

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19500337

研究課題名(和文) 神経細胞死制御・軸索再生促進因子の発現調節及び作用機構に関する研究

研究課題名(英文) Mechanisms of gene regulation and action of neuroprotective factors

研究代表者

三五 一憲 (SANGO KAZUNORI)

財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・副参事研究員

研究者番号：50291943

研究成果の概要 成熟動物末梢神経の培養系を用いて、損傷後の神経細胞死制御・軸索再生に与する因子の発現調節機構や作用機構を解析した。

1) 毛様体神経栄養因子(CNTF)は、培養ニューロンの生存や神経突起伸長を有意に促進するとともに、転写因子 STAT3、ERK、Akt の各リン酸化を誘導した。これらの因子を介したシグナル伝達経路の活性化が、CNTF の作用機構に与するものと考えられた。

2) グリア細胞株由来神経栄養因子(GDNF)による軸索再生促進のメカニズムに、新規の神経活性化因子・ガレクチン-1 の発現誘導が与することを明らかにした。

交付

	金 単 位 円		
	直接経費	接経費	合 計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総 計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野 神経細胞生物学 末梢神経、網膜、病態生理学

科研費の分科・細目 神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード 毛様体神経栄養因子(CNTF)、ガレクチン-1(GAL-1)、神経成長因子(NGF)、グリア細胞株由来神経栄養因子(GDNF)、後根神経節(DRG)ニューロン、シュワン細胞

研究(始当初の背景)

近年、幹細胞を用いた再生医療への期待がまる一方で、神経再生機構の解明が後回しにされてきたきらいがある。損傷後の軸索再生過程に与する内在性因子の機能的意義を明らかにするとともに、それらの活性化や不活性化を介して軸索再生を促し、機能再建をはかろうとする試みも重要である。特に成熟動物 DRG ニューロンやシュワン細胞の培養系は、軸索再生過程に与する因子の発現調節・作用機構を解明する上で極めて有用な解

析系である。

研究の目的

成熟ラット DRG ニューロンやシュワン細胞の培養系を用いて、CNTF ならびに GAL-1 の発現調節機構や細胞死制御・軸索再生促進機構を解明する。

(1) 発現調節機構 in vivo ならびに in vitro における CNTF や GAL-1 の発現分布に着目して、その発現調節メカニズムを詳らかにする。

- (2) 細胞死制御・軸索再生促進機構 CNTF やGAL-1の作用メカニズム、特にシグナル伝達系やその下流にある標的遺伝子等を明らかにする。

研究の方法

- (1) *in vivo* ならびに *in vitro* における CNTF や GAL-1 の発現を、RT-PCR、*In situ* hybridization、Western blotting、免疫組織化学等の手法を用いて検討する。
- (2) DRG ニューロンの培 系に栄 因子・サイトカイン等を投与し、細胞生存や神経突起伸長に対する効果を比較する。培 ニューロンにおけるシグナル伝達系の活性化 諸種転写因子のリン酸化や核内移行 の有無を、Western blotting や免疫組織化学等により検討する。さらにシグナル伝達系 害薬を投与した の、栄 因子・サイトカイン等の効果の減弱・消失の有無を確認する。

研究成果

- (1) CNTF の発現調節に する研究 *in vivo* DRG 組織切片 では従来の報告と同様、CNTF の発現はシュワン細胞に 局していた。これに対し分散培 系では、単 されたDRGニューロンの細胞体ならびに神経突起に CNTF の発現がみられたが、シュワン細胞には発現がみられなかった。一方マトリゲル内で器官培 された DRG では、CNTF の発現がシュワン細胞にほぼ 局しており、ニューロンでの発現はみられなかった。以上のことから、ニューロンにおける CNTF の発現は、培 自体ではなく細胞 の相互作用 特に軸索とシュワン細胞との接触 が断たれることにより誘導されるものと考えられた (Sango et al, Histochem Cell Biol, 2007) 。末梢ニューロンでの CNTF の発現に する最初の報告であり、その意義については更なる検討が必要である。また *in vivo* においても、脱 に伴い CNTF の発現パターンが変化する可能性が示唆され、今後は多発性硬化症や Charcot-Marie-Tooth 病のような脱 性疾患での検討を進めたい。
- (2) CNTF による神経細胞死制御・軸索再生促進のメカニズムに する研究 培 液中に投与したリコンビナント CNTF は、DRG ニューロンの生存や神経突起伸長を有意に促進した。これに対し NGF や GDNF も神経突起伸長を促進したが、生存維持効果はみられなかった。CNTF 投与 5-30分後に DRG ニューロンにおける転写因子 STAT3、ERK、Akt の各リン酸化誘導がみられた。また JAK 害薬 AG490、STAT3 害薬 STA21、PI3K 害薬

LY294002 をそれぞれ付加することにより、CNTF の生存・突起伸長促進効果は減弱→消失した。これに対し MEK 害薬 PD98059 を付加した場合、生存に変化はみられなかったが突起伸長は低下した。以上より、CNTF による細胞死制御には JAK-STAT3 及び PI3K-Akt のシグナル伝達系の 与が、軸索伸長促進には上記に加え MEK-ERK 系の 与が示唆された 表 1 。 (Sango et al, Histochem Cell Biol, 2008)

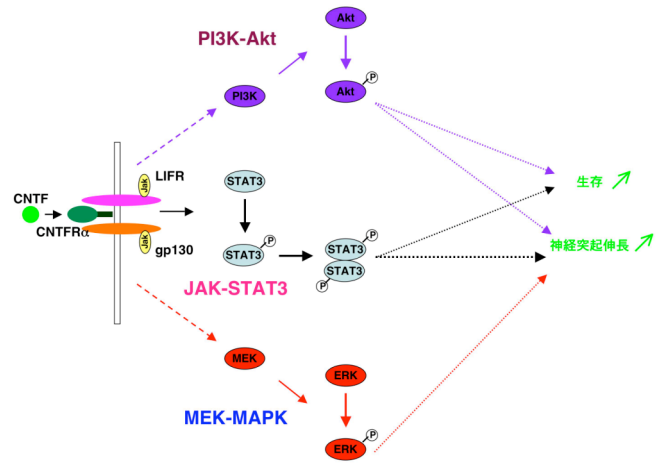


表1. シグナル伝達系を介したCNTFの作用機構

成熟 DRG ニューロンを用いて CNTF の作用機構を解析した初めての報告であり、各経路 でのクロストークの可能性や、各経路を介して誘導される標的遺伝子・タンパクを明らかにすべく、さらに解析を進めている。

- (3) GDNF による軸索再生促進・GAL-1 の発現誘導のメカニズムに する研究 成熟フラット DRG の組織切片を用いた免疫二重染色により、GAL-1 が GDNF 依存性小径ニューロン(GDNF 受容体を発現し、isolectin B4 に結合)に強く発現していることが明らかとなった。また培 液中に投与したリコンビナント GDNF は、DRG ニューロンの神経突起伸長を有意に促進するとともに、ニューロンにおける GAL-1 の発現を誘導した。NGF も神経突起伸長を促進したが、GAL-1 の発現誘導効果はなかった。以上より、GDNF によって発現誘導された GAL-1 が軸索再生促進機構に 与する可能性が示唆された。(Sango et al, in preparation)
- 幼弱期の DRG ニューロンにおける生存や GAL-1 の発現は、NGF に依存することが報告されている。これに対し成熟期では、GDNF が GAL-1 の発現誘導に 与していることが明らかとなった。GAL-1 は細胞外に放出された後、一部が酸化型に構造

変換して軸索再生促進作用を獲得することが示唆されており、今後の研究により GAL-1 の作用機構の全貌を詳らかにしたい。

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

[誌論文] 計 9 件

- ① 三五一憲. 培系を用いた、糖尿病性神経害の病態解明へのアプローチ. 糖尿病合併症, 印刷中 (査読無)
- ② 三五一憲. 糖尿病性神経害の成因論の新しい展(. Diabetes Frontier, 20:46-50, 2009 (査読無)
- ③ Sango K., Yanagisawa H., Kato K., Kato N., Hirooka H., Watabe, K. Differential effects of high glucose and methylglyoxal on viability and polyol metabolism in immortalized adult mouse Schwann cells. Open Diabetes J, 1: 1-11, 2008 査読有
- ④ Teng X, Sango K, Kawano H, et al. (8人中5番目および8番目) Regeneration of nigrostriatal dopaminergic axons after transplantation of olfactory ensheathing cells and fibroblasts prevents fibrotic scar formation in the lesion site. J Neurosci Res, 86: 3140-3150, 2008 査読有
- ⑤ Ibi M, Sango K, Yabe-Nishimura, C, et al. (13人中8番目) Reactive oxygen species derived from NOX1/NADPH oxidase enhance inflammatory pain. J Neurosci, 28: 9486-9494, 2008 査読有
- ⑥ Sango K, Yanagisawa H, Komuta Y, Si Y, Kawano H. Neuroprotective properties of ciliary neurotrophic factor for cultured adult rat dorsal root ganglion neurons. Histochem Cell Biol, 140: 669-679, 2008 査読有
- ⑦ Sango K, Yamanaka S, Ajiki K, Arai N, Takano M. Involvement of retinal neurons and pigment epithelial cells in a murine model of Sandhoff disease. Ophthalmic Res, 40: 241-248, 2008 査読有
- ⑧ Li H-P, Homma A, Sango K, Kawamura H, Raisman G, Kawano H. Regeneration of nigrostriatal dopaminergic axons by degradation of chondroitin sulfate is accompanied by elimination of the fibrotic scar and glia limitans in the lesion site. J Neurosci Res, 85:536-547, 2007 査読有
- ⑨ Sango K, Yanagisawa H, Takaku S. Expression and histochemical localization of ciliary neurotrophic factor (CNTF) mRNA/protein in cultured adult rat dorsal root ganglion neurons. Histochem Cell Biol, 128: 35-43, 2007 査読有

[学会発表] 計 14 件

- ① 三五一憲, 柳澤比呂子, 小牟田縁, 堀江秀典, 門屋利彦. 成熟ラット後根神経節ニューロンにおける Galectin-1 ならびに Galectin-3 の発現と機能. 第 19 回日本病態生理学会大会, 2009 年 1 月 25 日, 所沢
- ② Sango K, Yanagisawa H, Watabe K. Differential effects of high glucose and methylglyoxal on viability and polyol metabolism in immortalized adult mouse Schwann cells. Society for Neuroscience 38th Annual Meeting, 2009 年 1 月 25 日, Washington D.C. (USA)
- ③ 三五一憲. 培系を用いた、糖尿病性神経害の病態解明へのアプローチ. 第 23 回日本糖尿病合併症学会 (Young Investigator Award 受賞講演), 2008 年 10 月 3 日, 東京
- ④ 三五一憲, 柳澤比呂子, 渡部和彦. グルコースならびに糖化物負荷に伴うシュワン細胞株 IMS32 の動態変化. 第 19 回日本末梢神経学会学術会, 2008 年 9 月 5 日, 名古屋
- ⑤ Sango K, Yanagisawa H, Komuta Y, Kawano H. CNTF is a potent neurotrophic cytokine for adult rat DRG neurons. Neuroscience 2008 第 31 回日本神経科学大会, 2008 年 7 月 9 日, 東京
- ⑥ 三五一憲, 柳澤比呂子, 渡部和彦. 神経害モデルとしてのシュワン細胞株 IMS32 グルコース負荷と糖化物負荷の相違点. 第 51 回日本糖尿病学会年次学術会, 2008 年 5 月 22 日, 東京
- ⑦ 三五一憲, 柳澤比呂子, 小牟田縁, 川野仁. CNTF による末梢神経細胞死制御・軸索再生促進の分子機構. 第 49 回日本神経学会総会, 2008 年 5 月 16 日, 横浜
- ⑧ Sango K. Action mechanisms of neurotrophic cytokines on cultured adult rat dorsal root ganglion neurons. 第 85 回日本生理学会大会企画シンポジウム (Organizer: Sango K, Watabe K.), 2008 年 3 月 27 日, 東京
- ⑨ 三五一憲, 柳澤比呂子. CNTF による後根神経節ニューロンの細胞死制御・神経突起伸長機構. 第 18 回日本病態生理学会大会, 2008 年 1 月 26 日, 神戸
- ⑩ Sango K, Yanagisawa H, Si Y, Kawano H. CNTF promotes survival and neurite outgrowth of cultured adult rat dorsal root ganglion neurons. Society for Neuroscience 37th Annual Meeting, 2007 年 11 月 7 日, San Diego (USA)
- ⑪ 三五一憲, 柳澤比呂子, 渡部和彦. グルコース負荷 IMS32 細胞におけるポリオール代謝亢進と反応性アルデヒドの発現上昇, 2007 年 10 月 26 日, つくば

- ⑫ Sango K, Yanagisawa H. Molecular mechanisms for the neurotrophic actions of CNTF on cultured adult rat dorsal root ganglion neurons. Neuro2007 第30回日本神経科学大会, 2007年9月11日, 横浜
- ⑬ 三五一憲, 柳澤比呂子. 培後根神経節ニューロンを用いた、毛様体神経栄養因子の作用機構解析. 第18回末梢神経学会学術会, 2007年8月25日, 弘前
- ⑭ 三五一憲, 柳澤比呂子, 渡部和彦. グルコースならびに糖化物負荷 IMS32 細胞における酸化ストレスマーカーの発現誘導. 第50回日本糖尿病学会年次学術会, 2007年5月26日, 仙台

[図書] 計 1 件

- ① Sango K. 分担執筆 Research Signpost, Kerala, India. Chondroitin sulfate proteoglycan in the peripheral nervous system after injury. In: Neural proteoglycans (Nobuaki Maeda: ed.), pp 229-238, 2008 執筆分 10 、全体 281

[その他]

東京都神経科学総合研究所ホームページ

- ① 三五一憲. 成熟動物脊後根神経節 (DRG) ニューロンの分散培養法とその応用 <http://tmin.ac.jp/research/dept/20/20.html>
- ② 三五一憲. 日本糖尿病合併症学会賞 Young Investigator Award を受賞して http://tmin.ac.jp/fukyu/news/2008/230/230-to-pics_3.html
- ③ 三五一憲. 培 シュワン細胞を用いた、糖尿病性神経害の病態解明と治療法(発へむけてのアプローチ http://tmin.ac.jp/fukyu/news/2008/228/228-research_2.html

研究組織

(1) 研究代表者

三五一憲 (SANGO KAZUNORI)

財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・副参事研究員

研究者番号 50291943

(2) 研究分担者

川野 仁 (KAWANO HITOSHI)

財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・副参事研究員

研究者番号 20161341

柳澤 比呂子 (YANAGISAWA HIROKO)

財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・研究員

研究者番号 60416659