

平成 21 年 5 月 30 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19791514
 研究課題名（和文） Wnt シグナル伝達系を介する細胞間接着分子カドヘリンの制御機構の
 解明
 研究課題名（英文） Clarification of regulatory mechanism of Cadherin, cell adhesion
 molecule through Wnt-signaling transmission
 研究代表者
 村田 真穂（MURATA MAHO）
 神戸大学・医学部附属病院・医員
 研究者番号：00444604

研究成果の概要：マウスの正常坐骨神経において αE - αN -カテニン、 β -カテニン、OB-カドヘリンの反応は、無髄および有髄神経のシュワン細胞と軸索の細胞質内にび漫性に認められた。軸索-シュワン細胞間接着は弱くかつダイナミックなものであること、さらに接着以外の機能を担っていることが推察された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,800,000	210,000	2,010,000

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：外科系歯学

キーワード：①細胞・組織②シグナル伝達③蛋白質

1. 研究開始当初の背景

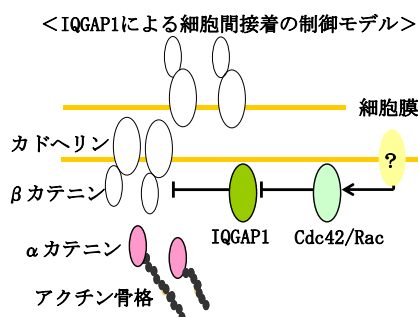
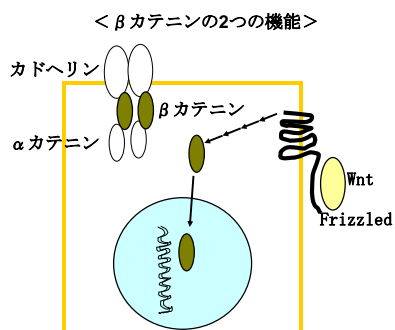
細胞間接着は、個体発生における形態形成のみならず神経回路網形成、創傷治癒、炎症、癌など多くの生理的・病理的現象に関与しており、その分子機構を解明することは医学・生物学上きわめて重要である。

その中でもカドヘリンは、 Ca^{2+} 依存性の接着分子であり、さらに細胞質内で結合する蛋白質として α カテニン、 β カテニン、 γ カテニン（プラコグラビン）が同定されている。国内外では様々な研究がすすめられ、近年、細胞接着分子によるシグナル伝達が細胞運

動・増殖・接着シグナル伝達系のクロストークに関与することが明らかとなりつつある。

一方、細胞外分泌蛋白質である Wnt は、現在脊椎動物において約 20 種類の分子が同定され、そのシグナルは細胞の増殖・分化の制御を行なうとされている。上皮系においては、Wnt シグナルにより β カテニンが接着部位から核内に移行し、転写調節因子として機能することがわかっている。また、低分子量 GTP 結合蛋白質である Rho ファミリー（Rac、Cdc42、Rho）は、細胞外シグナルの下流で情報伝達を担い、標的蛋白質である IQGAP1 を介して

カドヘリンを介した細胞接着を制御していると報告された。最近、 α カテニンも、細胞質内で相互作用を示す蛋白質が核内でも発見されたことから、シグナル伝達への関与が示唆されている。



軸索損傷後、その中枢側より萌芽した成長円錐は様々なガイダンスに応じてその走行を選択し、正しく標的器官へと軸索を伸長して神経を再生するが、この正確な軸索ガイダンスの機構の1つとして軸索とその周囲の細胞とのカドヘリンによる細胞接着が知られており、我々はこれまでにカドヘリンやカテニンが末梢神経再生過程の突起伸長や神経束形成に関与することを、超微形態学的な観察により明らかにしてきた。

(1) 坐骨神経におけるカドヘリンとカテニンの局在について

N/R カドヘリンは、ニワトリの正常神経の軸索-シュワン細胞の両者の細胞膜に、さらに再生軸索の細胞膜に局在した (Neuroscience 1995, Anat Embryol 2001)。 β カテニンは、ラットとマウスにおいてその発現が確認できた。 α カテニンについては、そのサブタイプである α Nカテニンが、ニワトリの正常無髄神経の軸索と再生軸索の細胞質内全体にび慢性に局在した (J

Neurocytol 1996)。 α Eカテニンはラットの正常無髄神経と有髄神経のシュワン細胞にび慢性に局在し、再生神経では光顕レベルで損傷部位に一致した反応の増強が認められ、何らかの役割を果たしていることがうかがえた。

⇒以上より動物種は異なるものの、末梢無髄神経の軸索-シュワン細胞間では、N/Rカドヘリンはホモフィリックに接着部位に集積しているが、細胞質では α E/ α Nカテニンの発現はヘテロであり、これらカテニンは接着部位に集積しておらず、軸索-シュワン細胞間接着は弱くかつダイナミックなものであること、さらに接着以外の機能を担っていることが推察された (Kobe J Med Sci 2006)。

(2) 坐骨神経の親細胞におけるカドヘリンとカテニンの局在について

ニワトリの腰椎レベルにおいて、N/Rカドヘリンは脊髄神経節の神経細胞体の細胞膜に、 α E/ α Nカテニンは後根神経節細胞の細胞体全体に局在したが、前角神経細胞には α Eカテニンのみが局在した (Kobe J Med Sci 2003, Kobe J Med Sci 2005)。⇒この結果から、 α カテニンの棲み分けにより神経線維が遠心性か求心性かを識別できることが示唆された。

2. 研究の目的

日常の臨床において、外傷や観血的手術手技により、運動性または知覚性麻痺に苦しむ症例をしばしば経験する。その際の末梢神経再生過程において、カドヘリンファミリーがどの部位にあるいはどの過程において重要な役割を担っているか、また細胞間接着の結果、再生過程の神経線維において何が起こるのかという詳しい機構については未だ解明されていない。

今回の研究計画では、動物実験における坐骨神経結紮損傷モデルを用い、正常・再生神経の各段階における接着分子（カドヘリンファミリー）の超微形態学的局在をさらに明らかにするとともに、そこにシグナル分子（Wnt・Rhoファミリー・IQGAP1）がどのように関連するのかについて解明することを目的とした。

3. 研究の方法

正常・再生過程の末梢神経において、カドヘリンファミリーや Wnt 受容体、Rho ファミリー、IQGAP1 が発現するのか否かについては、ウェスタンブロッティングと光顕での観察によって調べた。さらに、発現している蛋白質については、末梢神経の正常時および再生過程の各段階とも関連付けながら、免疫電顕の手法により観察を行った。

【動物】

動物は 1 次抗体に適合する小動物（主にラット、マウス、ウサギ等）を選択した。飼育は神戸大学医学部附属動物実験施設にて行う。

【ウェスタンブロッティング】

未処置のマウスを屠殺し、採取した神経片をウェスタンブロッティングにて蛋白質の発現の有無を確認した。まず組織をホモジネートし、SDS-PAGE にて展開、PVDF 膜に転写した。免疫抗体反応後、化学発光検出試薬にて可視化し確認する。

【組織採取】

ペントバルビタールナトリウム（ネンブタール[®]）の腹腔内投与による全身麻酔後にシリンジポンプを用いた経心的な灌流固定を行った。通常は生理食塩水またはリン酸緩衝液を灌流後、パラフォルムアルデヒド溶液を用いた灌流固定を行った。固定後、大腿部を切開し坐骨神経を剖出する。実体顕微鏡下で坐骨神経を取り出し、神経片を採取する。

【切片の作製】

神経片は速やかに 4°C 約 4 時間の浸漬固定後、段階的に高濃度のショ糖溶液に浸漬し、凍結組織包埋剤（OCT コンパウンド）に包埋後、ドライアイス・アセトンにて急速凍結し、クリオスタットにて 8 μm の切片を作製する。

【免疫染色】

主に間接酵素抗体法にて行った。
*1 次抗体: Wnt 受容体 LRP・Frizzled(1~9)・Ror-2、Rac・Cdc42・IGAP1 を標的として選択。
β カテニン: C 末端を認識 β-CAT-7D8 モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体。
α E カテニン: ポリクローナル抗体 (sc1495)。
*2 次抗体: HRP 標識のものを使用した場合は、DAB 水溶液にて発色する。1.4nm の金粒子標識のものを使用した場合は、銀にて増感する。

【光学顕微鏡による観察】

染色の有無やその局在を観察する。

【電顕試料作製】

オスミウム酸による後固定を行い、脱水後 Epon812 で包埋し、ダイヤモンドナイフにて超薄切片を作製する。HRP 標識の場合は電子染色を行わず、金粒子標識の場合は鉛染色のみ行う。

【電顕による観察】

透過型電顕 (H7100) にて電子染色を行わなかった場合は電圧を低めに、電子染色を行った場合は通常の電圧 (100kV) に設定の上、超微形態の観察を行う。

再生末梢神経については、正常神経と同様に実験を行うが、神経片採取前に結紮による損傷を行い、損傷後の再生神経の経時的な変化を観察する。

ペントバルビタールナトリウム（ネンブタール[®]）の腹腔内投与による全身麻酔下に、大腿部を切開し、坐骨神経を剖出する。これを 2-0 絹糸にて 24 時間結紮し、解放後 2 日目、5 日目、7 日目に灌流固定を行う。ウェスタンブロッティング、免疫染色、光顕および電顕による観察は正常神経に準じる。

<坐骨神経 結紮損傷モデル>

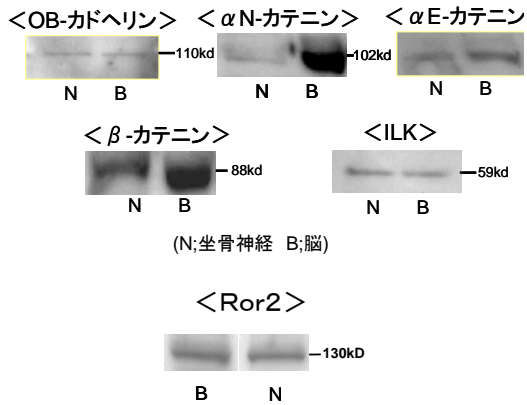


4. 研究成果

まず、マウス坐骨神経における軸索-シュワン細胞の細胞間接着様式を明らかにすることを目的に、α E カテニン、α N カテニン、β カテニン、OB-カドヘリン、M-カドヘリン、K-カドヘリン、Integrin linked kinase (ILK)、Ror-2 の発現の有無、および超微形態学的な局在の観察を行った。

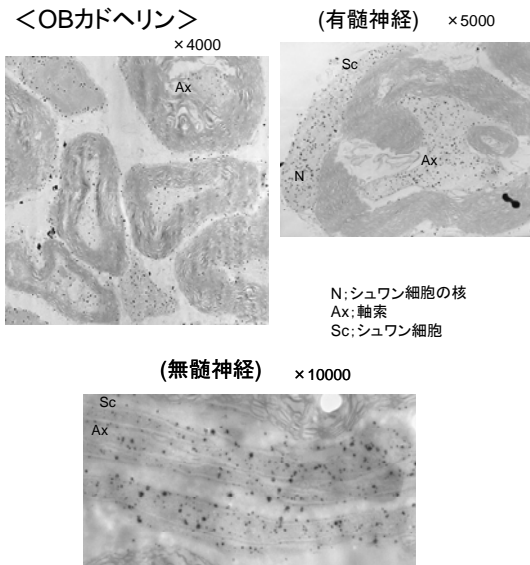
正常坐骨神経を用いて、ウェスタンブロット法により上記タンパクの発現があること

を確認した。

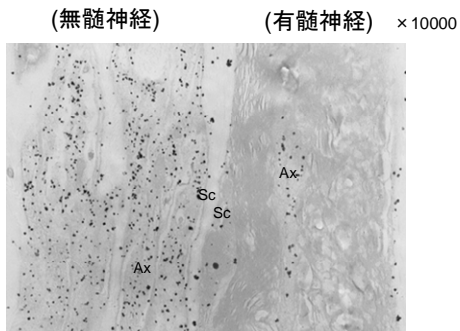


(N:坐骨神経 B;脳)

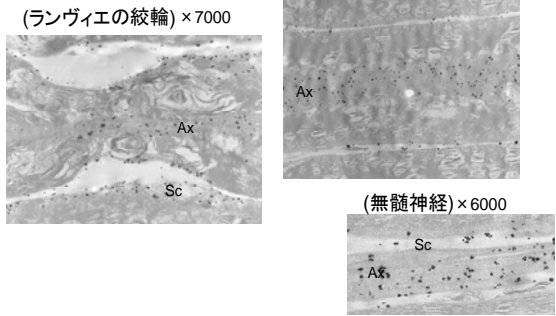
次に、間接酵素抗体法による免疫電顕の結果、αE-カテニン、αN-カテニン、β-カテニン、OB-カドヘリンの免疫反応は、無髄および有髄神経のシュワン細胞と軸索の細胞質内に認められた。これらは細胞膜の裏打ちに限局しておらず、細胞質内全体にび漫性に認められた。



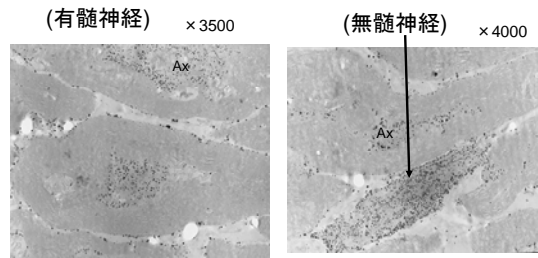
<αN-カテニン>



<αE-カテニン>

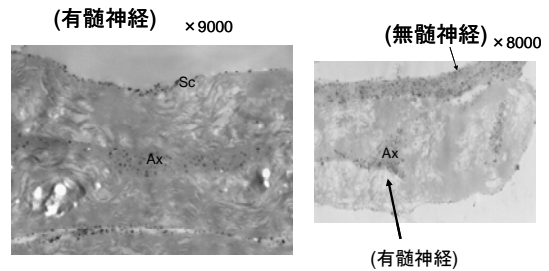


<β-カテニン>



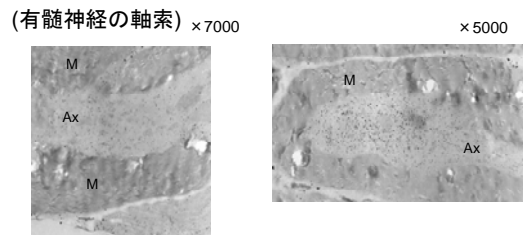
この結果を考察するために、ILK についても免疫電顕にて観察を行ったところ、同様に、無髄および有髄神経のシュワン細胞と軸索の細胞質内に認められた。

<ILK>

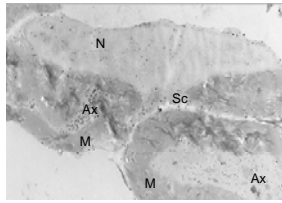


Ror2 の免疫反応は、無髄および有髄神経のシュワン細胞と軸索の細胞質内に認められた。これらは細胞膜の裏打ちに限局しておらず、細胞質内全体にび漫性に認められた。

<Ror2>

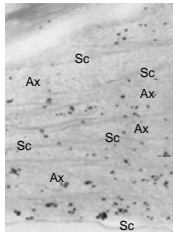


(有髄神経のシュワン細胞) ×10000



N:シュワン細胞の核 Ax:軸索
Sc:シュワン細胞 M:髄鞘

(無髄神経) ×9000



マウス坐骨神経には複数のカドヘリンが存在していたが、強固な細胞間接着力を発揮する場合にカドヘリン・カテニン複合体は細胞膜の裏打ち部分に濃縮すると考えられ、今回の細胞質内全体に一樣に拡散する発現様式は、軸索同士あるいは軸索-シュワン細胞間の接着が弱く、またはダイナミックな接着様式である可能性を示唆した。また、細胞質内に拡散したカドヘリンやカテニンは、シグナル伝達など細胞接着以外の機能に参与しているとも考えられた。ILK は膜の裏打ちに限局するカテニンを拡散した分布へ変えると言われており、その発現は今回のカテニンの局在と関連する可能性が示唆された。

また、末梢神経における Ror2 の発現が確認されたが、Ror2 の細胞内ドメインを認識する抗体では細胞質内全体に一樣に拡散する発現様式を認め、Ror2 の細胞質内における役割を考えるうえで興味深い所見と思われた。

現在、結紮損傷を加えた神経組織でのβカテニンのタンパク量の時間的変化を検討するためにウエスタンブロットを用いた実験を継続中である。またカテニンの細胞質内でのび慢性の発現に関わっていると考えられる Wnt、Rho ファミリー、IQGAP1 等の抗体を用いて、免疫反応を観察していく予定である。

5. 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)

[雑誌論文] (計 1 件)

①Takeuchi J, Shibuya Y, Murata M, Komori T. Expression of beta-catenin and integrin-linked kinase in the mouse sciatic nerve. Kobe J Med Sci. 54. 217-226. 2009.

[学会発表] (計 2 件)

①竹内純一郎, 渋谷恭之, 小林正樹, 池端伯子, 田中慎亮, 村田真穂, 鈴木泰明, 古森孝英. マウス坐骨神経におけるカドヘリン・カテニン・ILKの局在について. 第62回日本口腔科学会総会. 2008. 4. 17-18. 福岡市.

②竹内純一郎, 渋谷恭之, 小林正樹, 池端伯子, 村田真穂, 鈴木泰明, 古森孝英. マウス坐骨神経におけるRor2 の超微細構造的局在. 第63回日本口腔科学会総会. 2008. 4. 16-17. 福岡市.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 真穂 (MURATA MAHO)

神戸大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：00444604

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者