

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K19225

研究課題名(和文) Hedgehogシグナル制御による軸索伸長と感覚回復機構の関連の解明

研究課題名(英文) Elucidation for regulation of axonal extension and sensory recovery by Hedgehog signaling

研究代表者

佐藤 友里恵(山田友里恵)(Sato-Yamada, Yurie)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：20804537

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Hhシグナルが活性化指標している細胞[Gli1(+細胞)]が末梢神経の神経周膜と神経内鞘の両方で観察された。内鞘では、Gli1(+細胞)は血管に付随しているものとしていないものに分類された。神経損傷後、血管周囲のGli1(+細胞)は増殖し、血管内皮細胞とともに損傷部位に集積した。Gli1(+細胞)特異的にHhシグナルを不活化したマウス(Smo cKO)では、傷害後、Smo cKOマウスは、神経再生の初期段階で、血管形成の乱れとともに、蓄積したGli1(+細胞)の数が有意に減少し、その後軸索の異常な伸展を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

末梢神経再生の分子メカニズムの詳細は分かっていない。そのため、神経損傷の根本的治療薬は現存しない。本研究では、損傷神経で活性化し、Hedgehogシグナルに着目して神経再生の分子機構の一部を明らかにした。Cre-loxPシステムを用いて神経再生過程におけるHhシグナルの発現時期と部位を、自由にコントロールし、Hhシグナルのバランスの揺らぎを人為的に再現する実験系を用いた。これによりHhシグナルの神経再生における詳細なメカニズムを検討することができた。本研究で得られた知見は神経の再生機構に基づく新たな末梢神経再生治療法の確立に寄与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We observed that Hh signaling responsive cells [Gli1(+) cells] in both the perineurium and endoneurium. In the endoneurium, Gli1(+) cells were classified as blood vessel associated or non-associated. After injury, Gli1(+) cells around blood vessels mainly proliferated to then accumulate into the injury site along with endothelial cells. Hh signaling activity was retained in Gli1(+) cells during nerve regeneration. To understand the role of Hedgehog signaling in Gli1(+) cells during nerve regeneration, we examined mice with Gli1(+) cells-specific inactivation of Hh signaling (Smo cKO). After injury, Smo cKO mice showed significantly reduced numbers of accumulated Gli1(+) cells along with disorganized vascularization at an early stage of nerve regeneration, which subsequently led to an abnormal extension of the axon. Thus, Hh signaling in Gli1(+) cells appears to be involved in nerve regeneration through controlling new blood vessel formation at an early stage.

研究分野：神経科学

キーワード：末梢神経 神経再生 Hedgehogシグナル 血管周囲細胞 Gli1

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

歯科治療における頻度の高い偶発症として下歯槽神経の損傷がある。下歯槽神経の損傷症例ではしばしば感覚異常を伴う異常再生症例に遭遇する。下歯槽神経損傷後の異常感覚は痛覚過敏・錯感覚・感覚低下に大別されるが、同様に傷害された神経が、神経損傷後に再び正常な感覚を取り戻すためには、神経線維の発芽・伸長、再生神経の成熟、神経伝導・伝達機能の回復という連続した再生過程が時系列的に正確に進行する必要がある。損傷した末梢神経が十分に伸長しなかった場合、本来の支配領域からの感覚刺激を受容・伝達が不可能となり、また誤った方向に伸長すると、本来受けるはずのない不要な感覚刺激を受けることになる。実際、予後不良例の下歯槽神経摘出標本では、再生神経線維の異常な方向への伸長や伸長不全が認められる。このように、軸索の伸長異常は下歯槽神経損傷後の感覚異常の出現と関連している可能性はあるものの、末梢神経再生における損傷神経の伸長を制御する分子機構は明らかにされていない。

Hedgehog(Hh)シグナルは、発生時に軸索伸長をガイドするシグナルの一つである。しかしながら、神経再生過程における Hh シグナルの役割は不明であったが、申請者の先行研究で、成体の正常下歯槽神経で発現が認められない Hh シグナルが、神経損傷刺激により、神経再生過程で活性化することを明らかにし(図1)、発生時の神経線維伸長の制御機構が成体でも機能していることを指摘した(Yamada et al., Neuroscience Letters 2018)。Hh シグナルは、リガンドの濃度勾配に、下流転写因子の調節が加わることによって、複雑なシグナルの強弱や活性の有無のバランスが生じ、複雑な神経の走行を規定する軸索誘導を可能にしている。一方、軸索伸長の制御メカニズムの乱れ、すなわち Hh シグナルのバランスの乱れが神経線維の異常伸長に直結すると容易に想像される。ここに申請者は、「Hh シグナルの活性バランスの乱れが、下歯槽神経損傷後に認められる感覚の過敏または低下という相反する症状を引き起こすのではないか?」と考えた。

### 2. 研究の目的

本研究は、最終ゴールである「末梢神経再生分子基盤に基づいた、神経損傷後異常感覚の新規治療法の確立」の達成に向けて、「Hh シグナルの軸索伸長機構ならびにそれに続く感覚の回復機構の解明」を目的とする。

### 3. 研究の方法

研究目的達成のため、以下の課題を設定した。

- 1) 正常神経における Hh シグナルの詳細の解析
- 2) 損傷神経、再生過程の神経における Hh シグナル活性調節の検討
- 3) Hh シグナル活性を有する細胞の末梢神経再生時の動態観察
- 4) Hh シグナルの末梢神経軸索再生への影響の分析

実験動物として、野生型マウス、Gli1creER R26RYFP(Gli1YFP)マウス、Gli1creER;Smof1/fl R26RYFP (Smo)マウス、Gli3<sup>+/-</sup>マウスを使用した。実験手法には、免疫染色、FACS, RT-PCR, qPCR, ウェスタンブロット、複合活動電位測定、電子顕微鏡を使用した。

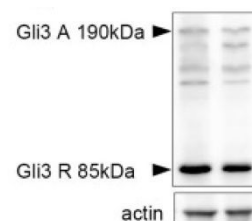
### 4. 研究成果

- 1) 末梢神経における Hh シグナルの詳細の理解

末梢神経は、Hh シグナルが成体で活性化している数少ない組織の一つである。しかし、その活性調節メカニズムと、Hh シグナル活性を有する細胞については詳細が分かっていない。そこで、

まず初めに正常神経の Hh シグナル活性の調節機構を検討した。正常の神経では Hh シグナルリガンドの Desert Hedgehog(Dhh)と受容体の Patched1(Ptch1)、下流転写因子の Gli1, Gli3 が発現していた。Dhh, Gli3 はシュワン細胞に発現が認められた。一方、Ptch 1, Gli1 の発現は神経周膜を構成する線維芽細胞、神経内鞘の線維芽細胞、および血管周囲の線維芽細胞様細胞の 3 種類の細胞が発現していることが分かった。

Gli3 は Hh シグナルの活性強度に応じて, activate form と repressor form の 2 つの様式を取りながら Hh シグナルの活性調節に参与していることが過去に報告されている。Gli3 のウエスタンブロットを行い、末梢神経内での Gli3 は repressor form であることを突き止めた(図 1)。



## 2) 損傷神経、再生過程の神経における Hh シグナル活性調節の理解

損傷神経における Gli3 のウエスタンブロットを行ったところ、Gli3 は神経損傷後に発現が低下することが分かった。一方で Hh シグナルの活性を示す Gli1 の発現および、Hh シグナルリガンドの Sonic hedgehog(Shh)の発現が上昇していた。なお、正常神経で発現していた Dhh の発現は低下していた。以上の結果より、損傷神経では Gli3 の抑制が低下することで、Hh シグナルの活性を促進しているのではないかと考えた。そこで、この仮説を検証するために、Gli3 の機能が半減しているヘテロ変異マウス (Gli3<sup>+/-</sup>マウス) を用いて、Hh シグナルの活性レベルを野生型と比較した。Gli3<sup>+/-</sup>マウスの正常末梢神経の機能は正常であったが、シュワン細胞の一部に異常な形態を認めた。Gli3<sup>+/-</sup>マウスの損傷神経における Hh シグナルの活性および Shh の発現量は野生型マウスより有意に高かった。これらの結果より、Gli3 は正常神経および損傷神経における Hh シグナルの活性の調節に参与しており、さらに損傷神経の Shh の発現は Gli3 の発現低下に依存することが示唆された。また、Gli3<sup>+/-</sup>マウスの再生神経を観察したところ、再生軸索の長さが野生型マウスより有意に長く、再生後の神経の伝導速度も速かった。これらの結果より、神経損傷時の repressor form Gli3 の発現低下は神経再生の促進に寄与していることが示された。

図 1 正常神経における Gli3

さらに神経損傷を境に起こる Dhh から Shh へのリガンドの切り替えが神経再生に及ぼす影響を調べるために、損傷神経に Shh の阻害剤および Dhh を投与し、神経軸索の再生を観察した。すると Shh 阻害剤投与群および Dhh 投与群のいずれも再生軸索の伸長が認められなかった(図 2)。以上より、神経損傷時の Hh シグナルのリガンドの切り替えが再生神経の軸索伸長に必要なことが明らかになった。

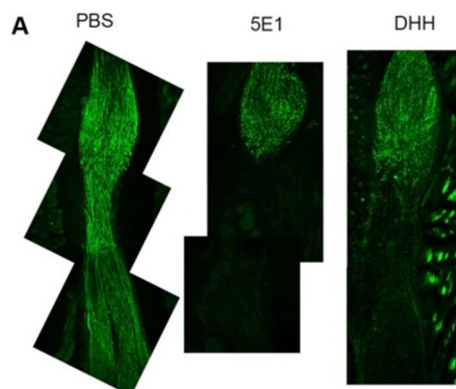


図 2 Shh 阻害剤 (5E1) Dhh 投与後の再生神経

## 3) Hh シグナル活性を有する細胞の末梢神経再生時の動態観察

Hh シグナルが活性化している細胞、すなわち Gli1 を発現している細胞の神経損傷後の動態を調べるために Gli1 YFP マウスの末梢神経内の YFP 発現細胞を観察した。Gli1 の発現は神経周膜を構成する線維芽細胞、神経内鞘の線維芽細胞、および血管周囲の線維芽細胞様細胞の 3 種類の細胞が発現していることが分かった。Gli1 YFP マウスに神経損傷を施したところ、Gli1 陽性細胞が神経損傷後早期に増殖し、神経両断端から損傷部位に向かって集積していた(図 3)。

この神経損傷部に集積する細胞は、3 種類の Gli1 陽性細胞のうち、血管周囲の線維芽細胞様細胞であった。

この細胞と新生血管、再生軸索、シュワン細胞との位置関係を観察したところ、Gli1 細胞は

新生血管と緊密な位置関係をとつつ、シュワン細胞と再生軸索より早期に損傷部位へと集積していた。

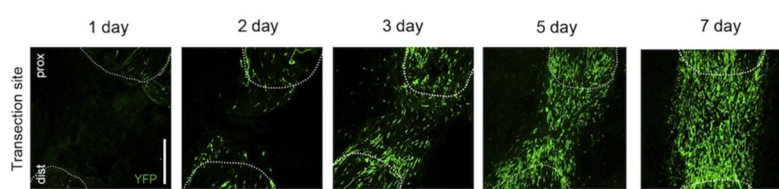


図 3 Gli1 陽性細胞の神経損傷部への集積

## 4) Hh シグナルの末梢神経軸索再生への影響の分析

損傷部に集積した Gli1 陽性細胞は、神経再生過程においても Hh シグナルの活性を有していた。

そこで、軸索再生における Hh シグナルの役割を理解するために、Smo マウスの再生神経を観察した。すると、Smo マウスでは Gli1 陽性細胞がボール状の異常な形態を示し、新生血管、シュワン細胞の損傷部の走行が乱れていた。また、再生軸索の伸長は抑制されていた。(図 4)

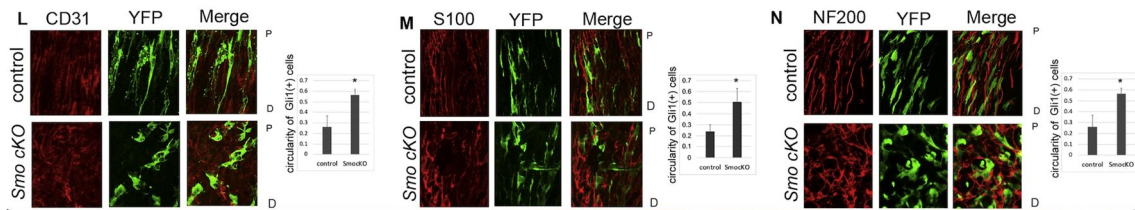


図 4 Smo マウスの新生血管、シュワン細胞、再生軸索

そこで、タモキシフェンの投与のタイミングを変更することで、Hh シグナルを神経再生初期で活性化し、後期で不活化したところ、初期

から不活化した群と比較して再生軸作は有意に伸長していた(図 5)。以上の結果より、Hh シグナルは神経再生の初期の他細胞の動態および軸索伸長に重要な役割を有していると考えられる。

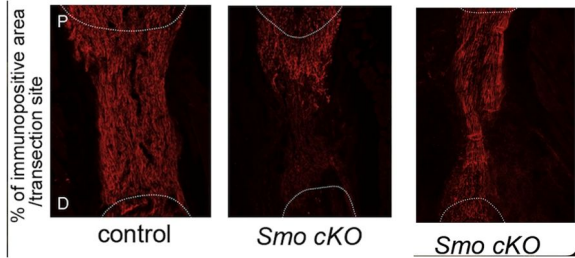


図 5 Smo マウス(初期 Hh シグナル OFF; 中央、後期 Hh シグナル OFF; 右)の再生軸索

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 2件）

1. 著者名 Yurie Yamada Kenji Seo Supaluk Trakanant Jun Nihara Takehisa Kudo Makio Saeki Masayuki Kurose Daisuke Matsumaru Takeyasu Maeda Atsushi Ohazama	4. 巻 432
2. 論文標題 Gli3 is a key factor in the Schwann cells from both intact and injured peripheral nerves	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 229-239
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuroscience.2020.02.036	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 Yurie Yamada, Jun Nihara, Supaluk Trakanant, Takehisa Kudo, Kenji Seo, Izumi Iida, Kenji Izumi, Masayuki Kurose, Yutaka Shimomura, Miho Terunuma, Takeyasu Maeda, Atsushi Ohazama	4. 巻 173
2. 論文標題 Perivascular Hedgehog responsive cells play a critical role in peripheral nerve regeneration via controlling angiogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 62-70
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2021.06.003	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yurie Yamada, Takeyasu Maeda
2. 発表標題 The role of perivascular fibroblast in peripheral nerve regeneration
3. 学会等名 第45回分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤友里恵、前川知樹、前田健康
2. 発表標題 軸索変性分子SARM1活性はシャルコー・マリー・トゥース病の病態を悪化させる
3. 学会等名 第129回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2024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
---------	---------