

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 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791743

研究課題名（和文） P75 遺伝子の神経再生における役割と治療への応用

研究課題名（英文） Role of P75NTR in peripheral nerve regeneration

研究代表者 波多 祐紀

（ Yuki Hata ）

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：10351058

研究成果の概要（和文）：P75 神経栄養因子受容体欠損かつ S-100 蛋白 GFP 発現の両方の性質を持つマウスの作成に成功した。これらの遺伝子改変マウスに対して神経移植手術により髄鞘の再生を可視化する方法を改良中である。研究を進める中で P75 欠損マウスの皮膚創傷治癒が大きく遅延する事象を認めたため、その線維芽細胞を用いた実験も行った。P75 欠損線維芽細胞の遊走能・増殖能・分化能が野生型のそれに比べ低下している事を支持するデータを得たため、発表を行った。

研究成果の概要（英文）：Double transgenic mice without P75NTR and with GFP expression in S-100 protein was successfully created. We invented the way to visualize myelin sheath regeneration by peripheral nerve transplantation. In addition, we proved that lack of p75 Low Affinity Nerve Growth Factor Receptor (p75NTR) impairs the migration, proliferation and the differentiation to miofibroblasts in fibroblasts of mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
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・形成外科学

キーワード：末梢神経再生、p75NTR、シュワン細胞、創傷治癒、線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

顔面神経麻痺や腕神経叢損傷などの末梢神経障害は、その機能回復が困難である事から多くの患者の生活を困難にし続けている。

末梢神経に損傷が起きた際、神経細胞とシュワン細胞は相互に作用しながら神経再生を来す事は古くから知られている。

さらに近年の研究では損傷した神経の再生はニューロトロフィンなどの各種神経外因子により制御されていることが明らかに

なり始めている。なかでも TNF 受容体ファミリーに属する低親和性ニューロトロフィン受容体である p75 は、その様々な作用が過去に報告されてきたが、その評価は一定しない。

この機序を解明するため、我々のグループでは、まずは軸索の影響しない環境でのシュワン細胞の変化を研究する必要があると考えた。このため、まずはヌードマウスに p75 ノックアウトマウスのシュワン細胞を移植

したところ、対照のワイルドタイプのシュワン細胞を移植したものに比べて有意に軸索の再生が阻害された。

この結果によりシュワン細胞において p75 が末梢神経損傷後の再ミエリン化及び軸索伸展に貢献していることを我々のグループは証明した。

2. 研究の目的

前述の背景を踏まえ、本研究は「末梢神経損傷後の髄鞘再構築に於いて p75 遺伝子がどの様に関与しているか」を解明することを目的とした。

この結果を用いて、末梢神経の再生を促進する神経外因子を解明することができれば、その投与による顔面神経麻痺や腕神経叢損傷など末梢神経障害の治療の研究をさらに発展させることができると考えた。

3. 研究の方法

(1) in vitro

シュワン細胞に GFP を発現するマウスと p75 ノックアウトマウスを交配させたマウス（生後 4-5 日）から DRG（後根神経節）を採取し、既定のプロトコルに従ってシュワン細胞を培養する。同時にコントロール群として野生型マウスより採取・培養したシュワン細胞群を用意する。

両細胞群をボイデンチャンバー(Ritch, P. A., Carroll, S. L. & Sontheimer, H. (2003) J. Biol. Chem. 278, 20971-20978.)に移し、チャンバーを通過させる。蛍光顕微鏡下にて通過した細胞数を計測し、遊走能の違いを評価する。

また、同じマウスから採取した坐骨神経片をチャンバースライドに配置し、細胞培養培地内で 48 時間インキュベートした後固定し、蛍光顕微鏡下にて深頸断端からのシュワン細胞の遊走距離の違いを比較する。

(2) in vivo

シュワン細胞に GFP を発現するマウスと p75KO マウスを交配させた成熟マウスにおいて、片側坐骨神経を露出する。数mmの神経欠損を作成し、GFP 非発現マウスの坐骨神経グラフトにて欠損部を再建した後、フィブリン糊にて固定する。（コントロール群として野生型マウスに対し同一手術を施行した群を用意する。）

約 10 日後灌流固定し、蛍光顕微鏡下にて、移植神経グラフト内のシュワン細胞の進展距離を計測し、遊走能の違いを評価する。

4. 研究成果

P75NTR ノックアウトマウスの安定した繁殖に成功した。同時に P75NTR ノックアウト及び S-100 蛋白 GFP 発現の double transgenic マウスの作成を進め、これの安定した繁殖に成功した。

これらの transgenic マウスに対して手術により髄鞘の再生を可視化する方法を考案し、実用化した。具体的には common peroneal nerve に 10mm の欠損を生じさせた S-100 蛋白 GFP 非発現マウスに対して GFP 発現マウスの神経片移植を行い、一定期間の後に摘出する。レシピエントの common peroneal nerve 内に進入した GFP の蛍光を計測し、シュワン細胞の進入距離とした。P75 ノックアウト・野生型両タイプについて行い、P75 の欠失が in vivo で髄鞘の再生に及ぼす影響を計測した。

P75 ノックアウトマウスの common peroneal nerve が野生型に比べて非常に細いため、統計的な比較を行える計測結果を得られるよう手技を改良中である。

また、研究を進める中で P75 ノックアウトマウスの皮膚創傷治癒が野生型に比べ遅延する事象を認めたため、その皮膚より培養した線維芽細胞を用いた実験を行った。P75 ノックアウトマウス線維芽細胞の遊走能・増殖能・筋線維芽細胞への分化が野生型のそれに比べ低下している事を in vitro /in vivo 両面から示すデータを得たため後述の発表を行った。

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）

〔学会発表〕（計 2 件）

波多祐紀、p75 ニューロトロフィン受容体欠損マウスにおける線維芽細胞への影響、第 18 回日本形成外科学会基礎学術集会、2009 年 10 月 1 日

波多祐紀、p75 ニューロトロフィン受容体欠損マウス線維芽細胞における筋線維芽細胞への分化の評価、第 19 回日本形成外科学会基礎学術集会、2010 年 9 月 16 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者 波多 祐紀
(Yuki Hata)

大阪大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：10351058

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：