

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10397

研究課題名(和文) コレシストキニンB受容体蛋白による軸索伸長効果

研究課題名(英文) The role of Cholecystokinin B receptor (CCKBR) in axonal elongation

研究代表者

長谷川 智彦 (Hasegawa, Tomohiko)

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50402368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：末梢神経損傷により神経細胞は励起状態となる。更に二度目の損傷が加わると軸索再生が著しく促進する現象はconditioning効果と呼ばれ、中枢神経再生の鍵と考えられている。今回、conditioningによりマウス後根神経節で発現が10倍以上上昇する遺伝子CCKBRの神経再生への関与について検討した。CCKBRアンタゴニスト投与による坐骨神経損傷後の後根神経節培養神経細胞での喪失実験において軸索伸長が180 μ mから65 μ m、発芽率が20%から4%に有意に抑制され、CCKBRのconditioning効果への関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Pre-conditioning peripheral nervous system (PNS) neurons by a peripheral axonal injury primes them through massive transcriptional changes to regenerate more vigorously and faster in the face of a second injury because of an induction of networks of regeneration-associated genes. Studies of the transcriptional response in pre-conditioned dorsal root ganglion (DRG) neurons have implicated regeneration-promoting roles for many transcription factors and regeneration-associated genes. Among them, cholecystokinin B receptor (CCKBR) gene increases ten times at DRG after pre-conditioning. However, the role of CCKBR in regeneration is yet to be elucidated. The purpose of this study is to investigate the role of CCKBR in association with peripheral nerve regeneration. In loss-of-function experiments, LY225910 significantly reduced neurite initiation (53% reduction, $P < 0.001$) and maximal axon length (64% reduction, $P < 0.001$) relative to vehicle controls.

研究分野：神経再生

キーワード：conditioning nerve regeneration cckbr dorsal root ganglion

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷では脊髄に外力が加わり、脊髄内の神経伝達が途絶えた状態である。ノーベル生理学賞を受賞したスペインの病理学者である神経科学者であるカハールが 20 世紀はじめに述べているように、一度損傷を受けた成人哺乳類の中樞神経(脳・脊髄)再生は非常に困難であると考えられている。それから 90 年近く経った現在においても未だ有効とされる治療は確立されていない。脊髄損傷では脊髄に外力による損傷が加わり、組織の直接損傷が生じ、脳・血管関門の破綻、それに引き続き炎症細胞の浸潤が生じる。それと同時に炎症性サイトカインの上昇や、数千の遺伝子とその発現に変化を起こす。そして炎症細胞の浸潤や虚血により徐々に二次障害を生じ、脱髄、空洞形成を生じる。その後空洞部分にはグリア瘢痕を生じ、このグリア瘢痕は物理的に軸索再生を阻害させるだけでなく、分子学的にも軸索阻害因子を生じ、軸索の伸長を阻害する。これらの機序をもとに、現在の脊髄損傷への研究アプローチは、炎症反応の抑制、グリア瘢痕の除去、軸索再生因子の除去、内因性の遺伝子の活性化、細胞移植と以上のような治療戦略がある。

炎症反応の抑制では二次障害予防目的とし、炎症性サイトカインをターゲットにして、そのシグナルを抑制する戦略であり、IL-6 や TNF α の阻害剤による研究が試みられている。

グリア瘢痕の除去では、物理的な軸索伸長阻害因子であるグリア瘢痕を薬剤による戦略であり Chondroichinase ABC 等の研究が行われている。分子学的な軸索再生阻害因子を抑制する研究では、NogoA, MAG, OMgp 等の因子をそれぞれ抑制する研究報告やそのコンビネーションによる研究報告も行われている。①～③は主に外因要素、環境要素の改善による治療戦略である。内因性の遺伝子活性化に関しては、中樞神経損傷では損傷後の軸索伸長に關与する内因性遺伝子が

抑制されていると考えられるため、内因性伸長力の活性を試みる研究が行われている。幹細胞移植に関しては、近年注目されている iPS 細胞の移植を含めて幹細胞を損傷部に移植させることで、移植細胞が神経細胞に分化し、それが介在ニューロンとなり神経をリレーして目的臓器まで軸索を伸長させるというコンセプトの元に各種研究が行われている。

我々は過去に関節リウマチや他疾患で臨床応用されている IL-6 受容体抗体治療に注目し研究を行ってきた。その結果 IL-6 受容体抗体である MR16-1 の損傷直後の単回投与が過去の報告と同様に、脊髄損傷後の炎症を抑制し、脊髄損傷後の運動機能の回復に寄与した。また MALDI 質量分析イメージングの手法を用いることで今までは不可能であったリン脂質の局在の可視化に成功し、膜リン脂質の一つであり、潜在的に神経保護作用のある DHA 含有 phosphatidylcholine 分子種の減少が IL-6 受容体抗体投与群の損傷周辺部で抑制されていたことを明らかにした。しかしながら、この戦略では二次損傷の拡大を抑制することで成長阻害因子となるグリア瘢痕の形成を抑制し、結果として運動機能の回復に寄与したがその効果は限定的であった。

この原因として、軸索再生が十分におこっていなかったことが原因の一つとして考えられる。中樞神経では神経の過剰な再生による神経の過誤支配を防ぐために、神経細胞自身が軸索成長因子を抑制していると考えられている。そのため、我々は軸索成長因子を同定し、その遺伝子を活性化し内因性軸索再生効果をあげる治療法を既存の IL-6 受容体抗体治療と組み合わせることが、脊髄損傷に対する画期的な治療戦略として考えている。本研究室の連携研究者である大村助教は、アメリカ、ハーバード大学神経生物学の研究所

において、9種類の遺伝的に最も異なる近交系マウスを用いて末梢神経損傷後にその上流である後根神経節で発現する遺伝子の網羅的解析を行い、神経損傷後にその発現量が10倍以上上昇する9種の遺伝子を発見した。その中で我々は神経再生への関与が未知である遺伝子 *cckbr* に注目している。遺伝子 *cckbr* はコレシストキニン B 受容体蛋白をコードしている。本研究の目的はこのコレシストキニン B 受容体の促進剤、阻害薬を用いて、神経細胞の再生を *in vivo*, *in vitro* で解析することである。

2. 研究の目的

本プロジェクトでは、コレシストキニン B 受容体の神経細胞への関与を解明する目的で *in vitro* においてコレシストキニン B 受容体蛋白の局在解析と発現量の定量を行う。その後、初代後根神経性培養神経細胞にコレシストキニン B 受容体のアゴニスト、アンタゴニストを投与し機能獲得、損失実験を行い、コレシストキニン B 受容体蛋白の軸索伸長作用を検討する。

3. 研究の方法

8週齢の C57BL/6J マウスを用い、坐骨神経損傷前および損傷後 5 日での後根神経節 (L3-5) における CCKBR の局在評価を免疫染色にて検討した。遺伝子発現の検討として坐骨神経損傷後 0, 1, 3, 7, 14 日目における後根神経節 (L3-5) での CCKBR mRNA の発現量の経時的変化を定量的 PCR で検討した。さらに CCKBR の機能獲得、喪失実験として坐骨神経損傷後 5 日 L3-5 の後根神経節神経細胞単離培養を行い、24 時間培養した神経細胞において CCKBR のアゴニスト (CCK8S)、アンタゴニスト (LY225910) を用いた検討を行った。

4. 研究成果

CCKBR は後根神経節神経細胞の細胞膜に局在

し、坐骨神経損傷後にその発現量が増加した。mRNA 発現の検討において CCKBR は坐骨神経損傷後徐々に上昇し、1 日目から 3 日目で有意に上昇し ($P < 0.001$)、7 日目で最大量 (0 日目の 790 倍) となって 14 日目では減少していた。CCKBR アンタゴニスト投与による坐骨神経損傷後の後根神経節培養神経細胞での喪失実験において軸索伸長が $180 \mu\text{m}$ から $65 \mu\text{m}$ 、発芽率が 20% から 4% に有意に抑制された ($P < 0.001$, < 0.001)。一方で CCKBR アドニスト投与による軸索伸長および発芽率の有意な差はみられなかった。

CCKBR は坐骨神経損傷後のマウス後根神経節神経細胞の細胞膜での発現が増加し、後根神経節における mRNA の発現も上昇していた。機能喪失実験において CCKBR アンタゴニストは conditioning による軸索再生促進効果を有意に抑制しており、CCKBR の conditioning 効果への関与が実証された。

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 2 件)

発表者名: 三原唯暉

発表演題名: コレシストキニン B 受容体 (CCKBR) の神経再生への関与の検討

学会名: 第 51 回日本脊髄障害医学会

発表年: 2016 年

発表者名: 三原唯暉

発表演題名: コレシストキニン B 受容体 (CCKBR) の神経再生への関与

学会名: 第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会

発表年: 2017 年

〔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：

出願年月日：

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

長谷川 智彦 (HASEGAWA Tomohiko)

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50402368