

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03395

研究課題名(和文) 損傷神経再生における脂質リモデリングと脂質シグナリングの役割の解明

研究課題名(英文) Roles of lipid signaling and remodeling in nerve injury

研究代表者

木山 博資 (Kiyama, Hiroshi)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：00192021

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者らは損傷運動神経再生の分子メカニズムの解明にむけ、独自の研究を行っている。運動神経損傷により発現する遺伝子の探索で当初オルファン受容体として得られたGPR34は脂質受容体であり、神経障害性疼痛に関与することが明らかになった。さらに、損傷神経が再生あるいは変性する過程で、細胞内のオルガネラや周辺のグリアがダイナミックに変動し、これには細胞膜内の脂質リモデリングや脂質による細胞間情報伝達が重要であることが明らかになった。脂質リモデリングや脂質を介する情報伝達は神経損傷後の適切な軸索再生や生存のための適切なグリア活動に関わることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

運動神経軸索障害は著しい運動障害だけでなく、神経障害性疼痛など難治性の疼痛の原因となる。損傷神経の修復による運動機能の修復や神経障害性疼痛からの開放に至る研究は、QOLの観点から重要な課題である。本研究では損傷修復の修復過程に脂質のリモデリングや脂質を介する神経・グリア細胞間情報伝達が重要であることを明らかにした。損傷神経修復過程のコレステロールやリン脂質の局在変化やグリアにおける脂質受容体を介する応答は、今後の治療の標的となりうることを動物を用いた基礎研究で明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We have been examining molecular mechanisms underlying neuronal degeneration and regeneration after nerve injury. In our gene screening we have identified several molecules associated with lipid dynamics. Our previous GPCR screening revealed several orphan receptors were expressed by glial cells in response to nerve injury. Recently those orphan GPCRs were deorphanized and found that some of them were associated with intercellular lipid signaling. In this study we have examined the functional significances of phosphatidylserine receptor GPR34, and found the GPR34 mediated signal is associated with neuropathic pain.

Nerve injury induced characteristic changes of membrane of injured neurons. The remodeling of lipid composition would be necessary for axon regeneration. Furthermore, lipid remodeling in glial cells was found to be critical for the changes of microglial morphology. We also found that the lipid mediated signaling is critical in phagocytosis by microglia and astrocyte.

研究分野：神経解剖学

キーワード：軸索再生 脂質 神経変性 神経再生

1. 研究開始当初の背景

末梢神経の損傷は著しい運動障害だけでなく、神経障害性疼痛など難治性の疼痛の原因となる。損傷神経の修復による運動機能の修復や神経障害性疼痛からの開放に至る研究は、QOLの観点から出口研究につながることが待たれる重要な課題である。しかし、その本質的な変性や再生の分子メカニズムについては、一分子の動きで説明できるものではなく、多元的ないわば損傷神経再生のバイオロジーといえる領域の理解が必要である。研究代表者らは、損傷神経の温存再生へ向けてそのメカニズムの全貌を解明し、損傷神経再生のバイオロジー領域を確立したいと考えている。そのため、神経損傷が引き起こす現象を分子レベルから個体レベルで解明しようと考え基礎研究を積み上げている。最初に一連の研究をするための動物モデル(舌下神経損傷モデル)を確立し、それを用いて神経損傷後の運動神経に発現する分子探索から始まった。得られた分子の機能解析には遺伝子改変動物を用いて明らかにした。研究代表者らが2008年に行った損傷神経再生関連遺伝子探索(Gamo, *J Neurosci* 2008)の中で、特にG蛋白共役型受容体(GPCR)の探索を行った時に、多くの損傷神経核で発現誘導されるGPCRが得られたが、その中にはオルファン受容体(リガンドが不明のもの)が多数あった。最近これらがデオルファニイズ(リガンドが解明)され、それらの中には脂肪酸やリゾリン脂質などの脂質受容体が複数存在することが明らかになった。また研究代表者らの他のスクリーニングでも、コレステロールを引き抜くABCA1トランスポーターや脂肪酸の不飽和化酵素SCD1などが得られており、これらを総合すると、損傷をうけた神経細胞では膜の脂肪酸の性質が変化していることが予想された。また、アシル基1本からなるリゾリン脂質は細胞膜を通過しやすい性質があり、この性質を利用して細胞膜のリン脂質局在を変えると、再生に関与するミクログリアの形態が劇変することも発見した(Tokizane, *Glia* 2017)。

2. 研究の目的

上述の背景から、脂質リモデリングはオルガネラだけではなく、損傷後の軸索伸展の促進や損傷神経細胞と周辺グリア細胞の形態と機能に直接作用することが強く予想された。例えば、ABCA1によるコレステロールの引き抜きは膜を柔らかくし流動性を増す。また、膜のラフトの量や局在を変化させることが考えられる。同様に脂肪酸の不飽和化は膜の流動性を上げる。これら一連の膜の性質の変化は細胞の形態変化、特に軸索の伸展には有利になると予想される。一方、リン脂質の脂質二重膜内局在については、フォスファチジルセリン(PS)やフォスファチジルイノシトール(PI)、フォスファチジルエタノールアミン(PE)は細胞内に、フォスファチジルコリン(PC)は細胞外に多く局在している。しかしアポトーシス等が生じるとPSが膜の外に移動し、これがeat me シグナルとなりミクログリアやマクロファージ等による貪食の引き金となる。神経損傷は、オルガネラ間でのリン脂質の移動や細胞膜内局在を変化させていると考えられる。そこで、本研究では脂質リモデリングに必要な、コレステロールの局在制御、リン脂質組成の変化などに焦点をあて、損傷神経の再生・変性過程に脂質リモデリングがどのように変動し機能するかを明らかにする。

本研究のもう一つの目的は、上述の膜のリモデリングなどにより産生される可能性のある脂肪酸やリゾリン脂質が、受容体を介して細胞間のシグナリングに関与する可能性の解明である。特に損傷神経細胞からは脂肪酸やリゾリン脂質がメディエーターとなって周辺のグリア細胞や神経細胞自身に機能する可能性がある。上述のGPCR遺伝子スクリーニングで得られた、脂肪酸やリゾリン脂質の受容体のGPCRは多くが損傷神経細胞周辺に存在するミクログリアやシュワン細胞に発現している。そこで、これらの脂質メディエーターによるニューロン・グリア連関についての解析もめざす。これらにより、神経再生における脂質リモデリングとそこから生じる新たな脂質メディエーターの役割を解明する。

3. 研究の方法

マウス舌下神経損傷モデル、あるいはマウス坐骨神経損傷モデルを用い解析した。解析には各種遺伝子改変動物を用いた。特にコンディショナルノックアウトには研究代表者らが作成したAtf3:BAC Tgマウス(Kiryu-Seo et al, *Sci Rep* 2016)をCreドライバーマウスとして用いた。研究に必要な遺伝子組み換え研究や実験動物の取り扱いについては名古屋大学の機関承認を得て、適切に行った。

4. 研究成果

(1) リゾフォスファチジルセリン受容体 GPR34 の機能解析

GPR34 は G 蛋白共役型受容体(GPCR)に属する細胞膜上に存在する受容体である。最近、リゾリン脂質の中でもリゾフォスファチジルセリンが GPR34 のリガンドであることが明らかになった。研究代表者らは遺伝子スクリーニングにより GPR34 が脳内でミクログリア特異的に発現していることを同定し、神経障害により発現量が激増することを見出した。この脂質受容体の神経損傷における機能について同定するために、坐骨神経部分切断(L4切断)による神経障害性疼痛モデルを用いて、疼痛行動における GPR34 の機能について検討した。GPR34 のノックアウトマウスを用いた実験では、神経損傷後に観察される脊髄後角でのミクログリアの増加やその活性化型の形態には変化が見られなかった。しかし、脊髄後角での炎症性サイトカイン(TNFalpha, IL-1beta, IL-6)の遺伝子発現は低下していた。さらに von Frey テストにより疼痛行動を解析したところ、GPR34 ノックアウトマウスでは疼痛閾値の低下がみられた。以上のことから GPR34 を介したシグナルはミクログリアの増殖や形態変化には影響を及ぼさないが、炎症応答には関係しており、疼痛を惹起するシグナルと考えられた。次に野生型マウスの疼痛モデルを用いて、GPR34 のアンタゴニストを髄腔内に投与したところ、部分的に疼痛を抑制できることが示された。以上の結果から考察すると、神経損傷により生じるリゾフォスファチジスセリンはミクログリアの GPR34 に作動して炎症性応答を増強し神経障害性疼痛を増悪していると考えられた(Sayo et al, *J Neuroinflammation* 2019)。

(2) 神経損傷時にミクログリア・神経細胞に発現する脂質関連分子の機能解析

脂質受容体としても知られる TREM2/DAP12 複合体の健常脳における機能について、本研究の一部の成果を踏まえて総説を発表した(Konishi & Kiyama, *Neurochem Int* 2020)。ミクログリアをはじめとした神経系細胞の形態変化を誘導する因子として、フォスファチジルセリンの局在による Cdc42 の局所へのリクルートが重要であることを研究代表者らは以前報告した(Tokizane et al, *Glia* 2017)。また、この Cdc42 と機能的に相同で神経細胞に発現する TC10 が損傷後の運動神経が再生する際に強く発現誘導され、膜の形態変化(神経突起形成)に関わることも報告した(Tanabe et al, *J Neurosci* 2000)。本年は TC10 コンディショナルノックアウトマウスなどの遺伝子改変動物が揃ったことから、TC10 が損傷神経の再生に必要であることを *in vivo* で証明した(Koinuma et al, *J Neurochem* 2020)。また、神経損傷時や神経変性疾患においてミクログリアが変調をきたした時に、アストロサイトが代わって貪食を行うこと、その際、貪食標的細胞の膜脂質フォスファチジルセリンとそれに結合する介在分子や受容体をメディエーターとして貪食するメカニズムを明らかにした(Konishi et al, *EMBO J* 2020)。軸索損傷後の神経細胞や周辺グリア細胞間で引き起こされる様々な現象動態には脂質が関与し、損傷神経の応答や再生に関与していることが明らかになった。

(3) コレステロール代謝に関わる ABCA1 トランスポーターの軸索再生における役割

コレステロールは膜の性質を決定する上で重要な役割があり、軸索再生においてもその役割が考えられる。研究代表者らの過去の研究から、生体膜からコレステロールを引き抜く機能のある ABCA1 が軸索損傷応答に重要な役割があると考えている。ABCA1 の Flox マウスと研究代表者らが独自に開発した Atf3:BAC Tg マウスを交配したマウスを用いて、神経損傷による再生への影響を明らかにする研究を行った。DRG 細胞を培養した *in vitro* の実験系では ABCA1 をノックアウトすると、明らかに神経突起の分岐パターンの変化が見られた。特に神経突起の分岐が著しく増加した。これを *in vivo* で、軸索損傷特異的に ABCA1 をノックアウトし、軸索の再生速度の変化を検討した。その結果、ABCA1 ノックアウトにより軸索再生には顕著な変化はないものと思われる。今回 Cre ドライバーとして ATF3 のプロモーターを用いて新たにコンディショナルノックアウトマウスを作成したが、シュワン細胞での ABCA1 の発現も同時に抑制されている影響も考えられる。しかし、*in vitro* では明らかな形態変化を引き起こすこと、さらに運動ニューロンの軸索損傷後には ABCA1 は顕著な発現亢進が見られることから、コレステロールを膜から除去することによる膜の性質の変化は軸索再生に何等かの影響があると考えている。

(4) その他

運動ニューロン損傷時の軸索再生にはミクログリアが関与することがわかっており、脂質代謝に注目してグリアの影響を考えるため、中枢神経系でミクログリアを取り除く実験系を開発していたが、マクロファージに影響を与えずに胎児期のミクログリアを除去するシステムの構築が完成した(Li et al 2021)。また、ミクログリアとアストロサイトの機能の補完性について、2020 年度の実績をふまえて総説をまとめた(Konishi et al, 2022)。

引用文献

- Gamo K, Kiryu-Seo S, Konishi H, Aoki S, Matsushima K, Wada K and Kiyama H (2008) G protein coupled receptor screen reveals a role for chemokine receptor CCR5 in suppressing microglial neurotoxicity, **J Neurosci** 28(46):11980-11988.
- Tokizane K, Konishi H, Makide K, Kawana H, Nakamura S, Kaibuchi K, Ohwada T, Aoki J, Kiyama H, (2017) Phospholipid localization implies microglial morphology and function via Cdc42 in vitro, **Glia** 65(5):740-755. doi: 10.1002/glia.23123
- Kiryu-Seo S, Tamada H, Kato Y, Yasuda K, Ishihara N, Nomura M, Mihara K, Kiyama H (2016) Mitochondrial fission is an acute response against injury-induced neurodegeneration, **Sci Rep**, 6:28331. (doi: 10.1038/srep28331)
- Sayo A, Konishi H, Kobayashi M, Kano K, Kobayashi H, Hibi H, Aoki J, Kiyama H, (2019) GPR34 in Spinal Microglia Exacerbates Neuropathic Pain in Mice. **J Neuroinflammation** 16(1):82. doi: 10.1186/s12974-019-1458-8.
- Konishi H, Kiyama H, (2020) (Review article) Non-pathological roles of microglial TREM2/DAP12: TREM2/DAP12 regulates the physiological functions of microglia from development to aging, **Neurochem Int**, 141:104878, Doi:10.1016/j.neuint.2020.104878
- Tanabe K, Tachibana T, Yamashita T, Che YH, Yoneda Y, Ochi T, Tohyama M, Yoshikawa T, Kiyama H (2000) The small GTP-binding protein TC10 promotes growth cone-like formation and nerve elongation in neuronal cells, and its expression is induced during nerve regeneration in rats. **J. Neurosci.** 20:4138-4144.
- Koinuma S, Negishi R, Nomura R, Sato K, Kojima T, Segi-Nishida E, Goitsuka R, Iwakura Y, Wada N, Koriyama Y, Kiryu-Seo S, Kiyama H, Nakamura T. (2020) TC10, a Rho family GTPase, is required for efficient axon regeneration in a neuron-autonomous manner. **J Neurochem**. doi: 10.1111/jnc.15235
- Konishi H, Okamoto T, Hara Y, Komine O, Tamada H, Maeda M, Osako F, Kobayashi M, Nishiyama A, Kataoka Y, Takai T, Udagawa N, Jung S, Ozato K, Tamura T, Tsuda M, Yamanaka K, Ogi T, Sato K, Kiyama H (2020) Astrocytic phagocytosis is a compensatory mechanism for microglial dysfunction, **EMBO J** 39(22):e104464. doi: 10.15252/embj.2020104464.
- Li C, Konishi H, Nishiwaki K, Sato K, Miyata T, Kiyama H, (2021) A mouse model of microglia-specific ablation in the embryonic central nervous system, **Neurosci Res.** 173:54-61, doi: 10.1016/j.neures.2021.06.002

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sato Takehito, Konishi Hiroyuki, Tamada Hiromi, Nishiwaki Kimitoshi, Kiyama Hiroshi	4. 巻 384
2. 論文標題 Morphology, localization, and postnatal development of dural macrophages	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	6. 最初と最後の頁 49 ~ 58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00441-020-03346-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 -
1. 著者名 Koinuma Shingo, Negishi Ryota, Nomura Riko, Sato Kazuki, Kojima Takuya, Segi Nishida Eri, Goitsuka Ryo, Iwakura Yoichiro, Wada Naoyuki, Koriyama Yoshiki, Kiryu Seo Sumiko, Kiyama Hiroshi, Nakamura Takeshi	4. 巻 -
2. 論文標題 TC10, a Rho family GTPase, is required for efficient axon regeneration in a neuron autonomous manner	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.15235	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 Konishi Hiroyuki, Okamoto Takayuki, Hara Yuichiro, Komine Okiru, Tamada Hiromi, Maeda Mitsuyo, Osako Fumika, Kobayashi Masaaki, Nishiyama Akira, Kataoka Yosky, Takai Toshiyuki, Udagawa Nobuyuki, Jung Steffen, Ozato Keiko, Tamura Tomohiko, Tsuda Makoto, Yamanaka Koji, Ogi Tomoo, Sato Katsuaki, Kiyama Hiroshi	4. 巻 39
2. 論文標題 Astrocytic phagocytosis is a compensatory mechanism for microglial dysfunction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e104464
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2020104464	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 該当する
1. 著者名 Konishi Hiroyuki, Kiyama Hiroshi	4. 巻 141
2. 論文標題 Non-pathological roles of microglial TREM2/DAP12: TREM2/DAP12 regulates the physiological functions of microglia from development to aging	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 104878 ~ 104878
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.2020.104878	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 Sayo A, Konishi H, Kobayashi M, Kano K, Kobayashi H, Hibi H, Aoki J, Kiyama H	4. 巻 16(1)
2. 論文標題 GPR34 in Spinal Microglia Exacerbates Neuropathic Pain in Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Neuroinflammation	6. 最初と最後の頁 82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12974-019-1458-8	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 Yasui M, Menjyo Y, Tokizane K, Shiozawa A, Tsuda M, Inoue K, Kiyama H	4. 巻 16(1)
2. 論文標題 Hyper-activation of proprioceptors induces microglia-mediated long-lasting pain in a rat model of chronic fatigue syndrome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Neuroinflammation	6. 最初と最後の頁 67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12974-019-1456-x	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 Konishi Hiroyuki, Kiyama Hiroshi, Ueno Masaki	4. 巻 77
2. 論文標題 Dual functions of microglia in the formation and refinement of neural circuits during development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Developmental Neuroscience	6. 最初と最後の頁 18 ~ 25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijdevneu.2018.09.009	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4件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 木山博資
2. 発表標題 損傷末梢神経生存再生の分子基盤
3. 学会等名 第35回日本整形外科学会基礎学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木山博資
2. 発表標題 脳内炎症とグリア
3. 学会等名 第16回日本疲労学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kiyama H
2. 発表標題 Novel function of lipid mediators for the microglial regulation in the fate determination of injured neurons.
3. 学会等名 第60回日本神経学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kiyama H
2. 発表標題 DAP12 and the associated receptors elicit multiple functions of microglia in neural diseases
3. 学会等名 The 15th International Symposium on Geriatrics and Gerontology（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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