms of bone metabolism by nervous system

研究代表者

加藤 直樹（KATO NAOKI）

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：90448895

## 研究成果の概要（和文）：

我々は p38 の転写因子を介するシグナル伝達経路の活性化が維持され、酵素を介するシグナル伝達のみを阻害するノックインマウス(sem マウス)を作製し、骨代謝および神経再生の両面から個体レベルでの p38MAPK の機能について詳細に検討した。まず骨代謝について検討したところ、骨密度は野生型と比較して、sem マウスで高く、特に海綿骨では有意差を認めた。また細胞培養の結果から、こうした骨密度の増加は破骨細胞の分化阻害により生じていると思われる。次に神経再生における p38MAPK の生理的機能について検討し、sem マウスの圧挫損傷後の神経再生は組織学的にも機能的にも遅延することを確認した。p38MAPK は炎症の制御分子として、また、炎症治療の分子標的として注目されている。そこで、炎症性サイトカインである TNF $\alpha$  および IL-1 $\beta$  の発現に着目した。その結果、sem マウスでは TNF $\alpha$  および IL-1 $\beta$  の発現パターンが野生型と異なる事を見出した。加えて Wallerian 変性の指標となる Caspase-3 や神経再生の指標となる Tenascin-C についても検討し、TNF $\alpha$  および IL-1 $\beta$  同様、その発現パターンが異なる事を見出した。

## 研究成果の概要（英文）：

We generated novel p38 $\alpha$  mutant mice (sem mice) with a point mutation in the region encoding the p38 $\alpha$  substrate-docking-site, which serves as a limited loss-of-function model of p38 $\alpha$ . In the present study, we utilized sem mice and wild-type littermates (wt mice) to investigate the physiological role of p38 $\alpha$  in bone metabolism and in nerve regeneration. In bone metabolism, sem mice showed higher bone density compared with wt mice, which could come from the inhibition of the osteoclast differentiation. In nerve regeneration, we confirmed that histological and functional nerve recovery following crush injury was delayed in sem mice compared with that in wt mice. To investigate the underlying mechanisms of these findings, we examined inflammatory responses of the sciatic nerve, and found that TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , Caspase-3 and Tenascin-C showed different expression patterns following crush injury. This is the first study demonstrating physiological role of p38 $\alpha$  in bone metabolism and in nerve regeneration without the use of pharmacological inhibitors.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	600,000	180,000	780,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：シグナル伝達、酵素、転写因子、骨代謝、神経科学

### 1. 研究開始当初の背景

我々は、骨代謝、リモデリングにおける神経系制御に着目し、転写因子である Pax6 や、これを活性化する MAP キナーゼ (MAPK) と呼ばれるセリン/スレオニンリン酸化酵素の 1 つである p38MAPK を中心に研究を行ってきた。p38MAPK はエフェクター細胞であり病的な骨破壊の成因となる破骨細胞の分化に必須な転写因子の活性化を調節することや、神経細胞の生命維持、再生に関与することが知られている。

### 2. 研究の目的

骨代謝、神経再生の両面で強力な活性化作用をもつ p38MAPK の生体内における生理的機能を解明する。

### 3. 研究の方法

これまで p38 knock-out マウスが胎生致死であるため、培養細胞レベルでの研究結果が報告されてきたが、様々なシグナル伝達経路が相互的に作用しあう生体内での p38MAPK の役割を考察するには限界があった。そのため、p38MAPK の阻害剤を投与することで個体レベルでの機能解析が行われてきたが、相反する結果が報告されており、未だ統一した見解に到っていない。そこで我々は、p38 の基質結合領域に点突然変異を導入し、一部の基質との結合性を失わせた p38MAPK knock-in マウス (sem マウス) を作製した。sem マウスは p38 locus のうち基質結合領域である 11 番 exon の 316 番のアミノ酸をアスパラギン酸からアスパラギンに組み替えたマウスであり、転写因子を介するシグナル伝達経路の活性化は維持され、酵素を介するシグナル伝達のみが阻害されるマウスである。今回、この sem マウスを用いて骨代謝および神経再生の両面から解析を行った。

#### (1) 骨代謝

まず野生型および sem マウスの初代培養マクロファージ細胞に RANKL 刺激を加えてリン酸

化状態の違いを確認した。その後、野生型および sem マウスの骨密度を実験動物用 ALOKA 社製実験動物用 X 線 CT 装置により測定した。加えて両群のマウスより骨髄細胞を採取し、M-CSF の存在下に collagen gel 上で培養後、破骨細胞に分化させた。

#### (2) 神経再生

野生型および sem マウスの左坐骨神経を展開し、把持力 250g の Sugita clip を 3 分間装着して圧挫損傷を作製した。圧挫損傷後 4 週時に、Inserra の報告したマウス用の SFI を算出して歩行解析を行い、機能的神経再生を評価した後、坐骨神経を採取して神経横切標本を作製した。切片は toluidine blue で染色後、光学顕微鏡下に観察し、1 視野辺りの軸索短径、軸索面積をコンピューターシステム (NIH ImageJ ver.1.38) を用いて解析した。加えて TNF- $\alpha$  や IL-1 などの炎症性サイトカイン、caspase-3 および tenascin-C に着目し、神経損傷後の発現性について免疫組織化学的に比較検討した。

データは one-way analysis of variance (ANOVA) で解析後、Fisher's protected least significant difference (PLSD) post hoc test を用いて統計学的有意差の有無について検討した。統計学的に  $p$  値が 0.05 未満をもって有意差ありとした。

### 4. 研究成果

#### (1) 骨代謝

RANKL 刺激後の p38 MAPK のリン酸化状態を Immunoblotting にて経時的に確認したところ、通常の野生型マウスの骨髄より採取した初代培養マクロファージ細胞は、刺激後 5 分で phospho-p38 MAPK が上昇し 30 分の時点で認められなくなるのに対し、sem mouse については 15 分まで phospho-p38 MAPK が上昇し、その後 120 分まで高い発現を認めた。

全骨、皮質骨、海綿骨の各パラメーターにおける骨密度は sem マウスが高く、特に海綿骨では有意差を認めた。また sem マウスでは骨

髄細胞から破骨細胞への分化過程が有意に抑制されていた。この結果から、p38 MAPK の酵素を介したシグナル伝達を選択的に阻害すると、破骨細胞の分化阻害が生じ、その結果、骨密度が増加する事が明らかとなった。

## (2) 神経再生

圧挫損傷後4週時では、野生型と比較してsemマウスは小径軸索が大部分を占め、その軸索密度も高かった。平均軸索面積はsemマウスが $3.15 \pm 0.15 \mu\text{m}^2$ 、野生型が $5.24 \pm 0.36 \mu\text{m}^2$ 、平均軸索短径はsemマウスが $1.37 \pm 0.04 \mu\text{m}$ 、野生型が $1.52 \pm 0.06 \mu\text{m}$ であり、野生型と比較してsemマウスは有意差をもって軸索面積および軸索短径が小さかった。コントロールとして圧挫損傷反対側の右坐骨神経を採取して評価したが、平均軸索面積はsemマウスが $9.93 \pm 2.94 \mu\text{m}^2$ 、野生型が $10.21 \pm 2.34 \mu\text{m}^2$ 、平均軸索短径はsemマウスが $3.75 \pm 1.64 \mu\text{m}$ 、野生型が $3.87 \pm 1.37 \mu\text{m}$ であり、野生型とsemマウスに有意差を認めなかった。続いて機能評価として、歩行解析をマウス用のSFIを用いて算出したところ、野生型が-21.18、semマウスが-34.64であり、semマウスは有意差をもって機能的神経再生も遅延していた。この結果から、p38 MAPK の酵素を介したシグナル伝達を選択的に阻害しても、神経組織の成長過程には変化が生じないが、損傷後の神経再生は有意に抑制される事が確認出来た。

そこで、こうした神経再生の遅延を生じる機序について調べる目的で炎症性サイトカインに着目し、圧挫損傷後3日および4週時のTNF- $\alpha$  とIL-1 $\beta$  の発現について確認した。まず、TNF- $\alpha$  であるが、圧挫損傷3日後、野生型では多くの領域に発現を認めたのに対し、semマウスでは僅かな部分に認めたのみであった。陽性率は野生型が $5.8 \pm 1.7 \%$ 、semマウスが $1.3 \pm 0.8 \%$ と有意差をもって野生型が高値を示していた。一方、神経損傷後4週時では損傷後3日目の所見と逆で、陽性率は野生型が $0.3 \pm 0.2 \%$ 、semマウスが $0.9 \pm 0.4 \%$ と有意差をもってsemマウスが高値を示していた。次いでIL-1 $\beta$  であるが、圧挫損傷3日後の陽性率は野生型が $6.3 \pm 1.5 \%$ 、semマウスが $2.2 \pm 0.9 \%$ と有意差をもって野生型が高値を示していたが、4週時では野生型が0.6

$\pm 0.4 \%$ 、semマウスが $0.8 \pm 0.6 \%$ であり、semマウスが高値を示すものの両群に有意差を認めなかった。こうした結果を受けて、損傷後早期の神経内アポトーシスに關与するcaspase-3と神経再生の指標の1つであるTenascin-Cの発現を確認したところ、圧挫損傷後3日のCaspase-3の陽性率は野生型が2.1、semマウスが0.8と有意差をもってsemマウスで低下しており、Tenascin-Cについては、両群とも神経内膜を中心に発現を認め、陽性率は野生型が6.3、semマウスが1.2とCaspase-3と同様に、有意差をもってsemマウスでTenascin-Cの発現は低下していた。この結果から、p38 MAPKの酵素を介したシグナル伝達の選択的阻害により生じる神経再生の抑制には、炎症性サイトカインの発現パターンの変化が關与している事が確認出来た。

以上の結果から、p38 MAPK経路は骨代謝および神経再生の両面で、他の経路により代償されない重要な働きを演ずることが個体レベルで明らかとなった。

## 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7件)

Kato N, Matsumoto M, Kogawa M, Atkins GJ, Findlay DM, Fujikawa T, Oda H, Ogata M, Critical role of p38 MAPK for regeneration of the sciatic nerve following crush injury in vivo, J. Neuroinflammation 10(1), 2013、有

加藤直樹、松本征仁、緒方正人、禾泰壽、酒井宏哉、織田弘美、個体レベルにおけるp38 MAPKの神経再生への関与 第2報、末梢神経、21(2)、320-321、2010、無

加藤直樹、松本征仁、緒方正人、禾泰壽、織田弘美、p38 MAPKシグナル伝達阻害により神経再生は遅延する：変異型p38ノックインマウスを用いた知見、末梢神経、21(1)、84-90、2010、有

加藤直樹、松本征仁、緒方正人、禾泰壽、

織田弘美、生体内における p38 MAPK を介した神経再生制御機構(第2報)、日本手外科学会雑誌、27(1)、S276、2010、無

加藤直樹、松本征仁、緒方正人、禾泰壽、織田弘美、個体レベルにおける p38 MAPK の神経再生への関与、末梢神経、20(2)、174-175、2009、無

加藤直樹、松本征仁、緒方正人、禾泰壽、織田弘美、生体内における p38 MAPK を介した神経再生制御機構：遺伝子マウスを用いた個体レベルでの検討、日本手外科学会雑誌、26(1)、S298、2009、無

加藤直樹、松本征仁、緒方正人、関川三四子、禾泰壽、織田弘美、遺伝子組み換えマウスを用いた p38 MAPK の神経再生制御機構に関する新たな知見、末梢神経、19(2)、398、2008、無

〔学会発表〕(計8件)

加藤直樹ほか、生体内の p38 MAPK の酵素を介したシグナル伝達経路に神経再生制御因子が存在する、日本末梢神経学会(22) 2011年9月2日、沖縄

加藤直樹ほか、骨代謝および神経再生における p38 MAPK の役割：遺伝子組み換えマウスを用いた知見、日本整形外科学会基礎学会(25) 2010年10月14日、京都

加藤直樹ほか、個体レベルにおける p38 MAPK の神経再生への関与 第2報、第21回日本末梢神経学会、2010年9月4日、仙台

加藤直樹ほか、生体内における p38 MAPK を介した神経再生制御機構 第2報、第52回日本手外科学会、2010年4月15-17日、新潟

加藤直樹ほか、個体レベルにおける p38 MAPK の神経再生への関与、第20回日本末梢神経学会、2009年9月4-5日、埼玉

加藤直樹ほか、生体内における p38 MAPK を介した神経再生制御機構：遺伝子改変マウ

スを用いた個体レベルでの検討、第52回日本手外科学会、2009年4月17日、東京

加藤直樹ほか、変異型 p38 ノックインマウスを用いた骨代謝における p38 MAPK の関与、第26回日本骨代謝学会、2008年10月29-31日、大阪

加藤直樹ほか、遺伝子組み換えマウスを用いた p38 MAPK の神経再生制御機構に関する新たな知見、第19回日本末梢神経学会、2008年9月5-6日、名古屋

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

加藤 直樹 (KATO NAOKI)  
埼玉医科大学・医学部・講師  
研究者番号：90448895

### (2) 研究分担者

無し

### (3) 連携研究者

松本 征仁 (MATSUMOTO MASAHITO)  
埼玉医科大学・医学部・講師  
研究者番号：90321819

織田 弘美 (ODA HIROMI)  
埼玉医科大学・医学部・教授  
研究者番号：60101698