

令和 2 年 5 月 30 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K06988

研究課題名(和文) 妊娠に伴う神経軸索伸長の制御機構

研究課題名(英文) Axonal remodeling of peripheral nerves during pregnancy

研究代表者

長谷川 潤 (Hiroshi, Hasegawa)

神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：10332230

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、妊娠時の母体の組織構造がどのように変化するのか、またそれに伴い末梢神経軸索がどのように変化するのかを明らかにすることを試みた。妊娠時の乳頭においては末梢神経軸索が伸長すること、またその伸長にはバソプレシンまたはオキシトシンが関与する可能性を見出した。また、乳頭、膣において組織構造の変化を司る分子として、TIMP-1の発現が動的に制御されていること、その発現細胞の一つが血管内皮細胞であることが分かった。また、TIMP-1の発現にはエストラジオールが関与している可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、妊娠時母体における組織構造変化の一端が分かり、またそれに伴う末梢神経軸索の変化が明らかとなった。妊娠時の神経系の変化については研究が少なく、本研究の成果は今後の本研究領域の先駆けとなると考えられる。

多くの女性が妊娠に伴う体の変化に戸惑い、時に健康・安心な妊娠の維持に困難な状況が生じることがある。本研究の発展により妊娠による母体の変化を理解し、またそれを制御する方策が開発されれば、妊産婦の健康に寄与し、妊娠・出産に対する女性の意欲向上に役立つ可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research is to reveal (1) molecular mechanisms of various peripheral tissues remodeling during pregnancy and (2) to identify how peripheral axons are remodeled in those tissues. We found that the expression of TIMP-1 is dynamically regulated in the pregnant nipples, skin, and vagina. The expression is probably controlled by the increase in blood estradiol-level caused by pregnancy. We also found that the peripheral axons grow in the nipples during pregnancy and estradiol-induced enlargement of the nipples may contribute to the axon growth. Axon growth was specific to the nipples and not observed in the abdominal skin and vagina. This peripheral axon growth in the nipples requires oxytocin or vasopressin.

研究分野：神経科学

キーワード：妊娠 末梢神経

1. 研究開始当初の背景

妊娠は女性の身体にとって大きな変化である。受精卵の子宮への着床が起きると、性ホルモンの血中濃度の変動が起こり、身体の様々な部分が変化する。乳房においては、乳腺細胞の増殖による乳腺の発達があり、乳頭も肥大化する。腹部皮膚は表面積を劇的に増大させる。こうした形態変化に伴って、痛覚過敏など神経系の機能異常が観察されることがある。こうした神経系の形態・機能の異常が脳で表在化したものが妊娠うつを始めとする精神系のトラブルの原因ではないかと考えられる。これらのことから、妊娠中の母体における神経系の形態・機能の異常を制御することは妊産婦のQOLにとって重要である。しかしこうした妊娠による神経系の構造変化についてはほとんど解析が行われていなかった。

我々は、マウス末梢神経系をモデルとして、末梢神経の軸索伸長・軸索再生における分子メカニズムの研究を行ってきた。発生をモデルとした研究により、表皮には末梢神経軸索の伸長を抑制するメカニズムがあることを見出していた。また、成体においても末梢神経軸索が切断された際には、皮膚からの逆行性シグナルが損なわれることで切断された末梢神経の軸索再生が促されることを明らかにしていた。これらのことから、皮膚からの逆行性シグナルによる末梢神経軸索の制御に興味を持って研究を進めていた。

2. 研究の目的

発生期や修復期における表皮からの逆行性軸索制御メカニズムの存在と、妊娠時には組織構造が大きく変化するという点を併せて考えたとき、妊娠による組織構造の変化が末梢神経系のリモデリングを促し、それにより神経系の妊娠への適応化が起きるのではないかという仮説にたどり着いた。そこで本研究では、妊娠時の組織構造がどのように変化するのか、その分子メカニズムを解析するとともに、それに伴う末梢神経系のリモデリングを明らかにし、その間を結びつける分子メカニズムについて検討することを目的とした。

3. 研究の方法

野生型マウスを用い、timed-matingにより各ステージの妊娠マウスを得た。それぞれの妊娠マウスの乳頭、皮膚、子宮、膣、胸腺、脊髄後根神経節(DRG)等を採用し、総RNAを抽出、定量的RT-PCR法にて各組織に発現する遺伝子量を解析した。また、各組織をparaformaldehydeで固定し、凍結切片を作製、各種一般染色や抗体を用いた免疫組織染色を行った。

エストラジオール及びプロゲステロンの影響を検討する目的としては、野生型の雄マウスまたは雌マウスに、食用油に溶かしたエストラジオール(個体あたり2 μ g)またはプロゲステロン(個体あたり1mg)を7日間皮下投与した。オキシトシンの影響を検討する目的では、野生型の雌マウスに、リン酸緩衝液に溶解したオキシトシン(体重1kgあたり1mg)を腹腔内投与した。オキシトシン受容体のアンタゴニストであるAtosibanは、生理食塩水に溶解し、体重1kgあたり0.5mgを腹腔内投与した。

4. 研究成果

(1) 乳頭の解析

妊娠時の乳頭を経時的に採取し、各ステージにおける末梢神経軸索の状態を抗Gap-43抗体及び抗PGP9.5抗体を用いた免疫組織染色により観察した。その結果、妊娠中期、すなわち乳頭の肥大化が観察され始める時期においてGap-43陽性の神経軸索が認められることが分かった。したがって、このステージにおいて末梢神経軸索が伸長していることが示唆された。乳頭組織の肥大化を司る分子機構を明らかにするために、Matrix metalloproteinase(MMP)群の細胞外基質分解酵素及びMMPの制御因子であるTissue inhibitor of metalloproteinase(TIMP)の発現を検討した。その結果、妊娠中期～後期においてTIMP-3、TIMP-4の緩やかな発現上昇が観察された。一方、出産後の乳頭においては、TIMP-1の発現が著しく増加した。TIMP-1は血管内皮細胞に発現することが知られていたこと、また血管は神経軸索のリモデリングに関与することが知られていたことから、TIMP-1の発現が血管と末梢神経を繋ぐキーマカニズムである可能性を考え、出産後の乳頭におけるTIMP-1の発現細胞を同定することを試みた。その結果、TIMP-1は一部の血管内皮細胞に発現することが分かったが、すべてのTIMP-1が血管内皮細胞に発現するのではなく、おそらく免疫細胞と考えられる他種の細胞にも発現することが分かった。

また、Gap-43陽性の神経線維が観察されたことから、神経軸索の伸長を促す分子機構を明らかにする目的で、DRG神経細胞内のmRNA発現を検討した。DRG神経細胞で見られたGap-43 mRNAの発現上昇は、オキシトシン受容体/バソプレシン受容体のアンタゴニストであるAtosibanを投与することにより抑制された。しかし、オキシトシンの単独投与はGap-43 mRNAの発現上昇を促さなかった。妊娠中にはオキシトシンの血中濃度は顕著に上がることはないと考えられるため、これらのことを合わせて考えると、妊娠や出産に伴う乳頭への末梢神経軸索の伸長は、バソプレシンを必要とすると思われる。一方、オキシトシンが局所的に作用する可能性は否定できないため、別の可能性として、妊娠期の末梢神経軸索伸長はオキシトシンを必要とするが、オキシトシンのみで十分ではなく、他のシグナルとの協調作用により機能する可能性が考

えられる。これらのいずれが正しいのかについては、今後の研究を待つこととなる。

(2) 皮膚の解析

乳頭への神経軸索伸長が明らかとなったため、同じように組織構造に大きな変化がある腹部皮膚に関しても同様に末梢神経軸索の伸長が見られるのかを、組織学的に検討した。腹部皮膚の凍結組織切片に対し、抗 Gap-43 抗体及び抗 PGP9.5 抗体を用いた免疫組織染色を行った。その結果、妊娠時の腹部皮膚においては、末梢神経軸索が伸長している明確な証拠を得ることはできなかった。しかし、現在の解析では薄切切片を用いた染色しか行っておらず、細かい神経軸索まで観察できていないと考えられるため、最終的な結論は 3 次元的な組織解析を行うまで待たなくてはならないと考えている。

(3) 腔の解析

腔においては、骨形成因子 BMP-4 が末梢神経軸索の伸長を促すこと、また骨においてエストラジオールが BMP-4 の発現上昇を促すことが既に報告されていたので、妊娠による血中エストラジオールの上昇が BMP-4 の発現上昇を介して腔に投射している感覚神経軸索のリモデリングを促すと考えた。しかし、組織解析の結果、腔においても末梢神経軸索の明らかなリモデリングは検出できなかった。現在、末梢神経細胞で特異的に蛍光タンパク質を発現する遺伝子操作マウスを作製中であり、将来的にはこのマウスを用いて、妊娠時の腔において神経軸索リモデリングが起きているのかについての明確な結論を得たいと考えている。

一方、MMPs の遺伝子発現変化を定量的 RT-PCR 法にて検討したところ、乳頭と同様に、出産後に TIMP-1 の発現が顕著に増大することが分かった。また、MMPs の発現を調べたところ、出産前後で発現量が大きく変化する MMP が複数有り、発現が変化するタイミングから 4 つのグループに分類されることがわかった。

(4) 胸腺の解析

胸腺は妊娠 10 日目程度から顕著に退縮した。退縮した胸腺では CD34 陽性の血管密度と PGP9.5 陽性の末梢神経密度の上昇が観察された。これらの変化は血中エストラジオールの上昇によるものだと考えられたため、エストラジオールの投与実験を行った。その結果、エストラジオールの投与による胸腺退縮でも同様の血管と神経軸索の変化が見られた。この時、プロスタノイドの合成が上昇すること、また胸腺前駆細胞の胸腺内での移動が障害されることが分かった。これらの関連性について、現在引き続き解析を行っている。また、これが妊娠時に特有の減少かを検討する目的で、食事制限ストレスモデルを用いて同様の実験を行った。その結果、食事制限ストレスモデルにおいても同様に血管と神経軸索の密度の上昇が観察された。しかし、プロスタノイドの上昇レベルや未分化 T 細胞の揺らぎなどはエストラジオールによるものと異なっていた。したがって、胸腺退縮に伴う血管や神経線維のリモデリングが妊娠による胸腺退縮時と同じ分子メカニズムを用いているものかどうか今後の検討を待つ必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kinoshita-Kawada M, Hasegawa H, Hongu T, Yanagi S, Kanaho Y, Masai I, Mishima T, Chen X, Tsuboi Y, Rao Y, Yuasa-Kawada J, Wu JY.	4. 巻 146
2. 論文標題 A crucial role for Arf6 in the response of commissural axons to Slit.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev172106
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.172106	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 該当する
1. 著者名 Kamao M, Hirota Y, Suhara Y, Tsugawa N, Nakagawa K, Okano T, Hasegawa H.	4. 巻 33
2. 論文標題 Determination of Menadione by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Using Pseudo Multiple Reaction Monitoring.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Anal Sci	6. 最初と最後の頁 863-867
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2116/analsci.33.863.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hirono J, Sanaki H, Kitada K, Sada H, Suzuki A, Lie LK, Segi-Nishida E, Nakagawa K, Hasegawa H.	4. 巻 29
2. 論文標題 Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases and matrix metalloproteinases in the ischemic brain of photothrombosis model mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuroreport	6. 最初と最後の頁 174-180
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/WNR.0000000000000946.	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 -
1. 著者名 Miura Y, Ngo Thai Bich V, Furuya M, Hasegawa H, Takahashi S, Katagiri N, Hongu T, Funakoshi Y, Ohbayashi N, Kanaho Y	4. 巻 7
2. 論文標題 The small G protein Arf6 expressed in keratinocytes by HGF stimulation is a regulator for skin wound healing	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 46649
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/srep46649	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 -

1. 著者名 Minagawa K, Hasegawa H	4. 巻 3
2. 論文標題 Membrane phospholipid signaling for the regulation of cytoskeleton in neurons	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Internal Medicine Review	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18103/imr.v3i2.354	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19件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 長谷川潤
2. 発表標題 生体ストレスが誘導する血管系リモデリング
3. 学会等名 日本薬学会 第139年会 (千葉)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村田裕香, 北條寛典, 佐田晴佳, 井上枝里夏, 中川公恵, 長谷川潤
2. 発表標題 軸索再生に関与するMMPの同定と機能解析
3. 学会等名 日本薬学会 第139年会 (千葉)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北條寛典, 村田裕香, 井上枝里夏, 廣野順介, 中川公恵, 長谷川潤
2. 発表標題 末梢神経再生におけるT細胞機能の解析
3. 学会等名 日本薬学会 第139年会 (千葉)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長田理沙, 北條寛典, 岡本大志, 吉田千秋, 廣野順介, 中川公恵, 長谷川潤
2. 発表標題 妊娠マウスの生殖器に対する内分泌かく乱物質DEHPの毒性評価
3. 学会等名 第68回 日本薬学会近畿支部総会・大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北條寛典, 外園さや, 廣野順介, 瀬木 - 西田恵里, 中川公恵, 長谷川潤
2. 発表標題 妊娠時末梢組織における神経軸索伸長
3. 学会等名 フォーラム2018 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 立石奈恵美, 鈴木篤史, 廣野順介, 正木美有, Laurensius K. Lie, 中川公恵, 長谷川潤
2. 発表標題 フタル酸エステルを投与した妊娠マウスにおける骨形成因子の発現
3. 学会等名 第44回 日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐名木遥佳, Laurensius K. Lie, 廣野順介, 中川公恵, 長谷川潤
2. 発表標題 加齢に伴う胸腺の組織学的・分子生物学的変化
3. 学会等名 フォーラム2017 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 長谷川潤
2. 発表標題 組織の老化に伴う血管新生とその制御
3. 学会等名 ConBio2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 廣野順介, 佐名木遙佳, 北田夏菜, 佐田晴佳, 鈴木篤史, 瀬木 - 西田恵里, 中川公恵, 長谷川潤
2. 発表標題 光血栓性脳梗塞モデルにおけるTimp/MMPファミリーの発現解析
3. 学会等名 ConBio2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Laurensius Kevin Lie, 中川公恵, 須原義智, 長谷川潤
2. 発表標題 ビタミンKによる脂肪細胞分化の制御
3. 学会等名 第67回 日本薬学会近畿支部総会・大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 津川尚子, 栗原晶子, 小笠原帆南, 鎌尾まや, 中川公恵, 長谷川潤, 田中清
2. 発表標題 若年成人女性の Vitamin D 栄養の年間実態把握と栄養改善を目的とした調査
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤原聖美, 西村亮宏, 中川公恵, 岡野登志夫, 須原義智, 長谷川潤
2. 発表標題 Tamoxifen誘導型全身性ビタミンK変換酵素 (UBIAD1) 欠損マウスの表現型解析
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木篤史, 長谷川潤
2. 発表標題 神経突起伸長における細胞膜ダイナミクスによる細胞骨格制御
3. 学会等名 第63回 日本生化学会 近畿支部例会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 鎌尾まや, 山村翔太, 神谷有紀, 長尾真里, 佐方俊介, 岡野登志夫, 長谷川潤
2. 発表標題 ビタミンD受容体欠損マウスの生殖機能不全に及ぼす高カルシウム食の影響
3. 学会等名 日本ビタミン学会 第68回大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 廣野順介, 川口貴美乃, 鈴木篤史, 長谷川潤
2. 発表標題 末梢神経損傷の損傷部位における血管内皮細胞の集積と役割
3. 学会等名 フォーラム2016 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 鎌尾まや, 川本実穂, 倉本舞, 持田七瀬, 中村友紀, 岡野登志夫, 長谷川潤
2. 発表標題 ビタミンD受容体およびビタミンD活性化酵素遺伝子欠損マウスの生殖機能低下に及ぼすカルシウム補充の影響
3. 学会等名 日本薬学会 第137年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中川公恵, 泰井麻由奈, 横田衣利, 原香織, 三宅智子, 澤田夏美, 須原義智, 岡野登志夫, 長谷川潤
2. 発表標題 脳神経特異的ビタミンK2合成酵素UBIAD1欠損マウスの脳機能解析
3. 学会等名 日本薬学会 第137年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小笠原帆南, 栗原晶子, 尾坂郁恵, 小野智子, 鎌尾まや, 中川公恵, 長谷川潤, 田中清, 津川尚子
2. 発表標題 若年成人女性のビタミンD栄養とライフスタイルの年間実態調査
3. 学会等名 日本薬学会 第137年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鈴木篤史, 正木美有, 鎌尾まや, 中川公恵, 瀬木 - 西田恵里, 長谷川潤
2. 発表標題 妊娠期におけるTissue inhibitor of metalloproteinase (Timp)ファミリーの発現
3. 学会等名 日本薬学会 第137年会
4. 発表年 2017年

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