

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10401

研究課題名(和文) 神経筋接合部の変性制御により神経損傷後の運動機能回復を促進する薬理的アプローチ

研究課題名(英文) Pharmacologic Approaches to Preserve the Neuromuscular Junction after Traumatic Nerve Injury

研究代表者

栗本 秀 (Kurimoto, Shigeru)

名古屋大学・医学系研究科・特任講師

研究者番号：70597856

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、神経損傷後に起こるアセチルコリン受容体の分散を制御し、神経再生後の運動機能回復を促進するための薬理的アプローチを確立することである。坐骨神経損傷モデルマウスの脱神経筋内において、Wnt3aによるカテニン依存経路のみでなく、カテニン非依存性経路のWnt4、Wnt9a、Wnt11も上昇を認めた。カテニン依存経路を抑制するIWR1や、カテニン非依存性経路も抑制するporc inhibitorの投与により、アセチルコリン受容体の凝集促進効果が得られた。末梢神経損傷後の神経筋接合部の変性をWntアンタゴニストの投与により薬理的にコントロールできる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In the rat sciatic nerve transection model, not only the Wnt/beta-catenin pathway but also the non-canonical pathway of Wnt signaling, such as Wnt4, Wnt9a, Wnt11, were activated secondary to traumatic nerve injury. The effect of the Wnt antagonists on acetylcholine receptor (AChR) cluster formation were also investigated. The treatment of C2C12 myotubes by IWR1 and porc inhibitor increased the number of AChR clusters. Wnt signaling pathway may be a useful therapeutic target to prevent the motor endplate degeneration that occurs following traumatic nerve injury with Wnt inhibitors serving as a pharmacologic adjunct to surgical repair.

研究分野：神経再生

キーワード：神経筋接合部 末梢神経 脱神経筋 Wnt

## 1. 研究開始当初の背景

末梢神経系は、損傷後の神経再生能力は比較的高いと考えられているが、神経縫合などの外科的治療技術や人工神経などの補填材料が発展しても、成人での主要な神経損傷後の運動機能回復には限界があり、受傷前と同じ筋力や巧緻性を獲得することは未だに困難である。神経損傷後の運動機能回復は、受傷年齢と損傷部位、損傷後の経過時間に依存することがわかっている。成人において末梢神経の再生速度は1-3mm/日とされており、近位部での末梢神経損傷では脱神経筋内での変性が起こる前に軸索が標的となる筋に到達できない。Waller 変性後に脱神経の状態が遷延すると、運動神経細胞の神経再生能の低下、Schwann 細胞の減少、神経内瘢痕形成、神経筋接合部の変性など様々な変化が起こる。後シナプス構造におけるアセチルコリン受容体 (AChR) の凝集には Neural Agrin が必要とされ、神経損傷後の運動神経終末では Agrin の放出が減少し、AChR の分散が起こる。我々は頭脳循環を加速する若手研究者戦略的海外派遣プログラム (平成 23・26 年) において、University of California, Irvine と「神経再生医療の実現に向けた神経幹細胞分化の最適化のための国際共同研究-脊髄・末梢」をおこなった。この中で高度に変性した AChR に到達した軸索は神経筋接合部を形成しにくく、神経筋接合部の変性を防ぐことが神経再生後の運動機能回復を改善することがわかった。また、我々はこれまでに ES 細胞由来運動神経細胞に対する神経筋接合部形成促進薬の網羅的探索法に関する研究 (挑戦的萌芽研究:平成 25・26 年) をおこない、人体に対する安全性が確立された 1000 種超の FDA 既認可薬を用いて AChR の形成を促進する薬剤 A を、high-throughput screening により同定した。これらの研究の中で、神経筋接合部の変性抑制や形成促進を薬理的にコントロールすることができれば、神経損傷部位や損傷後の経過時間に影響を受けず良好な運動機能回復を実現でき、神経損傷に対する外科的治療成績を一気に向上させることができると考えた。

## 2. 研究の目的

末梢神経損傷の外科的治療には 'critical time window' があり、その間は運動終板が神経再生に対して permissive な状態で、機能的な神経修復が可能であると考えられている。神経損傷後の運動終板の変性は、この 'critical time window' を規定する重要な因子であると考えられる。しかし、現在おこなわれている末梢神経再生の研究の多くは、軸索再生促進や欠損補填材料の開発に注力し、神経損傷後の神経筋接合部の変性に着目した治療研究はほとんどない。

我々のこれまでの研究で、発生段階の神経筋接合部の形成や維持に重要な役割を果たしている Wnt シグナル伝達経路が神経損傷後の AChR の分散に強く関与していることがわか

った。末梢神経損傷後の神経筋接合部の変化と Wnt シグナル伝達経路の関連を報告した研究は今までにない。特に我々がこの経路に注目したのは、腫瘍生物学の分野において Wnt シグナルは重要な役割を担い、多くの研究が行われているためにその詳細なメカニズムについても解明されてきているためである。既に IWR1 や Quercetin、Porcupine インヒビターである C59 など多くの薬理的な Wnt アンタゴニストが同定・開発され、一部は in vivo での安全性の確認がおこなわれ、腫瘍増殖抑制のための臨床試験に進んでいる。また、我々が high-throughput screening により同定した薬剤 A は、既に市販されている薬剤の未知の効果を探る Drug repositioning 法を用いており、安全性試験が不要で、開発費用がかからず、すぐに臨床応用可能というメリットがある。これらの薬剤が末梢神経損傷後の AChR の変性抑制および再神経支配後の神経筋接合部形成を促進する可能性がある。

本研究の目的は、神経損傷後に運動終板で起こる AChR の分散を制御し、神経再生後の運動機能回復を促進するための薬理的アプローチを確立することである。神経筋接合部の変性を薬理的にコントロールすることができれば、神経損傷に対する外科的治療を補完する新しい治療法を確立する重要な成果が期待される。

## 3. 研究の方法

次のステップを用いて、Wnt アンタゴニストと AChR 凝集促進剤 A による神経筋接合部の形成促進や変性制御の薬理的効果を検討する。

既存薬による神経筋接合部の形成促進作用の確認する。マウス筋芽細胞株を用いて myotube を作成し、in vitro での薬剤投与下に AChR の凝集を調べる。AChR の cluster 数・蛍光強度、MuSK のリン酸化、Rapsyn の発現量を定量評価する。

坐骨神経損傷モデルマウスを用いて、Wnt シグナルの発現と Wnt シグナル伝達経路のターゲット遺伝子や蛋白の発現を定量評価する。Wnt は様々なレセプターと結合し下流の伝達経路を活性化するが、大きく  $\beta$  カテニン依存性経路 (canonical pathway) と  $\beta$  カテニン非依存性経路 (non-canonical pathway) に分類される。Wnt3a による  $\beta$  カテニン依存性経路、及び Wnt3, Wnt4, Wnt9a, Wnt11 といった  $\beta$  カテニン非依存性経路の Wnt シグナルについて、坐骨神経を 10mm 切除するマウス神経損傷モデルを使用し、脱神経筋内の Wnt シグナルの mRNA 発現量を qRT-PCR を用いて経時的に (1 週、2 週、1 ヶ月、2 ヶ月) 健側と比較検討する。また、Wnt/ $\beta$  カテニン経路のターゲット遺伝子である Axin2、SP5、C-myc、LEF1、さらに Rapsyn の mRNA と蛋白の発現量も qRT-PCR、Western blotting 法で評価する。

神経損傷後に活性化している Wnt 経路を

抑制し、神経筋接合部の変性を制御する。Wnt アンタゴニストによる AChR の形成促進作用の確認する。既存薬の実験と同様にして、マウス筋芽細胞株を用いて myotube を作成し、Wnt アンタゴニストを投与下に AChR の凝集を調べる。免疫組織学的評価に加え、Rapsyn, Lrp4, MusK, Axin2 の mRNA 発現量を検討した。

#### 4. 研究成果

神経再生後の良好な運動回復を得るためには AChR の高密度な再凝集が必要となる。神経筋接合部の再形成促進を薬理的にコントロールするために、high-throughput screening により同定された既存薬を用いて AChR の凝集を検討した。high-throughput screening により最も凝集を促進する可能性がある薬剤 A に加え、20 番目までの既存薬を用いて in vitro でマウス筋芽細胞種の AChR 凝集を評価する second screening と、シナプス形成に必要なシグナルを伝達する MuSK のリン酸化を免疫沈降後に Western blotting を用いて評価する third screening を行ったが、既存薬については AChR の凝集に対する一貫した有意な結果が得られていない。

末梢神経損傷後に AChR の分散に関わるメカニズムを明らかとするため、発生段階において AChR 形成や維持に重要な役割を果たしている Wnt シグナルの関与について検討した。坐骨神経損傷モデルマウスにおいて、 $\beta$  カテニン依存性経路は坐骨神経切断後に、優位に活性化されていることがわかっているが、 $\beta$  カテニン非依存性経路についても mRNA の発現量を調べた。坐骨神経損傷後 2 週の時点では Wnt3 の mRNA が低下し、Wnt4, 9a, 11 mRNA は増加していることがわかった。特に  $\beta$  カテニン依存性経路は、坐骨神経切断モデルの脱神経筋内において、変性した運動終板に一致して発現が増加しているため、Wnt3a/ $\beta$  カテニン依存性経路が重要な負の制御因子としての役割を果たしていると考えている。

この Wnt/ $\beta$  カテニン依存性経路を Wnt アンタゴニストにより抑制し、AChR の形成促進効果が得られるかについて検討した。マウス筋芽細胞株を用いて myotube を作成し、至適な Agrin 濃度下における AChR 凝集を、Wnt アンタゴニスト投与の有無で比較した。Wnt/ $\beta$  カテニン依存性経路を抑制する Quercetin については効果が確認できなかったが、同様に Wnt/ $\beta$  カテニン依存性経路を抑制する IWR1 投与群において、AChR の凝集は濃度依存性に凝集量が増加することがわかった。本研究において、Wnt/ $\beta$  カテニン依存性経路以外の Wnt シグナル伝達経路も関与している可能性が示されたため、その他の Wnt シグナル伝達経路も抑制できる Wnt アンタゴニストについても追加調査をおこなった。Wnt の機能発現や細胞外分泌に必要な Porcupine を抑制することで、ほとんどの

Wnt の発現を抑える porc inhibitor を用いた。porc inhibitor の投与により IWR1 以上の AChR 凝集効果が得られた (図 1)。生体の恒常性維持に Wnt シグナルは重要な役割を果たしている。しかし、porc inhibitor は、既に腫瘍増殖抑制のための臨床試験がおこなわれ、生体安全性の確認が進められている。本研究において、Wnt アンタゴニストの投与により末梢神経損傷後の神経筋接合部の変性を薬理的にコントロールできる可能性が示された。

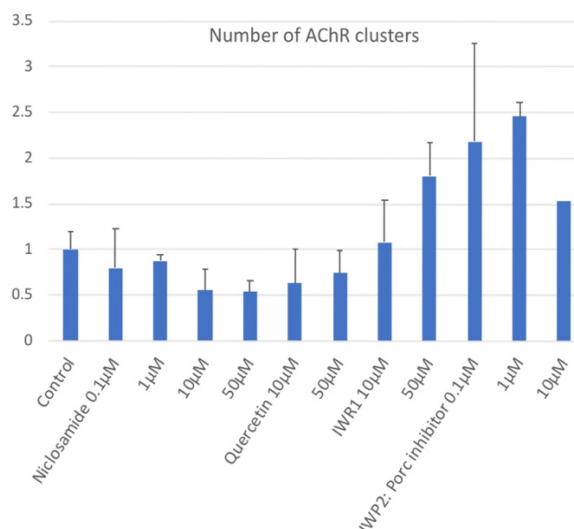


図 1. Wnt inhibitor 投与下における myotube 上の AChR cluster 数

#### 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 5 件)

1. Nakano T, Kurimoto S, Kato S, Asano K, Hirata T, Kiyama H, Hirata H. Complete adult neurogenesis within a Wallerian degenerating nerve expressed as an ectopic ganglion. *J Tissue Eng Regen Med*. 査読有 2018. Epub ahead of print. doi:10.1002/term.2679.
2. 中野智則 栗本秀 岩月克之 平田仁, 末梢神経内に作成した異所性 neural ganglion による機能再建, 末梢神経, 査読有, 28 巻, 2017, 78-85
3. 平田仁, 再生医療の最先端 ES 細胞を用いた運動機能再建, 日本整形外科学会雑誌, 査読有, 90 巻, 2016, 13-17
4. Kurimoto S, Kato S, Nakano T, Yamamoto M, Nishizuka T, Hirata H. Transplantation of embryonic motor neurons into peripheral nerve combined with functional electrical stimulation restores functional muscle activity in the rat sciatic nerve transection model. *J Tissue Eng Regen Med*. 査読有

2016;10:E477-E484. doi:10.1002/term.1844.  
5. Kurimoto S, Jung J, Tapadia M, Lengfeld J, Agalliu D, Waterman M, Mozaffar T, Gupta R. Activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling cascade after traumatic nerve injury. *Neuroscience*. 査読有 2015;294:101-108.doi:10.1016/j.neuroscience.2015.02.049.

[学会発表] (計 29 件)

1. Reconstruction of Motor Function in Peripheral Nerves by Transplantation of human iPSC-derived Motor Neuron Progenitors, ポスター, Satoshi Niwa, Masaomi Saeki, Hiroki Shinkai, Shigeru Kurimoto, Tomonori Nakano, Yohei Okada, Hitoshi Hirata, 2018 Annual Meeting of Orthopaedic Research Society Annual Meeting, 2018/3/13, 海外.  
2. 神経幹細胞移植によって末梢神経内に生じる neurogenesis の組織評価と麻痺骨格筋再建法, 口演, 中野智則 徳武克浩 浅野研一 丹羽智史 栗本秀 平田仁, 第 44 回日本マイクロサージャリー学会学術集会, 2017/12/8, 国内.  
3. 末梢神経における胎児由来神経前駆細胞移植による感覚神経再生, 口演, 浅野研一 中野智則 丹羽智史 新海宏明 栗本秀 平田仁, 第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2017/10/27, 国内.  
4. 末梢神経へのヒト iPSC 細胞由来の運動神経前駆細胞移植による運動機能の再構築, 口演, 丹羽智史 新海宏明 中野智則 栗本秀 小野寺一成 岡田洋平 平田仁, 第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2017/10/27, 国内.  
5. 末梢神経:再生, 口演, 平田仁, 第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2017/10/27, 国内.  
6. ES 細胞由来運動神経細胞移植による末梢神経の運動機能再建, 口演, 新海宏明 丹羽智史 佐伯将臣 中野智則 栗本秀 岡田洋平 平田仁, 第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2017/10/27, 国内.  
7. Agrin 欠乏と神経筋接合部変性促進, 口演, 大西哲朗 栗本秀 平田仁, 第 28 回日本末梢神経学会学術集会, 2017/8/26, 国内.  
8. 神経筋接合部の再形成を促進するための薬理的アプローチ, 口演, 能登公俊 栗本秀 石井久雄 大西哲朗 岩月克之 平田仁, 第 28 回日本末梢神経学会学術集会, 2017/8/26, 国内.  
9. ES 細胞由来運動神経細胞移植による末梢神経の運動機能再建, 口演, 新海宏明 丹羽智史 中野智則 栗本秀 岡田洋平 平田仁, 第 28 回日本末梢神経学会学術集会, 2017/8/26, 国内.  
10. 末梢神経における胎児由来神経前駆細胞移植による感覚神経再生, 口演, 浅野研一 中野智則 佐伯将臣 丹羽智史 新海宏明 栗本秀 平田仁, 第 28 回日本末梢神経学会学術集会, 2017/8/26, 国内.

11. ヒト iPSC 細胞由来運動神経前駆細胞を用いた末梢神経における運動機能再建, 口演, 丹羽智史 佐伯将臣 新海宏明 中野智則 栗本秀 岡田洋平 平田仁, 第 28 回日本末梢神経学会学術集会, 2017/8/26, 国内.  
12. Reconstruction of motor function in peripheral nerves by transplantation of hiPSC-derived motor neuron progenitors, ポスター, Satoshi Niwa, Hiroki Shinkai, Kazunari Onodera, Takuji Ito, Satoshi Tanaka, Jiawei Li, Shigeru Kurimoto, Tomonori Nakano, Manabu Doyu, Hitoshi Hirata, Yohei Okada, 第 40 回日本神経科学大会, 2017/7/20, 国内.  
13. 異所性神経節誘導による駆動筋の再生, 口演, 中野智則 浅野研一 新海宏明 丹羽智史 栗本秀 平田仁, 第 49 回日本結合組織学会学術集会, 2017/6/17, 国内.  
14. 末梢神経外科の歴史と将来展望, 口演, 平田仁, 第 90 回日本整形外科学会学術総会, 2017/5/21, 国内.  
15. ヒト iPSC 細胞由来の運動神経細胞移植による末梢神経における運動機能再建, 口演, 丹羽智史 新海宏明 中野智則 栗本秀 小野寺一成 岡田洋平 平田仁, 第 60 回日本手外科学会学術集会, 2017/4/28, 国内.  
16. ES 細胞由来運動神経細胞移植による末梢神経の運動機能再建, 口演, 新海宏明 丹羽智史 栗本秀 岡田洋平 平田仁, 第 60 回日本手外科学会学術集会, 2017/4/28, 国内.  
17. Reconstruction of Denervated Muscles Using Motor Neurons Derived from Mouse ES Cells, ポスター, Hiroki Shinkai, Satoshi Niwa, Shigeru Kurimoto, Yohei Okada, Hitoshi Hirata, 2017 Annual Meeting of Orthopaedic Research Society Annual Meeting, 2017/3/22, 海外.  
18. Creation of ectopic neural ganglion within peripheral nerve graft, ポスター, Tomonori Nakano, Shigeru Kurimoto, Kennichi Asano, Hiroki Shinnkai, Satoshi Niwa, Hitoshi Hirata, 71th Annual Meeting of the American Society for Surgery of the Hand, 2016/10/1, 海外.  
19. Transplanted Neurons in Peripheral Nerve Provide a Novel Treatment Strategy for Paralyzed Muscles., ポスター, Shigeru Kurimoto, Tomonori Nakano, Hiroaki Shinkai, Satoshi Nina, Masahiro Tatebe, Hitoshi Hirata, 71th Annual Meeting of the American Society for Surgery of the Hand, 2016/10/1, 海外.  
20. 脱神経筋の変性に影響を与える Wnt シグナルおよびその伝達経路の解明, ポスター, 栗本秀 能登公俊 赤根真央 中川泰伸 米田英正 中野智則 西塚隆伸 岩月克之 Ranjan Gupta 平田仁, 第 27 回日本末梢神経学会学術集会, 2016/8/27, 国内.  
21. 末梢神経内に作成した異所性 neural ganglion による機能再建, ポスター, 中野智

則 栗本秀 岩月克之 平田仁, 第 27 回日本末梢神経学会学術集会, 2016/8/27, 国内.

22. Agrin deficiency deteriorates Neuromuscular Junction after nerve injury in a mouse model, ポスター, Tetsuro Onishi, Jared Su, James Jung, Tom Chao, Shigeru Kurimoto, Weiping Wang, Tahseen Mozaffar, Ranjan Gupta, 2016 Annual Meeting of Orthopaedic Research Society Annual Meeting, 2016/3/5-8, 海外.

23. 遊離神経片内に移植した motoneuron は中枢神経系類似環境を構築し支配神経として機能する, 口演, 中野智則 栗本秀 石井久雄 新海宏明 平田仁, 第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2015/10/23, 国内.

24. Screening of a novel drug to activate the formation of neuromuscular junctions, ポスター, Hisao Ishii, Shigeru Kurimoto, Tomonori Nakano, Michiro Yamamoto, Katsuyuki Iwatsuki, Hitoshi Hirata, 70th Annual Meeting of the American Society for Surgery of the Hand, 2015/9/12, 海外.

25. 末梢神経内への運動ニューロン移植による運動機能再建, 口演, 栗本秀 中野智則 加藤宗一 新海宏明 岩月克之 山本美知郎 平田仁, 第 5 回細胞再生医療研究, 2015/7/26, 国内.

26. 末梢神経内への運動ニューロン移植による運動機能再建, ポスター, 栗本秀 中野智則 加藤宗一 新海宏明 岩月克之 山本美知郎 石黒直樹 平田仁, 第 88 回日本整形外科学会学術総会, 2015/5/24, 国内.

27. 神経損傷による神経筋接合部の変性を防ぐために-Wnt/ $\beta$ カテニン経路の検討, 口演, 栗本秀 岩月克之 山本美知郎 Ranjan Gupta 平田仁, 第 58 回日本手外科学会学術集会, 2015/4/17, 国内.

28. 遊離神経片内へ移植した motoneuron を新たな支配神経とする脱神経筋再建, ポスター, 中野智則 栗本秀 加藤宗一 新海宏明 平田仁, 第 58 回日本手外科学会学術集会, 2015/4/17, 国内.

29. 神経筋接合部形成促進薬の探索, ポスター, 石井久雄 栗本秀 中野智則 岩月克之 山本美知郎 平田仁 大河原美静 大野欽司, 第 58 回日本手外科学会学術集会, 2015/4/17, 国内.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

栗本 秀 (KURIMOTO SHIGERU) 名古屋大学・医学系研究科・特任講師 研究者番号:70597856

### (2)研究分担者

平田 仁 (HIRATA HITOSHI) 名古屋大学・予防早期医療創成センター (医)・教授 研究者番号:80173243

山本 美知郎 (YAMAMOTO MICHIRO) 名古屋大学・医学系研究科・特任講師 研究者番号:90528829

石井 久雄 (ISHII HISAO) 名古屋大学・医学系研究科・寄附講座助教 研究者番号:30738349

岩月 克之 (IWATSUKI KATSUYUKI) 名古屋大学・医学部附属病院・講師 研究者番号:90635567

西塚 隆信 (NISHIZUKA TAKANOBU) 名古屋大学・医学系研究科・特任講師 研究者番号:20725535

### (3)連携研究者

なし

### (4)研究協力者

なし