

令和元年5月23日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10853

研究課題名(和文) 神経筋接合部保持が神経機能再生にもたらす効果とその利用法の確立

研究課題名(英文) The effect of Preservation of motor endplate after nerve injury upon regeneration of motor nerve function and the use of this technique

研究代表者

大西 哲朗 (Onishi, Tetsuro)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：70759927

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)：脱神経後の神経筋接合部に対する agrin の作用を調査した。Agrin deficient mouse を用いて agrin 量の減少が脱神経後の神経筋接合部に与える影響について wild type mouse と比較検討した。Agrin deficient mouse において脱神経後の神経筋接合部の変性がより高度であることが認められた。次に agrin と生理食塩水を脱神経後の筋肉に局所投与しその効果の違いについて比較検討した。Agrin の局所投与群で神経筋接合部の変性が軽度であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

成人の神経損傷の場合、神経縫合や神経移植など手術治療を行っても、損傷前の筋力、巧緻性を再獲得する事は困難な事が多い。特に近位部の損傷の場合、支配筋までの距離が長く十分な運動機能回復が見込めない。神経損傷後の機能回復に影響を与える因子の一つに損傷部と支配筋の距離が長く、再生軸索が筋を再支配するまでの間に神経筋接合部の退行変性などにより、再生軸索が到達しても機能回復できないためである。この神経筋接合部の退行変性を防ぐことができれば、神経機能回復の成績を向上させることができる可能性がある。本研究が示した agrin による神経筋接合部保持は意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：The effect of agrin on the neuromuscular junction after denervation was investigated.

We examined the effect of agrin decline on the neuromuscular junction after denervation between agrin deficient mouse and wild type mouse. Degeneration of the neuromuscular junction after denervation was found to be more severe in Agrin deficient mice. Next, agrin and saline were locally administered to the denervated muscles, and the differences in their effects were compared and studied. Deterioration of the neuromuscular junction was shown to be mild in the Agrin topical administration group.

研究分野：末梢神経

キーワード：神経筋接合部 アグリン

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

1. 研究開始当初の背景

末梢神経は損傷を受けると24-48時間以内に損傷部の遠位においてWallerian変性による軸索の崩壊が起こり、再生軸索伸長に適した組織環境創成が起こる。一方損傷部近位においては近位断端より軸索の再生が始まる。神経損傷に対する手術治療としては断端部に緊張のない端々縫合を基本とし、縫合部に緊張のかかる場合は神経移植を行い神経機能の回復を待つ。動物実験においては、神経損傷後、再生軸索が伸長し支配筋に到達、運動機能が良好に回復すると報告されている。しかし、成人の神経損傷の場合、損傷前の筋力、巧緻性を再獲得する事は困難な事が多い。特に近位部の損傷の場合、支配筋までの距離が長く十分な運動機能回復が見込めないため、神経移行や腱移行によって運動機能を再建する事となる。さらに腕神経叢損傷などの近位部の広範な損傷の場合、神経移行や腱移行の選択肢も限られ、予後不良である。神経損傷後の機能回復に影響を与える因子としては受傷後の時間経過、年齢、受傷形態、支配筋からの距離、受傷部軟部組織損傷、血管損傷などがある。これらの因子に対し、再生軸索による筋の再支配を高める解剖学的再建に基づく手術的治療、神経移植、神経移行の技術改良がなされてきたがその治療成績の向上は頭打ちになりつつある。それはどんなに優れた手術治療を施行しても再生軸索の伸長速度は一日1mm程度で変わらず、その再生軸索が筋を再支配するまでの間に神経筋接合部の退行変性、筋の萎縮線維化が起き、たとえ再生軸索が到達しても十分な機能回復がなされないことが原因の一つとされている。この状況を克服するため、神経損傷、修復に関係した分子生物学的なアプローチの研究が盛んに行われており、それには神経伸長を促すものと脱神経後の神経筋接合部を保持するものがある。神経伸長を促すものとして代表的なものには神経成長因子があり神経成長促進、維持、神経損傷後の神経細胞の生存に関与し軸索伸長を促す効果が確認されている。一方で脱神経後の神経筋接合部の保持については、MMP-3 knock out mouseを用いた研究で神経筋接合部でのAgrinの分解を抑制する事で脱神経後の神経筋接合部の保持、神経縫合後の運動機能回復の改善が示されている。また、Agrinの産生が野生型の半分程度のAgrin deficient mouseを用いた我々の研究でも、Agrin deficient mouse群で脱神経後の神経筋接合部の退行消失が野生型と比べて顕著(図1)で、Agrinが神経筋接合部の保持に重要な役割を果たしている事が確認された。脱神経後にAgrin投与し神経筋接合部保持することで神経機能回復が促進されるとすれば、末梢神経神経機能再建において福音となる。

2. 研究の目的

脱神経筋部への外部からのAgrin投与により、脱神経筋の神経筋接合部保持効果が示され、運動機能回復が優れているかを調査する。

3. 研究の方法

Agrin deficient mouseとwild type mouseの脱神経後の神経筋接合部の状態を評価し、Agrin欠乏が神経筋接合部に与える影響を詳細に評価した。Agrin deficient mouseとwild type mouseの脱神経後の比較を行った。評価項目は前脛骨筋の筋湿重量を測定後、HE染色にてmuscle cross sectional areaを計測、免疫染色にてアセチルコリンレセプター(AChR) band部のAChR pixel density, AChR area, AChRの形態評価を行った。phosphorylated MuSK, AChR alpha1 subunitの蛋白レベルをWestern blot法にて評価した。

脱神経筋にAgrinを持続的に投与するためにAgrin deficient mouse坐骨神経切断モデルにmini-osmotic pumpとcatheterを移植したmouseモデルを作成した。mini-osmotic pumpにはそれぞれAgrinと生理食塩水を注入し2群とする。Agrinポンプモデル、生理食塩水ポンプモデルを作成し術後4週、8週、12週で比較し評価を行った。評価項目は足底筋、下腿三頭筋の筋湿重量を測定後、HE染色にてmuscle cross sectional areaを計測、免疫染色にてAChR band部のAChR pixel density, AChR area, AChRの形態評価を行った。Agrin投与後のphosphorylated MuSK, rapsyn, AChR alpha1 subunitの蛋白レベルをWestern blot法にて評価した。

4. 研究成果

Agrin deficient mouseとwild type mouseの脱神経後の変化では前脛骨筋の筋湿重量は脱神経後8週の時点でAgrin deficient mouseの方が有意に小さくなった。(図1)

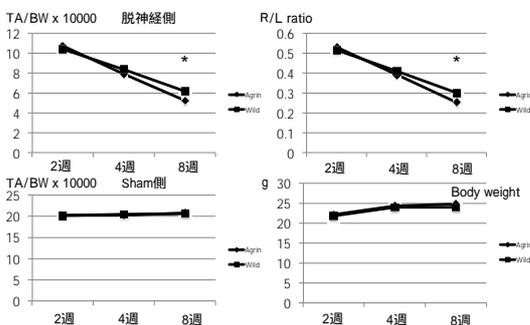


図1 筋湿重量(前脛骨筋)
左上: 脱神経側、左下: Sham側、右上: 右/左の重量、右下: 体重

t test * P < 0.05 Error bar : SE

筋横断面積に関しても脱神経後8週の時点でAgrin deficient mouseが小さくなった。

下腿三頭筋の phosphorylated MuSK 術後 2 週と 4 週の時点で、脱神経側において agrin deficient mouse の方が有意に少ない結果となった。
 AChR subunit alpha1 は術後 8 週の時点で脱神経側において Agrin deficient mouse の方が有意に少ない結果となった。(図 2)

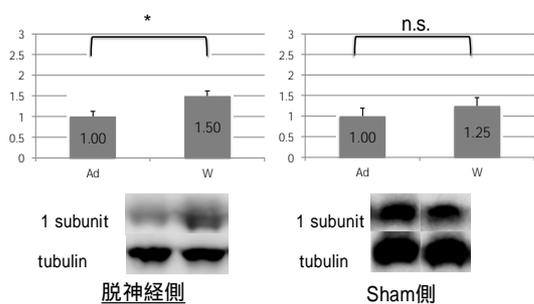


図2 AChR subunit alpha1 (脱神経後8週間)
 Ad : agrin deficient, W : wild t test * P < 0.05 Error bar : SE n = 6

AChR を免疫染色し形態学的評価を行なった。
 AChR pixel density や AChR area は Sham 側では両群間に差は認めなかったが、脱神経側では agrin deficient mouse の方が AChR pixel density、AChR area 共に有意に低くなっていた。(図 3,4)

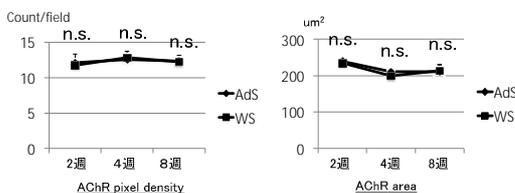


図3 神経筋接 部 Sham側
 AdS: agrin deficient sham, WS: wild sham
 t-test * : P < 0.05

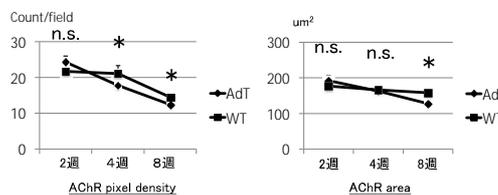


図4 神経筋接 部 脱神経側
 AdT: agrin deficient transect, WT: wild transect
 t-test * : P < 0.05

AChR の形態評価においても agrin deficient mouse の方がより変性の進んだ plaque type が多い結果となった。(図 5)

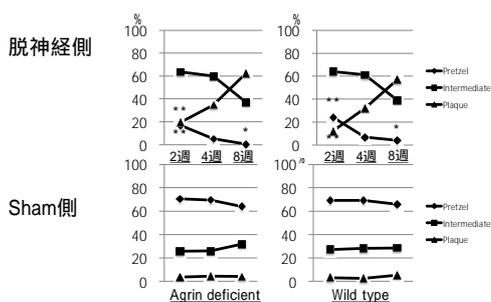


図5 神経筋接合部の形態
 Chi square test * : p < 0.05, ** p < 0.01

これらのことより、agrin 欠乏により脱神経後に神経筋接合部の変性がより高度に起こることが示された。

Agrin deficient mouse の脱神経モデルに osmotic pump を移植し agrin と生理食塩水を投与する群に分けて比較評価を行なった。

AChR の形態学的評価では、AChR pixel density と AChR area が術後 8 週で agrin pump 群が有意に高くなった。(図 6)

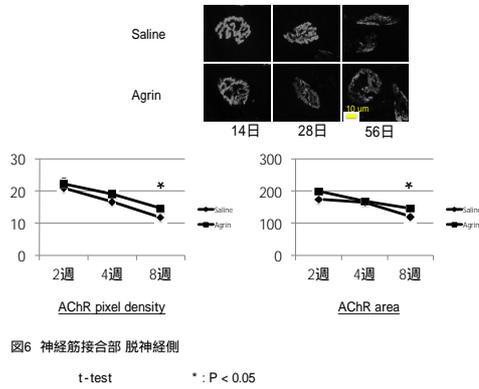
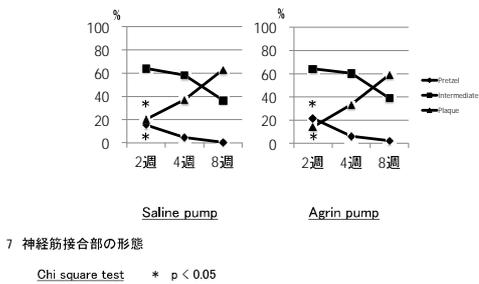
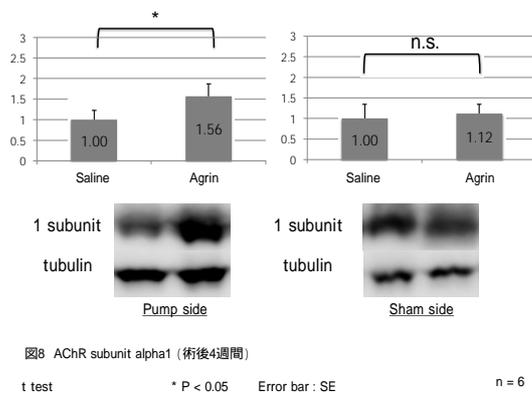


図6 神経筋接合部 脱神経側
AChR の形態においても術後 2 週の時点で agrin を投与した群の方がより変性の進んだ plaque type が少ない結果となった。(図 7)



7 神経筋接合部の形態
AChR subunit alpha1 は術後 4 週の時点で agrin pump の群で有意に高値を示した。術後 2 週、8 週では有意差を認めなかった。(図 8)



phosphorylated MuSK 術後 2 週、 4 週、 8 週の時点で二群間に有意差を認めなかった。

これらの結果より、 agrin の局所投与で、脱神経後の神経筋接合部変性を遅らせることができる可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

Winnie A. Palispis, Henry Hoang, Jennifer jong, Justin P. Chan, Tetsuro Onishi, Ranjan Gupta, Local Delivery of Supplemental Agrin at the Time of Injury Prevents Motor Endoplate Degeneration, ORS 2018 annual meeting, 2018/3/10-13

大西哲朗、栗本秀、平田仁、Ranjan Gupta, Agrin 欠乏と神経筋接合部変性促進、第 28 回 末梢神経学会、2017 年 8 月 25-26 日

大西哲朗、栗本秀、平田仁、Ranjan Gupta, Agrin の不足により神経損傷後の神経筋接合部の変性が助長される、第 59 回日本手外科学会、2016 年 4 月 21-22 日

〔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)研究分担者

研究分担者氏名：建部 将広

ローマ字氏名：TATEBE Masahiro

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：医学系研究科

職名：寄附講座准教授

研究者番号(8桁)：60420379

研究分担者氏名：栗本 秀

ローマ字氏名：KURIMOTO Shigeru

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：医学系研究科

職名：特任講師

研究者番号(8桁)：70597856

研究分担者氏名：平田 仁

ローマ字氏名：HIRATA Hitoshi

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：予防早期医療創成センター

職名：教授

研究者番号(8桁)：80173243

研究分担者氏名：山本 美知郎

ローマ字氏名：YAMAMOTO Michiro

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：医学系研究科

職名：特任講師

研究者番号(8桁)：90528829

研究分担者氏名：岩月 克之

ローマ字氏名：IWATSUKI Katsuyuki

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：医学部附属病院

職名：講師

研究者番号(8桁)：90635567

(2)研究協力者

なし

研究協力者氏名：

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。