

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25430002

研究課題名(和文)リン脂質の細胞膜内ダイナミクスによる末梢神経軸索伸長の制御

研究課題名(英文)Regulation of peripheral axon elongation by membrane phospholipid dynamics

研究代表者

長谷川 潤 (Hasegawa, Hiroshi)

神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：10332230

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)：本研究では、細胞膜リン脂質の一種であるホスファチジルエタノールアミン(PE)の細胞膜内動態が、末梢神経細胞の軸索再生を制御する機構を明らかにするために解析を行ってきた。初代培養神経細胞を用いた実験より、細胞内カルシウム濃度の上昇がPEの細胞膜内移動を制御し、軸索の伸長を誘導することを示唆する知見を得た。また、細胞膜リン脂質に結合するMatrix metalloproteinaseの制御因子であるTissue inhibitor of metalloproteinase (Timp)の発現を検討し、末梢神経損傷ではTimp-3サブタイプが、脳梗塞ではTimp-1の発現が上昇することを見出した。

研究成果の概要(英文)：In this research, we have investigated the functional roles and molecular mechanisms of intramembranous movement of phosphatidylethanolamine (PE) in cellular membrane on axon regeneration of peripheral nerve. In primary cell culture experiments, we revealed that intracellular calcium upregulation is a critical mediator for the intramembranous movement of PE. In addition, we have investigated the expression of tissue inhibitor of metalloproteinase (Timp) family proteins, which are regulators of matrix metalloproteinases and bind to membrane phospholipid. The results indicated that Timp-3 is upregulated in peripheral axon injury, although Timp-1 is specifically upregulated in brain ischemic stroke.

研究分野：衛生薬学

キーワード：細胞膜脂質 神経突起

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の中樞神経系においては、軸索が損傷を受けた後、軸索再生を行うことが困難である。この理由としては、中樞神経系の軸索損傷の場合は、アストロサイトがグリア瘢痕と呼ばれる凝集塊を作り、それが軸索伸長を阻害するという細胞外環境に起因するもの（外因性の理由）と、神経細胞それ自体が軸索再生能を失っているという内因性の理由の両者が挙げられる。外因性の理由については数多くの研究がなされており、それを取り除く手法の開発も進んでいる。しかし、内因性の理由については、MAP キナーゼの関与など一部知られてはいるが、多くの点でまだ不明のまま残っている。

中樞神経系とは異なり末梢神経系においては、損傷を受けても軸索の再生が起きる。末梢神経系の軸索再生を司る分子メカニズムを理解することで、中樞神経系の軸索がなぜ再生をおこすことができないか、という現代医療の大きな問題を理解することに有用であり、将来的には中樞神経系の軸索損傷に対する治療法の開発に寄与するものであると考えられる。

我々は、それまでに科学研究費補助金にサポートしていただいた研究（研究課題番号：23700365）により、神経軸索伸長に関わる細胞膜リン脂質ホスファチジルエタノールアミン（PE）の役割を検討してきた。この中で我々は、マウス胎児より単離した海馬培養神経細胞を用い、神経突起伸長に PE の細胞膜内運動が必要であることを見出していた。

2. 研究の目的

上記の背景をベースとして本研究では、末梢神経の軸索伸長、特に神経軸索損傷時の軸索再生に PE がどのように関与するかを明らかにすることを目的として検討を行った。また、PE の細胞膜内局在を人為的に制御するための新たな手法の開発を目的として、Tissue inhibitor of metalloproteinase (Timp) ファミリーの発現と役割について検討を行った。

3. 研究の方法

(1) マウスより脊髄後根神経節（DRG）の神経細胞を初代培養し、軸索の伸長する際の成長円錐における PE の局在を検討することを試みた。

(2) マウス個体を用い、末梢神経の損傷モデルとして坐骨神経損傷モデル、また中樞神経系のモデルとして脳損傷モデルおよび脳梗塞モデルを作製し、病態からの回復時における PE の役割について検討することを試みた。

(3) (2) と同様にマウスの神経軸索損傷モデルを用い、Timp ファミリーの発現を解析し、Timp ファミリーの役割について明らかにすることを試みた。

4. 研究成果

(1) マウス胎児より DRG 神経細胞を初代培養し、伸長中の神経軸索における PE の挙動を可視化することを試みた。しかし、はっきりした成長円錐を見るための安定した結果を得ることができず、様々な培養条件を検討したが、結論を得られるまでには至らなかった。そのため、初代培養海馬神経細胞を用いて、どのようなガイダンス分子が PE の細胞膜内動態を制御するかを検討した。その結果、細胞内カルシウム濃度の上昇を引き起こすガイダンス分子が、PE の細胞膜内の移動を介して軸索の伸長を制御している可能性を見出すことができた。

(2) マウス個体を用いた神経損傷モデルの確立を行った。最初に坐骨神経挫滅モデルの作製を行ったが、これは挫滅部位の同定と神経軸索の再生を明確に可視化することが困難であり、炎症反応の同定のみに用いることとした。代替りのモデルとして、坐骨神経の完全切断 - 再縫合モデルを立ち上げた。本モデルでは、損傷部位が確実に分かり、軸索の再生もきちんと可視化できることがわかった。また炎症の状況も、免疫蛍光染色法や real time RT-PCR 法にて追跡できることを確認した。この系を用いて、細胞膜外層の PE を可視化しようとしたが、バックグラウンドレベルが高く、成長円錐の PE を選択的に検出することが困難であった。また、中樞神経系損傷のモデルとして、脳損傷モデル、脳梗塞モデルを作製する方法を確立した。これらのモデルにおいて神経軸索伸長のマーカー抗体での免疫抗体染色を行ったが、染色像が得られなかった。これらの系における神経軸索の再伸長と PE の局在解析は、現在も検討を継続している。

(3) 細胞膜リン脂質である PE の細胞膜内動態が神経軸索の伸長に果たす役割を解析する上で、PE の細胞膜内での移動を人為的に制御する手法は必須であるが、これまでそのような方法は開発されていない。過去の論文から、Matrix metalloproteinase (MMP) が細胞膜リン脂質に直接結合すること、その結合は Timp ファミリータンパク質にて競合することが示されていた^{1,2}。そこで、PE の細胞膜内の移動を人為的に制御する手法を開発すること、また実際に個体レベルでそのようなことが起きている可能性を考慮し、神経損傷部位に Timp ファミリーの発現が見られるかを検討した。その結果、坐骨神経損傷モデルにおいては Timp-3 が、脳梗塞モデルにおいては Timp-1 の発現が損傷後に増加することを見出した。また坐骨神経損傷モデルにおいて Timp-3 のリコンビナントペプチドを適用することにより、神経軸索の再伸長がどのように変化するかを解析したところ、このペ

プチドの適用により神経軸索の再伸長が阻害されることがわかった。従って、Timp-3は神経軸索損傷後の再生を制御する分子であると考えられた。

<引用文献>

1. Medina et al., Binding of novel peptide inhibitors of type IV collagenases to phospholipid membranes and use in liposome targeting to tumor cells in vitro: *Cancer Res.* 2001; 61: 3978.

2. Koppiseti et al.: Ambidextrous binding of cell and membrane bilayers by soluble matrix metalloproteinase-12: *Nat Commun.* 2014; 5: 5552.

Doi: 10.1038/ncomms6552.

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8件)

Minagawa K, Hasegawa H.: Membrane phospholipid signaling for the regulation of cytoskeleton in neurons: *Int Med Rev.* 2017; 3.
Doi: 10.18103/imr.v3i2.354.

Miura Y, Ngo Thai Bich V, Furuya M, Hasegawa H., Takahashi S, Katagiri N, Hongu T, Funakoshi Y, Ohbayashi N, Kanaho Y.: The small G protein Arf6 expressed in keratinocytes by HGF stimulation is a regulator for skin wound healing: *Sci Rep.* 2017; 7: 46649.
Doi: 10.1038/srep46649.

Okada R, Yamauchi Y, Hongu T, Funakoshi Y, Ohbayashi N, Hasegawa H., Kanaho Y.: Activation of the Small G Protein Arf6 by Dynamin2 through Guanine Nucleotide Exchange Factors in Endocytosis: *Sci Rep.* 2015; 5: 14919.
Doi: 10.1038/srep14919.

Hongu T, Funakoshi Y, Fukuhara S, Suzuki T, Sakimoto S, Takakura N, Ema M, Takahashi S, Itoh S, Kato M, Hasegawa H., Mochizuki N, Kanaho Y.: Arf6 regulates tumour angiogenesis and growth through HGF-induced endothelial $\beta 1$ integrin recycling: *Nat Commun.* 2015; 6: 7925.
Doi: 10.1038/ncomms8925.

Teng S, Stegner D, Chen Q, Hongu T, Hasegawa H., Chen L, Kanaho Y., Nieswandt B, Frohman MA, Huang P.:

Phospholipase D1 facilitates second-phase myoblast fusion and skeletal muscle regeneration: *Mol Biol Cell.* 2015; 26: 506.
Doi: 10.1091/mbc.E14-03-0802.

Akiyama M, Hasegawa H., Hongu T, Frohman MA, Harada A, Sakagami H, Kanaho Y.: Trans-regulation of oligodendrocyte myelination by neurons through small GTPase Arf6-regulated secretion of fibroblast growth factor-2: *Nat Commun.* 2014; 5: 4744.
Doi: 10.1038/ncomms5744.

Nguyen TT, Kim YM, Kim TD, Le OT, Kim JJ, Kang HC, Hasegawa H., Kanaho Y., Jou I, Lee SY.: Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase α facilitates Toll-like receptor 4-mediated microglial inflammation through regulation of the Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adaptor protein (TIRAP) location: *J Biol Chem.* 2013; 288: 5645.
Doi: 10.1074/jbc.M112.410126.

Hasegawa H., Noguchi J, Yamashita M, Okada R, Sugimoto R, Furuya M, Unoki T, Funakoshi Y, Baba T, Kanaho Y.: Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase is indispensable for mouse spermatogenesis: *Biol Reprod.* 2012; 86: 136.
Doi: 10.1095/biolreprod.110.089896.

[学会発表](計14件)

鎌尾まや, 川本実穂, 倉本舞, 持田七瀬, 中村友紀, 岡野登志夫, 長谷川潤: ビタミンD受容体およびビタミンD活性化酵素遺伝子欠損マウスの生殖機能低下に及ぼすカルシウム補充の影響: 日本薬学会 第137年会, 2017年3月27日, 仙台

中川公恵, 泰井麻由奈, 横田衣利, 原香織, 三宅智子, 澤田夏美, 須田義智, 岡野登志夫, 長谷川潤: 脳特異的ビタミンK2合成酵素 UBIAD1 欠損マウスの脳機能解析: 日本薬学会 第137年会, 2017年3月27日, 仙台

鈴木篤史, 正木美有, 鎌尾まや, 中川公恵, 瀬木 - 西田恵里, 長谷川潤: 妊娠期における Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)ファミリーの発現: 日本薬学会 第137年会, 2017年3月26日, 仙台

廣野順介, 川口貴美乃, 鈴木篤史, 長谷

川潤：末梢神経損傷の損傷部位における血管内皮細胞の集積と役割：フォーラム 2016 衛生薬学・環境トキシコロジー，2016 年 9 月 10 日，東京

鎌尾まや，山村翔太，神谷有紀，長尾真里，佐方俊介，岡野登志夫，長谷川潤：ビタミン D 受容体欠損マウスの生殖機能不全に及ぼす高カルシウム食の影響：日本ビタミン学会 第 68 回大会 2016 年 6 月 17～18 日，富山

Hasegawa H. : TGF- β signaling pathway regulating peripheral nerve regeneration : Annual retreat 2015, Center for Complex Biological Systems, 2015 年 3 月 27 日，Los Angeles,

Hasegawa H. : Functional significance of blood vessel endothelial cells in peripheral nerve injury : 2nd International Symposium of Neurovascular Wiring, 2015 年 1 月 28 日，京都

岡田理沙，長谷川潤，金保安則：クラスリン依存的エンドサイトーシスにおける低分子量 G 蛋白質 Arf6 の新規な活性化メカニズム：ダイナミンによる GEF を介した Arf6 の活性化：第 87 回 日本生化学会大会 2014 年 10 月 17 日，京都

三浦悠樹，本宮綱記，船越祐司，長谷川潤，金保安則：ACAP3 は Arf6 特異的な GAP であり、海馬ニューロンにおける神経突起形成を制御する：第 65 回 日本細胞生物学会大会 2013 年 6 月 21 日，ウイנקあいち(名古屋)

喜多紗斗美，堀江一郎，長谷川潤，金保安則，岩本隆宏：圧負荷誘発性心肥大における PIP5 キナーゼ α の関与：第 86 回 日本薬理学会年会，2013 年 3 月 22 日，福岡国際会議場（福岡）

長谷川潤，金井友佑，本宮綱記，金保安則：マウス生殖細胞における低分子量 G 蛋白質 Arf6 シグナルの役割：第 85 回 日本生化学会大会：2012 年 12 月 16 日，福岡国際会議場（福岡）

秋山雅博，本宮綱記，阪上洋行，塩坂貞夫，影山龍一郎，長谷川潤，金保安則：Defect of axon myelination in the central nervous system of the small G protein Arf6 knockout mice：第 85 回 日本生化学会大会，2012 年 12 月 16 日，福岡国際会議場（福岡）

長谷川潤，鷓木隆光，松田伸爾，掛川渉，柚崎通介，金保安則：NMDA 受容体による脂質キナーゼ PIP5K の活性化は、LTD における AMPA 受容体のエンドサイトーシスに必須である：第 35 回 日本神経科学大会，2012 年 9 月 18 日，名古屋国際会議場（名古屋）

Hasegawa H, Kanai Y, Hongu T, Kanaho Y. : Requirement of ADP-ribosylation factor 6 for the development of mouse germ cells : Joint meeting of the 45th annual meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & the 64th annual meeting of the Japan Society for Cell Biology, 2012 年 5 月 31 日，神戸国際会議場（神戸）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 潤 (HASEGAWA, Hiroshi)
神戸薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：10332230

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

金保 安則 (KANAHO, Yasunori)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：00214437

(4) 研究協力者

鈴木 篤史 (SUZUKI, Atsushi)