

令和 4 年 6 月 12 日現在

機関番号：33501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K10764

研究課題名（和文）末梢神経における動的構造部位に関連する運動障害の研究

研究課題名（英文）Research of movement disorders related to dynamic structural sites in peripheral nerves

研究代表者

齊藤 百合花（Saitoh, Yurika）

帝京科学大学・医学教育センター・講師

研究者番号：00530099

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：末梢神経にのみ存在するシュミット・ランターマン切痕（切痕）に蛋白複合体として局在する接着分子CADM4、膜骨格蛋白4.1G、MPP6、足場蛋白Lin7について本研究を行った結果、4.1GがCADM4およびMPP6を結合して切痕に運搬し、MPP6がLin7を結合して運搬しており、4.1G欠損ではMPP6欠損よりも加齢による構造異常や運動負荷による運動障害も誘導することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究に用いた欠損マウスの末梢神経は、現在も完治する治療法が見つかっていない難治性疾患であるシャルコー・マリー・トゥース病の病変に一部似た病変を呈することが分かっている。この疾患は薬物治療が難しく、リハビリテーション治療が主に行われている。本研究結果においてリハビリテーション治療の運動負荷を行うことによる運動障害が見られたことは、運動負荷が本当に治療として適切かどうかの議論の参考となるものであり、今後の治療方針にも関わる結果であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：As a result of conducting this study on the adhesion molecule CADM4, membrane skeleton protein 4.1G, MPP6, and scaffold protein Lin7 localized as a protein complex in the Schmidt-Lanterman incisure (SLI) existing only in the peripheral nerve, 4.1G bound and transported CADM4 and MPP6 to the SLI, and MPP6 bound and transported Lin7. 4.1G deficiency induces stronger structural abnormalities due to aging and motor disorders due to exercise than MPP6 deficiency.

研究分野：解剖組織学

キーワード：末梢神経 シュワン細胞 蛋白複合体 シュミット・ランターマン切痕 髄鞘

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳からの指令を電気伝導する末梢神経は、四肢の筋肉に向けて線維状に配置しているが、筋伸縮に伴って神経線維自身も常に伸び縮みをしている。中でも代表的な太い神経線維は伝導速度を上げるために、絶縁効果を持つミエリンという神経突起を取り囲むシュワン細胞の細胞膜が何重にも巻かれた構造をもつ。その末梢神経のミエリン内には、円錐台状のシュミット・ランターマン切痕（以下、切痕）という中枢神経にはない特殊な構造体が複数存在する。私は、この切痕の運動に伴うダイナミックな動的形態変化に着目して研究を行ってきた。標的を瞬時に冷却する生体内凍結技法を用いた結果、伸展した末梢神経線維は形態が数珠状に変形し、切痕が数珠の起点となる部位に位置しながらバネのように伸びることを明らかにした。さらにこの切痕がなぜ末梢神経にのみ構築されるかについても、構成する新規の蛋白を明らかにしてきた。

2. 研究の目的

本研究では、この動的に変化する切痕の形態に基づく末梢神経の構造と末梢神経の障害との相関性を明らかにして、ヒトのリハビリテーションにおける適正な運動療法を考案する。

3. 研究の方法

欠損マウスにおいて、末梢神経の分子生物学的解析、形態学的解析およびマウスの運動学的解析を下記の検討に用いて研究を行う

切痕の構成蛋白の複合体形成様式の検討

(i)加齢での変化

正常マウスの成長（1・3・7日齢、2・4・8週齢、6・12カ月齢）に伴う切痕の円錐台の高さの変化、切痕の出現頻度、円錐台の向きに着目して時間的な構造変化を明らかにする。

(ii)構成蛋白の欠損に関する検討としては、これまでに明らかにした切痕を形成する複合体蛋白を欠損するマウスを用いて、それらの微細構造変化に及ぼす影響を解明した上で、(i)にある加齢に伴う変化も検討する。

切痕の構造と運動時の伸縮における影響の検討

切痕の構造変化をもたらず要因としてに挙げた加齢や構成蛋白の関与が第一に考えられるが、切痕が構造変化を起こした際に実際の個体レベルの運動機能にどのような影響が出るか、また運動負荷後に末梢神経線維にどのような影響が出るかを(i)伸展時の神経線維の形態変化と(ii)尾懸垂試験での下肢の保持能力との相関性に焦点を当てて検討を行う。

(i)伸展時の神経線維変化の検討として、の結果を参考に切痕の構造に違いが出る時期の正常もしくは構成蛋白欠損マウスの坐骨神経を露出して伸展させ、神経線維の形状変化を観察する。この試料作製のためには、これまで開発してきた生体内凍結技法を用いて比較する。また外傷の際に起こる末梢神経の過伸展状態を想定して、過剰に伸展させた神経線維の形態に起こる現象も、この凍結方法を用いて検討する。

(ii)尾懸垂試験での下肢の保持能力の個体レベル変化の検討として、の結果を参考にしながら、切痕の構造に違いがでる時期の実験マウスを用いて行う。この検討ではまず、4.1G欠損マウスで運動負荷によって筋肉保持力が低下したタイミングでの形態変化を調べ、それらの相関性を明らかにする。正常マウスにおいては、加齢による尾懸垂試験での下肢の保持能力への影響と、運動負荷後の神経線維を(i)伸展させた神経線維変化を見ることによって、運動に伴う神経への負荷による影響という観点から解析を行い、四肢の動作を考慮してリハビリテーションを意識した適正な加療法を合わせて考察する。

末梢神経傷害後の神経再生時の切痕の関わりについての検討

実際の末梢神経傷害の動物モデルとして、麻酔した正常マウスの坐骨神経を剖出して(i)クリップで一定時間挟むことで損傷部位を作製し、神経線維と共にミエリンの再生段階において切痕がどのような役割を担うか、あるいは、どのような蛋白が活性化されるかを含めて、リン酸化の時に反応する抗体による免疫染色や生化学的手法で検討する。また(i)の傷害モデルに加えて、(ii)末梢神経の一部断裂状態を坐骨神経の過伸展によって起こし、切痕を含むミエリンさらに神経線維への形態や機能の影響を検討する。

(i)クリップによる坐骨神経損傷・再生時の切痕の役割と活性化因子の検討として、実験動物モデルを確立し、該当期間で検討を行う。その際の損傷部位の神経線維とミエリンの再生について、再生期間中の切痕の形・数・大きさを主体に経時的な構造変化を明らかにする。また同時に Src のリン酸化部位の変化や、Src によってさらにリン酸化される蛋白やシグナルカスケードについても探索して、それらの局在や活性化を確認する。

(ii)神経の過伸展によって起こる切痕への形態や機能の影響の検討として、生体内凍結技法を用いて、過伸展の強度を変えることによって切痕の形態変化や神経傷害の程度に及ぼす影響を確認し、切痕の機能を明らかにする。これまでの研究過程で、末梢神経を過伸展させた際には、神経線維の断裂が切痕部から起こると思われる形態像を得ていることから、前述の Src 蛋白のリン酸化による活性化のみならず、構造的にも切痕から傷害時の再生に関わるシグナルが発生する可能性を考えている。そこでこの過伸展モデルを、定量性をもつように方法を確立し、(i)と同様に経時的な構造や機能の変化を明らかにする。

4. 研究成果

運動時に筋肉へ電気信号を伝える末梢神経にのみ存在するシュミット・ランターマン切痕(以下、切痕)を主体にミエリンの顕微鏡で認める構造変化と実際の運動障害の関連性を明らかにするために、当該年度は切痕の構成蛋白の複合体形成に関する検討を行った。末梢神経疾患のシャルコー・マリー・トゥース病の病理所見に類似する所見をすでに報告している膜骨格蛋白 4.1G の欠損マウスに加え、4.1G 複合体の一つであるシグナル蛋白 MPP6 の欠損マウスも検討に用いた。その結果、4.1G 欠損マウスでは切痕で 4.1G と蛋白複合体を形成している接着蛋白 CADM4、MPP6、シグナル蛋白 Lin7 が欠損することで病理所見を示すが、MPP6 欠損マウスでは蛋白複合体のうち Lin7 のみが欠損していた。そして、MPP6 欠損マウスの病理所見は 4.1G 欠損マウスよりも穏やかな所見にとどまり、髄鞘が正常よりもやや過形成であることを明らかにした。以上より、切痕の構成蛋白である 4.1G は複合体のうち CADM4 および MPP6 を運搬し、MPP6 が Lin7 を運搬することが示唆された。また、4.1G 欠損マウスでは、加齢マウスへの運動負荷により運動障害が悪化するが、病理所見の穏やかであった MPP6 欠損マウスでも同様に運動障害がみられるものの軽症である傾向であった。

予定していた計画の方法の検討中に、MPP6 欠損マウスでは、MPP6 が大脳や小脳でも発現していたことから、運動障害に関しては中枢神経系の関与を否めず、末梢神経だけの判断は困難であったため、中枢神経系における MPP6 の局在や役割について検討を行うこととなった。その結果、中枢神経系において MPP6 は MPP ファミリー蛋白である MPP1 や MPP2、MPP ファミリーの属する membrane-associated guanylate kinases (MAGUK) ファミリーの CASK と蛋白複合体を形成し、主にシナプス後部に局在することが明らかとなった。また、末梢神経とは異なり、MPP6 欠損においても、これらの蛋白複合体に影響はなかったが、MPP6 欠損のシナプスでは、シナプス間隙やシナプス後肥厚部のわずかな縮小が認められた。さらに、MPP6 欠損マウスでは不安行動試験である高架十字迷路試験において、壁のない通路の散策行動が見られる個体があり、不安行動に関与している可能性があったため、期間終了後も検討を続けている。

また、中枢神経系の関与に関わる検討に時間がかかったため、の末梢神経傷害による神経再生については検討が終了せず、期間終了後も検討を続けている。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Nobuo Terada, Yurika Saitoh, Akio Kamijo, Junji Yamauchi, Nobuhiko Ohno, Takeharu Sakamoto	4. 巻 1190
2. 論文標題 Structures and Molecular Composition of Schmidt-Lanterman Incisures	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Adv Exp Med Biol	6. 最初と最後の頁 181-198
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-981-32-9636-7_12	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 Saitoh Yurika, Kamijo Akio, Yamauchi Junji, Sakamoto Takeharu, Terada Nobuo	4. 巻 151
2. 論文標題 The membrane palmitoylated protein, MPP6, is involved in myelin formation in the mouse peripheral nervous system	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Histochemistry and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 385 ~ 394
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00418-018-1745-y	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 齊藤百合花、坂本毅治、寺田信生
2. 発表標題 マウス末梢神経における膜骨格蛋白複合体4.1G-MPP6-Lin7-CADM4機能の検討
3. 学会等名 日本組織細胞化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齊藤百合花、上條明生、山内淳司、坂本毅治、寺田信生
2. 発表標題 マウス末梢神経の髄鞘形成への膜骨格蛋白複合体がもたらす役割
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齊藤百合花、上條明生、寺田信生
2. 発表標題 マウス末梢神経における膜骨格蛋白複合体の役割
3. 学会等名 日本ミエリン研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 齊藤百合花、上條明生、鈴木龍雄、坂本毅治、寺田信生
2. 発表標題 マウス大脳における膜骨格蛋白Membrane palmitoylated protein 6 (MPP6)の検討
3. 学会等名 日本解剖学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 齊藤百合花、寺田信生
2. 発表標題 マウス末梢神経における膜骨格4.1G結合シグナル蛋白Membrane protein palmitoylated-6 (MPP6) 機能の検討
3. 学会等名 日本組織細胞化学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>帝京科学大学 教員詳細 齊藤百合花 https://www.ntu.ac.jp/research/kyoin/igaku/saito_y.html</p>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------