

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592208

研究課題名(和文) グルココルチコイドによる髄鞘形成機構の解明および髄鞘形成誘導を介した神経再生促進

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of myelination by glucocorticoids.

研究代表者

藤原 浩芳 (FUJIWARA, HIROYOSHI)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90381962

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：グルココルチコイドによる末梢神経保護のための薬物応用を実現するために、まだ解決できていない課題を克服することが目的である。グルココルチコイド受容体がシュワン細胞に存在し、CORT濃度に応じてGRの蛍光強度が変化することが明らかになった。またラマン分光顕微鏡による非染色な観察により、末梢神経の細胞および組織から有用なピーク変化をとらえることができ、非侵襲的な画像診断法につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Glucocorticoids improve the symptoms of peripheral nerve disorders, such as carpal tunnel syndrome and peripheral neuropathy. Schwann cells of the peripheral nerves express glucocorticoid receptors (GR), and glucocorticoids enhance the rate of myelin formation in vitro. Moreover, label-free biochemical imaging with Raman spectroscopy can be used to detect turnover of axon and myelin in peripheral nerve regeneration.

研究分野：整形外科

キーワード：末梢神経 グルココルチコイド 神経再生

1. 研究開始当初の背景

末梢神経障害後の回復スピードは約1日1mmと遅く、また完全に損傷前の機能を回復することはない。本疾患に対する効果的な薬物療法は、いまだ確立しておらず、薬物による末梢神経再生誘導治療が望まれている。

申請者は、末梢神経再生をテーマに分子生物学的およびイメージングの手法を用いて、再生メカニズムの解明及び末梢神経再生に関連する因子の同定を行ってきた。この結果、ステロイドホルモンの一つであるグルココルチコイドおよびその受容体であるグルココルチコイド受容体(GR)に着目し、末梢神経再生過程において、以下のような重要な作用を担うことを明らかにした。1. GRが正常および損傷した坐骨神経においてシュワン細胞に存在し、末梢神経再生過程に発現が亢進した。2. 内因性グルココルチコイドは、シュワン細胞のGRを介して、末梢神経損傷後の髄鞘形成に関与していた。3. 末梢神経再生の非侵襲的イメージング技術として、MRI拡散テンソル法が有用であること。

2. 研究の目的

本研究は、グルココルチコイドによる末梢神経保護のための薬物応用を実現するために、まだ解決できていない課題を克服することが目的である。計画している具体的な研究項目は、グルココルチコイドの髄鞘形成機構を、分化、転写因子、免疫、ストレス応答作用機構との関連から解明し、末梢神経障害モデルを用いて、髄鞘形成に関与する内因性制御因子の賦活化および新たに開発したドラッグデリバリーシステムとを組み合わせ、髄鞘形成を介した神経再生誘導効果を検証することである。

3. 研究の方法

(1) グルココルチコイド及びGRによる髄鞘形成メカニズムの解明

分化段階の異なるシュワン細胞を採取し、GRがどの段階で発現変化を解析することで、

GRの作用時期を明らかにする。

分化促進に関与する因子であるNRG-1(未分化シュワン細胞への誘導)、Krox20、Oct6(髄鞘シュワン細胞への誘導)との相互作用を免疫沈降法で検索する。また、分化段階におけるMAPキナーゼ(p-ERK1/2, p-JNK1/2, p-p38)の発現変化も観察する。

GRを抗GR抗体で抑制した条件および、GRのプロモーターに転写因子を導入して、過剰発現させた条件下での髄鞘形成および成熟シュワン細胞の増殖数を観察する。

髄鞘形成の制御因子との相互作用を明らかにする。GRをノックダウンして促進因子および抑制因子のmRNA、タンパク量を測定する。

免疫系炎症系関連因子との作用を明らかにするため、グルココルチコイドの投与モデルを作製し、神経損傷後の坐骨神経を採取し、炎症性サイトカイン(IL-1、TNF、IL-10)の蛋白発現量をELISA法で解析し、シュワン細胞およびT細胞、マクロファージの細胞数を計測する。

ストレス関連タンパクNF- κ Bおよび向精神薬(SSRI, CRF拮抗薬)を投与して、髄鞘形成の変化をMBP, MAG, POの発現量をウエスタンブロットング法で解析する。

(2) 内因性制御因子の賦活化による髄鞘形成促進効果の検討

上記の系統的探索で解明した因子で修飾したシュワン細胞を合成する。まず、抑制因子をRNAi法で機能低下させたシュワン細胞を作製する。さらに、促進因子(協同的作用因子)を過剰発現させたシュワン細胞を作製する。

末梢神経欠損モデルの作製 ラット坐骨神経を10mm欠損させ、シリコン製のT型のチューブで欠損部を架橋させたモデルを作製する。外からシュワン細胞を反復投与が可能なようにポートを後頸部に埋め込む。遺伝子修飾したシュワン細胞をポートから投与する。

細胞投与後、経時的に髄鞘形成効果および末梢神経再生効果を運動機能評価、電気生理学的評価、形態学的評価、再生関連蛋白発現量の生化学評価を用いて行う。

(3)新たなドラッグデリバリーシステム開発による効果的薬物誘導法の検討

グルココルチコイドの作用を抑制する因子の RNAi を添加し、抑制した状態で、グルココルチコイドを投与し、髄鞘発現効果を解析する。

細胞の生存効果を高めるコラーゲンをチューブ内に充填して、細胞徐放効果を検討する。

生体溶解性材料（キトサン、ポリ乳酸）をチューブ材料として使用し、髄鞘形成効果を検討する。

液性因子（NGF, BDNF, GDNF）を脊髄内に投与し、神経細胞を賦活させた状態での効果を検討する。

4. 研究成果

(1) GR はシュワン細胞に存在し、CORT 濃度に応じて GR の蛍光強度が変化することが明らかになった。GR の髄鞘形成効果は、CORT を除去すると低下し、CORT を投与すると回復した。このことから、シュワン細胞に発現する GR は、血中の CORT 濃度に応答して髄鞘形成に関与していると考えた。

(2)末梢神経再生可視化の試みとして、ラマン顕微鏡に着目し、再生の評価法としての有用性を検討した。その結果、細胞レベルの検討：初代培養した後根神経節およびシュワン細胞を観察し、細胞に特有のピークを認めるか観察した。ラマン顕微鏡はLabRam ARAMIS (Horiba Jobin-Yvon)を使用した。組織レベルの検討：6週齢SDラットの正常な坐骨神経を採取し、長軸切片を作製し、ラマン顕微鏡で観察し、培養細胞のピークとの比較を行った。次に、5分間結紮した後、解除した圧挫損傷モデルを作製し、術後7, 14, 21, 28日目に末梢神経を摘出し、長軸切片を作製した。損

傷部から遠位5mmの部位をラマン顕微鏡で観察した。連続切片を免疫組織化学染色により、軸索、髄鞘のマーカーを使用し、ラマンのピーク変化との相違を比較検討した。

結果として、後根神経節およびシュワン細胞のピークは2886, 2940 cm^{-1} 、2851, 2889, 2909 cm^{-1} であり、異なるパターンを有していた。正常末梢神経から観察された波形は、培養細胞で観察されたピーク変化に依存した波形と一致した。損傷坐骨神経の経時的観察によると、着目した2853, 2885, 2940 cm^{-1} のピーク比が変化した。この変化は免疫組織化学染色の結果と類似した変化をしていた。

(図1, 2)

図1

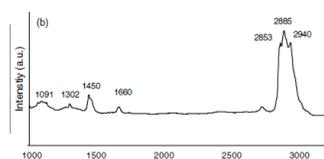
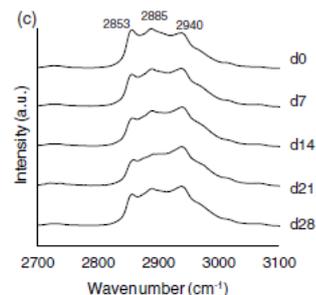


図2



以上の結果から、ラマン分光顕微鏡による非染色な観察により、末梢神経の細胞および組織から有用なピーク変化をとらえることができた。今後はより実用化できる撮影方法の工夫を行うことで、非侵襲的な画像診断法につながる可能性がある。

(3)末梢神経損傷後の局所における神経再生過程を非侵襲的に評価する試みとして、MRIの撮像法の一つである Diffusion Tensor Imaging (DTI)を用いた評価法を検討した。ラットの坐骨神経を圧挫損傷したのちに経時的にMRI撮像を行うと同時に、運動神経機能回復を toe spreading index を用いて評価

した。また、圧座損傷後の坐骨神経の組織学的評価を行い、DTI で得られたパラメータと運動神経機能回復、組織学的変化を比較検討した。その結果 DTI パラメータのうち FA は末梢神経損傷後早期に低下し、その後回復した。一方、 λ_{\perp} は損傷直後上昇し、その後低下した。(図 3, 4)

図 3

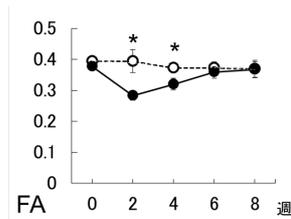
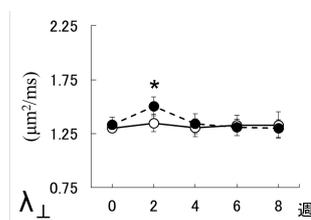


図 4



組織学的評価では末梢神経損傷後 8 週で軸索数は損傷前のレベルまで回復したが、髄鞘化軸索面積率は損傷前の値までは回復しなかった(図 5, 6)。

図 5

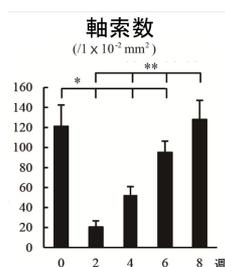
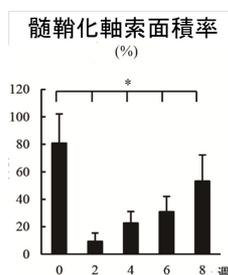


図 6



坐骨神経損傷後の運動神経の回復は、損傷作成後 6 週以降に認められた。FA は髄鞘数、髄鞘化軸索面積率と相関し、さらに運動機能

の指標で toe spreading index と相関を示した。以上の結果から、MRI の撮像法の 1 つである DTI は末梢神経損傷後の回復を非侵襲的に評価する方法として有用であることを示した。

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 12 件)

Inoue H, Arai Y, Kishida T, Terauchi R, Honjo K, Nakagawa S, Tsuchida S, Matsuki T, Ueshima K, Fujiwara H, Mazda O, Kubo T. Hydrostatic pressure influences HIF-2 alpha expression in chondrocytes. *Int J Mol Sci* 16 1043-1050 2015. 査読有

Matsuki T, Arai Y, Tsuchida S, Terauchi R, Oda R, Fujiwara H, Mazda O, Kubo T. Expression of connexin 43 in synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Arch Rheumatol epub* 2015. 査読有

Mizoshiri N, Mazda O, Kishida T, Yamamoto K, Shirai T, Terauchi R, Tsuchida S, Mori Y, Ejima A, Sato Y, Ara Y, Fujiwara H, Yamamoto T, Kanamura N, Kubo T. Transduction of Oct6 or Oct9 gene concomitant with Myc family gene induced osteoblast-like phenotypic conversion in normal human fibroblasts *Biochem Biophys Res Commun* 467 1110-1116 2015. 査読有

Kabuto Y, Morihara T, Sukenari T, Kida Y, Oda R, Arai Y, Sawada K, Matsuda K, Kawata M, Tabata Y, Fujiwara H, Kubo T. Stimulation of Rotator Cuff Repair by Sustained Release of Bone Morphogenetic Protein-7 Using a Gelatin Hydrogel Sheet. *Tissue Eng Part A*. 21 2015-33 2015. 査読有

Ikegami A, Ueshima K, Saito M, Ikoma K, Fujioka M, Hayashi S, Ishida M, Fujiwara H, Mazda O, Kubo T. Femoral perfusion after pulsed electromagnetic field stimulation in a steroid-induced osteonecrosis model. *Bioelectromagnetics* 36 349-57 2015.

査読有

Yamasaki T, Fujiwara H, Oda R, Mikami Y, Ikeda T, Nagae M, Shirai T, Morisaki S, Ikoma K, Masugi-Tokita M, Yamada K, Kawata M, Kubo T. In vivo evaluation of rabbit sciatic nerve regeneration with diffusion tensor imaging (DTI): correlations with histology and behavior. *Magn Reson Imaging*. 33 91-101 2015. 査読有

Oda R, Taniguchi D, Fujiwara H, Toyama S, Tokunaga D, Kubo T. Function Assessment for Rheumatoid Thumb Deformity. *Rheumatology and Autoimmune Diseases*. 5 92-95 2015. 査読有

Ishibashi H, Tonomura H, Ikeda T, Nagae M, Sakata M, Fujiwara H, Tanida T, Mastuda KI, Kawata M, Kubo T. Hepatocyte growth factor/c-met promotes proliferation, suppresses apoptosis, and improves matrix metabolism in rabbit nucleus pulposus cells in vitro. *J Orthop Res*. 467(4) 2015 査読有

Inoue H, Arai Y, Kishida T, Shin-Ya M, Terauchi R, Nakagawa S, Saito M, Tsuchida S, Inoue A, Shirai T, Fujiwara H, Mazda O, Kubo T. Sonoporation-mediated transduction of siRNA ameliorated experimental arthritis using 3 MHz pulsed ultrasound. *Ultrasonics* 54(3)

p.874-881 2014 査読有

Fujiwara H, Oda R, Morisaki S, Ikoma K, Kubo T. Long-Term Results of Vascularized Bone Graft for Stage III Kienböck Disease. *J Hand Surg Am* 38 p.904-908 2013 査読有

Fujiwara H, Oda R, Kubo T. Re-evaluation of stress radiographic findings for preoperative diagnosis of Stener lesion. *J Hand Surg Eur* 38(8) p906-907 2013 査読有

Ikoma K, Kido M, Nagae M, Ikeda T, Shirai T, Ueshima K, Arai Y, Oda R, Fujiwara H, Kubo T. Effects of stress-shielding on the dynamic viscoelasticity and ordering of the collagen fibers in rabbit Achilles tendon. *J Orthop Res* 31(11) p.1708-1712 2013 査読有

[学会発表](計 9件)

Yamasaki T, Ikoma K, Oda R, Fujiwara H, Kubo T. The change of activity in central nervous system after peripheral nerve injury; the functional MRI study. 61th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society Las Vegas, U.S.A 2015.3.30-31.

市丸宏三, 藤原浩芳, 勝見 泰和, 久保俊一. 直流電気刺激による末梢神経再生因子の解析 第42回日本生体電気物理刺激研究会 東京慈恵会医科大学(東京都港区) 2015.3.14.

Fujiwara H, Oda R, Asada M, Tsuchida S, Yamada M, Okada N, Katsumi Y, Kubo T. A case of cubital tunnel syndrome caused by mucopolysaccharidosis type I The 24th Japanese-Korean Combined Orthopaedic Symposium Hakone, The Prince Hakone (hakone-machi Kanagawa)

2014.6.6

山崎哲朗, 小田 良, 藤原浩芳, 土田真嗣, 久保俊一. 家兔末梢神経損傷モデルにおける拡散テンソル法を用いた in vivo 末梢神経再生の評価 第 57 回日本手外科学会学術集会沖縄コンベンションセンター ラグナガーデンホテル (沖縄県 那覇市) 2014.04.17

市丸宏三, 小田 良, 藤原浩芳. 直流電気刺激による軸索再生促進効果の分子機構解析 第 41 回日本生体電気物理刺激研究会 横浜シンポジア (神奈川県横浜市) 2014.4.5.

市丸宏三, 藤原浩芳, 森崎真介, 小田 良, 金谷文則, 久保俊一. 直流電気刺激による軸索再生促進効果の分子機構解析 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集會幕張メッセ (千葉県 千葉市) 2013.10.17

Morisaki S, Ota C, Matsuda K, Fujiwara H, Oda R, Kubo T, Kawata M. Application of Raman spectroscopy for visualizing biochemical changes during peripheral nerve injury in vitro and in vivo. Neuroscience 2013 San Diego, USA 2013.11.9-11.13

山崎哲朗, 藤原浩芳, 小田 良, 森崎真介, 祐成 毅, 原佑 輔, 林 成樹, 生駒和也, 久保俊一. 家兔末梢神経損傷モデルにおける拡散テンソル法を用いた in vivo 末梢神経再生の評価 組織学的評価および運動機能評価との検討 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集會幕張メッセ (千葉県 千葉市) 2013.10.17

森崎真介, 藤原浩芳, 小田 良, 山崎哲朗, 勝見泰和, 久保俊一. ラマン分光顕微鏡による末梢神経の再生評価 第 24 回日本末梢神経学会学術集會朱鷺メッセ (新潟県 新潟市) 2013.8.23

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組

(1) 研究代表者

藤原 浩芳 (FUJIWARA HIROYOSHI)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号: 90381962

(2) 研究分担者

小田 良 (ODA RYO)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号: 80516469

徳永 大作 (TOKUNAGA DAISAKU)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号: 90343409

(3) 連携研究者

()

研究者番号: