

令和 4 年 5 月 16 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18824

研究課題名(和文) 蝸牛神経と坐骨神経のシュワン細胞の膜電位変化がそれぞれの神経に与える影響の解析

研究課題名(英文) Analysis of the effect of membrane potential change in the schwann cell of the cochlear and sciatic nerve on each of nerves

研究代表者

佐藤 満雄 (Sato, Mitsuo)

近畿大学・医学部・医学部講師

研究者番号：40580775

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：まず、ChR2(光感受性非選択的陽イオンチャネル)が遺伝子改変マウスの蝸牛神経と坐骨神経の髄鞘に発現しているかを免疫組織化学実験により確かめた。電子顕微鏡を用いた詳細な解析(paranodeやjuxtaparanodeへの発現解析)までは行えなかったが、標的細胞への発現までは確認できた。中枢神経系の髄鞘の脱分極による神経刺激作用が報告されていることから、同様に末梢神経系でも生じ、それが神経再生の助長につながる可能性もあるという仮説をたて、in vivo実験を施行した。蝸牛神経の電気刺激応答は光刺激により、軽度ではあるが潜時の短縮が認められた。坐骨神経に対する同様の実験は現在検討中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経を取り巻く髄鞘の脱分極が神経を刺激させることが末梢神経でも示唆された。これは蝸牛神経では神経疾患由来の感音難聴に対して、坐骨神経では外傷や神経疾患に対しての新たな治療戦略の一つとなり得る。光遺伝学は外部からの光刺激のみで非侵襲的に標的細胞の電位変化をもたらすことが可能で、臨床応用もすでに始まっている分野であり、期待が持てる。しかし、本実験結果はまだまだ不十分であるため、今後の更なる検討が必要である。また、神経刺激のみならず、神経の再生促進への関与も検討していく予定である。

研究成果の概要(英文)：First, the expression of ChR2 (light-gated non-selective cation channel) in the cochlear and sciatic glial cells of transgenic mice was examined with immunohistochemistry (IHC). Although the detailed analysis identifying the precise expression sites with electron microscopy was not performed, ChR2-expressing targeted cells were confirmed using IHC. Based on the previous reports, we hypothesized depolarization of the glia cells could cause stimulation of the peripheral nerve, leading possibly to facilitation of nerve regeneration. In in-vivo experiments, the latency of the electrical response in the cochlear nerves became slightly shortened. The same experiments has been ongoing in the sciatic nerve.

研究分野：inner ear

キーワード：inner ear peripheral nervous electrophysiology

## 1. 研究開始当初の背景

末梢神経系の恒常性維持やその再生過程において、神経軸索を取り巻くシュワン細胞が主要な役割を担っている。しかし、その詳細な機構は、未だ不明な点が多い。これまで主に分子生理学実験により、その分子機構が解明されてきたが、電気生理学的アプローチは多くはない。シュワン細胞にはカリウムチャンネルを主体とした多くのチャンネルが発現しており、約-50 mVの静止膜電位が保持されている。この膜電位の変化は神経系の病態生理に関連すると考えられるが、従来の薬理学的手法や遺伝子改変技術では、組織特異的で迅速かつ非侵襲的に膜電位を制御することは困難であった。そこで本研究では、光遺伝学手法を活用した。光遺伝学では、外部からの青色光刺激によって迅速に開口する光感受性非選択的陽イオンチャンネルであるチャンネルロドプシン2 (ChR2)を、特定の細胞群に強制発現させることが可能である。この光開口性チャンネルは細胞の興奮性を規定するイオンを透過させるため、光照射により時空間的に自在に細胞膜電位を操作できる (Disseroth, *Nat Neurosci* 2015)。これにより、シュワン細胞の電位変化が与える神経への影響を解析することができ、髄鞘と神経の関連性に関する病態生理のより深い理解につながることを期待される。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、神経を取り巻くシュワン細胞に発現する ChR2 の活性化が、神経系へ及ぼす影響を解析し、髄鞘と神経の電気化学的關係性を調べることである。標的は蝸牛神経と坐骨神経の髄鞘とし、光誘導膜電位変化による神経への影響の解析を計画した。前者では、神経由来の感音難聴に対する新しい治療方法の開発の基盤となることを期待される。後者では、末梢神経系の神経再生を促進する新しいメカニズムの知見が得られることが期待させる。

## 3. 研究の方法

中枢神経の髄鞘を形成するグリア細胞の特異的プロモーターを制御し作成した、ChR2 を発現するトランスジェニックを使用した(Tanaka, *Cell Rep* 2012)。ChR2 の発現部位の同定は免疫組織化学実験を計画した。シュワン細胞の膜電位変化は ChR2 発現シュワン細胞にホールセルパッチクランプを行い、青色光刺激による膜電位変化を確認することとした。その後、*in vivo* 実験に移るが、まずは坐骨神経から解析を行うこととした。マウスを麻酔後、坐骨神経を露出させ、神経電気刺激により生じる神経応答のアンプリチュードとその潜時を青色光刺激の有無で比較する。次に、坐骨神経挫滅後の神経再生促進に関する実験を行うこととした。具体的には、露出した坐骨神経を挫滅させ、母趾反射の消失を確認する。その後、青色光の光源を患部近傍に埋め込み、固定し、皮膚縫合を行い、手術を終える。光刺激群とコントロール群(シャム手術群)を継続的に観察し、再生に要する時間を比較検討する。光刺激時間は上述した *in vitro* 実験の結果から決定しておく。神経の再生評価方法は母趾反射の回復、rotarod performance での解析、組織学的・電気生理学的検討を予定した。

## 4. 研究成果

組織学的検査からは、聴神経の髄鞘およびラセン神経と神経節、そして、坐骨神経の髄鞘に ChR2 が発現していることを確認した。蝸牛は複雑な構造をしているため、Figure 1 に結果を示す。聴神経に対する実験としては、蝸牛へのバイポーラ電気刺激により脳波を誘発させ、その中の聴神経由来の反応に焦点を当てて解析することにより行なった。遺伝子改変マウスで青色 LED の光照射下に電気刺激を行うと、700 $\mu$ A (N=3) でコントロールとの平均差異が 0.12 ms、650 $\mu$ A (N=3) でコントロールとの平均差異が 0.08 ms 認められ、聴神経応答の潜時が軽度短くなることが *in vivo* 実験でわかった (Table 1)。これは聴神経がその髄鞘の電位変化により刺激されたことを示しており、神経損傷後の神経再生を助長させる刺激となる可能性が以前の報告からは考えられた (Xu, *PLoS One* 2014)。ここで、まずはアプローチしやすい坐骨神経の髄鞘の電位変化をパッチクランプにより試みた。以前の我々のデータ (Sato, *Front Mol Neurosci* 2017) からは脱分極が生じると予想された。しかし、髄鞘へのパッチクランプが困難であったため、この期間中には確かめることはできなかった。発現部位の詳細に関しては電子顕微鏡により試みたが、手技的な問題からか、ChR2 の髄鞘内での発現部位の正確な同定は困難であった。電気刺激による坐骨神経の伝導速度解析は現在、検討中であるが、現時点ではデータ取得には至っていない。引き続き解析を続けていく予定だが、申請者はすでに留学しているため、この実験に関する継続申請は行っていない。コロナのパンデミックにより、臨床へのウェイトが非常に大きくなり、当初計画していたよりも実験が進められなかったが、帰国後はこの実験も継続していく予定である。

Figure 1

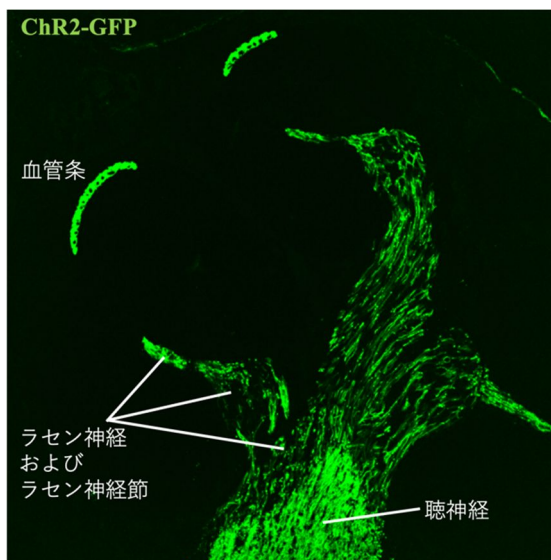


Table 1

Stimulus	Latency (ms) in no light			Latency (ms) in blue light		
	700uA	2.1	1.84	2.02	1.73	1.88
650uA	2.16	1.86	2.06	1.91	1.94	1.98

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 0件）

1. 著者名 Zhang Qi、Ota Takeru、Yoshida Takamasa、Ino Daisuke、Sato Mitsuo P.、Doi Katsumi、Horii Arata、Nin Fumiaki、Hibino Hiroshi	4. 巻 599
2. 論文標題 Electrochemical properties of the non excitable tissue stria vascularis of the mammalian cochlea are sensitive to sounds	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 4497 ~ 4516
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1113/JP281981	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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