

令和 6 年 5 月 17 日現在

機関番号：13701
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2021～2023
課題番号：21K09273
研究課題名（和文）シュワン細胞脱分化機構の解明と未分化シュワン細胞誘導による末梢神経再生の研究

研究課題名（英文）Identification of the pathway regulating schwann cells dedifferentiation and peripheral nerve regeneration via promoting immature schwann cells

研究代表者
平川 明弘（Hirakawa, Akihiro）

岐阜大学・大学院医学系研究科・特任准教授

研究者番号：50422720
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：Schwann細胞の脱分化過程および末梢神経再生におけるPI3K/Aktシグナルの役割を解明するために、Schwann細胞特異的遺伝子改変マウス：Sox10-Cre-ERT2マウスとPten flox/floxマウスを交配しPI3K/Aktシグナル亢進マウスを作成した。Sox10-CreERT2/Pten flox/floxマウスの坐骨神経損傷後5、28日目に免疫染色をおこなうとMbp（分化Schwann細胞マーカー）発現が持続していた。Schwann細胞におけるPI3K/Aktシグナル亢進によって、Schwann細胞の脱分化が遅延し同シグナルが治療ターゲットになり得ると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
現在、末梢神経損傷において縫合処置が困難な場合は自家神経移植が行われているが、これには健常部位からの組織採取を必要とし機能回復も決して十分ではない。一方末梢神経損傷後に生じる未分化Schwann細胞が神経再生に重要であることは知られているがSchwann細胞の脱分化を制御するメカニズムは未解明な点が多い。本研究ではSchwann細胞におけるPI3K/Aktシグナル亢進によって脱分化が遅延することが明らかになった。本シグナルに作用するシード化合物を同定することや、未分化Schwann細胞を誘導することにより、新しい末梢神経再生医療が可能となることを示唆すると考える。

研究成果の概要（英文）：To investigate the role of PI3K/Akt signaling in Schwann cell dedifferentiation and peripheral nerve regeneration, Schwann cell-specific genetically engineered mice: Sox10-Cre-ERT2 mice were crossed to Pten flox/flox mice. Immunofluorescence analysis of injured sciatic nerve sections at 5 and 28 days post injury from Sox10-CreERT2/Pten flox/flox mice demonstrated elevated Mbp (marker of differentiated Schwann cell) expression. It was suggested that PI3K/Akt signaling enhancement delays Schwann cell dedifferentiation. These findings present the potential value of PI3K/Akt signaling in Schwann as a molecular therapeutic strategy for peripheral nerve injury.

研究分野：末梢神経再生

キーワード：未分化Schwann細胞 末梢神経再生 PI3K/Aktシグナル

1. 研究開始当初の背景

現在、末梢神経損傷において縫合処置が困難な場合は自家神経移植が行われているが、これには健常部位からの組織採取を必要とし機能回復も決して十分ではない。一方末梢神経損傷後に生じる未分化シュワン細胞が神経再生に重要な役割を果たし、新規治療方法のターゲットとして注目されている(Painter MW, et al. Neuron 2014)。しかし脱分化時のシグナル経路や脱分化を制御するメカニズムは未解明な点が多く、脱分化シグナル経路に作用する新規化合物や未分化シュワン細胞を誘導し、これを神経再生に用いた研究は報告されていない。

2. 研究の目的

末梢神経損傷部における Schwann 細胞の脱分化時のシグナル経路および脱分化を制御するメカニズムを明らかにし、それらの知見を利用することにより全く新しい末梢神経再生医療を目指すことである。

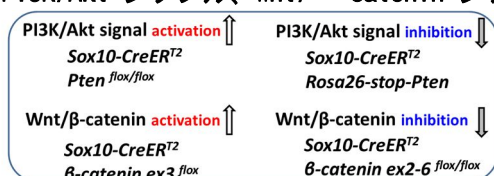
3. 研究の方法

マウスの坐骨神経損傷モデルを作製し、坐骨神経をサンプルとして RNA シークエンスを行い、シュワン細胞の脱分化を正または負に制御する遺伝子群およびシグナル伝達経路を解析した。その結果、シュワン細胞の脱分化過程において PI3K/Akt および Wnt/ β -catenin シグナル活性が優位に低下することを同定した。そこで、神経損傷後の未分化シュワン細胞を積極的分化誘導するためには、PI3K/Akt および Wnt/ β -catenin シグナルを抑制することが有益となると仮説を立てた。

Cut Nerve down: 2920 genes KEGG pathway analysis

Annotation Cluster	Term	Count	%	PValue
Annotation Cluster 4	Enrichment Score: 3.943215773017712			
KEGG_PATHWAY	mmu04512:ECM-receptor interaction	26	0.926586	9.77E-06
KEGG_PATHWAY	mmu04510:Focal adhesion	43	1.532431	1.23E-04
KEGG_PATHWAY	mmu04151:PI3K-Akt signaling pathway	60	2.138275	0.001234722
Annotation Cluster 6	Enrichment Score: 2.869853534436737			
KEGG_PATHWAY	mmu05217:Basal cell carcinoma	19	0.67712	1.59E-05
KEGG_PATHWAY	mmu04916:Melanogenesis	26	0.926586	8.59E-05
KEGG_PATHWAY	mmu04310:Wnt signaling pathway	32	1.140413	2.13E-04
KEGG_PATHWAY	mmu04390:Hippo signaling pathway	33	1.176051	3.43E-04

(1)PI3K/Akt シグナル、Wnt/ β -catenin シグナル亢進・抑制マウスの作成



上記を in vivo で証明すべく、坐骨神経損傷後のシュワン細胞脱分化における PI3K/Akt シグナル、Wnt/ β -catenin シグナルの関与を解析するため、タモキシフェンを投与することでシュワン細胞特異的に Cre-LoxP 組換え反応の誘導が可能である Sox10-CreERT2 マウスを

導入した。さらに、Cre 依存的 PI3K/Akt シグナル活性化マウス Pten flox マウスを導入し、Cre 依存的 PI3K/Akt シグナル抑制マウス Rosa26-stop-Pten マウスを新規に作製した(2019 年度先端モデル動物支援プラットフォーム 支援番号 Aa200010)。また、Cre 依存的 Wnt/ β -catenin シグナル活性化マウス β -catenin ex3 flox、Wnt/ β -catenin シグナル抑制マウス β -catenin ex2-6 flox マウスを導入した。上記を交配し、Sox10-CreERT2/Pten flox/flox (gain of function) および、Sox10-CreERT2/Rosa26-stop-Pten (loss of function)、Sox10-CreERT2/ β -catenin ex3 flox (gain of function)、Sox10-CreERT2/ β -catenin ex2-6 flox/flox (loss of function) を作製した。

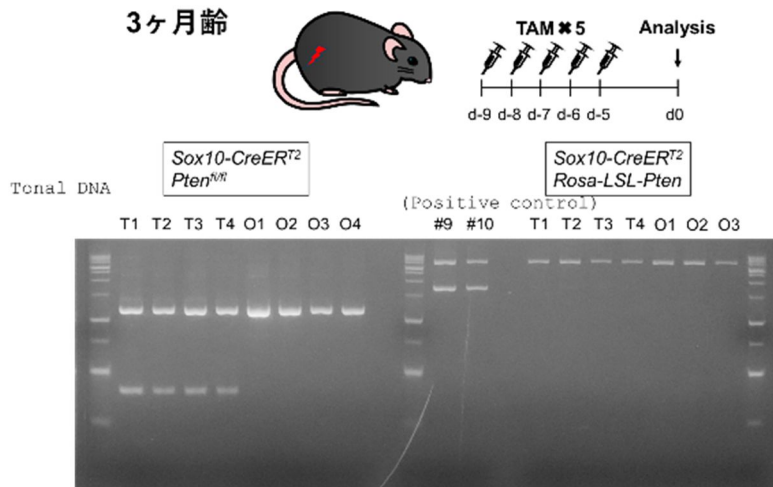
(2)末梢神経損傷モデルマウスの作製・神経損傷部における免疫組織化学的解析

上記(1)で作成したマウスに対して8週齢の時点で右坐骨神経を露出させ、これを Forceps を用いて挫滅させることにより末梢神経(坐骨神経)損傷モデルマウスを作成する。モデルマウスにおいて損傷後5日目および28日目に損傷部を採取し組織切片を作成。遺伝子・タンパク発現について免疫組織化学的解析をおこなった。

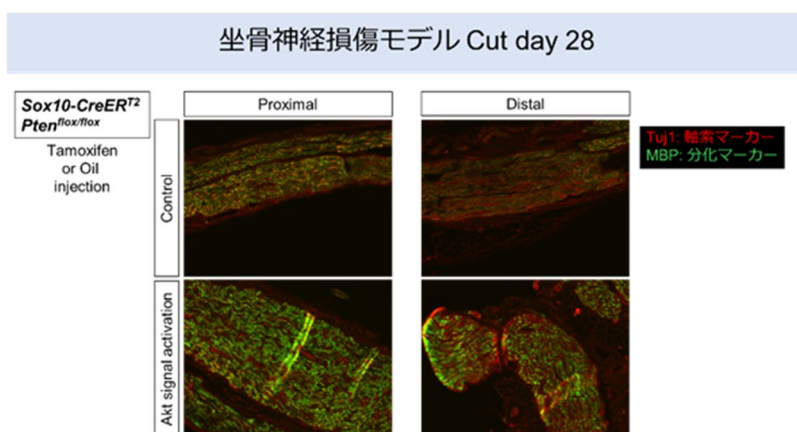
4. 研究成果

(1)PI3K/Akt シグナルの解析

Sox10-CreERT2/Pten flox/flox マウスおよび Sox10-CreERT2/Rosa26-stop-Pten マウス(3ヶ月齢)にタモキシフェンおよび corn oil (コントロール)を投与後、坐骨神経損傷モデルを作製した。坐骨神経から DNA を回収し、PCR 法を用いて Cre-LoxP 反応を確認したところ、Sox10-CreERT2/Pten flox/flox マウスでは Cre-LoxP 反応が確認できたが、Sox10-CreERT2/Rosa26-stop-Pten マウスにおいては Cre-LoxP 反応が生じなかった(図1)。そのため、シュワン細胞における PI3K/Akt シグナルの抑制実験 (Sox10-CreERT2/Rosa26-stop-Pten マウス)を断念した。Sox10-CreERT2/Pten flox/flox マウスの坐骨神経損傷後5日目、28日目に組織標本作製し、H&E 染色、免疫染色(分化シュワン細胞マーカー(Mbp)、未分化シュワン細胞マーカー(Ngfr)軸索マーカー(Tuj1))を行った。その結果、シュワン細胞における PI3K/Akt シグナル亢進によって、Mbp 発現が持続していたことから、シュワン細胞の脱分化が遅延することが示唆された(図2)。



(図 1)



(図 2)

(2)Wnt/ -catenin シグナルの解析

Sox10-CreERT2/ -catenin ex3 flox マウス、Sox10-CreERT2/ -catenin ex2-6 flox/flox マウス (3ヶ月齢) にタモキシフェンおよび corn oil (コントロール) を投与後、坐骨神経損傷モデルを作製した。28 日目に組織標本を作製し、H&E 染色、免疫染色を行った。しかし、コントロール群と比較し、坐骨神経の再生には変化を認めなかった。以上より、Wnt/ -catenin 関連の動物実験を中止した。

(3)まとめ

本研究では末梢神経損傷時にシュワン細胞における PI3K/Akt シグナル亢進によってシュワン細胞の脱分化が遅延することが明らかになった。本シグナルに作用するシード化合物を同定することや未分化 Schwann 細胞を誘導することにより、新しい末梢神経再生医療が可能となることを示唆すると考える

今後は In vivo でのシュワン細胞特異的 PI3K/Akt シグナル抑制実験を実施すべく、新規遺伝子改変マウスの作製に着手した (Sox10-CreERT2/Rosa26-stop-rtTA/Col1a1⁺; Tet0-Akt1^{K179M} (kinase dead Akt1: dominant negative))。ES 細胞への遺伝子導入に成功し、キメラマウスが得られた。今後、同マウスを使用し、シュワン細胞特異的 PI3K/Akt シグナル抑制による脱分化促進 (未分化 Schwann 細胞の誘導) を検証する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	河村 真吾 (Komura Shingo) (30456511)	岐阜大学・医学部附属病院・助教 (13701)	
研究分担者	秋山 治彦 (Akiyama haruhiko) (60402830)	岐阜大学・大学院医学系研究科・教授 (13701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関