

令和元年6月23日現在

機関番号：13101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06697

研究課題名(和文) 下歯槽神経再生にはGli3を介したHedgehogシグナル伝達経路が必須である

研究課題名(英文) Hedgehog signaling pathway via Gli3 is essential for regeneration of inferior alveolar nerve

研究代表者

山田 友里恵 (Yamada, Yurie)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：20804537

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：正常坐骨神経でGli3の発現が確認された。ウエスタンブロットで正常坐骨神経におけるGli3のタンパクサイズを調べたところ、シグナルを抑制するフォームで存在していることが分かった。一方損傷神経では、正常神経に比べてGli3の発現は低下していた。Hedgehogシグナルの活性を損傷前後で比較したところ、損傷後に有意な活性上昇を認めた。以上より、Gli3は正常末梢神経においてHhシグナルの過剰活性を抑制しているが、神経損傷後はその発現量を減じて活性抑制を解除し、Sonic hedgehogを介したHhシグナルの賦活化に寄与していると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

末梢神経損傷時には、Sonic hedgehogシグナルが活性化することが知られているが、その活性調節機構は不明な点が多く残されていた。本研究では、シグナルの最下流に存在する転写因子であるGli3が、その調節に関与していることを明らかにした。

Sonic hedgehogシグナルの活性化は神経再生に重要な役割を果たしていることが明らかにされつつある。よって、このシグナルの分子基盤を明らかにすることは、将来的に末梢神経の新規治療法の開発に役立つ可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The expression of Gli3 was confirmed in normal sciatic nerve. The protein size of Gli3 in normal sciatic nerve was examined by Western blot and was found to be present in a form that suppresses the signal. On the other hand, in the injured nerve, the expression of Gli3 was lower than that of the normal nerve. Hedgehog signal activity was significantly increased in injured nerve. From the above, Gli3 suppresses the over activation of Hh signal in intact peripheral nerve, but after nerve injury, reduction of the suppression Gli3 contribute to the activation of Sonic hedgehog signal.

研究分野：神経科学

キーワード：Hedgehog シグナル伝達 末梢神経再生 Gli3

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯科治療における頻度の高い偶発症に、下歯槽神経損傷がある。一般的に末梢神経の再生能力は高いとされているものの、下歯槽神経損傷の予後は非常に悪く、支配領域の知覚鈍麻や、激しい疼痛、痛覚過敏、いわゆる神経障害性疼痛を誘発し、患者のQOLを著しく低下させる。しかし、その病態メカニズムは未だ明らかにされていないため、治療は対症療法が中心となっている。下歯槽神経損傷に対する根本的な治療法確立のためには、末梢神経再生メカニズムの分子レベルでの詳細な理解が不可欠である。

発生過程と再生過程では、分子基盤で重複する点が多く、神経発生における分子メカニズムの知見は、末梢神経の再生過程の把握に有用な情報となる。神経の発生と再生は、ともに軸索の伸長を大きな特徴とするが、神経発生過程における軸索伸長は軸索ガイダンス因子によって緻密な制御を受けており、さまざまな器官発生に必須な経路として Hedgehog (Hh) シグナル伝達経路がそのメインプレーヤーの一つとして同定されている。

Hh シグナル経路は、複数あるリガンド (Shh, Dhh, Ihh) が受容体に結合し、多数のタンパク質を介した後、Gli 転写因子群 (Gli1, Gli2, Gli3) が標的遺伝子を転写することを特徴としている。このシグナル伝達系の最下流に位置する3種類の Gli 転写因子群は、それぞれの活性様式が異なることにより Hh シグナル経路の多様性を生み出し、シグナル伝達の中心的な役割を担っている。中でも Gli3 はその場面に応じて Hh シグナルを活性方向にも抑制方向にも導くという、他の Gli にない特有の機能を有している。我々は予備実験でマウス下歯槽神経切断モデルでの Gli1, Gli2, Gli3 の発現を確認したところ、Gli3 が最も強い活性を示した。さらに、Gli3 欠損マウスに下歯槽神経切断を施したところ、神経軸索の再生が全く認められなかった。これらの結果より、申請者は「Gli3 を介した Hh シグナル経路が、下歯槽神経の末梢神経再生に重要な働きを担う」という仮説をたて、本研究課題の立案に至った。

2. 研究の目的

・マウス下歯槽神経切断モデルを、Gli3 欠損マウスに応用し、形態学的、分子生物学的、細胞学的各種解析により、Gli3 を介した Hh シグナル伝達経路の下歯槽神経再生における機能を解明する。

・本申請は、発生過程における神経形成の分子メカニズムの知見を、再生へと投射した研究課題であるが、切断をしない正常神経をも対象にすることで、正常神経の恒常性における Hh シグナルの機能も標的とする。

・Gli3 改変マウスの神経障害後の異常感覚の発現を生理学的に分析し、神経障害後の異常感覚発現機構における分子レベルでの新たな知見の獲得も目指す。

3. 研究の方法

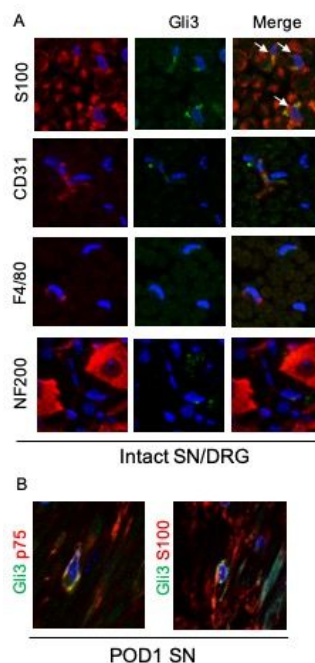
研究目的の確実な達成に向け、(1) Gli3 の末梢神経再生における役割の解明、(2) Gli3 の末梢神経における存在意義の解明、(3) Gli3 の異常感覚発現への関与の検討、(4) 再生異常および異常感覚発現のレスキューの可能性の追求の4点を研究課題とした。各具体的研究目標の下に、

下歯槽神経再生時の Gli3 発現細胞の同定、Gli3 発現細胞の機能解析、Gli3 欠損マウスの下歯槽神経の性状・機能の観察、痛み関連行動と Gli3 の関連の検討、Gli3 欠損マウスの神経再生異常・異常感覚のレスキュー実験を設定した。動物は、野生型マウス (C57BL6)、Gli3^{+/+}-マウス、正常マウスおよび Gli1^{creER};Smof1/fl;R26RYFP マウス (Gli1 発現細胞特異的に Hedgehog シグナルをノックアウトできるマウス) を用いた。Gli3 欠損マウスの神経傷害モデルを作成し、形態学 (HE 染色、各種免疫組織染色)、分子生物学 (RTPCR, qPCR, ウェスタンブロット)、薬理学的手法 (Hedgehog シグナル活性抑制剤の投与) を用いて、多方面からの解析を計画した。なお、下歯槽神経損傷モデルにおける検討の前に、パイロット実験として、生体最大の末梢神経であり、研究対象として最も利用されている坐骨神経損傷モデルを用いて実験を開始した。

4. 研究成果

RTPCR、ウェスタンブロット、免疫染色にて Gli3 は成体の正常坐骨神経で発現していることがわかった。過去の研究より、Gli3 は Hedgehog シグナルの活性レベルに応じて、タンパクサイズを変化させて、シグナルを賦活または抑制という相反する調節を行うことが知られている。そこで、ウェスタンブロットで正常坐骨神経における Gli3 のタンパクサイズを調べたところ、Gli3 はシグナルを抑制するフォームで存在していることが分かった。この Gli3 の発現が、神経損傷前後で変化があるか qPCR およびウェスタンブロットで確認したところ、Gli3 は神経損傷後に有意に低下していた。正常坐骨神経では、Hh シグナルのリガンドは Desert Hedgehog

が発現していることが分かっている。そこで、野生型マウスと Gli3 欠損マウスの正常坐骨神経において、Desert hedgehog の発現量を qPCR で比較したところ、Gli3 欠損マウスにおいて Desert hedgehog の有意な発現低下を認めた。これは Dhh が Gli3 の標的遺伝子であることを示す結果であり、Gli3 が正常神経における Desert Hedgehog シグナルを調節していることが示唆される。一方で、神経損傷後には Hh シグナルのリガンドの一つである Sonic hedgehog の発現量が増大し、シグナルの活性レベルが上昇することを明らかにしていた。そこで、野生型マウスと Gli3 欠損マウスの損傷坐骨神経において、Sonic hedgehog の発現量を qPCR で比較したところ、Gli3 欠損マウスにおいて Sonic hedgehog の有意な発現上昇を認めた。この結果より、神経損傷後に生じる Gli3 の発現低下は、Sonic hedgehog の発現増大を促進していることが示唆された。また、シグナル活性マーカーである Gli1 の発現を損傷前後の神経で比較したところ、損傷神経では有意な Gli1 の上昇を認めた。そこで、野生型マウスと Gli3 欠損マウスの損傷神経において、Gli1 の発現量を qPCR で比較したところ、Gli3 欠損マウスにおいて Gli1 の有意な発現上昇を認めた。正常坐骨神経でシグナル抑制型で存在している Gli3 の発現が、損傷により減少することで、シグナル活性が上昇したためと考えられる。次に、Gli3 を発現している細胞を同定するために、Gli3 と、坐骨神経に存在する各種細胞マーカーとの免疫二重染色を行った。Gli3 は、正常神経においても、損傷神経においても、ともにシュワン細胞のマーカーである S100 との merge を認め、シュワン細胞が Gli3 を発現していることが示された。過去の研究では、末梢神経における Desert hedgehog, Sonic hedgehog はともにシュワン細胞より産生されることが分かっており、この Gli3 発現細胞がシュワン細胞であるという結果は、Gli3 が Hedgehog シグナルリガンドの産生調節を行うという本研究の結果と矛盾しない。以上より、本研究は、シュワン細胞の発現する Gli3 が、正常末梢神経において Hh シグナルの過剰活性を抑制しているが、神経損傷後はその発現量を減じて活性抑制を解除し、Sonic hedgehog シグナルの賦活化に寄与しており、Hedgehog シグナルリガンドの発現調節を行っているということを明らかにした。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yamada Y, Ohazama A, Maeda T, Seo K The Sonic Hedgehog signaling pathway regulates inferior alveolar nerve regeneration. *Neurosci Lett*. 2018 Apr 3;671:114-119.(査読有)

〔学会発表〕(計 5 件)

- 1) Yamada Y, Maeda T, Ohazama A: The role of Hedgehog signaling for peripheral nerve regeneration: International Niigata-Taiwan Universities Collaborative Dental Research Symposium, Taipei City, Taiwan, 2019. 3. 9-10
- 2) Yamada Y, Maeda T, Ohazama A: Hedgehog signaling via Gli3 is essential for peripheral nerve regeneration. International Collaborative Symposium on Development of Human Resources in Practical Oral Health and Treatment, Phuket, Thailand, 2019. 2. 10-11.
- 3) Yamada Y: The role of Hedgehog signaling pathway in inferior alveolar nerve regeneration. Niigata U-CU Seminar in Periodontal Research. Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, 2018. 4. 24, 2018
- 4) Yamada Y: The role of Hedgehog signaling pathway in inferior alveolar nerve regeneration. Shaping the Future of Collaborations in Dentistry, International Collaborative Symposium, Taipei City, Taiwan, 2017. 11. 18-19, Program & Abstracts: 29, 2017.
- 5) Yamada Y, Ohazama A, Maeda T, Seo K: The role of hedgehog signaling pathway during peripheral nerve regeneration. 10th Congress of the European Pain Federation EFIC®, Copenhagen, Denmark, 2017. 9. 6-9, 2017,

<http://web.kenes.com/KLead/EFIC2017Abstract/data/HtmlApp/main.html#>,
Abstract: 347, 2017.

6 . 研究組織

(1) 研究分担者
なし

(2) 研究協力者
なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。