

令和元年6月24日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05041

研究課題名(和文)ヘッジホッグシグナル伝達系は末梢神経再生を誘導する

研究課題名(英文)Activation of hedgehog signal pathway induces peripheral nerve regeneration

研究代表者

瀬尾 憲司 (Seo, Kenji)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：40242440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：末梢神経が損傷するとソニックヘッジホッグ(Shh)とその転写因子Gli1が神経損傷部に発現する。Shhシグナル系を抑制すると、再生軸索は異常に走行し、軸索結合は障害される。さらに中枢側断端の幼若シュワン細胞数を増加させ、末梢側でマクロファージ数を減少させる。損傷後の経過では、Shhの発現は損傷後早期に上昇し後期に減衰するが、Dhhは損傷後早期に発現量が低下し後期になると上昇する。Ihhは損傷前後では発現しない。すなわち損傷を契機にDhhシグナルからShhシグナルへのスイッチングが起こっている。以上の結果から損傷神経の再生にはShh, Dhhが重要な役割をしていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胚発生において形態形成と細胞増殖に働くヘッジホッグシグナル伝達系は、出生後においても末梢神経損傷で誘導され、これらはaxonの慎重に関与してその神経軸索結合・再生に関与する。さらにその中でもソニックヘッジホッグとデザートヘッジホッグは別々に誘導され、それぞれ別々の働きで神経再生に影響する。したがって、末梢神経の再生にはこうした因子の調節が正常な治癒に関与すると考えられる。本研究による結果は、神経種の形成などによる末梢神経再生障害を予防する方法の開発へ貢献できると期待される。

研究成果の概要(英文)：Peripheral nerve injury induces expressions of a morphogen Sonic Hedgehog (Shh) and its transcriptional regulator Gli1 in the lesion. Blockade of Shh signaling pathway after peripheral nerve injury leads to abnormal axon growth in random directions, resulting in a disturbance of axonal regeneration. This also increases the number of immature Schwann cell in the medial site of the lesion, but it decreases that of macrophage in the distal site. During the regeneration period, the expression of Shh in the lesion elevates immediately after the injury and attenuates later. In contrast, another homologues Hedgehog family Desert hedgehog (Dhh) exhibits the reverse process. This implicates that nerve injury induces switching the expression of Shh to Dhh and these factors contribute to peripheral nerve regeneration.

研究分野：歯科麻酔学

キーワード：hedgehog peripheral nerve nerve injury sonic hedgehog desrt hedgehog Gli1 macrophage schwann cell

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

1. 研究開始当初の背景

下顎埋伏智歯の抜歯やインプラント埋入術などにより下歯槽神経または舌神経を損傷する症例は決して少なくない。これらにより発症した難治性の慢性疼痛の外科的治療においては外傷性神経腫が発見されることが多かった。申請者は今までに 10 例以上の下歯槽神経または舌神経の損傷部に対して神経腫切除または PGA-Collagen tube で損傷部を修復し、神経再生の場を設定することで感覚回復を得て神経腫の再発を予防してきた。これは神経突起の伸びる方向を人工神経管で誘導すれば神経突起が乱雑な方向に伸長する神経腫の形成が抑制されることから、神経突起が進展する方向をコントロールすることが正常な神経再生には重要であることを示唆している。

ヘッジホッグ遺伝子は初めにショウジョウバエの体節の前後方向を決定する遺伝子として発見された(Nisslein-Volhard C, Nature 1980)。脊椎動物ではこのヘッジホッグには Desert (Dhh), Indian (Ihh), Sonic(Shh)のリガンドとして 3 種類が、その受容体である patched には 2 種類(1, 2 型)があることが報告されており、これらはヘッジホッグシグナル伝達系とされている。この伝達系は発生期において細胞から自己分泌されたヘッジホッグ蛋白(hh)が、分泌細胞周囲に濃度勾配を形成し、それによって組織の伸長・発達が誘導されると考えられている。一方、成熟動物においてもヘッジホッグシグナル伝達系が組織の維持や再生に働いており、末梢神経損傷により軸索の断端には Shh の mRNA が増加し、ヘッジホッグ蛋白の受容体である Patched の mRNA がシュワン細胞に存在していることが報告され(Bajestan S, J Neurobiol 2005)、シュワン細胞における Dhh は末梢神経の膜構造の形成に働いている(Parmantier E, Neuron 1999)。臨床では末梢神経が損傷しても自然に接合する場合があるが、切断した神経端同志の再接合機構および神経腫形成メカニズムは不明である。ヘッジホッグ蛋白は末梢神経損傷によりその神経断端から伸びた神経突起の方向の誘導にも関与している可能性がある。

以上より、ヘッジホッグ蛋白の調節が末梢神経再生に及ぼす影響と、それに関わる要因を検討することは、難治性の神経障害性疼痛の発生機序を解明し、さらには予防法の確立へとつながることが出来る。

2. 研究の目的

本研究では損傷神経の再生過程における神経突起誘導のメカニズム、特にヘッジホッグ蛋白の関与を解明することを目的とした。この研究目標達成のために、神経損傷によるヘッジホッグシグナル伝達系(蛋白・受容細胞)の発現とその時間的経過を検討し、ヘッジホッグシグナル伝達系の末梢神経姿勢に及ぼす影響を検討する。本研究の最終ゴールは損傷神経の再生メカニズムの解明であり、末梢神経の再生を促進または抑制する要因を調節することにより、末梢神経再生の治療法の開発へと発展させることである。

3. 研究の方法

7-9 週齢の C57BL6 マウスおよび、Shh のプロモーターの下流に GFP がレポーターとして組み込まれているマウス(Shh-GFP マウス)を使用した。深麻酔下で下歯槽神経を切断し、術後 3, 7 日目に灌流固定し、通法に従い凍結切片を作成した。免疫染色による各種分子(GFP, Gli1, PGP9.5, MBP, F4/80)の検索を行った。また、Shh シグナル抑制の神経再生への影響も検索するため、神経切断後、連続 7 日間 Shh シグナルのインヒビターである cyclopamine を投与し、切断部の再生軸索の走行を免疫染色で観察した。切断神経の再生の確認には、Dil のオトガイ孔への投与による Dil トレーシングアッセイも併用した。さらに、Shh の細胞増殖における影響を調べるため、培養細胞に Shh を添加し、MTT アッセイを行なった。

次に、正常神経および損傷後 1, 3, 5, 7, 14, 28 日における損傷神経における Shh, Dhh, Ihh の発現変動を坐骨神経損傷モデルで qPCR およびウエスタンブロットを用いて確認した。これらの神経再生における意義を確認するために、神経損傷時に損傷部には Dhh と 5E1(Shh 中和抗体)をそれぞれ投与し、Dhh シグナルから Shh シグナルへの変化をブロックした系を作成し、神経切断後 7 日の損傷神経を観察した。

4. 研究成果

Shh シグナルのリガンドである Shh は、神経損傷後 3 日目に、切断部中枢側断端と末梢側全域で発現していた。Shh シグナル活性のマーカー転写因子である Gli1 も、Shh と同様の発現パターンを示した。Shh, Gli1 とともに、損傷後 7 日目で、その発現が低下していた(図 1)。術後 3 日目における Shh と Gli1 は、幼若シュワン細胞のマーカーである p75 と共染することが確認された。また、Shh も Gli1 との共染も認められた。cyclopamine による Shh シグナル抑制では、神経損傷後 7 日目に再生軸索の異常走行(図 2)と、三叉神経節における Dil 陽性細胞数の減少が認められ、神経再生が Shh シグナル抑制により障害されたことが確認された。cyclopamine による Shh シグナルの抑制では、中枢側断端の幼若シュワン細胞数が増加していたのに対し、末梢側でのシュワン細胞数の増加は認められなかった。In vitro アッセイでは、培養液への SHH タンパクの添加によるシュワン細胞の細胞増殖抑制が観察された。一方、切断神経の末梢側においては、cyclopamine による Shh シグナルの抑制で、マクロファージ数の減少と、ミエリンタンパクの残存が認められた(図 3)。

神経損傷後の Shh, Dhh, Ihh の発現は、Shh の発現が損傷後早期に上昇、後期になるにつれて、

減衰した。Dhh は損傷後早期に発現量が低下し、後期になると上昇した。Ihh は損傷前後共に末梢神経では発現していなかった。

またコントロールに比べると Dhh 投与群、5 E1 投与群は共に軸索伸長が抑制された。さらに、術後 28 日の各群の損傷遠位部では、Dhh 投与群 5E1 投与群で、髄鞘化神経の数は有意に少なかった。

図 1

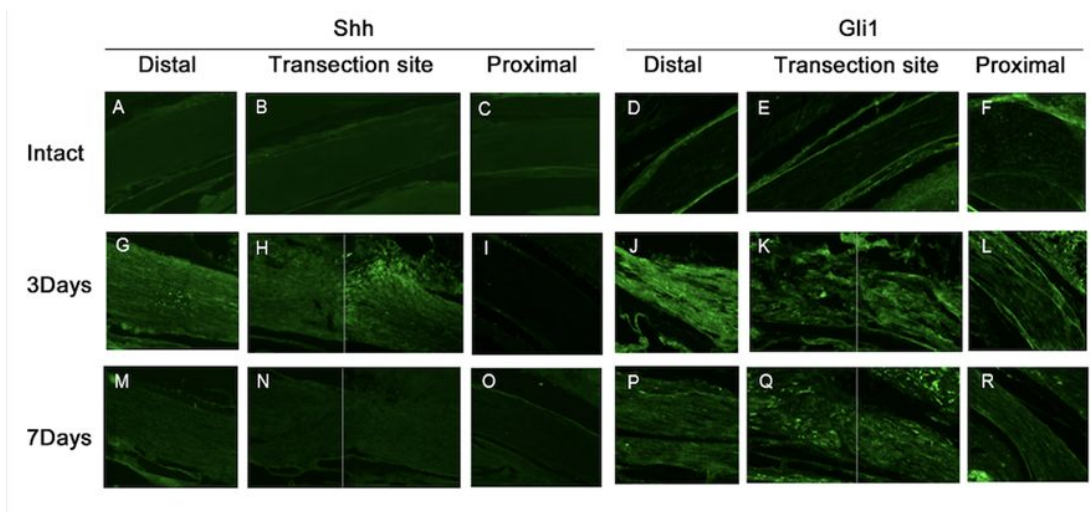


図 2

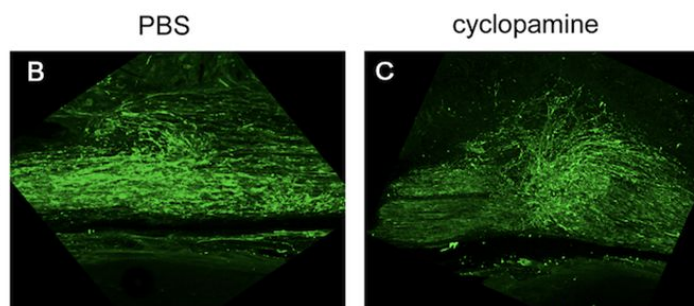
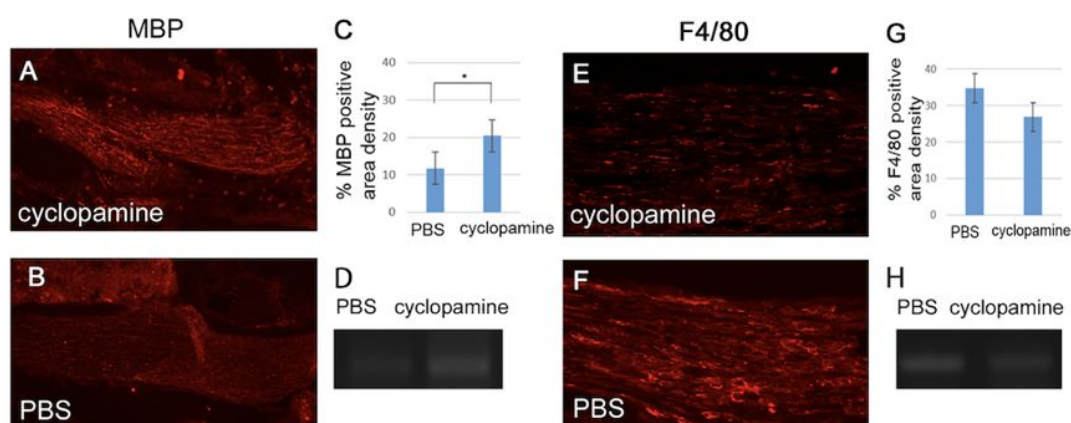


図 3



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- 1) 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.

〔学会発表〕(計 3 件)

- 1) Yurie Yamada, Takeyasu Maeda, Kenji Seo. Hedgehog signaling pathway participate in inferior alveolar nerve regeneration. Annual meeting of society for neuroscience, 2015, Chicago, USA
- 2) Yurie Yamada, Takeyasu Maeda, Atsushi Ohazama, Kenji Seo. Hedgehog signaling pathway is involved in peripheral nerve regeneration, Annual meeting of society for neuroscience 2016, San Diego, USA
- 3) Yurie Yamada, Atsushi Ohazama, Takeyasu Maeda, Kenji Seo. The role of Hedgehog signaling pathway during peripheral nerve regeneration. European Pain Federation 2017 Amsterdam. Denmark

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 該当事項なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：前田 健康

ローマ字氏名：MAEDA TAKEYASU

所属研究機関名：新潟大学

部局名：医歯学系

職名：教授

研究者番号(8桁)：40183941

研究分担者氏名：大峡 淳

ローマ字氏名：OHAZAMA ATSUSHI

所属研究機関名：新潟大学

部局名：医歯学系

職名：教授

研究者番号 (8 桁): 40266169

研究分担者氏名 : 紙谷 義孝

ローマ字氏名 : KAMIYA YOSHINORI

所属研究機関名 : 新潟大学

部局名 : 医歯学系

職名 : 准教授

研究者番号 (8 桁): 90381491

(2)研究協力者

研究協力者氏名 : 該当なし

ローマ字氏名 :

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。