

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430056

研究課題名(和文) 株化ニューロン シュワン細胞共培養系を用いた、末梢神経病変へのアプローチ

研究課題名(英文) Coculture of neuronal and Schwann cell lines as a useful tool for the study of peripheral nerve degeneration and regeneration

研究代表者

三五 一憲 (SANGO, Kazunori)

公益財団法人東京都医学総合研究所・運動・感覚システム研究分野・プロジェクトリーダー

研究者番号：50291943

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：シュワン細胞は末梢神経系のグリア細胞として、ニューロンの機能を維持するとともに髄鞘を形成する。我々は成熟ラットの末梢神経組織から株化シュワン細胞IFRS1を樹立するとともに、株化ニューロン(PC12細胞)との共培養系を確立し、髄鞘形成を誘導することに成功した。株化細胞同士の共培養系は、実験動物を使用せず簡便に末梢神経病変の解析ができるという利点がある。本研究ではこの共培養系を用いて、軸索再生・髄鞘形成誘導作用を有するGDNF, galectin-1, exendin-4等の作用機構や抗不整脈薬amiodaroneによる脱髄誘導メカニズムを解析した。

研究成果の概要(英文)：We have established spontaneously immortalized Schwann cell lines from long-term cultures of adult Fischer rat dorsal root ganglia (DRG) and peripheral nerves. One of these cell lines, designated IFRS1, exhibit distinct Schwann cell phenotypes and fundamental ability to myelinate neurites in coculture with primary cultured dorsal root ganglion (DRG) neurons and nerve growth factor (NGF)-primed PC12 cells. By using these coculture systems, we investigated the mechanisms of axonal regeneration- and myelination-promoting effects of exendin-4, a glucagon-like peptide 1 receptor agonist, and the pathogenesis of demyelinating neuropathy induced by an anti-arrhythmic agent amiodarone.

研究分野：神経細胞生物学、病態生理学

キーワード：神経科学 脳神経疾患 糖尿病 細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

ニューロンとシュワン細胞のクロストークに関する異常が、糖尿病性ニューロパチーや種々の脱髄性ニューロパチーの発症・進行に深く関与すると考えられているが、その病態解明は進んでおらず、有効な治療法も確立されていない。これらの疾患を克服するためには、ニューロン、シュワン細胞それぞれの病態に加え、両者の相互作用の破綻から生じる脱髄や軸索変性などの病態を詳しく解析できる実験系の開発が急務である。

2. 研究の目的

成熟ラット末梢神経組織の初代培養系から樹立したシュワン細胞株 IFRS1、および IFRS1 と株化ニューロンとの共培養系を用いて、軸索変性・再生、髄鞘形成・脱髄等に関与する諸因子・シグナル系を解析し、末梢神経障害の発症機構解明や、有効な治療法開発を目指す。

3. 研究の方法

- 1) 株化ニューロンと IFRS1 との共培養系確立：株化細胞の増殖能制御と生存維持、髄鞘形成誘導に関する種々の培養条件を開発・改良し、IFRS1 との安定した共培養系を確立する。
- 2) 軸索再生・髄鞘形成に関与する因子の解析：ニューロン、IFRS1、両者の共培養系を用いて、グリア細胞株由来神経栄養因子 glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)、動物レクチン galectin-1、glucagon-like peptide (GLP)-1 受容体作動薬 exnedin-4 等の軸索再生・髄鞘形成における役割を明らかにする。
- 3) ニューロパチーの病態解明・治療法開発：糖尿病性、免疫介在性、薬剤誘発性、アミロイドポリニューパチーの各病態解析に有用な共培養系を確立し、脱髄や神経変性機構を解析する。

4. 研究成果

- 1) 神経成長因子 nerve growth factor (NGF)

を投与しニューロン様細胞に分化させた褐色細胞腫由来 PC12 細胞を、低密度で撒布・維持することによって増殖を制御し IFRS1 との共培養系確立・髄鞘形成誘導に成功した (Sango et al., *Histochem Cell Biol*, 2012; Schwann *Cell Development and Pathology*, 2014)。また細胞増殖阻害薬を用いて株化運動ニューロン NSC-34 の増殖能を制御することにより、IFRS1 との共培養系確立・髄鞘形成誘導にほぼ成功した (Sango et al., in preparation)。

- 2) galectin-1 は、PI3 kinase シグナル系を介した GDNF の神経突起伸長促進および髄鞘形成誘導機構に関与する可能性が示唆された (Takaku et al., *Neurochem Int*, 2013)。また exendin-4 は、PI3 kinase 経路を介して再生阻害因子 RhoA 活性を抑制することにより、神経突起伸長促進および髄鞘形成誘導作用を示す可能性が示唆された (Tsukamoto et al., *Histochem Cell Biol*, 2015)。
- 3) 抗不整脈薬 amiodarone (AMD) は、濃度依存的に IFRS1 細胞内にリン脂質蓄積、酸化ストレス亢進、オートファジー障害等を惹起するとともに、PC12-IFRS1 共培養系において神経突起からの IFRS1 細胞の脱髄を誘導した。これらのことから、AMD はシュワン細胞のライソゾーム機能を障害することにより、脱髄を誘導する可能性が示唆された (Niimi et al., *Eur J Neurosci*, in press.)。

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 9 件)

- 1) Niimi N, Yako H, Tsukamoto M, Takaku S, Yamauchi J, Kawakami E, Yanagisawa H, Watabe K, Utsunomiya K, Sango K. Involvement of oxidative

- stress and impaired lysosomal degradation in amiodarone-induced schwannopathy. *Eur J Neurosci*, 印刷中. doi: 10.1111/ejn.13268. (査読有)
- 2) Sango K, Utsunomiya K. Efficacy of glucagon-like peptide-1 mimetics for neural regeneration. *Neural Regen Res* 10:1723-1724, 2015. doi: 10.4103/1673-5374.169611. (査読有)
 - 3) Tsukamoto M, Niimi N, Sango K, Takaku S, Kanazawa Y, Utsunomiya K. Neurotrophic and neuroprotective properties of exendin-4 in adult rat dorsal root ganglion neurons: involvement of insulin and PI3 kinase/RhoA signaling. *Histochem Cell Biol* 144:249-259, 2015. doi: 10.1007/s00418-015-1333-3. (査読有)
 - 4) Murakami T, Sango K, Watabe K, Niimi N, Takaku S, Li Z, Yamamura K, Sunada Y. Schwann cells contribute to neurodegeneration in transthyretin amyloidosis. *J Neurochem* 134:80-85, 2015. doi: 10.1111/jnc.13068. (査読有)
 - 5) Tsukamoto M, Sango K, Niimi N, Yanagisawa H, Watabe K, Utsunomiya K. Upregulation of galectin-3 in immortalized Schwann cells IFRS1 under diabetic conditions. *Neurosci Res* 92:80-85, 2015. doi: 10.1016/j.neures.2014.11.008. (査読有)
 - 6) Torii T, Miyamoto Y, Tago K, Sango K, Nakamura K, Sanbe A, Tanoue A, *Yamauchi J. Arf6 guanine-nucleotide exchange factor cytohesin-2 binds to CCDC120 and is transported along neurites to mediate neurite growth. *J Biol Chem* 289:33887-33903, 2014. doi: 10.1074/jbc.M114.575787. (査読有)
 - 7) Watabe K, Akiyama K, Kawakami E, Ishii T, Endo K, Yanagisawa H, Sango K, Tsukamoto M. Adenoviral expression of TDP-43 and FUS genes and shRNAs for protein degradation pathways in rodent motoneurons in vitro and in vivo. *Neuropathol* 34:83-98, 2014. doi: 10.1111/neup.12058. (査読有)
 - 8) Sango K, Kato K, Tsukamoto M, Niimi N, Utsunomiya K, Watabe K. Physiological and pathological roles of aldose reductase in Schwann cells. *J Mol Genet Med* S1:012, 2014. doi: 10.4172/1747-0862.S1-012 (査読有)
 - 9) Takaku S, Yanagisawa H, Watabe K, Horie H, Kadoya T, Sakumi K, Nakabeppu Y, Poirier F, Sango K. GDNF promotes neurite outgrowth and upregulates galectin-1 through the RET/PI3K signaling in cultured adult rat dorsal root ganglion neurons. *Neurochem Int* 62:330-339, 2013. doi: 10.1016/j.neuint.2013.01.008. (査読有)
- [学会発表](計 41 件)
- 1) Sango K, Niimi N, Yako H. Mechanisms of amiodarone-induced schwannopathy and myelinopathy. 第 93 回日本生理学会大会, 2016 年 3 月 24 日, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)
 - 2) 三五一憲. 培養系を用いた末梢神経病変へのアプローチ. 第 11 回 Chiba Neuroresearch Meeting, 2016 年 1 月 9 日, 京葉銀行文化プラザ(千葉県千葉市)
 - 3) Sango K, Niimi N, Yako H, Kawakami E, Watabe K. Immortalized adult rat Schwann cell line IFRS1 as a useful tool for the study of myelination and demyelination in the peripheral nervous system. 第 20 回グリア研究会シンポジウム「末梢神経髄鞘形成の研究から変性疾患の創薬標的分子を探る」, 2015 年 12 月 5 日, 名古屋市立大学医学部(愛知県名古屋市)
 - 4) 新見直子, 塚本雅美, 渡部和彦, 水上浩哉, 八木橋操六, 宇都宮一典, 三五一憲. アルドース還元酵素遺伝子欠損マウスより樹立した不死化シュワン細胞株の特性解析. *BMB* 2015 (第 38 回日本分子生物学会年会), 2015 年 12 月 1 日, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)
 - 5) 新見直子, 塚本雅美, 渡部和彦, 水上浩哉, 八木橋操六, 宇都宮一典, 三五一憲. アルドース還元酵素遺伝子欠損マウス由来シュワン細胞株 IKARS1 の機能解析. 第 30 回日本糖尿病合併症学会, 2015 年

- 11月27日, 愛知県産業労働センター(愛知県名古屋市)
- 6) 三五一憲, 新見直子, 渡部和彦, 加藤浩, 松本考史. 不死化シュワン細胞株 IMS32 および 1970C3 におけるポリオール代謝と、AR 阻害薬 Ranirestat と Epalrestat による抑制効果の検討. 第 30 回日本糖尿病合併症学会, 2015 年 11 月 27 日, 愛知県産業労働センター (愛知県名古屋市)
 - 7) 三五一憲, 新見直子. 培養細胞を用いた, アミオダロンによる末梢神経障害の機構解析. 第 20 回アミオダロン研究会, 2015 年 10 月 3 日, 経団連会館(東京都千代田区)
 - 8) 塚本雅美, 三五一憲, 新見直子, 金澤康, 宇都宮一典. Exendin-4 の末梢神経保護作用: インスリン、RhoA、PI3K シグナルの関与. 第 26 回日本末梢神経学会学術集会, 2015 年 9 月 19 日, ホテルブエナビスタ (長野県松本市)
 - 9) Sango K, Tsukamoto M, Niimi N, Utsunomiya K. Involvement of insulin and RhoA in the neuroprotective activities of exendin-4 in vitro. Neurodiab 2015, 2015 年 9 月 13 日, Elsinore (Denmark)
 - 10) 三五一憲, 塚本雅美, 新見直子, 金澤康, 宇都宮一典. GLP-1 受容体作動薬 exendin-4 の末梢神経再生促進・神経細胞保護作用: インスリンおよび RhoA の関与. 第 25 回日本病態生理学会大会, 2015 年 8 月 2 日, 愛媛大学城北キャンパス (愛媛県松山市)
 - 11) Sango K, Tsukamoto M, Niimi N. Neurotrophic and neuroprotective properties of exendin-4 on cultured adult rat DRG neurons. 第 38 回日本神経科学大会, 2015 年 7 月 30 日, 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)
 - 12) 三五一憲, 塚本雅美, 新見直子, 宇都宮一典. Exendin-4 による神経突起伸長促進・神経細胞生存維持: インスリン及び RhoA の関与. 第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2015 年 5 月 23 日, 海峡メッセ下関 (山口県下関市)
 - 13) Sango K, Tsukamoto M, Niimi N, Kadoya K. Immunohistochemistry of adult rat dorsal root ganglion neurons. 第 92 回日本生理学会大会, 2015 年 3 月 22 日, 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)
 - 14) Sango K, Tsukamoto M, Niimi N, Kanazawa Y, Watabe K, Utsunomiya K. Exendin-4 promotes neurite outgrowth, neuronal survival and myelination in vitro. 44th Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2014 年 11 月 16 日, Washington D.C. (USA)
 - 15) Niimi N, Tsukamoto M, Yanagisawa H, Watabe K, Sango K. In vitro models for the study of amiodarone-induced peripheral neuropathy. 44th annual meeting of Society for neuroscience, 2014 年 11 月 16 日, Washington D.C. (USA)
 - 16) Sango K, Tsukamoto M, Niimi N, Watabe K, Utsunomiya K. Upregulation of galectin-3 in immortalized Schwann cells IFRS1 under diabetic conditions. 第 87 回日本生化学会大会, 2014 年 10 月 17 日, 京都国際会議場 (京都府京都市)
 - 17) 三五一憲, 塚本雅美, 新見直子, 水上浩哉, 八木橋操六, 宇都宮一典, 渡部和彦. アルドース還元酵素遺伝子欠損マウス由来不死化シュワン細胞株 IKARS1 の樹立と解析. 第 29 回日本糖尿病合併症学会, 2014 年 10 月 3 日, 都市センターホテル (東京都千代田区)
 - 18) 塚本雅美, 三五一憲, 金澤康, 新見直子, 渡部和彦, 宇都宮一典. 末梢神経系細胞に対する Exendin-4 の作用とそのメカニズムの検討. 第 29 回日本糖尿病合併症学会, 2014 年 10 月 3 日, (東京都千代田区)
 - 19) 三五一憲, 渡部和彦. 不死化シュワン細胞株 IFRS1 を用いた髄鞘形成および脱髄の機構解析. 第 55 回日本組織細胞化学会 総会・学術集会; ワークショップ「神経の構造と機能をもたらす分子を捉える」, 2014 年 9 月 28 日, 松本中央公民館 (長野県松本市)
 - 20) Sango K, Tsukamoto M, Niimi N, Kanazawa Y, Watabe K, Utsunomiya K. Neurotrophic and neuroprotective properties of exendin-4 on cultured adult rat dorsal root ganglion neurons. Neurodiab 2014, 2014 年 9 月 12 日,

- Sopron (Hungary)
- 21) Niimi N, Tsukamoto M, Yanagisawa H, Watabe K, Sango K. Amiodarone neurotoxicity in vitro. Neuroscience 2014(第37回日本神経科学大会), 2014年9月11日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
 - 22) 三五一憲, 塚本雅美, 新見直子, 水上浩哉, 八木橋操六, 宇都宮一典, 渡部和彦. アルドース還元酵素遺伝子欠損マウスより樹立した不死化シュワン細胞株の解析. 第25回日本末梢神経学会学術集会, 2014年8月30日, ホテルルビノ京都堀川(京都府京都市)
 - 23) 塚本雅美, 三五一憲, 新見直子, 柳澤比呂子, 渡部和彦, 宇都宮一典. 糖尿病性神経障害における galectin-3 の発現誘導と病態への関与: ラット不死化シュワン細胞株 IFRS1 を用いた検討. 第25回日本末梢神経学会学術集会, 2014年8月30日, ホテルルビノ京都堀川(京都府京都市)
 - 24) 三五一憲, 新見直子, 塚本雅美, 柳澤比呂子, 渡部和彦. 抗不整脈薬 amiodarone による末梢神経障害. 第24回日本病態生理学会, 2014年8月9日, 北九州国際会議場(福岡県北九州市)
 - 25) 三五一憲, 塚本雅美, 新見直子, 金澤康, 宇都宮一典. 神経障害に対する GLP-1 受容体作動薬の有用性. 第18回日本適応医学会学術集会; スポンサーシップシンポジウム「糖尿病合併症治療の新たな展開-糖尿病治療薬の多面的効果を巡って-」, 2014年6月22日, 一橋講堂(東京都千代田区)
 - 26) 三五一憲, 塚本雅美, 新見直子, 水上浩哉, 八木橋操六, Sookja K. Chung, 宇都宮一典, 渡部和彦. アルドース還元酵素遺伝子欠損マウス由来不死化シュワン細胞株の解析. 第57回日本糖尿病学会年次学術集会, 2014年5月23日, 大阪国際会議場(大阪府大阪市)
 - 27) 塚本雅美, 三五一憲, 金澤康, 新見直子, 渡部和彦, 宇都宮一典. 末梢神経系細胞に対する GLP-1 受容体作動薬 Exendin-4 の直接作用. 第57回日本糖尿病学会年次学術集会, 2014年5月23日, 大阪国際会議場(大阪府大阪市)
 - 28) Sango K. In vitro models of diabetic neuropathy. 2014 1st Diabetic Committee Meeting, 2014年1月14日, web
 - 29) 新見直子, 柳澤比呂子, 渡部和彦, 三五一憲. シュワン細胞株を用いた Amiodarone による末梢神経障害発症機構の解析. 第36回日本分子生物学会年会, 2013年12月5日, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)
 - 30) Sango K, Niimi N, Tsukamoto M, Takaku S, Yanagisawa H, Kawakami E, Watabe K. In vitro models of amiodarone-induced Schwannopathy and myelinopathy. 44th annual meeting of Society for neuroscience, 2013年11月11日, San Diego (USA)
 - 31) Sango K, Tsukamoto M, Niimi N, Watabe K, Utunomiya K. Exendin-4 promotes neurite outgrowth and myelination in vitro. Neurodiab 2013, 2013年9月20日, Barcelona (Spain)
 - 32) 三五一憲, 塚本雅美, 新見直子, 金澤康, 宇都宮一典, 加藤宏一, 渡部和彦. 成熟マウス・ラット由来不死化 Schwann 細胞株を用いた、糖尿病性神経障害の病態解明. 第28回日本糖尿病合併症学会, 2013年9月13日, 旭川グランドホテル(北海道旭川市)
 - 33) 高久静香, 于文新, 平林義雄, 三五一憲. 亜鉛欠乏に伴うグルコシルセラミド合成酵素(GlcT-1)の発現変化. 第86回日本生化学会大会, 2013年9月11日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
 - 34) 塚本雅美, 三五一憲, 新見直子, 川野仁, 渡部和彦, 宇都宮一典. GLP-1 受容体作動薬 Exendin-4 による軸索伸長および髄鞘形成誘導. 第24回日本末梢神経学会学術集会, 2013年8月24日, 新潟コンベンションセンター(新潟県新潟市)
 - 35) 三五一憲, 新見直子, 塚本雅美, 柳澤比呂子, 宇都宮一典, 渡部和彦. Amiodarone による末梢神経障害: シュワン細胞株 IFRS1 および PC12-IFRS1 共培養系を用いた解析. 第24回日本末梢神経学会学術集会, 2013年8月24日, (新潟県新潟市)
 - 36) 三五一憲, 塚本雅美, 新見直子, 渡部和

- 彦, 金澤康, 宇都宮一典. GLP-1 受容体作動薬 Exendin-4 による末梢神経再生促進・髄鞘形成誘導. 第 23 回日本病態生理学学会, 2013 年 8 月 4 日, 東京慈恵会医科大学 (東京都港区)
- 37) Sango K, Takaku S, Yanagisawa H, Watabe K, Sakumi K, Nakabeppu Y, Poirier F, Horie H, Kadoya T. Involvement of galectin-1 and galectin-3 in GDNF-induced neurite outgrowth from adult rat DRG neurons. 第 36 回日本神経科学大会, 2013 年 6 月 21 日, 京都国際会議場 (京都府京都市)
- 38) 三五一憲, 渡部和彦. シュワン細胞株を用いた末梢神経再生機構の解析. 第 54 回日本神経学会総会, 2013 年 5 月 30 日, 東京国際フォーラム (東京都千代田区)
- 39) 塚本雅美, 三五一憲, 高久静香, 柳澤比呂子, 渡部和彦, 宇都宮一典. Exendin-4 の末梢神経再生促進・髄鞘形成誘導効果: 培養系を用いた検討. 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2013 年 5 月 17 日, テトリア熊本ビル (熊本県熊本市)
- 40) 三五一憲, 渡部和彦, 加藤宏一. 新たな視点からみたアルドース還元酵素の病態生理と、合併症治療への展望. 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2013 年 5 月 17 日, テトリア熊本ビル (熊本県熊本市)
- 41) 三五一憲, 塚本雅美, 柳澤比呂子, 河上江美子, 高久静香, 宇都宮一典, 渡部和彦. 株化ニューロン・シュワン細胞共培養系の確立とニューロパチー研究への応用. 第 54 回日本神経病理学会総会学術研究会, 2013 年 4 月 25 日, タワーホール船堀 (東京都江戸川区)

〔図書〕(計 4 件)

- 1) Sango K, Yamauchi J. Springer Japan KK, Schwann Cell Development and Pathology (Eds: Sango K, Yamauchi J), Chapter 1: Introduction, pp.1-4, 2014
- 2) Sango K, Tsukamoto M, Utsunomiya K, Watabe K. Chapter 10: Spontaneously immortalized adult rodent Schwann cells as valuable tools for the study of peripheral nerve degeneration and regeneration. Schwann Cell Development and Pathology (Eds:

Sango K, Yamauchi J), Springer Japan KK, Tokyo, pp.147-170, 2014

- 3) Sango K, Niimi N, Tsukamoto M, Utsunomiya K, Sakumi K, Nakabeppu Y, Kadoya T, Horie H. Chapter 4: What have we learned from cultured adult dorsal root ganglion neurons? Ganglion Cells: Morphology, Functional Development and Role in Disease (Ed: Vlastimil LG), Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge, USA, pp.125-148, 2014
- 4) 三五一憲, 渡部和彦. ポリオール代謝. 糖尿病性神経障害: 基礎から臨床のすべて (中村二郎編), 中山書店, pp.60-67, 2013

〔その他〕

ホームページ等

糖尿病性神経障害プロジェクト

<http://www.igakuken.or.jp/diabetic/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三五一憲 (SANGO Kazunori)

公益財団法人東京都医学総合研究所・運動・感覚システム研究分野・副参事研究員

研究者番号: 50291943

(2) 研究分担者

渡部 和彦 (WATABE Kazuhiko)

公益財団法人東京都医学総合研究所・運動・感覚システム研究分野・副参事研究員

研究者番号: 30240477

(3) 連携研究者

楠 進 (KUSUNOKI Susumu)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号: 90195438

村上 龍文 (MURAKAMI

Tatsufumi)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 30330591