

## 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 5 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21659353

研究課題名（和文） 末梢神経障害部位を描出する新しい検査方法の開発

研究課題名（英文） A new method for detecting the injury site of peripheral nerve

研究代表者

村瀬 剛（MURASE TSUYOSHI）

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：50335361

研究成果の概要（和文）：中枢神経障害の確定診断は正確に行われるようになったが、末梢神経障害の診断に有用な画像検査は現在もほとんど存在しない。本研究では、末梢神経に特異的に親和性を示すことが知られている M. Leprae 由来の蛋白質である ML-LBP21 のクローニングを行い、ある部位（30-40 アミノ酸配列）にシュワン細胞に特異的に結合するシグナルが含まれている可能性が高いことを示すデータを得た。これらをマーカーとして利用することで、末梢神経障害部位を鋭敏に検出する新しい画像検査方法の開発につながる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：A method for detecting the injury site of peripheral nervous system is not available whereas several examinations are available for that of central nervous system. In the present study, we reported that a peptide derived from ML-LBP21, a protein originated from M. Leprae, binded to the surface of the Schwann cells. Using this peptide as a marker of the injury site, we may detect the injury site of peripheral nervous system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	800,000	0	800,000
2010 年度	1,000,000	0	1,000,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	360,000	3,360,000

研究分野：末梢神経再生

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：末梢神経障害、シュワン細胞、画像診断、イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

CT や MRI 等の画像検査技術の発達により、脳梗塞、脳挫傷、脊髄損傷など様々な中枢神経障害に対する確定診断は格段に正確に行われるようになった。一方、末梢神経障害の診断に有用な画像検査は現在もほとんど存在しない。外傷性末梢神経損傷や絞扼性神経障害、あるいは頸椎症性神経根障害など末梢神経に起因する疾病の頻度の高さと、確定診断の難しさを考えれば末梢神経障害をター

ゲットとした新しい画像検査方法の確立は社会的に大きな意義を有するものと考えられる。本研究では全く新しい試みとして、末梢神経に親和性を示す物質を見だし、それをマーカーとして利用することにより、末梢神経障害部位を鋭敏に検出する新しい画像検査方法を開発しようとするものである。

末梢神経に親和性を示す物質を検索するに際して、我々は末梢神経特異的に感染する病原体に着目し、基礎研究を行ってきた。末

梢神経が侵される感染症として帯状疱疹とハンセン病が挙げられる。それぞれ帯状疱疹ウイルス、*Mycobacterium Leprae* (*M. Leprae*)が病原体である。いずれの疾病も末梢神経が特異的に侵されることが特徴であることから、まずこれらのウイルス、細菌の末梢神経親和性を示す部位の同定を行うことが末梢神経親和性物質検索の手がかりになると考えられる。特に *M. Leprae* は末梢神経の基底膜に強い親和性を示すことが知られており、これまで我々も *M. Leprae* に着目して研究を進めてきた。*M. Leprae* を構成するあるタンパク質 (ML-LBP21) は、末梢神経系細胞であるシュワン細胞のラミニン2に親和性を示すことがすでに知られていた (Rambukkana et al., PNAS 96(17): 9857-62, 1999) ため、我々はまず *M. Leprae* のゲノムライブラリーを入手し、ML-LBP21 を精製することから研究に着手してきた。

## 2. 研究の目的

前述したように *M. Leprae* を構成する蛋白質 ML-LBP21 がシュワン細胞に親和性を示し、取り込まれることがすでに確認されているため、ML-LBP21 のシュワン細胞親和性を示す責任部位の同定をまず行う。このように、あるウイルス、細菌が末梢神経に親和性を示すという特性を利用して、末梢神経に親和性を示す最小責任部位 (ペプチド) の同定を行うことが、まず最初の目標である。次にその同定したペプチドに GFP やルシフェラーゼなどのタグをつけることによりラベルを行い、末梢神経損傷モデル動物にラベルしたペプチドの全身投与を行う。末梢神経損傷部位ではワーラー変性によりシュワン細胞が増殖することが知られているため、実際に末梢神経損傷部位にラベルしたペプチドが集積するかどうかを確認する。このように、末梢神経に親和性を示すペプチドを末梢神経損傷モデルに投与することにより、末梢神経障害部位を描出する新しい検査方法を開発することを目的とする。

現在、中枢神経障害に対しては CT や MRI などで診断が可能であるが、末梢神経は中枢神経に比べて体積が小さく画像でとらえにくいことから、末梢神経障害に対する画像検査は未だほとんど開発されていない。そのため末梢神経障害に対しては現在もなお、麻痺筋の分布、知覚障害範囲、ティネル徴候の有無などの理学所見や、神経伝導速度、筋電図測定などの電気生理学的検査による診断が行われてきた。しかし、熟練した専門医による診察が必要であり、さらにそのような診察や検査を行っても確定診断が得られないことが少なくなかった。そのため末梢神経障害を鋭敏に描出する画像検査は、まさに臨床の場で渴望されている検査法と言える。

## 3. 研究の方法

### (1) 末梢神経に親和性を示す物質の同定

- ① *M. Leprae* のゲノムライブラリーから ML-LBP21 のクローニングを行い、大腸菌を用いて ML-LBP21 タンパク質の精製を行う。
- ② ラットの末梢神経系細胞の培養を行う。すなわち初代培養後根神経節ニューロン、初代培養シュワン細胞、およびそれらの共培養を行う。
- ③ ①で精製したタンパク質でマイクロビーズをコーティングし、そのマイクロビーズと培養細胞を混合することにより、マイクロビーズが細胞内へ取り込まれるかどうかを免疫細胞化学染色にて確認する。その際、マイクロビーズの数を数えることにより定量化を行う。
- ④ タンパク質の欠失変異体 (deletion mutant) を作製し、大腸菌を用いてそのタンパク質を精製する。
- ⑤ ③と同様にマイクロビーズのコーティングを行い、細胞内へ取り込まれるかどうかの確認を行う。
- ⑥ ④と⑤の工程を繰り返すことにより、末梢神経に親和性を示す最小単位の分子構造 (ペプチド) の同定を行う。

### (2) 末梢神経障害部位を描出する検査方法の開発

- ① 同定したペプチドにルシフェラーゼあるいは GFP を用いてラベリングを行う。
- ② ラベルしたペプチドを、末梢神経障害のない正常なマウスに全身投与する。
- ③ まず免疫組織化学染色にて全身の組織について投与したペプチドの分布の検討を行う。特に神経系組織については、中枢神経系も含めて詳細な観察を行う。
- ④ 次にルミネッセンス法 (ルシフェラーゼに対して)、フルオレッセンス法 (GFP に対して) にて *in vivo* イメージングを行い、ペプチドの分布の検討を行う。特に神経系組織については詳細な観察を行い、全身の末梢神経がうまく描出されるかどうか検討する。
- ⑤ また神経伝導速度検査、神経軸索用のトレーサー、行動機能評価などにより、ペプチド投与が、マウスの神経機能に及ぼす影響についての検討を行う。
- ⑥ ③、④および⑤の結果より投与量、投与後の観察期間などについて至

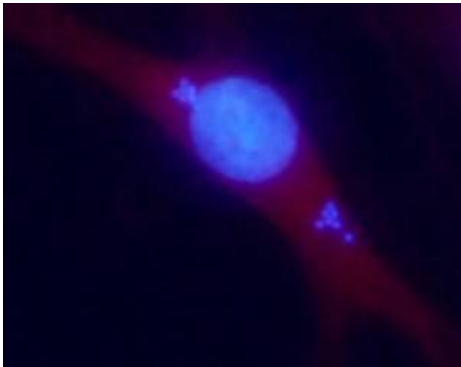
適条件の検討を行う。

- ⑦ マウスの末梢神経損傷モデルを作製し、ラベルしたペプチドを投与することにより末梢神経損傷部位にて変化(ペプチドの集積が亢進するのか、あるいは損傷部より末梢において集積が認められなくなるのかなど)が認められるかどうかを確認する。

#### 4. 研究成果

まず *M. Leprae* のゲノムライブラリーから ML-LBP21 のクローニングを行い、大腸菌を用いて ML-LBP21 蛋白質の精製を行った。それと平行して、初代シュワン細胞の培養を行った。精製した蛋白質でマイクロビーズをコーティングし、そのマイクロビーズと初代シュワン細胞を混合したところ、細胞内にマイクロビーズが取り込まれることがわかった(図1)。

図1 シュワン細胞に取り込まれたマイクロビーズ



青は DAPI、赤は S100 抗体、青色に小さく発色するのがマイクロビーズ

次に ML-LBP21 蛋白質の欠失変異体(deletion mutant)を 14 種類作製した。まず ML-LBP21 の N 端蛋白(aa 1-89)と C 端蛋白(aa 90-200)を作製し、同様に実験を行ったところ、N 端蛋白ではマイクロビーズの取り込みはほとんど認められなかった(図2)が、C 端蛋白では全長の ML-LBP21 と同様のマイクロビーズの取り込みが認められた(図3)。

図2 N 端蛋白でコーティングしたマイクロビーズのシュワン細胞への取り込み

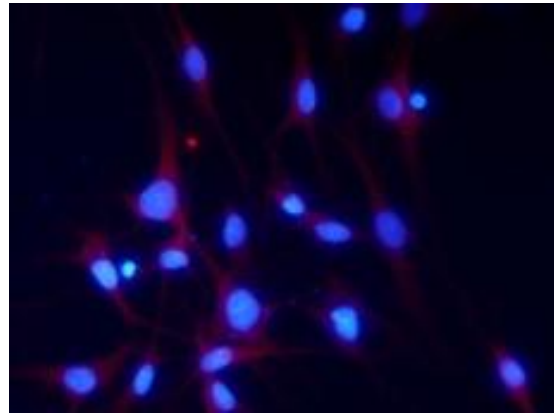
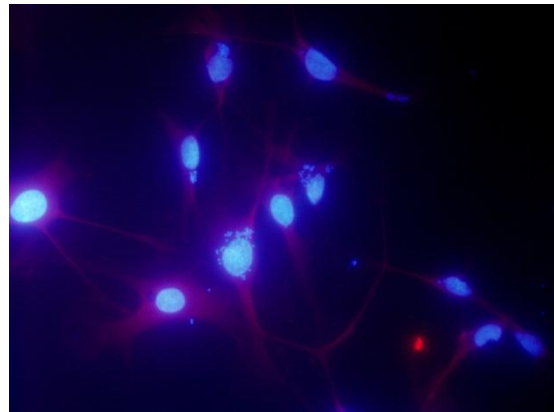


図3 C 端蛋白でコーティングしたマイクロビーズのシュワン細胞への取り込み



同様にマイクロビーズの取り込み実験を、欠失変異体を用いて研究を進めたところ、30-40 アミノ酸配列部に責任部位であることが示唆された。今後はさらにより限定された範囲まで、責任部位を解析する必要があり、末梢神経障害部位を描出する画像システムの開発のためには、今後も研究を継続する必要があると考える。

また、本研究による結果を発展的に応用することで、末梢神経障害部位へ神経栄養因子などを高効率にデリバリーして、神経再生を促す治療も将来可能になると考えられる。このように、本研究で得られる知見・技術は、将来的には末梢神経障害の診断と治療の両面を支えるテクノロジーに発展する可能性があるという点において、極めて社会的意義が高いものであると考える。

#### 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 4 件)

- ① Okada K, Tanaka H, Temporin K, Okamoto M, Kuroda Y, Moritomo H, Murase T,

Yoshikawa H. Akt/mTOR signaling pathway regulates neurite outgrowth in cerebellar granule neurons stimulated by methylcobalamin. *Neurosci Lett*. 査読有 495, 2011, 201-204.

DOI: 10.1016/j.neulet.2011.03.065

- ② 岡田 潔、西井 孝、田村 理、森友寿夫、村瀬 剛、吉川秀樹. MRI:T2 mapping 法を用いた特発性足根管症候群の評価の試み. *末梢神経*. 査読有 22, 2011, 211-212.
- ③ Okada K, Tanaka H, Temporin K, Okamoto M, Kuroda Y, Moritomo H, Murase T, Yoshikawa H. Methylcobalamin increases Erk1/2 and Akt activities through the methylation cycle and promotes nerve regeneration in a rat sciatic nerve injury model. *Experimental Neurology*. 査読有 222, 2010, 191-203.  
DOI: 10.1016/j.expneurol.2009.12.017
- ④ 岡田 潔、田中啓之、轉法輪光、黒田有佑、岡本道雄、森友寿夫、村瀬 剛、吉川秀樹. Methylcobalamin は Akt/mTOR シグナル伝達を介して神経軸索伸展を促進する. *末梢神経*. 査読無 21, 2010, 328-329.

[学会発表] (計 10 件)

- ① 岡田 潔 他. 神経再生における p70 ribosomal S6 protein kinase と methylcobalamin の関係. 日本運動器移植・再生医学研究会. 2011/9/25 福岡
- ② 岡田 潔 他. p70 ribosomal S6 protein kinase の活性化と methylcobalamin 作用機序の関係. 日本末梢神経学会. 2011/9/3 沖縄
- ③ 岡田 潔 他. 特発性足根管症候群に対する T2 mapping 法による評価の試み. 日本整形外科学会. 2011/5/15 Web 開催
- ④ Okada K, et al. Methylcobalamin promotes neurite outgrowth through Akt/mTOR signaling pathway in cerebellar granule neurons. 28<sup>th</sup> Annual Adrian E. Flatt residents and fellows conference in hand surgery. 2010/10/5 Boston USA
- ⑤ 岡田 潔 他. Methylcobalamin はラット坐骨神経損傷モデルにおいて軸索伸展および機能改善を促進する. 日本手外科学会. 2009/4/16 東京

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

村瀬 剛 (MURASE TSUYOSHI)  
大阪大学・医学系研究科・講師  
研究者番号 : 50335361

### (2) 研究分担者

吉川 秀樹 (YOSHIKAWA HIDEKI)  
大阪大学・医学系研究科・教授  
研究者番号 : 60191558

森友 寿夫 (MORITOMO HISAO)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号 : 00332742

岡田 潔 (OKADA KIYOSHI)  
大阪大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号 : 40576279

### (3) 連携研究者

なし