

令和 7 年 5 月 22 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2022～2024

課題番号：22K10116

研究課題名（和文）シグナル抑制機構から解明するシュワン細胞機能の調節メカニズム

研究課題名（英文）Suppression of Hedgehog signaling pathway modulate Schwann cell function

研究代表者

佐藤 由美子（Sato, Yumiko）

新潟大学・医歯学総合病院・特任助教

研究者番号：70709857

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）：シュワン細胞が分化・脱分化するモデルとして末梢神経損傷モデルを作成し、神経損傷を契機にシュワン細胞は脱分化するが、脱分化シュワン細胞ではヘッジホッグ(Hh)シグナル活性を上昇させ、このシグナルがシュワン細胞の増殖と分化の調節を行なっていることを見出した。さらに、正常末梢神経内の分化シュワン細胞はHhシグナル活性を欠いているが、このシグナル活性の調節に抑制型のGli3が働き、シグナル抑制によるシグナル不活化が起こっている可能性があることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞機能維持のためシュワン細胞内で不活化されているシグナルの調節メカニズムはこれまで注目されてこなかった。この調節メカニズムの一端が明らかになったことで、発現の有無が不明であった関連遺伝子やタンパク質を連鎖的に顕在化することが可能となり、さらに他の関連するシグナルの制御機構の全貌を解き明かす糸口となりうる。本研究成果はシュワン細胞依存的な末梢神経系の恒常性維持機構の理解に直結し、シュワン細胞の機能異常を伴う末梢神経疾患の病態把握に繋がる。

研究成果の概要（英文）：We studied the signaling which regulates differentiation and dedifferentiation of Schwann cells using a peripheral nerve injury model. We found that Schwann cells undergo dedifferentiation in response to nerve injury. In dedifferentiated Schwann cells, Hedgehog (Hh) signaling activity is upregulated, and this signaling was found to regulate the proliferation and differentiation of Schwann cells. Furthermore, although differentiated Schwann cells in normal peripheral nerves lack Hh signaling activity via repressor form Gli3. Our results suggest that Gli3 suppress Hh signaling in peripheral nerve.

研究分野：外科系歯学

キーワード：末梢神経 神経損傷 Hedgehogシグナル Gli3 神経再生

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景。

末梢神経系の恒常性の維持には末梢のグリア細胞であるシュワン細胞が重要な働きをしている。シュワン細胞は神経軸索と直接接触して軸索の支持・栄養、髄鞘形成、興奮伝導、さらには発生・再生といった機能維持に関わっている。シュワン細胞が機能異常を起こすと、腫瘍、脱髄疾患、ニューロパチーなどの末梢神経疾患を引き起こす(Stierli et al., 2019)。従って、末梢神経系の恒常性維持と疾患発生メカニズムの理解のためには、正常神経におけるシュワン細胞の機能の制御機構を解明する必要があるが、その詳細は未だ不明な点が多い。シュワン細胞の細胞学的特性の一つに、高い可塑性がある。シュワン細胞は軸索が傷害されると、脱分化し、再生軸索への足場の提供、神経栄養因子の放出により、神経線維の再生の際に重要な役割を果たす(Jessen et al., 2015)。再生完了後は、再分化して末梢神経系の恒常性維持に働く。このようにシュワン細胞の機能は脱分化シュワン細胞と分化シュワン細胞で異なり、これらの機能はさまざまなシグナル伝達経路で厳密に制御されているようである。しかしながら、その詳細はいまだ不明である。本研究の学術的問いは、『シュワン細胞の細胞機能を調節するシグナル伝達系はいかなるものか？その調節機構がシュワン細胞を介して、末梢神経の恒常性維持にどのように寄与しているか？』である。

2. 研究の目的

本研究の将来的最終ゴールは、「シュワン細胞機能維持の分子基盤の破綻と疾患発生の関連を探り、末梢神経疾患の病態把握および治療法の開発に寄与すること」である。末梢神経恒常性維持のメカニズムを明らかにすることを念頭に、本研究では、Hh シグナル系の下流転写因子である Gli3 に着目し、Hh シグナル不活化機構を介したシュワン細胞機能制御メカニズムの分子基盤を明らかにすることを目的とする。

2. 研究の方法

1 Gli3 発現細胞の同定

[1] Gli3 発現細胞の同定

1) 申請者の予備実験では、正常マウスにおける下歯槽神経再生過程において、損傷後 3 日目の下歯槽神経で Gli3 がもっとも高い活性を示した。そこで、正常マウスの下歯槽神経損傷後 3 日の試料に、抗 Gli3 抗体と末梢神経再生に関与する各種細胞マーカーの抗体を用いて免疫二重染色することで、Gli3 発現細胞を同定する。

2、正常末梢神経、再生過程の末梢神経における Gli3 の form の確認

Gli3 は active form と repressor form の、2 つのフォームに変化して Hedgehog シグナルの活性を調節する。この 2 つのフォームはタンパク質量が異なるため、ウェスタンブロットで末梢神経の Gli3 がいずれのフォームで存在するかを確認する。

3、Gli3 欠損マウスの末梢神経の性状・機能の観察

Gli3 欠損マウスに von-Frey テストを実施し、正常マウスとの感覚閾値の比較を行う。その後、灌流固定し、通法に従って下顎骨および三叉神経節の凍結切片を作製する。神経のマーカーとして PGP9.5、シュワン細胞のマーカーとして S100 タンパクを用いて免疫染色し、軸索の走行とシュワン細胞の分布を正常マウスと比較する。また、一部の試料は樹脂包埋し、電子顕微鏡で G ratio(軸索径/髄鞘を含む軸索径)を算出する。これにより、Gli3 と正常感覚ならびに神経伝導の関連を理解する。

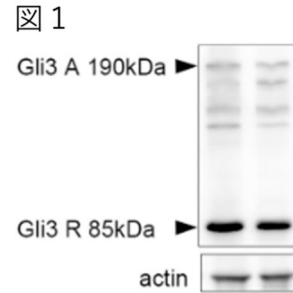
4、損傷神経における Gli3 および Hedgehog シグナル関連分子の発現変化の検討

Hedgehog シグナル関連分子 (Shh, Dhh, Ptch1, Ptch2, Gli1, Gli2, Gli3) の発現変化を神経損傷後 1、3、5、7、14 日後に q PCR で経時的に観察する。

4 . 研究成果

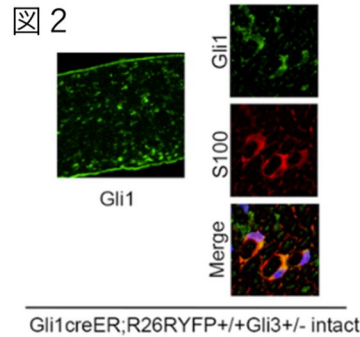
正常な末梢神経では、Hedgehog シグナルのリガンドである Desert Hedgehog が Schwann 細胞より分泌されているが、Hedgehog シグナル活性は低く、その制御機構はほとんど分かっていない。我々は Hedgehog シグナル活性の調節因子として働く Gli3 の機能に着目した。

正常神経の Gli3 の western blot を行ったところ、Gli3 は活性を抑制する repressor form で存在することが分かった(図 1)。



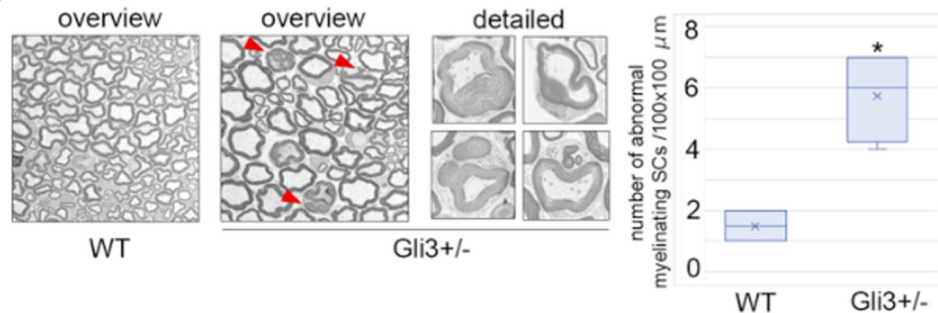
さらに、Hedgehog シグナルの受容体である Patched1 と Gli3 の免疫染色により、これらは Schwann 細胞に局在していることが分かった。神経を構成する他の細胞、すなわち神経細胞、血管内皮細胞、マクロファージなどには Gli3 の発現は認められなかった。次にヘッジホッグシグナルの活性マーカーである

Gli1 特異的に緑色蛍光蛋白を発現するマウスと Gli3 のノックダウンマウスを掛け合わせたマウス(Gli1creERR26RYFP+/+;Gli3+/-)の神経を観察したところ、Schwann 細胞の Gli1 の発現が野生型マウスに比べて上昇していた (図 2)。



また、Gli3 ヘテロ欠損マウスのシュワン細胞を観察したところ、ミエリンの構造に異常を呈するシュワン細胞が認められた (図 3) 。これらの結果から、正常神経内の Hedgehog シグナルは、オートクラインシグナルとして Schwann 細胞に働いているが、Gli3 によってその活性が抑えられていることが示唆された。さらに、Dhh の転

図 3

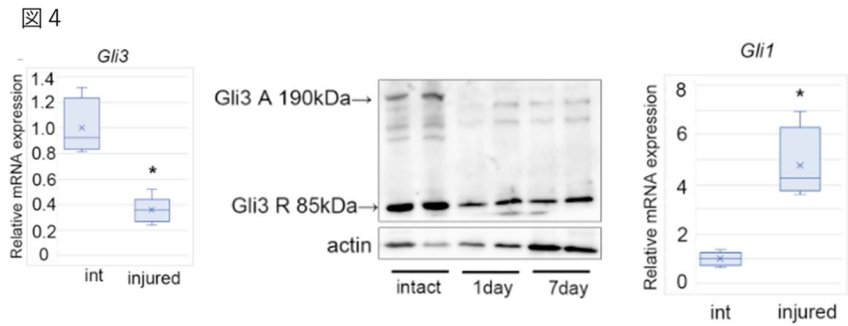


写に必要な Sox10 が Schwann 細胞に発現しており、Dhh の発現は Hedgehog シグナル非依存的に Sox10 が調節している可能性があることが示唆された。

神経損傷時の Gli3 の変化を q PCR およびウエスタンブロットで確認したところ、Gli3 の発現は正常神経に比べて低下していた。これは正常神経で多く存在していた repressor form の減少によるものであることがわかった (図 4) 。一方で、Hedgehog シグナルの活性マーカーである Gli1 の発現は損傷神経で上昇していた (図 4) 。以上の結果より、損傷神経では、Gli3 によるシグナル活性抑制の低下と Hedgehog シグナルの活性上昇に関連が示唆さ

れた。

正常末梢神経および損傷末梢神経のパブリックシングルセルRNAseqのデータを解析し、Hedgehogシグナル関連分子



(Dhh, Shh, Gli1, Gli2, Gli3, Smo) を発現している細胞、およびその遺伝子発現変動を解析した。すると、線維芽細胞が損傷神経において Hedgehog シグナルが活性化していることが分かった。そこで Gli1 を発現する線維芽細胞の分布を観察するために、ヘッジホッグシグナルの活性マーカーである Gli1 特異的に緑色蛍光蛋白を発現するマウス (Gli1creER R26RYFP マウス) の正常神経を確認した。Gli1 を発現する線維芽細胞は神経の周膜を構成する細胞と、内鞘の血管に付随する細胞、付随しない細胞の 3 種類に分類できることがわかった。Gli1creER R26RYFP マウスの神経を損傷し、損傷後 1、3、5、7、14、28 日に損傷神経を摘出し観察したところ、Gli1 陽性細胞が損傷神経断端で増殖し、損傷部に集まっていることがわかった。前述した 3 種類の細胞のいずれが増殖しているかを確認するために、Gli1 陽性細胞が最も増殖する損傷 3 日後の神経を血管内皮細胞マーカーの CD31 抗体で染色した。すると、血管周囲の Gli1 陽性細胞が増殖していることが分かった。Gli1 陽性細胞の増殖の経時的变化を Ki67 抗体の免疫染色で確認したところ、Gli1 陽性細胞は損傷後 1 ~ 3 日にかけて増加し、7 日以降はほぼ増殖していないことが分かった。血管周囲の Gli1 陽性細胞は、正常神経では NG2, PDGFR, SMA を発現していたが、損傷神経では SMA の発現を失っていた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ujita Tomoaki, Yamamoto Toru, Sato-Yamada Yurie, Kishimoto Naotaka, Maeda Takeyasu, Seo Kenji	4. 巻 16(12)
2. 論文標題 Optical Imaging of Trigeminal Ganglion Excitation Evoked by Electrical Stimulation of the Trigeminal Nerve	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cureus	6. 最初と最後の頁 なし
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7759/cureus.75522	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤由美子、瀬尾憲司
2. 発表標題 当院中央手術室での小児患者の抜歯における気道管理方法についての統計学的検討
3. 学会等名 第50回日本歯科麻酔学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤友里恵、前川知樹、前田健康
2. 発表標題 軸索変性分子SARM1活性はシャルコー・マリー・トゥース病の病態を悪化させる
3. 学会等名 第129回日本解剖学会総会・全国学術集会，那覇，
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 佐藤友里恵、前田健康
2. 発表標題 末梢神経障害後の脱神経骨格筋における微小血管リモデリング
3. 学会等名 第47回日本分子生物学会年会，福岡市
4. 発表年 2024年

〔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	佐藤 友里恵(山田友里恵) (Sato-Yamada Yurie) (20804537)	新潟大学・医歯学系・助教 (13101)	
研究 分担者	前田 健康 (Maeda Takeyasu) (40183941)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	
研究 分担者	瀬尾 憲司 (Seo Kenji) (40242440)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	

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
---------	---------