

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 6 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22500324

研究課題名（和文）ニューロンとシュワン細胞の相互作用に着目した、末梢神経変性・再生の機構解析

研究課題名（英文）Peripheral nerve degeneration and regeneration from the viewpoint of neuron-Schwann cell interplay

研究代表者

三五 一憲 (SANGO KAZUNORI)

公益財団法人東京都医学総合研究所・運動・感覚システム研究分野・副参事研究員

研究者番号：50291943

研究成果の概要（和文）：ニューロン、シュワン細胞および両者の共培養系を用いて、末梢神経の変性・再生機構を解析した。動物レクチンGalectin-1が成熟ラット後根神経節（DRG）の小径ニューロンやシュワン細胞に強く発現し、神経栄養因子GDNFの軸索再生促進機構に関与することを明らかにした。また、成熟ラット末梢神経組織の初代培養から不死化シュワン細胞株IFRS1を樹立し、DRGニューロンやPC12細胞との共培養において髄鞘形成を誘導することに成功した。

研究成果の概要（英文）：By employing cultured adult rat neurons and Schwann cells, we investigated the mechanisms of peripheral nerve degeneration and regeneration. The research suggests that galectin-1 is localized to small diameter dorsal root ganglion (DRG) neurons and Schwann cells and plays a role in GDNF-induced axonal regeneration. Moreover, an immortalized Schwann cell line IFRS1 established from adult Fischer 344 rats retains the fundamental ability to myelinate axons in coculture with DRG neurons and NGF-primed PC12 cells, thereby being a valuable tool for the study of demyelination and remyelination.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：神経細胞生物学、病態生理学

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：筋・末梢神経疾患

1. 研究開始当初の背景

末梢神経の変性・再生機構の解明には、ニューロン、シュワン細胞それぞれの生理・生化学的特性の理解を深めるとともに、両者の相

互作用に関する新たな知見の蓄積収集が不可欠である。安定して供給できる成熟動物由来ニューロン、シュワン細胞、および両者の共培養系を確立できれば、軸索変性・再生、

髄鞘形成・脱髄等に関与する諸因子の解析に極めて有用なツールとなる。

2. 研究の目的

ニューロンとシュワン細胞の相互作用に焦点を当て、成熟動物由来ニューロンやシュワン細胞の培養系、および両者の共培養系を確立する。さらにそれらの培養系を用いて、末梢神経の変性・再生過程に関与する諸因子の作用機構や、糖尿病性ニューロパチーをはじめとする末梢神経障害の発症機構を解明する。

3. 研究の方法

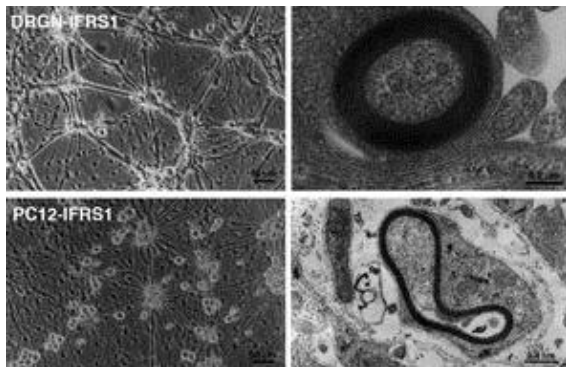
- (1) 成熟ラットDRGニューロンの高密度培養系を確立し、神経栄養因子やサイトカインの神経再生促進作用機構を解析する。
- (2) 成熟ラット末梢神経組織の初代培養系から不死化シュワン細胞株を樹立し、その細胞学的特性を解析する。
- (3) 樹立したシュワン細胞株とDRGニューロン、PC12細胞を共培養し、髄鞘形成を誘導する。
- (4) 確立した共培養系を用いて、髄鞘形成や脱髄を誘導する諸因子の作用機構を解析する。

4. 研究成果

- (1) 成熟ラット DRG ニューロンの高密度培養系を確立し、ウェスタンブロット解析に必要なタンパク量の回収に成功した。この系を用いて、Pleiotrophin や Galectin-1 等の発現調節機構を解析した(雑誌論文 1, 2, 6-8)。成熟ラット DRG の組織切片を用いた免疫染色により、Galectin-1 は GDNF 依存性小径ニューロンやシュワン細胞に強く発現していることが明らかとなった(図書 2)。培養液中に投与された GDNF は、受容

体 RET-PI3 kinase 経路の活性化を介して、DRG ニューロンの突起伸長および Galectin-1 のタンパク発現を誘導した(雑誌論文 2)。

- (2) 成熟 Fischer344 ラット末梢神経組織の初代培養系から、自発的な不死化シュワン細胞株 IFRS1 を樹立した。RT-PCR や免疫染色等の解析により、IFRS1 は S100、p75^{NTR} 等のシュワン細胞マーカーを発現し、成熟シュワン細胞としての特性を保持していることが明らかとなった(雑誌論文 6-7, 11-13)。
- (3) IFRS1 と成熟ラット DRG ニューロンや PC12 細胞との共培養を確立し、電顕レベルで髄鞘の形成を確認した [図 1] (雑誌論文 3-5)。DRG ニューロン-IFRS1 共培養系は、これまで報告されている共培養系に比べ、成熟動物由来の細胞同士を用いている点で、成人ニューロパチー研究により適していると考えられる。さらに PC12-IFRS1 共培養系は、株化細胞同士を用いて髄鞘形成を誘導した世界初の成功例であり、煩雑な初代培養をせずにニューロン、シュワン細胞のクロストークを効率よく安定して解析できるという大きなメリットがある。
- (4) 上記共培養系を用いて、GDNF(雑誌論文 5)、可溶性 III 型 neuregulin-1 (雑誌論文 3)、GLP-1 受容体作動薬 Exendin-4 等による髄鞘形成促進機構や、抗不整脈薬 Amiodarone による脱髄誘導機構を解析している。



【図 1】DRG ニューロン (上段)、PC12 細胞 (下段) と IFRS1 細胞との共培養系における髄鞘形成

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 11 件)

- 1) 三五一憲, 柳澤比呂子, 高久静香, 渡部和彦, 堀江秀典, 門屋利彦. 末梢神経再生とガレクチン-1. *Peripheral Nerve 末梢神経*, 印刷中 (査読有)
- 2) Takaku S, Yanagisawa H, Watabe K, Horie H, Kadoya T, Sakumi K, Nakabeppu Y, Poirier F, Sango K. GDNF promotes neurite outgrowth and upregulates galectin-1 through the RET/PI3K signaling in cultured adult rat dorsal root ganglion neurons. *Neurochem Int*, 62, 330-339, 2013 (査読有)
- 3) Sango K, Kawakami E, Yanagisawa H, Takaku S, Tsukamoto M, Utsunomiya K, Watabe K. Myelination in coculture of established neuronal and Schwann cell lines. *Histochem Cell Biol*, 137, 829-839, 2012 (査読有)
- 4) Sango K, Yanagisawa H, Takaku S, Kawakami E, Watabe K. Immortalized adult rodent Schwann cells as in vitro models to study diabetic neuropathy. *Exp Diabetes Res*, 374943, 1-9, 2011 (査読有) [DOI: 10.1155/2011/374943]
- 5) Sango K, Yanagisawa H, Kawakami E, Takaku S, Ajiki K, Watabe K. Spontaneously immortalized Schwann cells from adult Fischer rat as a valuable tool for exploring neuron-Schwann cell interactions. *J Neurosci Res*, 89, 898-908, 2011 (査読有)
- 6) Yanagisawa H, Komuta Y, Kawano H, Toyada M, Sango K. Pleiotrophin induces neurite outgrowth and up-regulates growth-associated protein (GAP-43) mRNA through the ALK/GSK3 β / β -catenin signaling in developing mouse neurons. *Neurosci Res*, 66, 111-116, 2010 (査読有)
- 7) Komuta Y, Teng X, Yanagisawa H, Sango K, Kawamura K, Kawano H. Activation of transforming growth factor β receptors in meningeal fibroblasts of the injured mouse brain. *Cell Mol Neurobiol*, 30, 101-111, 2010 (査読有)
- 8) Kimura-Kuroda J, Teng X, Komuta Y, Sango K, Yoshioka N, Kawamura K, Raisman G, Kawano H. An in vitro model of the inhibition of axon growth in the lesion scar formed after central nervous system injury. *Mol Cell Neurosci*, 43, 177-187, 2010 (査読有)
- 9) 三五一憲, 渡部和彦. 成熟マウス・ラット由来シュワン細胞株の樹立とその末梢神経疾患研究への応用. *Peripheral Nerve 末梢神経*, 43, 44-51, 2010 (査読有)

- 10) 三五一憲, 渡部和彦. Schwann細胞を用いた糖尿病性神経障害の病態解析. 糖尿病合併症, 24, 38-41, 2010 (査読無)
- 11) 渡部和彦, 三五一憲. Schwann細胞培養による病態解明. 日本臨床 (糖尿病性細小血管症 (第2版) -発症・進展制御の最前線 - III. 糖尿病性神経障害 特論), 68 (Suppl.9), 637-640, 2010 (査読無)

[学会発表] (計 27 件)

- 1) 三五一憲, 渡部和彦. 成熟動物ニューロン、シュワン細胞の培養系を用いた神経変性・再生機構の解析. 第 118 回日本解剖学会総会全国学術集会シンポジウム, 2013 年 3 月 30 日, 高松
- 2) 三五一憲, 柳澤比呂子, 渡部和彦, 高久静香, 堀江秀典, 門屋利彦. GDNF によるガレクチン-1 の発現誘導と、その末梢神経再生機構への関与. 第 90 回日本生理学会大会, 2013 年 3 月 27 日, 東京
- 3) 高久静香, 柳澤比呂子, 渡部和彦, 中別府雄作, Françoise Poirier, 堀江秀典, 門屋利彦, 三五一憲. GDNF は RET-PI3K 経路を介して DRG ニューロンの神経突起伸長ならびに Galectin-1 の発現を誘導する. 第 85 回日本生化学会大会, 2012 年 12 月 16 日, 福岡
- 4) 三五一憲, 柳澤比呂子, 河上江美子, 塚本雅美, 宇都宮一典, 渡部和彦. 株化ニューロン-シュワン細胞による共培養系の確立と末梢神経疾患研究への応用. 第 85 回日本生化学会大会, 2012 年 12 月 15 日, 福岡
- 5) 塚本雅美, 三五一憲, 柳澤比呂子, 渡部和彦, 宇都宮一典. 糖尿病性神経障害モデルとしての不死化ラットシュワン細胞株 IFRS1. 第 27 回日本糖尿病合併症学会, 2012 年 11 月 03 日, 福岡
- 6) Sango K, Yanagisawa H, Takaku S, Kawakami E, Tsukamoto M, Utsunomiya K, Watabe K. Coculture of NGF-primed PC12 cells and immortalized Schwann cells as a valuable tool for the study of myelination and demyelination. The 42nd Society for Neuroscience Annual Meeting Nanosymposium, 2012 年 10 月 15 日, New Orleans, USA
- 7) Sango K, Yanagisawa H, Watabe K. Coculture of established neuronal and Schwann cell lines as a valuable tool for the study of myelination-associated factors. 第 35 回日本神経科学大会シンポジウム, 2012 年 9 月 21 日, 名古屋
- 8) 三五一憲, 柳澤比呂子, 高久静香, 渡部和彦, 堀江秀典, 門屋利彦. GDNF による DRG ニューロンの神経突起伸長ならびにガレクチン-1 の発現誘導. 第 23 回日本末梢神経学会学術集会, 2012 年 8 月 31 日, 福岡 (優秀口演賞受賞)
- 9) 三五一憲, 柳澤比呂子, 河上江美子, 渡部和彦. 株化ニューロン-シュワン細胞共培養系の確立とニューロパチー研究への応用. 第 22 回日本病態生理学会, 2012 年 8 月 4 日, 由布
- 10) Sango K, Watabe K. Myelination in coculture of NGF-primed PC12 cells and immortalized adult Fischer rat Schwann cells (IFRS1). 第 34 回神経組織培養研究会・第 2 回国際神経組織培養研究会, 2012 年 6 月 12 日, 東京
- 11) 三五一憲, 柳澤比呂子, 河上江美子, 塚本雅美, 宇都宮一典, 渡部和彦. Amiodarone による末梢神経障害:シュワン細胞株 IFRS1 を用いた解析. 第 52 回日本神経学会総会, 2012 年 5 月 29 日, 東京

- 12) 塚本雅美, 三五一憲, 柳澤比呂子, 渡部和彦, 宇都宮一典. ラットシュワン細胞株 IFRS1 におけるグリケーション関連因子の検討. 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2012 年 5 月 18 日, 横浜
- 13) 三五一憲, 河上江美子, 柳澤比呂子, 高久静香, 渡部和彦. 株化ニューロン・シュワン細胞共培養系における髄鞘形成誘導法の確立. 第 89 回日本生理学会大会, 2012 年 3 月 30 日, 松本
- 14) 三五一憲, 柳澤比呂子, 渡部和彦. 高グルコース負荷に伴うシュワン細胞株 IFRS1 の代謝変化. 第 26 回日本糖尿病合併症学会, 2011 年 10 月 15 日, 大宮
- 15) Sango K, Yanagisawa H, Kawakami E, Watabe K. Myelination in cocultures of established neuronal and Schwann cell lines. 第 34 回日本神経科学大会, 2011 年 9 月 15 日, 横浜
- 16) 三五一憲, 柳澤比呂子, 河上江美子, 渡部和彦. 株化ニューロン・シュワン細胞による共培養系確立・髄鞘形成誘導. 第 22 回日本末梢神経学会学術集会, 2011 年 9 月 3 日, 宜野湾
- 17) 三五一憲, 柳澤比呂子, 堀江秀典, 門屋利彦. GDNF による DRG ニューロンの神経突起伸長促進ならびにガレクチン-1 発現誘導のメカニズム. 第 21 回日本病態生理学会, 2011 年 8 月 20 日, 東京
- 18) Sango K, Yanagisawa H, Kawakami E, Watabe K. Myelination in cocultures of PC12 cells and immortalized Schwann cells IFRS1. 2011 Peripheral Nerve Society Meeting, 2011 年 6 月 27 日, Potomac, USA
- 19) 三五一憲, 柳澤比呂子, 河上江美子, 渡部和彦. 末梢神経障害研究モデルとしての、ニューロン・シュワン細胞株共培養系の確立. 第 52 回日本神経学会総会, 2011 年 5 月 18 日, 名古屋
- 20) 柳澤比呂子, 小牟田縁, 川野仁, 三五一憲. 発生過程ならびに損傷後の中枢神経系における pleiotrophin の発現調節・シグナル伝達機構の解析. 第 83 回日本生化学会大会 (BMB2010), 2010 年 12 月 8 日, 神戸
- 21) Sango K, Yanagisawa H, Takaku S, Kawakami E, Watabe K. Spontaneously immortalized adult Fischer rat Schwann cells IFRS1 as a valuable tool for exploring neuron-Schwann cell interactions. 第 83 回日本生化学会大会 (BMB2010), 2010 年 12 月 8 日, 神戸
- 22) Sango K, Ajiki K, Kawakami E, Yanagisawa H, Takaku S, Watabe K. Establishment of spontaneously immortalized adult Fischer rat Schwann cells IFRS1. The 40th Society for Neuroscience Annual Meeting, 2010 年 11 月 16 日, San Diego, USA
- 23) 三五一憲, 柳澤比呂子, 渡部和彦. 成熟ラットシュワン細胞株 IFRS1 を用いた、糖尿病性神経障害の病態解析. 第 25 回日本糖尿病合併症学会, 2010 年 10 月 22 日, 大津
- 24) 三五一憲, 渡部和彦. 成熟ラット由来不死化シュワン細胞株と DRG ニューロンとの共培養系の確立. 第 21 回日本末梢神経学会学術集会, 2010 年 9 月 4 日, 仙台
- 25) 三五一憲, 安食京子, 河上江美子, 柳澤比呂子, 高久静香, 渡部和彦. 不死化シュワン細胞株 IFRS1 を用いた、ニューロン・シュワン細胞間相互作用の解析. 第 33 回日本神経科学大会, 2010 年 9 月 3 日, 神戸
- 26) 三五一憲, 柳澤比呂子, 渡部和彦. 新た

な糖尿病性神経障害研究モデルとしての、ニューロン-シュワン細胞株共培養系の確立. 第53回日本糖尿病学会年次学術集会, 2010年5月29日, 岡山

- 27) 三五一憲, 柳澤比呂子, 堀江秀典, 門屋利彦. GDNFによる末梢神経再生促進ならびにガレクチン-1発現誘導の分子機構. 第51回日本神経学会総会, 2010年5月20日, 東京

[図書] (計3件)

- 1) 三五一憲, 渡部和彦. ポリオール代謝 (60-67頁). 糖尿病性神経障害-基礎から臨床のすべて- (編集主幹: 荒木栄一, 専門編集: 中村二郎), 中山書店, 2013
- 2) Sango K, Yanagisawa H, Watabe K, Horie H, Kadoya T. Chapter 3: Galectin-1 as a multifunctional molecule in the peripheral nervous system after injury (pp.31-46). Basic Principles of Peripheral Nerve Disorders (Ed: Rayegani SM), InTech d.o.o., 2012
- 3) 三五一憲他 (分担執筆), 看護大事典 第2版 (和田攻, 南裕子, 小峰光博編, 3021頁), 医学書院, 2010

[その他]

ホームページ等

- 1) 神経変性病理解プロジェクトの研究紹介
<http://www.igakuken.or.jp/als/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三五 一憲 (SANGO KAZUNORI)

公益財団法人東京都医学総合研究所・運動・感覚システム研究分野・副参事研究員

研究者番号: 50291943

(2) 研究分担者

渡部 和彦 (WATABE KAZUHIKO)

公益財団法人東京都医学総合研究所・運動・感覚システム研究分野・副参事研究員

研究者番号: 30240477