

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10926

研究課題名(和文) 脊髄損傷後の軸索再生におけるGAP-43の機能解明と新規脊髄保護療法の開発

研究課題名(英文) Function of GAP-43 for axon regeneration after spinal cord injury

研究代表者

渡邊 慶 (Watanabe, Kei)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：40597671

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)：神経の成長円錐膜画分にて高頻度に認められたMicrotubule-associated protein 1B (MAP1B)のリン酸化部位(S25, S1201)に対する特異抗体を使用し、軸索伸長との関連について解析した。MAP1Bリン酸化は、マウス胎仔大脳皮質初代培養細胞にて軸索でより高いレベルを示し、胎仔脳の切片にて軸索が豊富にある構造に特異的に認められた。マウス坐骨神経圧挫モデルで、損傷部でpS25-MAP1BとpS1201-MAP1Bの検出レベル上昇を認めた。また、離断損傷後縫合モデルで、縫合遠位側にもpS1201-MAP1Bの検出レベル上昇を認め、軸索伸長と再生への関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、成長円錐のリン酸化プロテオミクス解析の結果を足掛かりとして、未解明であったMAP1Bリン酸化部位に対する特異抗体を使用して染色性を検討した。今後、本手法をモデルケースとして、さらなる軸索再生の病態解析の進歩が期待できる。

さらにMAP1Bをターゲットとして、脊髄損傷モデルを用いた再生軸索の評価を行い、脱リン酸化酵素を阻害するなどMAP1Bリン酸化レベルを高める介入の検証を行うことで、難治性の脊髄損傷に対する新たな分子生物学的評価法や治療戦略の確立の足がかりとなる。

研究成果の概要(英文)：Relationship between extending axons in developing and regenerating neurons and microtubule-associated protein 1B (MAP1B) as the most frequently phosphorylated protein presented in the growth cone was investigated. We produced phospho-specific antibodies against phosphorylated serines at positions 25 and 1201 of MAP1B that specifically recognize growing axons both in cultured neurons and in vivo in various regions of the embryonic brain. Following sciatic nerve injury, transected and sutured nerves revealed that regenerating axons were specifically recognized by these antibodies. These results suggest that these MAP1B phosphorylation sites are specifically involved in axon growth and that phospho-specific antibodies against MAP 1B are useful markers of growing/regenerating axons.

研究分野：整形外科学分野

キーワード：成長円錐 軸索再生 リン酸化プロテオミクス 神経成長タンパク MAP1B

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

損傷された神経軸索再生のマーカーとして、マウス GAP-43 の新規リン酸化部位として確認された 96 番目セリン (Ser96)、172 番目スレオニン (Thr172) があり、当初リン酸化 Ser96 に対する抗 pS96-GAP-43 抗体を用いた神経軸索再生評価を予定していた。しかし、ヒト GAP-43 では Thr172 のみが Thr181 として保存されており、リン酸化 Thr172 (pT172) の機能解析を優先することとして、GAP-43 のリン酸化に関わる相互作用分子として、脱リン酸化酵素の同定を試みたがその同定に至らなかった。従ってターゲットタンパクを成長円錐部膜画分にて高頻度に認められた Microtubule-associated protein 1B (MAP1B) のリン酸化に注目し、軸索再生時の発現過程の変化を評価の容易なマウス坐骨神経損傷モデルを用いて解析を行うこととなった。

2. 研究の目的

神経軸索の伸長・再生時には、先端に成長円錐と呼ばれる運動性に富んだ構造体が形成され、軸索伸長過程において不可欠な役割を果たす。成長円錐機能の分子機構の解明は、神経回路の形成・再編を理解するために必須である。この成長円錐に着目し、発達期ラット脳由来の成長円錐膜画分の質量分析 (リン酸化プロテオミクス解析) を施行し、成長円錐部膜各分にて高頻度に認められた MAP1B のリン酸化に注目した (Kawasaki et al., iScience 4:190 ['18])。

表 1 成長円錐に豊富に認められたリン酸化部位

Gene name	Phosphorylation site	Frequency	Kinase group
<i>Gap43</i>	S96	542	Proline-Directed
<i>Ncam1</i>	S784	503	Basic
<i>Marcks11</i>	S22	354	Proline-Directed
<i>Mtap1b</i>	S1493	350	Proline-Directed
<i>Stmn1</i>	S25	337	Proline-Directed
<i>Stmn2</i>	S62	287	Proline-Directed
<i>Mtap1b</i>	S1304	280	Proline-Directed
<i>Stmn1</i>	S38	265	Proline-Directed
<i>Gap43</i>	T172	245	Proline-Directed
<i>Mtap1b</i>	S25	204	Proline-Directed
<i>Mapt</i>	T542	176	Proline-Directed
<i>Marcks</i>	S27	171	Proline-Directed
<i>Rras2</i>	S186	162	Proline-Directed
<i>Mtap1b</i>	S1435	148	Proline-Directed
<i>Mtap1b</i>	S1201	110	Proline-Directed

MAP1B とは、微小管重合を安定化する分子として知られ、そのリン酸化が軸索伸長・再生と関連すると報告されてきた。しかし過去の報告は、S1256、T1261 が主であり、S25 および S1201 のリン酸化 (pS25、pS1201) については未解明であった。

本研究では、MAP1B の S25 と S1201 リン酸化と軸索伸長・再生との関連について解析することを目的とした。

3. 研究の方法

まずリン酸化 S25 および S1201 に対する特異抗体をそれぞれ作成した。これらの抗体を用いて発生期のマウス脳を免疫染色したところ、GAP-43 のリン酸化特異抗体と同様に伸長する軸索を選択的に認識することが証明された。またこれらの抗体に対するリン酸化の脳発達に伴う量的変化についても、発生初期から次第に増加し、軸索成長期の終了後に遞減することが見いだされた。さらに軸索再生過程との関連を検証するため、C57BL/6N 野生型マウスで下記 3 種類の坐骨神経損傷モデルを作成した。

- (1) 圧挫損傷モデル：両側坐骨神経を露出し、右坐骨神経を攝子にて挟み、圧挫損傷を加えた。左は露出のみとした。
- (2) 離断損傷モデル：両側坐骨神経を露出し、右坐骨神経を切離した。左は露出のみとした。
- (3) 離断損傷後縫合モデル：両側坐骨神経を露出し、両坐骨神経を切離した。右のみ 10-0 ナイロン糸で神経周膜を縫合して修復した。左は切離のみとした。

損傷後、一定期間飼育、灌流固定後に神経採取し、長軸切片を作成、組織学的評価を行い(図 1)、リン酸化抗体と軸索再生マーカーとして既報の抗 STMN2 (SCG10) 抗体と比較した。

4. 研究成果

(1) 圧挫損傷モデル

圧挫後 6 時間と 2 日で比較を行うと、pS25-MAP1B と pS1201-MAP1B の検出レベル上昇を認めた。これらは SCG10 の発現と同様の変化を認めた(図 2)。

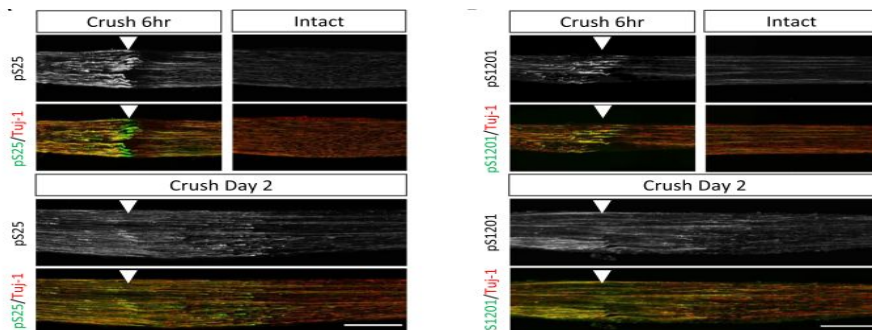


図 1:免疫蛍光染色(pS25-, pS1201-MAP1B 抗体) マウス坐骨神経縦断切片

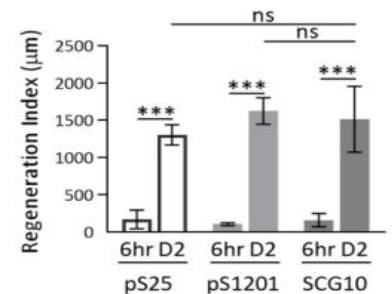


図 2: 各抗体における Regeneration Index

(2) 離断損傷モデル

離断後 1 日と 3 日で比較を行うと、離断近位側でのみ pS25-MAP1B と pS1201-MAP1B のリン酸化レベル上昇を認めた(図 3,4)。遠位側については、対照(左側)と比べ、いずれも上昇を認めなかった。これらは SCG10 と同様の变化を認めた(図 5)。

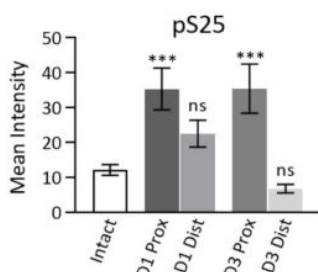


図 3:離断損傷モデル pS25-MAP1B 検出レベル

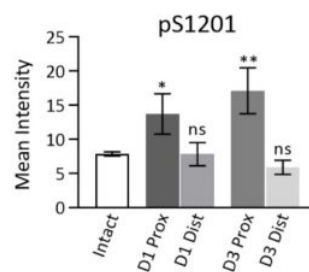


図 4:離断損傷モデル pS1201-MAP1B 検出レベル

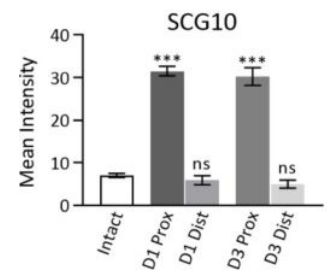


図 5:離断損傷モデル SCG10 検出レベル

(3) 離断損傷後縫合モデル

離断損傷修復後 5 日で比較を行うと、縫合遠位側にも pS25-MAP1B と pS1201-MAP1B のリン酸化レベル上昇を認めた。これらは SCG10 と同様の变化を認めた(図 6)。

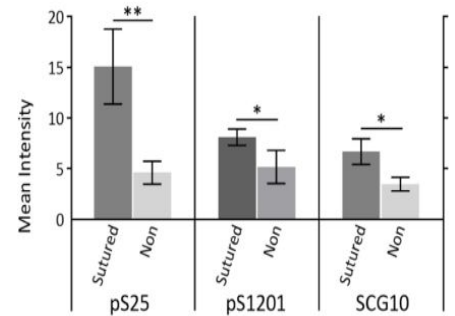


図 6: 離断損傷後縫合モデル各抗体での検出レベル

今回、成長円錐のリン酸化プロテオミクス解析の結果を足掛かりとして、未解明であった MAP1B リン酸化部位に対する特異抗体を使用し、染色性を検討した。再生時の神経軸索にて S25, S1201 のリン酸化レベルが高く、軸索伸長と再生への関与が示唆された。

坐骨神経損傷モデルの染色パターンは、再生中の神経のマーカーとされる SCG10 と同様であり、本研究のリン酸化抗体の再生軸索マーカーとしての有用性が示された。また、神経離断損傷モデルにて、損傷近位側ではリン酸化が上昇したが、遠位側では変化に乏しく、変性過程よりも再生過程でリン酸化が関与すると考えられた。さらに、神経離断後に縫合した神経で、遠位側でもリン酸化が検出されるようになり、再生過程との関与が更に裏付けられた。

今後の展望として、評価がより難しいマウス脊髄損傷モデルを用いた再生軸索の評価が必要となる。また、神経損傷において脱リン酸化酵素を阻害するなど、MAP1B リン酸化レベルを高める介入実験から、神経再生を促せるか検証してゆく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ishikawa Yuya, Okada Masayasu, Honda Atsuko, Ito Yasuyuki, Tamada Atsushi, Endo Naoto, Igarashi Michihiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Phosphorylation sites of microtubule-associated protein 1B (MAP 1B) are involved in axon growth and regeneration	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 93-93
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13041-019-0510-z	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 Igarashi Michihiro, Kawasaki Asami, Ishikawa Yuya, Honda Atsuko, Okada Masayasu, Okuda Shujiro	4. 巻 339
2. 論文標題 Phosphoproteomic and bioinformatic methods for analyzing signaling in vertebrate axon growth and regeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neuroscience Methods	6. 最初と最後の頁 108723 ~ 108723
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jneumeth.2020.108723	査読の有無 無
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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 石川裕也、渡邊慶、岡田正康、遠藤直人、五十嵐道弘
2. 発表標題 MAP1BのS25・S1201リン酸化が末梢神経の再生過程に関与する
3. 学会等名 第60回新潟生化学懇話会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 石川裕也、本多敦子、伊藤泰行、河野麻実、玉田篤史、遠藤直人、五十嵐道弘
2. 発表標題 発生脳におけるMAP1Bの高頻度リン酸化部位
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会、第62回日本神経化学大会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 石川裕也、渡邊慶、岡田正康、遠藤直人、五十嵐道弘
2. 発表標題 末梢神経再生におけるMAP1B新規リン酸化部位の解析
3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Ishikawa Y, Okada M, Honda A, Ito Y, Tamada A, Endo N, Igarashi M
2. 発表標題 The MAP1B phosphorylation sites specifically localized in the developing brain and in the regenerating peripheral nerves
3. 学会等名 Neuroscience 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020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
研究分担者	五十嵐 道弘 (Igarashi Michihiro) (50193173)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	
連携研究者	竹内 恒成 (Takeuchi Tsunenari) (90206946)	愛知医科大学・医歯学系・教授 (33920)	
連携研究者	岡田 正康 (Okada Masayasu) (00626492)	新潟大学・医歯学系・助教 (13101)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携 研究者	大橋 正幸 (Ohashi Masayuki) (70706720)	新潟大学・医歯学系・助教 (13101)	