

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861312

研究課題名(和文)末梢神経再生における骨代謝関連因子の検討

研究課題名(英文) Examination of the expression and localization of the Bone Morphogenetic proteins during peripheral nerve regeneration.

研究代表者

國分 直樹 (Kokubu, Naoki)

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40632378

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ラット坐骨神経軸索断裂モデルを用いた検討より、末梢神経損傷後早期のSchwann cellにおけるBMP-7/Smadシグナルの活性化と、in vitroでのBMP7のSchwann cellに対する細胞増殖能の増強作用が確認された。また同モデルに対するPTH(1-34)投与にて、電気生理学的に末梢神経損傷後の優位なMCVの改善を認め、in vitroでPTH(1-34)投与によりSchwann細胞でのBMP7の発現増大が確認された。本研究の結果からBMP7、PTH(1-34)が骨代謝の分野だけでなく末梢神経再生においてもSchwann cellを介し作用することが確認された。

研究成果の概要(英文)：The peripheral nerve injury made the significant up-regulation of BMP7/Smad signaling in the axon-Schwann cell units at the distal to the injured site. in vitro study demonstrated that cell viability of Schwann Cells(SCs) was significantly increased by administration of BMP7. Also by PTH(1-34) administration, electrophysiological studies showed the advantage of improvement of MCV after peripheral nerve injury. Furthermore, in vitro study, the Expression of BMP7 in SCs was significantly increased by administration of PTH(1-34). From these results, re-expressed BMP7/Smad signal can indirectly function in axonal regeneration as a neurotrophic growth factor for SCs, and suggested that PTH(1-34) is not only acting on bone metabolism, and is involved in peripheral nerve regeneration through SCs.

研究分野：末梢神経

キーワード：BMP 末梢神経再生 Schwann cell

### 1. 研究開始当初の背景

中枢神経系と異なり末梢神経系は再生能力を有するが、臨床的には軸索伸長速度や終末奏功器の変性などの阻害因子により十分な回復が得られないのが現状であり、軸索伸長の誘導は極めて重要な研究課題である。

Bone Morphogenetic Proteins(BMPs)はTGF-スーパーファミリーの最大の構成要素であり、これまでに20種類以上のメンバーが同定されている。BMPsは強力な骨誘導能を有し、すでに偽関節治療や骨組織再生に海外では使用されており、rh-BMP2、rh-BMP7が製品化されている。そのほかにも様々な組織の発生・分化・再生に重要とされ、中枢神経系においても発生における主要な調節因子であることが示されており、中枢神経損傷時の再発現、神経保護作用も報告されている。しかし末梢神経系におけるBMPsの作用に関する報告は少ない。我々は以前にRatの坐骨神経切断後に末梢神経におけるBMP7、BMP receptors(BMPRs)の発現増大を確認した。本研究の目的は、末梢神経再生の過程におけるBMP7の発現を評価し、末梢神経再生におけるBMP7の作用を検討することである。

### 2. 研究の目的

中枢神経系と同様に、末梢神経系においてもBMPsは神経再生に関与している可能性は高い。以前の研究で、坐骨神経切断後に末梢神経変性部のSchwann細胞におけるBMP7の発現増大を確認した。BMP7は中枢神経系において神経保護作用、神経栄養因子の作用増強などが報告されており、末梢神経系でも同様にBMP7はSchwann細胞に作用し軸索伸長に関与している可能性があると考えた。また骨形成促進薬 parathyroid hormone(PTH)(1-34)は骨代謝領域では、BMPシグナルを介した骨芽細胞分化の制御が報告されているが、PTH receptorは骨だけでなく様々な組織での発現が確認されており、DRGやSchwann細胞での発現の報告もある。PTH related proteinが末梢神経損傷後にSchwann細胞を介し神経再生に関与するとの報告もあり、PTH(1-34)が骨だけでなく末梢神経系に作用することが推測される。本研究では末梢神経再生の過程におけるBMP7シグナルの発現変化・局在、および機能の解析と、末梢神経再生におけるPTH(1-34)投与によるBMP発現の変化、及び軸索再生への効果を検討した。

### 3. 研究の方法

\* in vivo

SDラットを用い、血管クリップ(150N)にて坐骨神経を坐骨切痕部で5分間クランプすることで軸索断裂モデルを作成した。正常群、Sham手術群、軸索断裂群にわけ、術後1週、2週、4週、8週で坐骨神経を採取し、BMP7、BMPRs、Smad、およびBMP7のantagonist

であるNogginの発現を免疫組織学的、Western blotting(WB)、real-time PCRにてそれぞれ評価した。またSciatic functional index(SFI)を用いてモデルの運動機能回復を評価した。

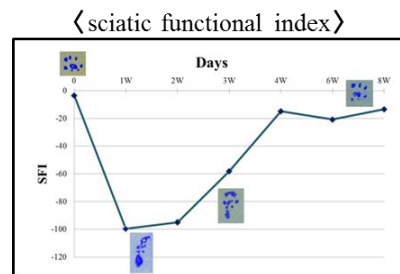
SDラットを用い、PTH(1-34)を30 $\mu$ g/kg、3回/週投与したPTH投与群(A群)、非投与群(B群)でそれぞれ術後1,2,3,4週の坐骨神経のMCVを測定し軸索再生の評価を行った。

\* in vitro

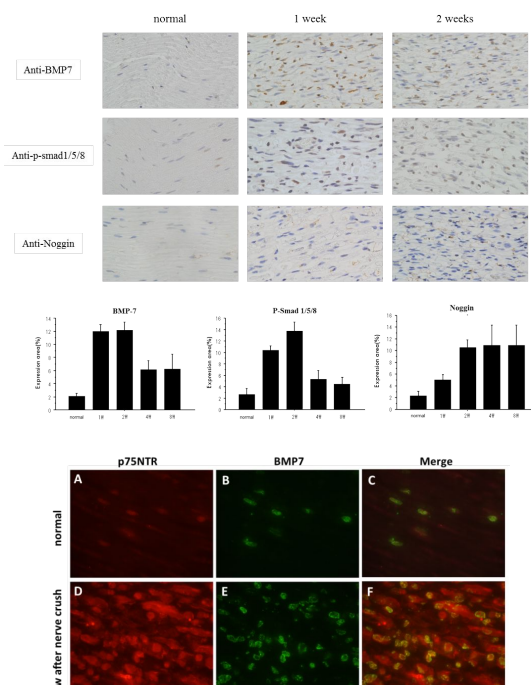
rat Schwann細胞を用い、BMP7投与(10,50,100ng/ml)の影響をMTS assayにて評価した。

rat Schwann細胞を用い、PTH(1-34)投与( $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ M)によるBMP7の発現変化を免疫組織学的、WBにて評価した。

### 4. 研究成果

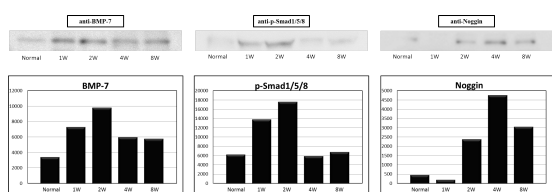


本モデルにおける軸索断裂後の機能回復はSFIの結果から、正常-3.48から術後1週:-99.6、4週:-20.8、8週-13.4と機能回復が確認された。

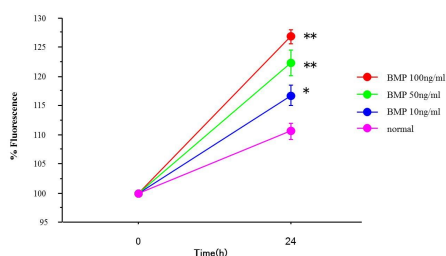


正常群、Sham 群での BMP7、BMPRs の発現はわずかであったが、軸索断裂群では BMP7、BMPRs の発現は免疫組織学的に術後 1 週、2 週で損傷部にて優位に増大し、機能回復が得られる 4 週以後に減少した。同様に BMP シグナルに下流である p-Smad1/5/8 も軸索断裂後に発現増大を認め、局在も酷似していた。また二重免疫染色にて BMP-7 は P75NTR の発現部位と一致し、末梢神経損傷後に脱分化した Schwann 細胞での発現が確認された。

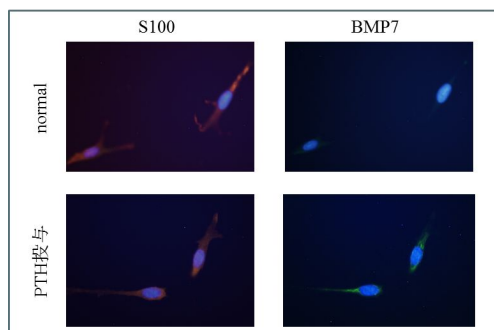
一方で Noggin は BMP/smud の発現より遅れて軸索断裂後 2 週より発現増大を認め、機能回復が得られる 8 週まで発現が維持された。



MCV は術前平均 55.4m/s, 術後は両群ともに術後 2 週までは測定不能であった。術後 3 週で B 群は全例測定不能であったが、A 群は 2/5 例で測定可能であり(平均 25m/s), 術後 4 週で A 群平均: 48.6m/s, B 群平均 32.8m/s と PTH 投与群で優位な改善を認めた。



MTS assay の結果では非添加群と比較して BMP7 添加群では 24 時間後より濃度依存性に SC の優位な増加を認めた。



免疫組織学的に PTH 投与群で Schwann 細胞における BMP7 の発現増強が確認された。同様に WB の結果からはも正常群と比較し、PTH 投与群において BMP7 の Schwann 細胞に

おける発現増大を認めた。

#### 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 4 件)

1. 萩 智仁, 辻井 雅也, 植村 剛, 國分直樹, 横山 弘和, 須藤 啓広 肩関節鏡視下滑膜切除の術直後に高K血症を認めた透析患者の1例 中部日本整形外科学会雑誌 57(3):561-562, 2014 査読有
2. 長尾 信人, 辻井 雅也, 植村 剛, 國分直樹, 横山 弘和, 須藤 啓広 足関節内果皮瘡潰瘍に対して後脛骨動脈穿通枝皮弁を用いて再建した1例 中部日本整形外科学会雑誌 57(2):357-358, 2014 査読有
3. 植村 剛, 辻井 雅也, 國分直樹, 飯田 竜, 平田 仁, 須藤 啓広 MRI を用いた尺骨動脈と有鉤骨鉤の解剖学的検討 中部日本整形外科学会雑誌 56(6):1371-1372, 2013 査読有
4. 植村 剛, 辻井 雅也, 里中 東彦, 國分直樹, 須藤 啓広 上腕骨外顆骨折変形治療に対し矯正骨切り術を施行した1例 中部日本整形外科学会雑誌 56(3):553-554, 2013 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

1. Naoki Kokubu, Masaya Tsujii, Takahiro Iino, Hirokazu Yokoyama, Akihiro Sudo. Involvement of BMP7/Smad signal in de-differentiated Schwann cells during peripheral nerve regeneration after nerve injury. 2015 Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. 2015 年 3 月 28-31 日, Las Vegas, USA
2. 國分直樹, 辻井雅也, 横山弘一, 飯野隆大, 明田浩司, 須藤啓広 末梢神経再生における BMP7 および BMP/smud シグナルの発現変化と局在の検討. 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2014 年 10 月 9-10 日 城山観光ホテル 鹿児島
3. 國分直樹, 辻井雅也, 植村剛, 平田仁, 須藤啓広. 末梢神経再生における Bone Morphogenetic Protein-7 の発現変化と局在. 第 57 回日本手外科学会学術集会. 2014 年 4 月 17-18 日 沖縄コンベンションセンター 沖縄
4. Naoki Kokubu, Masaya Tsujii, Takahiro Iino, Akihiro Sudo. Examination of the expression and localization of the Bone Morphogenetic protein- 7 in peripheral nerve regeneration. 2014 Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. 2014 年 3 月 15-18 日, New Orleans. USA

5. 國分直樹, 辻井雅也, 横山弘和, 里中東彦, 森田哲正, 須藤啓広 ラット坐骨神経挫滅モデルにおける BMPs 発現と局在の検討. 日本マイクロサージャリー学会 40 周年記念学術集会 2013 年 9 月 26-28 日, 盛岡市民文化ホール 盛岡

〔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:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

國分 直樹 (Kokubu Naoki)  
三重大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 40632378

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

辻井 雅也 (Tujii, Masaya)  
三重大学・医学系研究科・助教  
研究者番号: 40444442  
飯野 隆大 (IINO, Takahiro)  
三重大学・医学系研究科・技術補佐員  
研究者番号: 80626119  
須藤 啓広 (Sudo, Akihiro)  
三重大学・医学系研究科・教授  
研究者番号: 60196904