

令和 6 年 7 月 2 日現在

機関番号：34204

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07304

研究課題名(和文)末梢神経再生時におけるコレステロール制御の重要性に対する治療効果の可能性について

研究課題名(英文)The importance of cholesterol control in neurons during peripheral nerve regeneration

研究代表者

獅子王 信江(Nobue, Shishioh)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・研究員

研究者番号：50420401

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)：軸索の再生には、軸索膜の脂質動態が変化することが必要である。神経損傷後の脂質輸送に関連する遺伝子の発現を調べたところ、細胞膜からのコレステロール輸送に関するATP-binding cassette transporter-A1 (ABCA1)の発現上昇が見られた。神経再生におけるABCA1の機能的役割を明らかにするために、ABCA1欠損マウスと損傷神経特異的に遺伝子発現を抑制するコンディショナルマウス(Abca1^{CKO})において、損傷神経細胞の神経突起の分枝が増加していた。よって、ABCA1は神経再生において軸索をスムーズに伸展させるのに、コレステロール制御として関与する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、コレステロール制御に重要なABCA1遺伝子が神経再生における伸展する軸索の分枝を抑制していることを明らかにした。ABCA1は細胞膜上のコレステロール量を過剰な場合は細胞外に排出し、適切なコレステロール量を恒常する重要な遺伝子である。これは学術的に神経再生において脂質量制御が重要であることが示され、また一般的な細胞における脂質ホメオスタシスのメカニズムを明らかにする手がかりとなる。一方、神経再生治療において、既知の脂質代謝疾患に関する薬剤が効果をもたらす可能性も示唆された。このように脂質代謝異常と神経障害に関する知見が本研究によって相互に影響し、医療につながる社会的意義をもたらした。

研究成果の概要(英文)：Axon regeneration requires changes in the lipid dynamics of the axon membrane. We examined the expression of genes related to lipid transport after nerve injury and found elevated expression of ATP-binding cassette transporter-A1 (ABCA1), which is involved in cholesterol transport from the plasma membrane. To clarify the functional role of ABCA1 in nerve regeneration, branching in neurites of damaged neurons were increased in ABCA1-deficient mice and in conditioned mice in which gene expression was suppressed specifically in damaged nerves (Abca1^{CKO}). Thus, ABCA1 is involved as a cholesterol regulator in smooth axonal extension in nerve regeneration.

研究分野：生化学

キーワード：神経再生 遺伝子改変マウス 脂質 コレステロール 末梢神経

1. 研究開始当初の背景

末梢神経の多くは、神経損傷後、神経細胞は生存し新たに軸索を再生することが知られている。軸索は長く伸びた細胞膜であり、そこでは脂質の供給や組成の制御などが必要とされ、神経細胞における脂質コントロールに関する機構は非常に興味深い。本研究では、神経再生時に発現量に変化する脂質関連遺伝子を、ラット舌下神経再生モデルを用いて探索したところ、動脈硬化症と深く関与するコレステロールエフラックスを行う ATPase binding protein A1 (ABCA1) が神経再生に関与していることを発見した。ABCA1 は、細胞内に過剰に蓄積したコレステロールを細胞外の受け手（血液中ではリポプロテイン）に受け渡し細胞膜におけるコレステロール量をコントロールしている。ABCA1 欠損は重篤な動脈硬化症や高脂血症を招くことが知られている。神経細胞が細胞膜を増加させて軸索を伸ばす際に、コレステロール量をコントロールする可能性は高く、これを ABCA1 が担っている可能性が考えられた。本研究では、ノックアウトマウス、さらには、名古屋大学の桐生寿美子氏が開発した損傷神経のみで遺伝子発現抑制を行えるコンディショナルマウスを使用し、実際に損傷神経での ABCA1 の機能を明らかにすることを目的とした。

2. 研究の目的

神経損傷後に発現上昇する ABCA1 の神経再生に関わる機能を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子改変マウスの飼育と神経損傷法

ノックアウトマウス(以下 KO マウス)、並びにコンディショナルマウス (以下 CKO マウス) はオスメス共に 7 週齢において、イソフルラン吸気麻酔のもと、左下肢太腿を切開し坐骨神経を切断した後、切開面の皮膚を縫合した。または、右側舌下神経を切断し、同様に縫合した。7 日後における遺伝子発現を、*in situ* hybridization および Western blotting を用いて CKO マウスにおける ABCA1 発現抑制を確認した。

(2) 神経再生の評価方法

損傷した坐骨神経の神経核後根節 (DRG) を 7 日後に摘出し、ラミニンおよび PDL でコートしたカバーガラスの上で初代培養を実施した。16 時間後に PFA で固定、ニューロフィラメント M に対する抗体で蛍光免疫染色を行い神経突起伸長の程度と複雑さを Image J の *Sholl* analysis を用いて解析した。統計処理は、神経核の中心からの距離ごとにおける神経突起交差の数を student *t* test にて行った。

また、*in vivo* における神経再生評価については、損傷 7 日後に還流固定したマウスから坐骨神経損傷部位を摘出し、繊維に従って凍結切片を作製した。切片をニューロフィラメント M の抗体を用いて蛍光免疫染色を行い、損傷部位から再生された神経繊維の長さを比較した。さらに、舌下神経損傷モデルを用いて、神経再生の指標である神経筋接合時期について検証を行なった。右側舌下神経を損傷後、適宜舌を摘出し凍結切片を作製した。損傷後の神経筋接合は神経側を小胞アセチルコリントランスフェラーゼ (VAcHT) に対する抗体で、筋肉側を特異的に結合する神経毒素 α -bungarotoxin でそれぞれ蛍光免疫染色にて共染色の確認を行なった。

4. 研究成果

(1) *Abca1* ノックアウト (KO) マウスでは、*Abca1* の欠損により損傷後の DRG ニューロン初代培養における神経突起が複雑化することがわかった (図 1 A, B)。*Sholl* analysis で解析したところ、細胞体から 120~160 μ m 離れたところで有意に分枝の数が増え、全体の分枝点においても有意差が認められた ($p < 0.005$)。神経突起の全長や細胞体から最末端の距離には差が見られなかった。

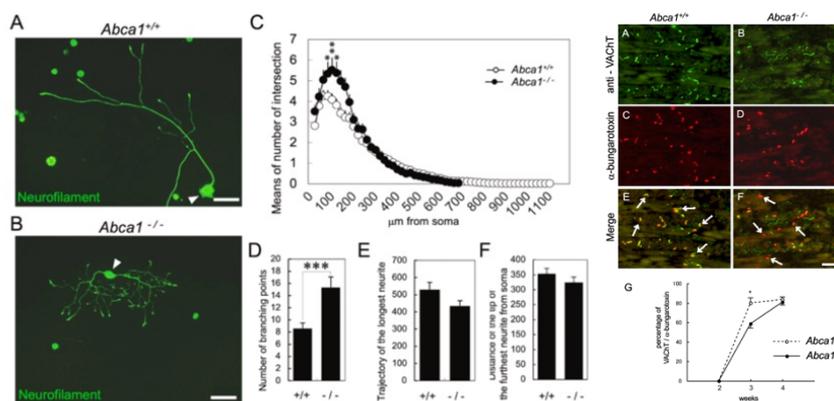


図 1 *Abca1* KO マウスの DRG ニューロンは神経突起が複雑化した。

図 2 *Abca1* KO マウスで神経筋接合の遅延が見られた

舌下神経損傷後の舌表面における神経筋接合の時期を調べたところ、図2に示すように *Abca1* KO マウスにて神経筋結合時期の遅延が見られた。3週後における *Abca1* KO マウスで接合部位が α -bungarotoxin のみの赤い染色像になっており、神経末端が到達していないことがわかる (F)。4週間後では、ほとんどのマウスで神経筋接合が起こっていたので、*Abca1* 欠損は神経再生が遅延するが神経障害の可能性を引き起こす原因には不十分であることがわかった。

しかしながら、KO マウスでは生まれつき ABCA1 の機能が欠損していることから、体内における脂質組成がコントロールマウスと異なる可能性が高い。特に神経組織では神経細胞よりもシュワン細胞の方にコレステロール含有量が多く、ABCA1 欠損の影響は大きいものと考えられる。そこで、損傷神経特異的に ABCA1 が欠損されるコンディショナルマウスを作製し、同様の解析を行ない野生型マウスにおける神経再生時の ABCA1 の機能を追求することにした。

(2) *Abca1* CKO マウスは、*Atf3* プロモーター下に Cre-loxP recombinase を発現し、ゲノム上に存在している *flox* 配列で挟まれた *Abca1* 遺伝子が削除される仕組みで、図3のように神経損傷後に発現する *Abca1* は *in situ* hybridization で神経細胞でのみ発現が見られなかった。タンパク質レベルでも確認できた。これら CKO マウスを用いて、DRG ニューロン初代培養における神経突起複雑さを検証したところ、CKO マウス由来の神経細胞はコントロール細胞 (CreWT) よりも細胞体付近がベタっとした形態が多く見られ (図5)、*sholl* analysis で KO マウスと同様、*Abca1* 欠損により神経突起が複雑化することが示された (図4)。神経突起の全長については有意差がなかったが、分枝の数については有意差があった ($p < 0.05$)。これらの結果より、KO マウスの結果と合わせて、神経細胞はスムーズな神経突起伸展のために *Abca1* の発現が必要であることが示された。

In vivo においては残念ながら影響がはっきりと観察されなかった。損傷部位からの軸索再生の長さにも明らかな違いは見られなかった (図6)。また、舌における神経筋接合の回復時間にも差が見られなかった (図7)。

これらの結果より、*Abca1* の神経再生時における機能は、再生する軸索をスムーズに伸展させるのに関与しているが、再生遅延まで至らないことがわかった。ABCA1 は細胞膜のコレステロールを細胞外に排出する機能を持つので、健康的なマウスではコレステロール量の影響を受けない可能性が示唆される。

(3) 神経系培養細胞である Neuro2A (マウス神経芽細胞種) を用いて、*Abca1* が発現上昇するとどのような形態変化が現れるかを調べるために、human *ABCA1* 遺伝子をプラスミドを介して強制発現させ、細胞形態を観察した。*hABCA1* 強制発現細胞では、細胞体の数倍ある神経突起の伸長をもつ細胞が多く見られた。そこで、ABCA1 について知られている変異型を用いて同様に強制発現させてみたところ、ATPase 不活性 (コレステロールエフラックスが起こらない) 変異 (K569M) では Rac 活性型のようなラフリングの多い神経突起が現れた。また、末端の 64 アミノ酸欠損も ATPase 不活性になるが、これも同様にラフリング様の神経突起を伸長させた。さらに解析したところ、C 末端に神経突起の伸長さえも欠損させる領域を突き止めた。

<引用文献> Nobue Shishioh, Sumiko Kiryu-Seo, Sumiko Abe-Dohmae, Shinji Yokoyama, Hiroshi Kiyama, Expression of ATP-binding cassette transporter A1 is induced by nerve injury and its deficiency affects neurite tip morphology and elongation in cultured neurons, Journal of Chemical Neuroanatomy, 125(2022)102164

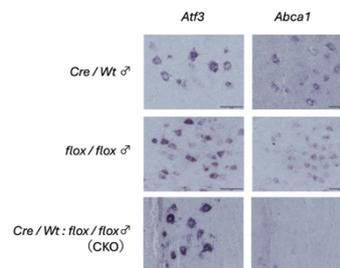


図3 神経損傷を受けたCKOマウスのDRGで*Abca1*の発現低下が確認できた。

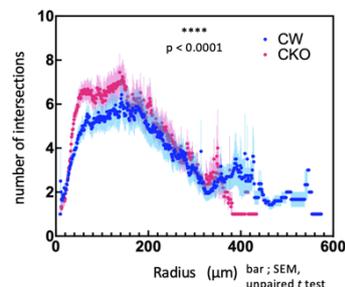


図4 損傷神経特異的*Abca1*欠損マウスDRG初代培養においても神経突起の複雑化が観察された。

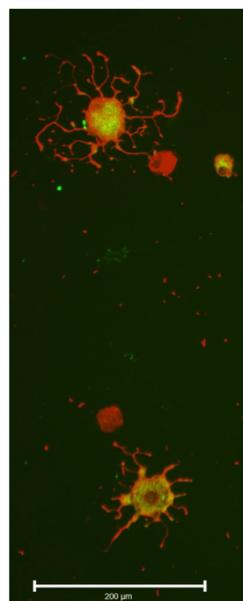


図5 CKO由来細胞で多く見られた形態。赤; NFM、緑; Cre発現を示すGFP

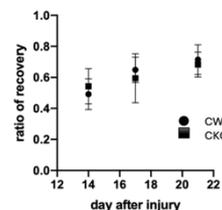


図6 損傷部位からの神経繊維の回復距離。

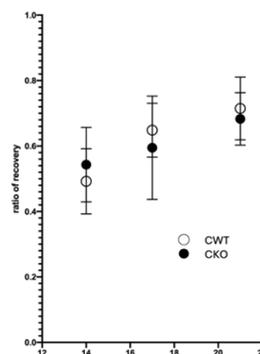


図7 舌における神経筋接合の回復。

5. 主な発表論文等

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

| | |
|--|-----------------------------|
| 1. 著者名 Nobue Shishioh, Sumiko Kiryu-Seo, Sumiko Abe-Dohmae, Shinji Yokoyama, Hiroshi Kiyama | 4. 巻 125 |
| 2. 論文標題 Expression of ATP-binding cassette transporter A1 is induced by nerve injury and its deficiency affects neurite tip morphology and elongation in cultured neurons | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Chemical Neuroanatomy | 6. 最初と最後の頁 102164-102174 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jchemneu.2022.102164 | 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 |

〔学会発表〕 計0件

〔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 |
|-------|-------------------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 博資 木山 (Hiroshi Kiyama) | | |
| 研究協力者 | 寿美子 桐生一瀬尾 (Sumiko Kiryu-Seo) | | |

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 |
|---------|---------|