

研究課題名：運動・知覚神経と筋との双方向再接続技術に関する研究

所属研究機関名：独立行政法人 産業技術総合研究所

研究者氏名：藤森 一浩

・研究計画の概要

研究の趣旨・目的

人間の滑らかで強動的な運動は、運動神経による動作の指令と、筋からのフィードバック情報による動作の制御が重要な働きをしている。すなわち、運動神経、骨格筋、筋知覚神経、筋紡錘、そしてさらに上位の中枢を含めた機能的なネットワークが協働してはじめて我々の随意運動が可能になる。したがって、事故や病気によって末梢神経末に障害を受けた場合、運動神経のみならず筋知覚神経も同様に再建する必要がある。そもそも発生過程において、筋知覚神経がどのような分子メカニズムによって末梢の標的である筋紡錘へと軸索を伸長し、シナプスを形成するのかまったく明らかにされていないのが筋知覚神経研究の現状である。そこで本研究課題では、中枢から末梢へいたる遠心性運動神経軸索の再接続・末梢から中枢へいたる求心性知覚神経の再接続、さらには我々の随意運動の中枢である大脳皮質脊髄路神経の機能的再建まで見据えて、システムとしての運動機能の再建、すなわち運動・知覚神経と筋との双方向再接続を可能にする技術の開発を最終的なゴールと位置付けて研究を行った。

研究計画の概要

筋知覚神経の軸索伸長因子を探索するためには、筋知覚神経軸索の伸長を生物学的に評価する系が必要である。将来の創薬を視野に入れ、再現性、定量性、簡便性を考慮した結果、細胞接着性ではなく可溶性リガンドによる作用としての軸索伸長を評価できる系、すなわち細胞塊をカラーゲル中に浮遊させた状態でトラップし、培養する3次元培養法が適用できるかどうか検討する。さらに、この培養系を用いて、当研究室がこれまでに運動神経・大脳神経軸索伸長因子としてすでに同定している2種の新規神経軸索伸長因子 Neurocrescin, MDP77あるいは活性を有する部分ペプチドがこの評価系において知覚神経軸索に対して伸長活性があるかどうかを検討する。用いる細胞種は実験の利便性を考え、ニワトリ胚を用いることとする。さらに、Neurocrescin, MDP77と同様のストラテジで Rauvalaらによって発見されたヘパリン結合性軸索伸長因子 Pleiotrophin, Amphoterin をクローニングし、大腸菌リコンビナントタンパクあるいは真核細胞を用いた糖鎖付加のあるリコンビナントタンパクとして調製する。これらのリコンビナントの筋知覚神経軸索に対する伸長活性を新たに開発した筋知覚神経培養系を用いて評価する。MDP77に関しては生化学的あるいは分子生物学的にまだ十分な解析が行われていなかったため、MDP77の特異性の高い部分配列をリコンビナントタンパクとして大量調製し、これを抗原として特異的抗体を作製する。この抗体を用いて MDP77 の組織分布、細胞分布、およびその発生に伴う変化について詳細に生化学的・免疫組織化学的な検討を行う。筋ホモジネートを作製し、さまざまなアフィニティクロマトグラフィーを用いて可溶性分画を調製し、評価系を用いて分画中の軸索伸長活性を評価する。ソースとしては量的に大量に調製できるヒヨコあるいはニワトリ胚の脚部および胸部骨格筋を用いる。さらに、筋知覚神経軸索伸長活性はすでに確立された細胞株(不死化細胞)に多く含まれている可能性があるため、よく用いられている Hela, HEK, COS, L6, C2C12 などの株細胞培養上清を調製し、筋知覚神経軸索伸長活性を測定する。筋知覚神経軸索伸長因子の生化学的単離・同定を行うために、生化学的解析を行い、この分子が NT-3 であるか、あるいは既知であるがこれまで活性の知られていない蛋白質であるか、新規の蛋白質であるかを検討する。アフィニティクロマトグラフィーによって目的蛋白質、およびそのトリプシン消化産物に対してフラグメントのN末アミノ酸配列を決定し、その分子が既知か未知であるかを判断する。さらに、このアミノ酸配列を元に作製したプライマーを用いて、筋知覚神経タンパクを調製した組織のcDNAライブラリーより目的の遺伝子をクローニングする。この遺伝子よりリコンビナント蛋白質を調製し、その蛋白質に筋知覚神経軸索伸長活性があるかどうかを再評価する。

研究計画の詳細報告

(単位：百万円)

研究項目	所要経費			
	H12 年度	H13 年度	H14 年度	合計
<p>1. 筋知覚神経軸索伸長評価のための選択的培養法の開発と既知神経軸索伸長因子の活性評価</p> <p>(1) 各種培養法の検討</p> <p>(2) NC, MDP77 の筋知覚神経軸索伸長活性の検討</p> <p>(3) Heparin 結合性軸索伸長因子のクローニングとリコンビナント蛋白質の作製、および筋知覚神経軸索伸長活性の検討</p>	<p>← 3.450 →</p>			3.450
	<p>← 4.228 →</p>			4.228
	<p>← 6.319 →</p>	<p>← 1.255 →</p>		7.574
<p>2. 筋知覚神経軸索伸長因子の探索</p> <p>(1) 筋組織より抽出した蛋白質成分の各種アフィニティークロマトによる分離法の検討</p> <p>(2) 各分画における筋知覚神経軸索伸長因子活性の評価</p> <p>(3) 筋芽細胞株を用いた軸索伸長因子の探索</p> <p>(4) MDP77 特異的抗体の作製と抗体を用いた生化学的・免疫組織化学的解析</p>		<p>← 3.921 →</p>		3.921
		<p>← 2.715 →</p>		2.715
		<p>← 1.800 →</p>	<p>← 1.615 →</p>	3.415
		<p>← 3.121 →</p>	<p>← 2.814 →</p>	5.935
<p>3. 筋芽細胞由来知覚神経軸索伸長因子 MDAPP の解析</p> <p>(1) MDAPP の調製と知覚神経軸索伸長活性の評価</p> <p>(2) MDAPP の生化学的精製法の検討</p> <p>(3) MDAPP の N 末アミノ酸解析</p>		<p>← 1.899 →</p>	<p>← 2.252 →</p>	4.151
			<p>← 4.075 →</p>	4.075
			<p>← 3.325 →</p>	3.325
<p>所要経費 (合計) (管理費を含む)</p>	13.997	14.711	14.081	42.789

・研究成果の概要

研究成果の概要

筋知覚神経の軸索伸長活性を評価するために、新たにコラーゲンゲル内培養法を用いた評価系を確立した。この培養法ではふ卵5日目～14日目までのニワトリ胚後根神経節を取り出し、コラーゲンゲルの中に浮遊させ培養を行うため、従来の平面培養法と比べて、細胞接着性には依存せずに可溶性リガンドに対してのみ伸長突起活性を示すという特性がある。これによって、細胞接着性因子の関与の可能性を排除することが可能になった。この評価系を用いて、これまで当研究室で発見している新規蛋白質 Neurocrescin および MDP77 の筋知覚神経に対する軸索伸長活性を調べたところ Neurocrescin, MDP77 が中枢および脊髄運動神経に対しては顕著な軸索伸長活性を示すのと対照的に、知覚神経に対しては伸長活性を示さないことが明らかになった。これらの結果が示すことは運動神経には運動神経のための、知覚神経には知覚神経のための軸索伸長因子が必要であるということであった。そのため、細胞接着性ではなく可溶性リガンドとしての筋知覚神経のための軸索伸長因子の探索を以下に行うこととなった。

筋知覚神経の軸索伸長に関わる因子を探索する過程で、我々は筋を作り出す素となる筋芽細胞由来の不活化細胞に着目し、その培養上清に筋知覚神経に対する強い神経軸索伸長活性があることを発見した。これは既存の成長因子 NT-3 等とは異なり、その生化学的特性から新規の蛋白質あるいは既知のタンパク質でもこれまで機能が知られていないものである可能性が高いと考えられた。筋知覚神経は筋紡錘という筋肉の緊張度、伸展を感知するセンサーを支配しているが、この筋紡錘はわずかな数しか存在しない。当研究室でクローニングされた MDP77 タンパク質がこの筋紡錘に非常に強く発現することを発見し、筋知覚において重要な役割を果たしていることが示唆された。

筋知覚神経が標的である筋紡錘へ軸索を再生させるときには、組織内を長い距離にわたって伸長していかなければならない。神経軸索の伸長には可溶性因子による効果、軸索と基質間の細胞接着による効果という2つのモードがあることがよく知られている。そこで、NC、MDP77と同様のストラテジで他のグループによって発見されたヘパリン結合成長因子の Pleiotrophin, Amphoterin に着目し、大腸菌リコンビナント蛋白質を作製し、ニワトリ胚 DRG 神経細胞、あるいは大脳神経細胞においてその作用メカニズムを検討したところ、Pleiotrophin, Amphoterin はともに大脳神経細胞に対して強い神経突起伸長活性を有し、それは接着性を高めることで軸索伸長を起こさせることを明らかにした。しかし、やはり筋知覚神経に対しては軸索伸長活性は示さなかった。また、Amphoterin-AP 融合タンパク質を用いた受容体探索の結果、これまで知られている RAGE 以外にも細胞膜上に新たに3種の結合タンパク質があることを明らかにした。

筋知覚神経の軸索伸長に関わる因子を探索する過程で、我々は筋を作り出す素となる筋芽細胞由来の不活化細胞に着目し、その培養上清に筋知覚神経に対する強い神経軸索伸長活性があることを発見した。その単離・同定および生物学的作用について解析を行った。これまでの解析で、発生期の筋で発現している NT-3 とは異なる分子であることはすでに示したとおりであったが、他の生理活性分子との異なるかどうかという点について RT-PCR、免疫沈降法、ELISA法、ウェスタンブロットリング、大脳新皮質を用いた細胞生存活性測定、Trkレセプターのリン酸化、さらに下流の細胞内シグナル伝達経路等により検討したところ、やはり既存の分子とは異なることが明らかになった。中枢神経系の細胞を用いた解析により、本因子は末梢神経細胞のみならず、中枢の神経細胞にも作用しうることが判明した。また、本因子はヘパリン結合性を有するが、Pleiotrophin, Amphoterin には知覚神経軸索伸長活性がないこと、さらにヘパリン結合性がこれらの分子よりは低いことから既存のヘパリン結合分子でないことも明らかになった。さらに、ヘパリンアフィニティクロマトグラフィーによって分離・精製した蛋白質のN末アミノ酸配列解析を行ったところこれまでに知られていないアミノ酸配列を持ったタンパク質が見出された。現在、プロテオーム技術を用いた MASS 解析によって知覚神経伸長活性を有する分子の同定を行っている。

波及効果、発展方向、改善点等

筋知覚神経は他の表在知覚神経(温度・痛みなど皮膚の感覚をつかさどる)に比べて、運動制御という意

味で非常に重要な役割を担っているにも関わらず、これまでは運動神経ばかりに研究が集中し、筋知覚神経の研究はあまり進んでいなかった。その理由の一つは、この筋知覚神経の軸索伸長や生存、発生・分化、あるいは生理作用の鍵となる一連の分子群が見つかってこなかったことによる。我々は本研究を通じて筋知覚神経の標的である筋芽細胞に由来する新規因子を発見した。今後、本研究課題によって明らかになった事実をもとに、本因子の単離・同定およびその生理的作用、ナチュラルレセプターの同定、細胞内シグナル伝達経路の探索など、多様な研究が発展し、その結果はシステムとしての神経機能再建という再生医療技術開発へとつながっていくことが期待される。本因子は筋知覚神経のみならず、一部の中枢神経にも作用することがすでに明らかになっていることから、さらに困難とされてきた中枢神経回路の再生にも展望が開けるかもしれない。本研究課題は実際のところ、一人で行うこととなった。近代科学はバイオテクノロジー分野に関わらずすべての分野が世界レベルでの競争であり、将来有望な研究分野を適格に読みぬき、誰よりも先に研究リソース(人、設備、およびそれを支える資金)をいかに短時間で集中して投資するかに掛かっているといっても過言ではない。これまで未開拓の分野だったが、筋知覚神経の研究を進めたこの数年のうちに、海外でも筋知覚神経軸索の伸長に関して分子レベルでの機構解明に着手する研究者が出てきている。今ならまだ当該研究がプライオリティを有することができ、当該分野における研究の地位を確立し、世界をリードすることも可能である。今こそ、日本発の神経再接続技術としての運動神経・筋知覚神経の双方向再接続技術の確立へ向けて、研究リソースを集中し、研究開発を展開することが望ましい。

. 研究成果公表等の状況

(1) 研究発表件数

	原著論文による発表	左記以外の誌上発表	口頭発表	合計
国内	0件	0件	11件	11件
国際	4件	0件	6件	10件
合計	4件	0件	17件	21件

(2) 特許等出願件数

合計 3件 (うち国内3件、国外0件)

(3) 受賞等

0件 (うち国内0件、国外0件)

(4) 主な原著論文による発表の内訳

原著論文による発表

国外誌

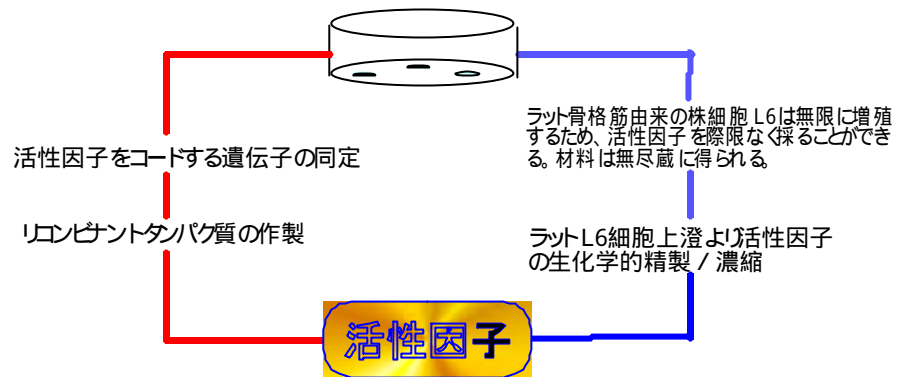
1. T. Ishimoto, **K. Fujimori**, M. Kasai, T. Taguchi, "Dendritic translocation of the rat ferritin H chain mRNA", *Biochme.Biophys.Res.Comm.* 272, 789-793, 2000/06
2. **K. E. Fujimori**, R. Takauji, N. Tamamaki, "Differential localization of high- and low-molecular weight variants of MAP2 in the developing rat telencephalon", *J. Comp. Neurol.* 449, pp.330-342, 2002/08
3. **K. E. Fujimori**, A. Uyeda, T. Taguchi, "Regulatory expression of MDP77 protein in the skeletal and cardiac muscles", *FEBS letters* 529, pp.303-308, 2002/09
4. N. Tamamaki, **K. Fujimori**, Y. Nojyo, T. Kaneko, R. Takauji, "Evidence that Semaphorin 3A and Semaphorin 3F regulate the migration of GABAergic neurons in the developing neocortex", *J. Comp. Neurol.* 455, pp.238-248, 2003/01

(5) 主要雑誌への研究成果発表

Journal	Impact Factor
T. Ishimoto, <u>K. Fujimori</u> , M. Kasai, T. Taguchi, "Dendritic translocation of the rat ferritin H chain mRNA", <i>Biochme. Biophys. Res. Commun.</i> 272, 789-793, 2000/06	2.946
<u>K. E. Fujimori</u> , R. Takauji, N. Tamamaki, "Differential localization of high- and low-molecular weight variants of MAP2 in the developing rat telencephalon", <i>J. Comp. Neurol.</i> 449, pp.330-342, 2002/08	3.515
<u>K. E. Fujimori</u> , A. Uyeda, T. Taguchi, "Regulatory expression of MDP77 protein in the skeletal and cardiac muscles", <i>FEBS letters</i> 529, pp.303-308, 2002/09	3.644
N. Tamamaki, <u>K. Fujimori</u> , Y. Nojyo, T. Kaneko, R. Takauji, Evidence that Sema3A and Sema3F regulate the migration of GABAergic neurons in the developing neocortex, <i>J. Comp. Neurol.</i> 455, pp.238-248, 2003/01	3.515
Sum	13.620

平成13年度 ラット筋芽細胞株培養上澄中には筋知覚神経に対する突起伸長活性があることを発見！

平成14年度 筋知覚神経突起伸長活性因子の精製 除神経モデル動物を用いて活性因子の神経再生効果を評価



除神経モデル動物実験

