

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861203

研究課題名(和文)膜型エストロゲン受容体GPR30を用いた末梢神経における髄鞘形成活性化機構の解明

研究課題名(英文)Role of GPR in the myelination of peripheral nerve

研究代表者

森崎 真介(Morisaki, Shinsuke)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：20627294

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：後根神経節および脊髄前角細胞の有効な初代培養系を確立する。神経細胞としては、後根神経節(DRG)を選択し、胎児マウスから抽出した。さらに、脊髄前角細胞 motor neuronの初代培養のために、ラット脊髄から専用キット(NycoPrepTM)を用いて抽出した。シュワン細胞の抽出はラットの坐骨神経を採取し、溶解処理を行い、抽出した。細胞体と軸索の分離培養系確立のため、AXISおよびCampanot chamberを使用した。また観察法として、共焦点レーザー顕微鏡での観察の時期および定量方法の調整を行った。

研究成果の概要(英文)：It is very meaningful in the field of orthopedic surgery to aim for early regeneration induction by drug therapy against peripheral neuropathy requiring a long treatment period. GPR30 is thought to be involved in the signaling of the myelination mechanism as a membrane type receptor. Establish effective primary culture system of dorsal root ganglia and spinal cord progenitor cells. For the neurons, dorsal root ganglia (DRG) was selected and extracted from fetal mice. Furthermore, for the primary culture of the spinal cord anterior horn cellular motor neuron, it was extracted from the rat spinal cord using a special kit (NycoPrepTM). To extract Schwann cells, rat sciatic nerves were collected, subjected to dissolution treatment, and extracted. Separation of cell bodies and axons AXIS and Campanot chamber were used to establish a culture system. As an observation method, the timing of observation with a confocal laser microscope and the method of quantification were adjusted.

研究分野：末梢神経

キーワード：GPR30 末梢神経

1. 研究開始当初の背景

末梢神経再生メカニズムの解明をテーマに、末梢神経の解剖および機能を形態学的および分子生物学的手法を用いて研究してきた。この結果、以下のような重要な知見を明らかにした。

1. 膜型エストロゲン受容体 GPR30 が髄鞘形成に重要な働きを担っていることを明らかにした。(Hirahara, Morisaki et al., GLIA 2013)

2. ラマン顕微鏡により髄鞘形成過程を非染色でイメージング可能であることを示した。(Morisaki, J Biomed Opt in press) 末梢神経障害は再生まで長期の時間を要し、また完全に損傷前の機能を回復させることは困難である。本疾患に対する効果的な薬物療法はいまだ確立しておらず、薬物による末梢神経再生誘導治療が望まれている。GPR30 は、G 蛋白質共役受容体 (G protein-coupled receptor; GPCR) の一つであり、創薬のターゲットとなりうる。本成果は髄鞘形成促進を介した末梢神経再生促進の作用薬へつなげる可能性を示したうえで、非常に興味深い。そこでわれわれは、GPR30 を起点とした末梢神経再生促進への治療法の開発を目指す。

2. 研究の目的

このメカニズム解明のために、われわれは膜型エストロゲン受容体 (GPR30) 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。

長期の治療期間を要する末梢神経障害に対して、薬物療法による早期の再生誘導を目指すことは、整形外科領域において非常に意義のあることである。申請者はこれまでに、運動器機能の再生をテーマに、末梢神経再生につながる分子の同定、実験手技を蓄積してきた。GPR30 は膜型受容体として髄鞘形成機構のシグナル伝達に関与すると考えられ、創薬のターゲットになりうるきわめて理想的なターゲットであり、今後の研究の発展が期待できる。GPR30 の髄鞘形成の制御機構を解明し、再髄鞘化の過程を効果的に機能させる方法が明らかにすることで、末梢神経障害の治療応用を目指す。本研究では、神経細胞およびグリア済ぼの共培養系を用いる。そのために、後根神経節および脊髄前角細胞の有効な初代培養系を確立する。神経細胞としては、後根神経節 (DRG) を選択し、胎児マウスから抽出した。さらに、脊髄前角細胞 motor neuron の初代培養のために、ラット脊髄から専用キット (Nycoprep™) を用いて

抽出した。シュワン細胞の抽出はラットの坐骨神経を採取し、溶解処理を行い、抽出した。細胞体と軸索の分離培養系確立のため、AXIS および Campenot chamber を使用し、神経とシュワン細胞の共培養系をそれぞれ確立するための条件設定および、効果的な細胞濃度や比率の調整を行った。また観察法として、共焦点レーザー顕微鏡での観察の時期および定量方法の調整を行った。

3. 研究の方法

【1】GPR30 を介した末梢神経における髄鞘形成機構の解明 *in vitro*

- 分化段階の異なるシュワン細胞を採取し、GPR30 がどの段階で発現変化を解析することで、GPR30 の作用時期を明らかにする。
- シュワン細胞と後根神経節 (DRG) との共培養系を用いて、GPR30 のアゴニストである G1 を投与して、髄鞘形成効果を髄鞘蛋白 (MBP, PO, PMP22) 発現を免疫細胞染色で観察する。
- G1 を投与した時の、転写因子の発現変化を観察する。分化促進に関与する因子である NRG-1 (未分化シュワン細胞への誘導)、Krox20, Oct6 (髄鞘シュワン細胞への誘導) を観察する。
- 同様に G1 を投与した時の、セカンドメッセンジャーの信号伝達系を明らかにするため、MAP キナーゼ (p-ERK1/2, p-JNK1/2, p-p38) の発現変化をウエスタンブロッティング法で観察する。
- GPR30 以外の膜型エストロゲン受容体 (ER、) の関与を明らかにするため、G1 を投与した時の発現変化を免疫染色で観察する。
- 性差による髄鞘形成効果の違いを観察するため、雄、雌それぞれから採取したシュワン細胞での発現変化を比較する。

【2】GPR30 の *in vivo* における髄鞘形成機構の解明

- ラットで産後 2 週齢、および 10 週齢、12 カ月齢の週齢の異なる時期における、GPR30 の末梢神経における発現様式を免疫組織学的に解析する。観察には共焦点レーザー顕微鏡を用いる。
- 10 週齢ラットに GPR30 のリガンドである G1 を投与したのちに、坐骨神経を摘出し、髄鞘 (MBP, PO, PMP22) の遺伝子発現およびタンパク発現をそれぞれリアルタイム PCR 法およびウエスタンブロッティング法により解析する。
- G1 投与後の、MAP キナーゼ (p-ERK1/2, p-JNK1/2, p-p38) の発現変化をウエスタンブロッティング法で観察する。

【3】GPR30 による髄鞘形成誘導効果の検討

- モデル動物の作成 脱髄モデル 2 週齢のラットに、脱髄効果をもつ cuprizone を 2 週間食

餌に混ぜて摂取させ、脱髄モデルを作成する。
神経圧挫損傷モデル 坐骨神経を絹糸で5分間結紮させ、その後の神経再生を促す。
b.モデル作成後にアゴニスト G1 を5日間皮下注射で投与し髄鞘形成効果を観察する。髄鞘蛋白(MBP, PO, PMP22)発現を免疫細胞染色で観察する。また髄鞘蛋白の遺伝子発現をリアルタイム PCR 法で解析する。
c. 上記動物モデル作成後にアンタゴニスト G15 を5日間皮下注射で投与し髄鞘形成効果を観察する。髄鞘蛋白(MBP, PO, PMP22)発現を免疫細胞染色で観察する。また髄鞘蛋白の遺伝子発現をリアルタイム PCR 法で解析する。
d. 神経再生の機能評価として、電気生理学的に神経伝導速度を計測し、運動機能を足底面積の変化から評価する (Sciatic Function Index)。

4. 研究成果

後根神経節および脊髄前角細胞の有効な初代培養系を確立する。神経細胞としては、後根神経節(DRG)を選択し、胎児マウスから抽出した。さらに、脊髄前角細胞 motor neuron の初代培養のために、ラット脊髄から専用キット (Nycoprep™) を用いて抽出した。シュワン細胞の抽出はラットの坐骨神経を採取し、溶解処理を行い、抽出した。細胞体と軸索の分離培養系確立のため、AXIS および Campenot chamber を使用し、神経とシュワン細胞の共培養系をそれぞれ確立するための条件設定および、効果的な細胞濃度や比率の調整を行った。また観察法として、共焦点レーザー顕微鏡での観察の時期および定量方法の調整を行った。

本研究では、神経細胞およびグリア細胞の共培養系を用いることを前提としている。後根神経節およびシュワン細胞の抽出は可能であるが、共培養系の確立が成功していない。単培養から共培養に移行する過程では、さまざまな条件設定が必要であり、安定して、再現することが難しい。細胞濃度、比率、長期の培養管理のための、無菌捜査過程や、細胞抽出の際の技術的課題の整理と克服が必要である。さらに共培養系が確立できない場合の、組織レベルでの研究を遂行することなどを検討した。
組織レベルの実験を行う上で、モデル動物の作成を行う。脱髄モデルとして、2週齢のラットに、脱髄効果をもつ 0.6% cuprizone を2週間食餌に混ぜて摂取させ、脱髄モデルを作成する。さらに、神経圧挫損傷モデル 坐骨神経を絹糸で5分間結紮させ軸索損傷させた。
後根神経節およびシュワン細胞の抽出は可能であるが、共培養系の確立にむけて、さらに条件設定や詳細な実験プロトコロールの決定を行った。細胞濃度、比率、長期の培養管理のための、無菌捜査過程や、細胞抽出の

際の技術的課題の整理と克服が必要であった。そのために、課題克服のために、実験効率を上げるための、物品の調達や、実験器具の調達を検討した。
さらに共培養系が確立できない場合の、組織レベルでの研究を遂行することなどを検討した。組織レベルの実験を行う上で、モデル動物の作成を行う。脱髄モデルとして、2週齢のラットに、脱髄効果をもつ 0.6% cuprizone を2週間食餌に混ぜて摂取させ、脱髄モデルを作成する。さらに、神経圧挫損傷モデル 坐骨神経を絹糸で5分間結紮させ軸索損傷させた。動物モデルの作成および評価方法については、以前の研究プロトコロールを応用した。また、評価方法の習熟のため、正常ラットでも同様の実験を行った。ラットで産後2週齢、および10週齢、12カ月齢の週齢の異なる時期から坐骨神経を摘出し凍結切片を作成した。

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)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

森崎 真介(MORISAKI SHINSUKE)
京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号:20627294

(2)研究分担者
()

研究者番号:

(3)連携研究者
()

研究者番号:

(4)研究協力者
()