

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24年6月5日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21500412

研究課題名（和文）

末梢神経再生におけるグルココルチコイド作用の蛍光イメージング解析

研究課題名（英文）Imaging analysis of the effect of glucocorticoid on peripheral nerve regeneration

研究代表者

藤原 浩芳 (FUJIWARA HIROYOSHI)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号：90381962

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、末梢神経再生現象および関連する分子メカニズムを可視化することで、新たな再生評価法を検討することである。さらに、ステロイドホルモンの一つであるグルココルチコイドの神経再生における役割を解明することで、神経再生への新たな薬物治療としての応用を検討することである。グルココルチコイドはグルココルチコイド受容体 (GR) を介して、様々な生理作用を発揮する。*In vitro* の研究で、GR がシュワン細胞に存在し、髄鞘形成に関与していることが知られているが、*in vivo* でのシュワン細胞における GR の機能については明らかでない。そこで、末梢神経損傷後の再生におけるグルココルチコイドの効果を検討した。①GR の発現動態： 6 週齢 SD ラットの坐骨神経を、5 分間結紮し圧挫損傷モデルを作製した。損傷後経時的に坐骨神経を摘出し、シュワン細胞における GR の発現動態を免疫組織化学的に観察した。②内因性グルココルチコイドの機能解明： 両側副腎を摘出した後 (ADX)、コルチコステロン CORT (1mg/kg) を毎日腹腔内投与した。上記と同様に坐骨神経圧挫損傷モデルを作成し、神経再生効果を検討した。まず、損傷 3 週目に MBP (myelin basic protein) の発現を Western blotting で解析し、損傷 4 週目に半薄切片による形態学的評価を行った。【結果】①免疫組織化学染色 GR はシュワン細胞に発現し、損傷後もシュワン細胞に発現していた。②1. Western blotting 損傷後 3 週目において、ADX 群に比べ、CORT 投与群で有意に MBP の発現が上昇していた ($p < 0.05$)。2. 形態学的検討 損傷後 4 週目において、ADX 群に比べ、CORT 投与群で有意に良好な髄鞘形成を認めた ($p < 0.05$)。免疫組織化学的検討から、*in vivo* においても GR がシュワン細胞に存在し、生理機能を担っていることが示唆された。さらに、副腎摘出モデルを用いた解析から、内因性のグルココルチコイドが、末梢神経再生過程における髄鞘形成に重要な作用を有することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Glucocorticoids improve the symptoms of peripheral nerve disorders, such as carpal tunnel syndrome and peripheral neuropathy. The effects of glucocorticoids are mainly antiinflammatory, but the mechanisms of their effects in peripheral nerve disorders remain unclear. Schwann cells of the peripheral nerves express glucocorticoid receptors (GR), and glucocorticoids enhance the rate of myelin formation *in vitro*. Therefore, it is possible that the clinical improvement of peripheral nerve disorders by glucocorticoids is due, at least in part, to the modulation of myelination. In this study, an adrenalectomy (ADX) was performed, and followed by a daily injection of either low dose (1 mg/kg) or high dose (10 mg/kg) corticosterone (CORT). We then simulated a crush injury of the sciatic nerves. A sham ADX operation, followed by a simulated crush injury, was conducted as a control. Immunohistochemistry showed that the nuclei of *in vivo* Schwann cells expressed GR and that glucocorticoids impacted the GR immunoreactivity of the Schwann cells. The mRNA and protein expression of myelin basic protein was significantly lower in the animals given ADX with vehicle than in the sham operation group. However, the expression was restored in the low-dose CORT

replacement group. Morphological analyses showed that the ADX with vehicle group had a significantly lower myelin thickness than did the low-dose CORT replacement group and the sham operation group. These results suggest that endogenous glucocorticoids have an important role in myelination through the GR in Schwann cells after an in vivo peripheral nerve injury.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物系

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：末梢神経、イメージング

1. 研究開始当初の背景

近年、末梢神経損傷後の再生過程においてグリア細胞であるシュワン細胞が重要な役割を果たすことが報告されている。シュワン細胞は神経再生過程において、軸索と相互に反応しながら髄鞘形成を行い、神経電気伝達の再建に貢献する。この髄鞘化に関与する分子として **Neuregulin** や **p75NTR** などが知られているが、末梢神経損傷後の再髄鞘化の分子機構については、未だ明らかでない。

2. 研究の目的

このメカニズム解明のために、われわれはステロイドホルモンレセプターの一つであるグルココルチコイドレセプター (**GR**) に着目した。抗炎症作用しか知られていなかったグルココルチコイドおよび受容体 **GR** の新たな機能解明をすすめることで、末梢神経損傷後の神経再生および髄鞘形成のメカニズムの解明に役立つと考えた。

3. 研究の方法

【1】末梢神経障害における GR の発現動態の観察
#1：実験モデルの作成およびサンプル採取 (藤原、森崎)
 実験動物として、生後 6 週齢の Sprague-Dawley 系雄ラットを準備し、片側坐骨神経を大腿中央部で 1-0 絹糸を用いて 5 分間結紮し、末梢神経損傷モデルを作成する。損傷遠位部のシュワン細胞における GR の発現動態解析のため、損傷後 1, 3, 7, 14, 21 日

後に坐骨神経を両側摘出する。損傷中枢部のニューロンにおける GR 発現動態解析のため、損傷後 1, 4, 8 時間、1, 3, 7 日後に腰髄および後根神経節を両側摘出する。

#2：GR の発現動態の観察

免疫組織化学的に GR のシュワン細胞、ニューロンにおける発現動態を観察する。シュワン細胞では、神経再生後の髄鞘形成に重要な働きを担っており、髄鞘形成に関連した発現動態に変化がみられることが期待される。また、ニューロンにおいては、最近の報告から損傷後の栄養因子や、転写因子のシグナル伝達に関与することが予想される。シュワン細胞のマーカーとして、S100, SCIP, MBP(myelin basic protein) を用いる。ニューロンは Neurofilament を用いる。観察には蛍光・共焦点レーザー顕微鏡を使用する。
 平成 22 年度

【2】シュワン細胞における GR を介したグルココルチコイドの機能解明 (小田、森崎)
 課題 1 から得られた GR のシュワン細胞およびニューロンにおける発現動態の知見を応用して、グルココルチコイドの GR を介した機能の解析を進める。

#1：実験モデルの作成

以下の 4 群を作成し、グルココルチコイドによる神経再生促進の重要な因子である髄鞘形成への関与を調べる。

コントロール群：片側坐骨神経損傷モデル (上記と同様)

ADX 群：両側の副腎を摘出し、3 日後に損傷を加えた群

ステロイド投与群 1：ADX+コルチコステロン投与群 (1mg/kg)

ステロイド投与群2： ADX+コルチコステロン投与群(10mg/kg)

#2：ウエスタンブロッティング 髄鞘タンパクの定量

損傷後1, 2, 3, 4週にそれぞれサンプルを回収し、髄鞘タンパクMBP, MPZ(Myelin Protein Zero)の発現変化を検討する。ADXにより内因性のコルチコステロンが除去され、末梢神経損傷に対する生理的応答が著しく変動することが期待される。グルココルチコイドがGRを介して、髄鞘形成に何らかの変化をもたらすことを解析する。

#3：形態学的検討

損傷後4週に灌流固定し、サンプルを回収する。坐骨神経の横断面を厚さ2umで切り、半薄切片を作成した後、光学顕微鏡で髄鞘径を観察する。

4. 研究成果

GCの血中濃度の異なるモデルを作製するために、6週齢雄SDラット(n=60)の両側の副腎摘出(adrenalectomy: ADXと略)を行い、濃度の異なるコルチコステロン(corticosterone: CORTと略)を投与した。CORTを0mg/kg, 1mg/kg, 10mg/kgの3種類の濃度でゴマ油に溶解し、毎日腹腔内投与したものを、それぞれADX群, 低用量群, 高用量群とした。ADXの偽手術のみ施行したものを対照群とした。全群に対して坐骨神経を5分間結紮することにより、圧挫損傷を加えた。損傷後4週目に4群の血中CORT濃度をELISAで測定した。次に、正常ラットの坐骨神経の凍結切片を用いて、シュワン細胞におけるGRの発現動態を免疫組織化学的に検討し、損傷後7日目のGRの蛍光強度を、4群間で比較検討した。髄鞘形成の評価として、損傷後2, 3週目にMyelin Basic Protein (MBP)とMyelin Protein Zero (P0)の遺伝子発現量をreal-time PCR法で比較した。また損傷後3週目にMBPの発現量をWestern blot法で解析した。損傷後4週目に、坐骨神経の損傷部から5mm遠位の部位で髄鞘形成を組織学的に観察した。定量評価として、各軸索の髄鞘径、軸索径、髄鞘厚、g-ratio(軸索径/髄鞘径)を計測した。

ELISAの結果、対照群の血中CORT濃度は 147.9 ± 21.1 ng/ml, ADX群は 0.83 ± 0.11 ng/ml, 低用量群は 108.3 ± 19.9 ng/ml, 高用量群は 421.7 ± 69.6 ng/mlであった。免疫組織化学染色では、正常坐骨神経のGRはS100陽性シュワン細胞に発現していた。核を染色する4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)を用いた3重染色では、GRはシュワン細胞の核内に存在していた。損傷後7日目におけるGRの蛍光強度は、ADX群で有意に低下し、低用量群および高用量群では上昇していた。髄鞘の遺伝子発現量は、損傷後2週目では4群間

に有意差を認めなかった。損傷後3週目においてADX群のMBPが対照群より有意に低下し、低用量群および高用量群で有意に上昇していた。P0でもMBPと同様の傾向を示した。ADX群のMBP蛋白発現量は対照群と比較して有意に低下し、高用量群は低用量群より低い傾向にあった。髄鞘の組織学的評価では、4群において明らかな構造的異常を認めなかった。定量評価の結果、髄鞘径および髄鞘厚は対照群および低用量群で有意に高値であった。g-ratioは高用量群で最も高く、高用量群より低用量群で良好な髄鞘形成効果を示した。末梢神経が損傷されると、損傷部から遠位ではワーラー変性といわれるマクロファージを中心とした損傷組織の食食反応がおこる。その後、神経損傷部から基底膜に沿って軸索が伸長する。シュワン細胞は幼若化したのち分化増殖する。成熟したシュワン細胞は再生軸索の再髄鞘化を行うと同時に、神経栄養因子を放出し、再生軸索の伸長に適した環境を形成する。本研究の結果から、*in vivo*においてもGRはシュワン細胞に存在し、CORT濃度に応じてGRの蛍光強度が変化することが明らかになった。GRの髄鞘形成効果は、CORTを除去すると低下し、CORTを投与すると回復した。このことから、シュワン細胞に発現するGRは、血中のCORT濃度に応じて髄鞘形成に関与していると考えた。MBPおよびP0の遺伝子にはglucocorticoid response elementが存在しないため、GCがGRを介して、これらの蛋白を直接合成した可能性は少ない。しかし、GRが神経栄養因子のBrain Derived Neurotrophic Factor (BDNF)の発現に関与することが知られており、BDNF活性化による間接的作用が髄鞘形成を促進させたと考えた。高用量群が低用量群より髄鞘形成が不良であった理由として、GCの抗炎症作用が関与した可能性がある。CORTの高用量投与は、損傷後のワーラー変性を遅延させ、軸索伸長を阻害した結果、髄鞘形成効果を低下させたと考えた。

本研究により、GCは末梢神経損傷後の髄鞘形成効果に重要な働きを担い、シュワン細胞の核内に存在するGRを介して髄鞘形成作用を発揮することを示した。末梢神経再生過程におけるGCの機能は、末梢神経障害の新たな治療法として応用できる可能性がある。

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 2件)

1. Morisaki S, Kawai Y, Umeda M, Nishi M, Oda R, Fujiwara H, Yamada K, Higuchi T, Tanaka C, Kawata M, Kubo T: In Vivo Assessment of Peripheral Nerve

Regeneration by Diffusion Tensor Imaging. Journal of Magnetic Resonance Imaging, 2011 33(3):535-42.

2. Morisaki S, Nishi M, Fujiwara H, Oda R, Kawata M, Kubo T.: Endogenous glucocorticoids improve myelination via Schwann cells after peripheral nerve injury: An in vivo study using a crush injury model. GLIA 2010 Jun 58:954-63.

[学会発表] (計 7 件)

1. Morisaki, S., Fujiwara, H., Nishi, M., Oda, R., Kawata, M., Kubo, T. The Effects of Glucocorticoids on Myelination after Peripheral Nerve Injury. 56th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society New Orleans, Louisiana, USA 2010. 3. 5-11.
2. Morisaki, S., Fujiwara, H., Nishi, M., Oda, R., Kawata, M., Kubo, T. The Effects of Glucocorticoids on Peripheral Nerve Injury. 32th Japan Neuroscience Nagoya, Japan 2009. 9. 16
3. Morisaki S, Oda R, Fujiwara H, Itoi K, Kawai Y, Umeda M, Higuchi T, Tanaka C, Kubo T. The Effectiveness of in vivo Diffusion Tensor Magnetic Resonance Imaging in Peripheral Nerve Injury 37th Japan NMR conference Yokohama, Japan 2009. 11. 5
4. Morisaki, S., Fujiwara, H., Nishi, M., Oda, R., Kawata, M., Kubo, T. NEW ROLE OF GLUCOCORTICOID AND GLUCOCORTICOID RECEPTOR IN THE PERIPHERAL NERVE INJURY 55th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society Las Vegas, USA 2009. 2. 22-25.

5. 森崎真介, 西真弓, 藤原浩芳, 小田良, 河田光博, 久保俊一 末梢神経障害におけるグルコルチコイドの効果 第 32 回日本神経科学大会 名古屋 2009. 9. 16

6. 森崎 真介, 小田 良, 藤原 浩芳, 糸井 恵, 河合 裕子, 梅田 雅宏, 樋口 敏宏, 田中 忠蔵, 久保 俊一: 末梢神経障害における in vivo 拡散テンソル法の有用性 第 37 回日本磁気共鳴医学会大会 横浜 2009. 10. 1

7. 森崎真介, 西真弓, 藤原浩芳, 小田良, 河田光博, 久保俊一: 末梢神経障害におけるグルコルチコイド作用の新たな機能解析 第 24 回日本整形外科学会基礎学術集会 横浜 2009. 11. 5

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 浩芳 (FUJIWARA HIROYOSHI)
京都府立医科大学・医学研究科・講師
研究者番号 : 90381962

(2) 研究分担者

西 真弓 (NISHI MAYUMI)
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 40295639

小田 良 (ODA RYO)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号 : 80516469

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :