

研究テーマ

革新的末梢神経再生方法の開発

研究代表者

施設名 : 山形県立米沢栄養大学

氏 名 : 船木 智

研究テーマ：革新的末梢神経再生方法の開発

所属先：山形県立米沢栄養大学

氏名：船木 智

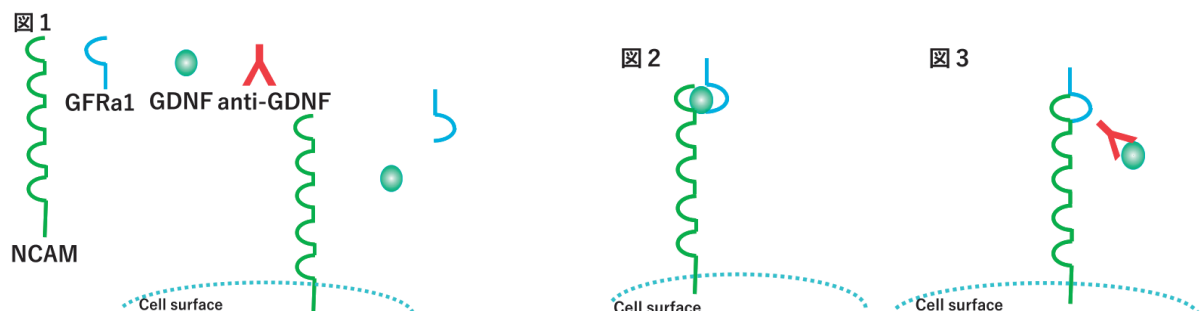
<目的>

申請者らは、GFR α 1を損傷したラット末梢神経に局所投与すると、軸索再生促進を介して、末梢神経損傷後の機能再生が促進することを同定した。また、GFR α 1はGDNFの受容体として知られるが（図2）、軸索再生効果はGDNFへの結合を要しないこと、GDNFへの結合でGFR α 1が消費されない方が（図3）、軸索再生効果に優れることを見出した。

一方でGFR α がリガンドとして反応する為にレセプターとして、NCAMであることも同定した。そこで、GDNFへの結合能を減弱したGFR α 1の変異体を作成すれば、GFR α 1の軸索再生効果を最大化できると考えた。

本研究の目的は、

- （1）GDNFへの結合能を減弱させたGFR α 1変異体を作成
- （2）変異体の培養神経細胞の神経突起伸長能を明らかにすることとした。

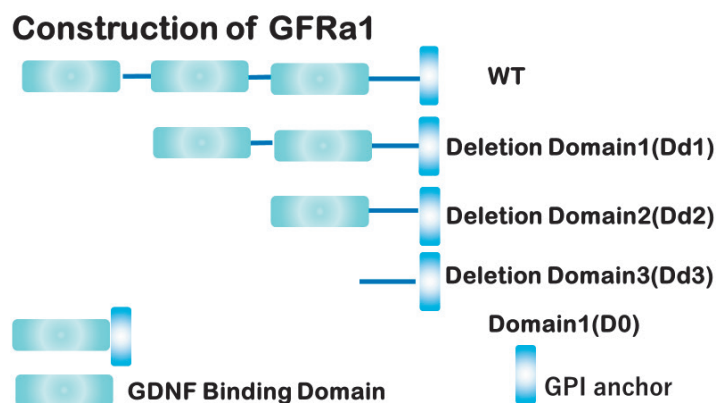


<方法>

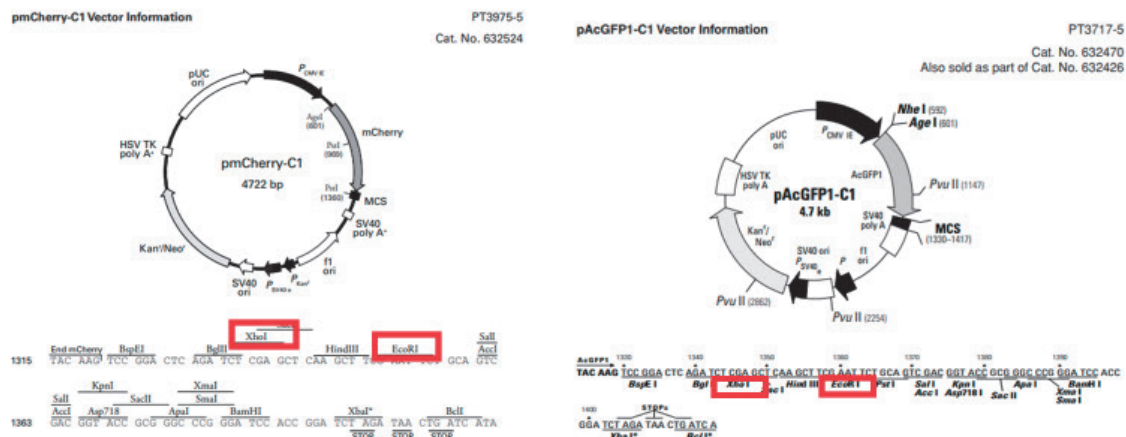
実験1) GDNFへの結合能を減弱させたGFR α 1変異体作成

ヒトGFR α 1にはGDNF結合Domainを有しており各々欠損を施した各種変異体を作製した。また今回は細胞同士の接着によるレセプター・リガンドの反応を観察することになると考え、膜表面上にGFR α が局在するように、GPI-anchorを各変異体のC末側に結合したデザインにした。

GFR α 1の変異体はHeLa細胞からcDNAを鋳型としてPCRで増幅した。



Vector information



<https://www.takarabio.com>

その後PCRで増幅したFragmentをpmcherryC1Vector Xho1-EcoR1SiteにInfusion(TakaraBio)によって組み込んだ。

一方のレセプターとしてNCAMも同様にPCRでFragmentを増幅後にpAcGFP-Vector Xho1-EcoR1SiteにInfusion(TakaraBio)によって組み込んだ。

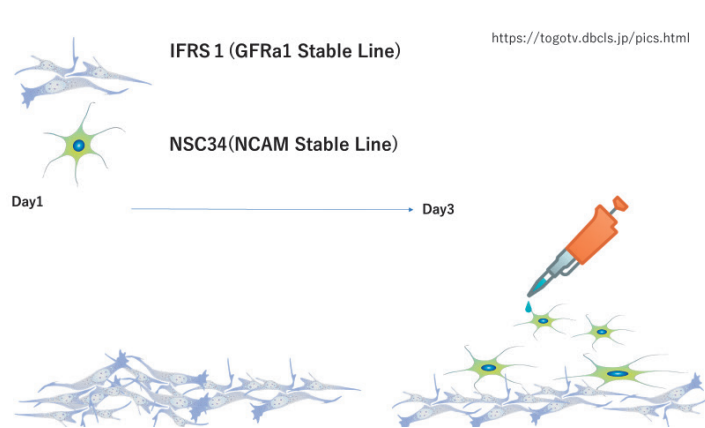
実験 2) 変異体の培養神経細胞の神経突起伸長確認

培養細胞は神経細胞への影響を見るため、GFRa 1 のStable発現株をIFRS1 (Rat Schwann cell line) を使用し、NCAMのStable発現株をNSC34 (Mouse Motor Neuron-Like Hybrid Cell Line) を使用した。

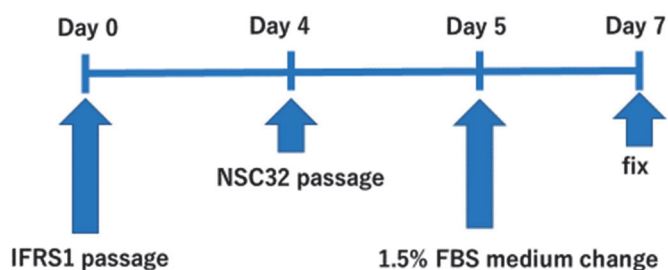
IFRS1細胞に各GFRa 1 変異体を組み込んだPlasmid VectorDNAをLipofectaminで遺伝子導入を行った。遺伝子導入に2日後にMediumを交換した。96WellPlateに1Wellあたり3CellsになるようにPassageし、MediumにG418 (1,5mg/ml) を添加し、選択的にGFRa 1 が発現している細胞を増殖させた。Mediumは3日ごとに交換を行った。

定常的な発現が弱いため、GFRa 1 を発現した細胞に再度目的遺伝子Vectorを遺伝子導入を行った。再度細胞の選択は、96WellPlateに1Wellあたり3CellsになるようにPassageし、MediumにG418(1,5mg/ml) を添加し、選択的にGFRa 1 が発現している細胞を増殖させた。Mediumは3日ごとに交換を行った。

同様にNSC34細胞にNCAMを組み込んだPlasmid VectorDNAをLipofectaminで遺伝子導入を行った。遺伝子導入に2日後にMediumを交換した。96WellPlateに1Wellあたり3CellsになるようにPassageし、MediumにG418 (1,5mg/ml) を添加し、選択的にGFRa 1 が発現している細胞を増殖させた。Mediumを3日ごとに交換を行った。

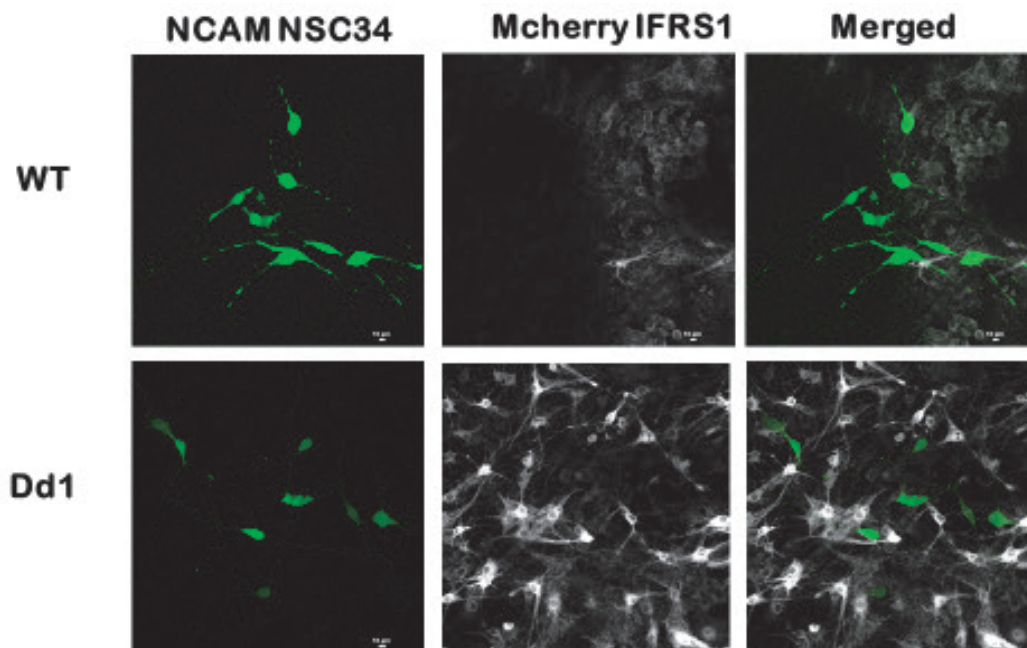


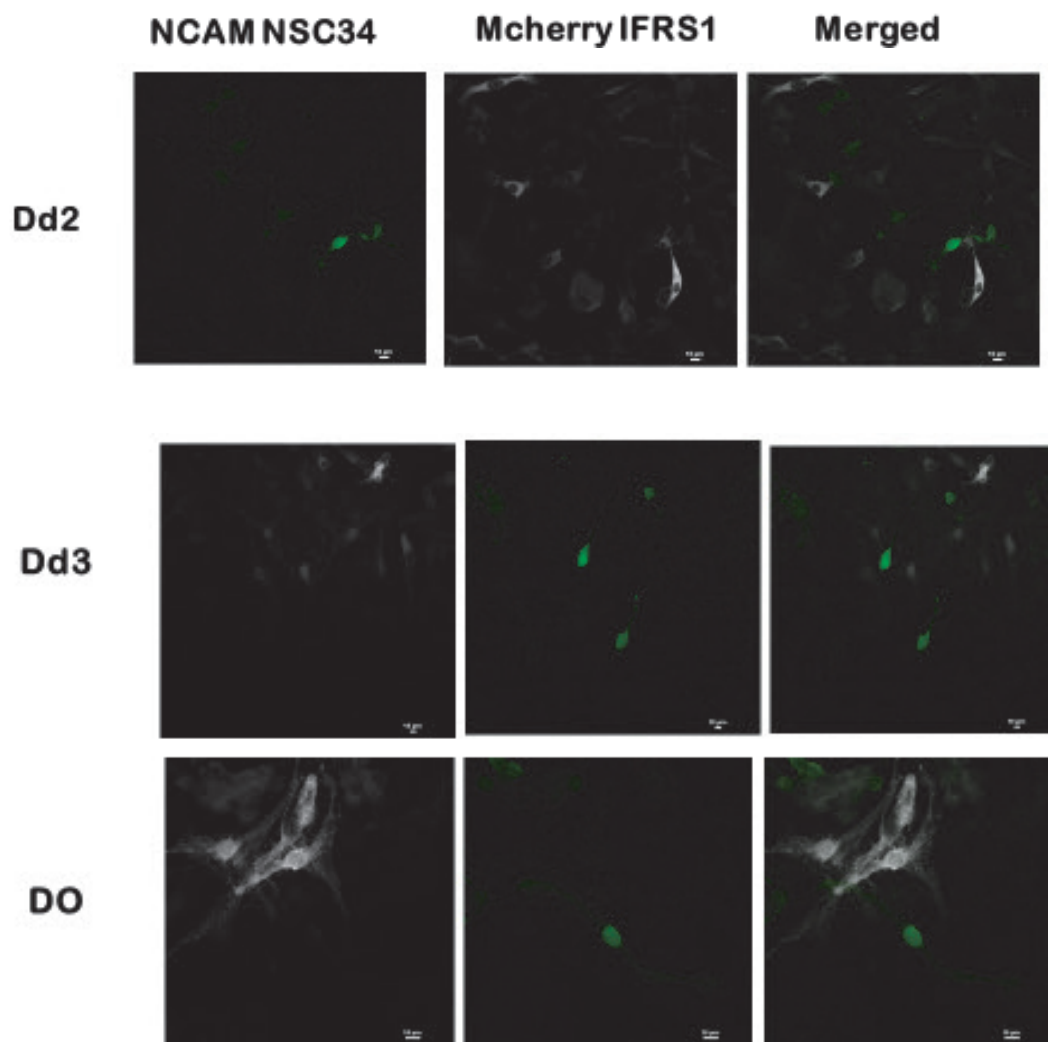
Time Schedule



培養神経細胞の神経突起伸長確認の為に、GFRa 1 変異体を定常的に発現しているIFRS1細胞を撒きその数日後にNCAMを発現しているNSC34 細胞細胞を撒きことで、GFRa 1 とNCAMによる神経突起伸長反応を確認できると考えた。

今回はIFRS1細胞を蒔いた4日後にNSC34細胞を撒き、細胞の接着状況を確認し、培地を5日後に1.5%FBSに交換後、7日後に4 %PFAで固定した。固定した細胞をさらに、Anti-GFP, Anti-mcherry、Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488) Donkey Anti-Goat IgG H&L (Alexa Fluor® 647) で染色し、コンフォーカル顕微鏡にて観察を行った。



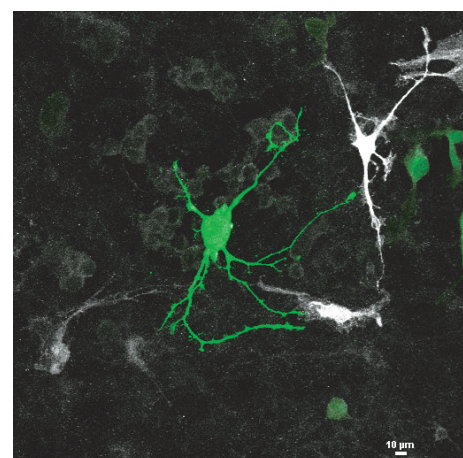


<結果・考察>

コンフォーカルでの観察では、NCAMを定常的に発現している細胞は細胞同士の接着が多く、細胞数に対して均一的に細胞を撒けず、細胞の密度に均一性を得にくい状態であった。神経突起の伸長反応の伸びにより、隣接している細胞の神経突起と接合し、GFRa 1 の影響そのものを見ることができなかった。

また、mcherryを発現している細胞は数日培養するため、IFRS1細胞の層ができ、GFRa 1 の変異体によっては、層の出来方に関しても違いが見られた。再度細胞数の条件検討が必要である。またIFRS1細胞のGFRa

1 の発現により、神経細胞突起の伸びだけではなく、樹状突起が多くなるものもいくつか見られた。細胞へのLipofectaminによる遺伝子導入で今回はStableLineを作製したが、ウイル



スによる遺伝子導入で、IFRS1細胞に対し、多く遺伝子導入された細胞での樹状突起への変化を観察予定である。

- Avraham O, Deng PY, Jones S, Kuruvilla R, Semenkovich CF, Klyachko VA, et al (2020) Satellite glial cells promote regenerative growth in sensory neurons. *Nat Commun.* 11(1): 4891
- Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D (2010) Integrins. *Cell Tissue Res.* 339(1): 269–80
- Barkhoudarian G, Hovda DA, Giza CC (2016) The Molecular Pathophysiology of Concussive Brain Injury - an update. *Phys Med Rehabil Clin N Am.* 27(2): 373–93
- Beggs HE, Baragona SC, Hemperly JJ, Maness PF (1997) NCAM140 interacts with the focal adhesion kinase p125(fak) and the SRC-related tyrosine kinase p59(fyn). *J Biol Chem.* 272(13): 8310–9
- Beggs HE, Soriano P, Maness PF (1994) NCAM-dependent neurite outgrowth is inhibited in neurons from Fyn-minus mice. *J Cell Biol.* 127(3): 825–33
- Beirowski B, Babetto E, Golden JP, Chen YJ, Yang K, Gross RW, et al (2014) Metabolic regulator LKB1 plays a crucial role in Schwann cell-mediated axon maintenance. *Nat Neurosci.* 17(10): 1351–61
- Boerboom A, Dion V, Chariot A, Franzen R (2017) Molecular Mechanisms Involved in Schwann Cell Plasticity. *Front Mol Neurosci.* 10: 38
- Bridge PM, Ball DJ, Mackinnon SE, Nakao Y, Brandt K, Hunter DA, et al (1994) Nerve crush injuries—a model for axonotmesis. *Exp Neurol.* 127(2): 284–90
- Brosius Lutz A, Barres BA (2014) Contrasting the glial response to axon injury in the central and peripheral nervous systems. *Dev Cell.* 28(1): 7–17
- Cao JP, Yu JK, Li C, Sun Y, Yuan HH, Wang HJ, et al (2008) Integrin beta1 is involved in the signaling of glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Comp Neurol.* 509(2): 203–10
- Cao JP, Wang HJ, Yu JK, Yang H, Xiao CH, Gao DS (2008) Involvement of NCAM in the effects of GDNF on the neurite outgrowth in the dopamine neurons. *Neurosci Res.* 61(4): 390–7
- Carmillo P, Dagø L, Day ES, Worley DS, Rossomando A, Walus L, et al (2005) Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) receptor alpha-1 (GFR alpha 1) is highly selective for GDNF versus artemin. *Biochemistry.* 44(7): 2545–54
- Chen BK, Madigan NN, Hakim JS, Dadsetan M, McMahon SS, Yaszemski MJ, et al (2018) GDNF Schwann cells in hydrogel scaffolds promote regional axon regeneration, remyelination and functional improvement after spinal cord transection in rats. *J Tissue Eng Regen Med.*

12(1): e398–e407

- Chen ZL, Yu WM, Strickland S (2007) Peripheral regeneration. *Annu Rev Neurosci.* 30: 209–33
- Deuis JR, Dvorakova LS, Vetter I (2017) Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. *Front Mol Neurosci.* 10: 284
- Ditlevsen DK, Povlsen GK, Berezin V, Bock E (2008) NCAM-induced intracellular signaling revisited. *J Neurosci Res.* 86(4): 727–43
- Durbec P, Marcos-Gutierrez CV, Kilkenny C, Grigoriou M, Wartiovaara K, Suvanto P, et al (1996) GDNF signalling through the Ret receptor tyrosine kinase. *Nature.* 381(6585): 789–93
- Endo T, Kadoya K, Kawamura D, Iwasaki N (2019) Evidence for cell–contact factor involvement in neurite outgrowth of dorsal root ganglion neurons stimulated by Schwann cells. *Exp Physiol.* 104(10): 1447–54
- Endo T, Kadoya K, Suzuki Y, Kawamura D, Iwasaki N (2019) A Novel Experimental Model to Determine the Axon–Promoting Effects of Grafted Cells After Peripheral Nerve Injury. *Front Cell Neurosci.* 13: 280
- Enomoto H, Hughes I, Golden J, Baloh RH, Yonemura S, Heuckeroth RO, et al (2004) GFRalpha1 expression in cells lacking RET is dispensable for organogenesis and nerve regeneration. *Neuron.* 44(4): 623–36
- Ganguly A, McEwen C, Troy EL, Colburn RW, Caggiano AO, Schallert TJ, et al (2017) Recovery of sensorimotor function following sciatic nerve injury across multiple rat strains. *J Neurosci Methods.* 275: 25–32
- Garcès A, Haase G, Airaksinen MS, Livet J, Filippi P, deLapeyrière O (2000) GFRalpha 1 is required for development of distinct subpopulations of motoneuron. *J Neurosci.* 20(13): 4992–5000
- Geiger B, Spatz JP, Bershadsky AD (2009) Environmental sensing through focal adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10(1): 21–33
- Giza CC, Hovda DA (2014) The new neurometabolic cascade of concussion. *Neurosurgery.* 75 Suppl 4(0 4): S24–33
- Gonzalez-Perez F, Udina E, Navarro X. 2013. Extracellular matrix components in peripheral nerve regeneration. *Int Rev Neurobiol.* 108: 257–75
- Gordon T, Tyreman N, Raji MA (2011) The basis for diminished functional recovery after delayed peripheral nerve repair. *J Neurosci.* 31(14): 5325–34
- Grim M, Halata Z, Franz T (1992) Schwann cells are not required for guidance of motor nerves in the hindlimb in Splotch mutant mouse embryos. *Anat Embryol (Berl).* 186(4): 311–8
- Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J (1988) A new and sensitive method

for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*. 32(1): 77–88

- He Z, Jin Y (2016) Intrinsic Control of Axon Regeneration. *Neuron*. 90(3): 437–51
- Höke A, Gordon T, Zochodne DW, Sulaiman OA (2002) A decline in glial cell-line-derived neurotrophic factor expression is associated with impaired regeneration after long-term Schwann cell denervation. *Exp Neurol*. 173(1): 77–85
- Hong K, Nishiyama M, Henley J, Tessier LM, Poo M (2000) Calcium signalling in the guidance of nerve growth by netrin-1. *Nature*. 403(6765): 93–8
- Hottinger AF, Azzouz M, Déglon N, Aebischer P, Zurn AD (2000) Complete and long-term rescue of lesioned adult motoneurons by lentiviral-mediated expression of glial cell line-derived neurotrophic factor in the facial nucleus. *J Neurosci*. 20(15): 5587–93
- Huang H, Liu H, Yan R, Hu M (2017) PI3K/Akt and ERK/MAPK Signaling Promote Different Aspects of Neuron Survival and Axonal Regrowth Following Rat Facial Nerve Axotomy. *Neurochem Res*. 42(12): 3515–24
- Huang HT, Sun ZG, Liu HW, Ma JT, Hu M (2017) ERK/MAPK and PI3K/AKT signal channels simultaneously activated in nerve cell and axon after facial nerve injury. *Saudi J Biol Sci*. 24(8): 1853–8
- Hynes RO (2009) The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science*. 326(5957): 1216–9
- Ibáñez CF (2010) Beyond the cell surface: new mechanisms of receptor function. *Biochem Biophys Res Commun*. 396(1): 24–7
- Ibáñez CF, Paratcha G, Ledda F (2020) RET-independent signaling by GDNF ligands and GFR α receptors. *Cell Tissue Res*. 382(1): 71–82
- Iwase T, Jung CG, Bae H, Zhang M, Soliven B (2005) Glial cell line-derived neurotrophic factor-induced signaling in Schwann cells. *J Neurochem*. 94(6): 1488–99
- Jagalur NB, Ghazvini M, Mandemakers W, Driegen S, Maas A, Jones EA, Jaegle M, Grosveld F, Svaren J, Meijer D (2011) Functional dissection of the Oct6 Schwann cell enhancer reveals an essential role for dimeric Sox10 binding. *J Neurosci*. 31(23): 8585–94
- Kadoya K, Tsukada S, Lu P, Coppola G, Geschwind D, Filbin MT, et al (2009) Combined intrinsic and extrinsic neuronal mechanisms facilitate bridging axonal regeneration one year after spinal cord injury. *Neuron*. 64(2): 165–72
- Jessen KR, Mirsky R (2008) Negative regulation of myelination: relevance for development, injury, and demyelinating disease. *Glia*. 56(14): 1552–65
- Jessen KR, Mirsky R (2016) The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves. *J Physiol*. 594(13): 3521–31
- Jing S, Wen D, Yu Y, Holst PL, Luo Y, Fang M, et al (1996) GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR- α , a novel receptor for GDNF. *Cell*. 85(7): 1113–24

- Kaewkhaw R, Scutt AM, Haycock JW (2012) Integrated culture and purification of rat Schwann cells from freshly isolated adult tissue. *Nat Protoc.* 7(11): 1996–2004
- Ledda F, Paratcha G, Ibáñez CF (2002) Target-derived GFR α 1 as an attractive guidance signal for developing sensory and sympathetic axons via activation of Cdk5. *Neuron.* 36(3): 387–401
- Lundborg G (2000) A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. *J Hand Surg Am.* 25(3): 391–414
- Mao S, Huang T, Chen Y, Shen L, Zhou S, Zhang S, et al (2019) Circ-Spindr enhances axon regeneration after peripheral nerve injury. *Cell Death Dis.* 10(11): 787
- Mendoza MC, Er EE, Blenis J (2011) The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem Sci.* 36(6): 320–8
- Mills CD, Allchorne AJ, Griffin RS, Woolf CJ, Costigan M (2007) GDNF selectively promotes regeneration of injury-primed sensory neurons in the lesioned spinal cord. *Mol Cell Neurosci.* 36(2): 185–94
- Mitchel JA, Hoffman KA (2011) Cellular scale anisotropic topography guides Schwann cell motility. *PLoS One.* 6(9): e24316
- Nakajima S, Hayashi M, Kouguchi T, Yamaguchi K, Miwa M, Yoshizaki G (2014) Expression patterns of gdnf and gfr α 1 in rainbow trout testis. *Gene Expr Patterns.* 14(2): 111–20
- Nieuwenhuis B, Barber AC, Evans RS, Pearson CS, Fuchs J, MacQueen AR, et al (2020) PI 3-kinase delta enhances axonal PIP(3) to support axon regeneration in the adult CNS. *EMBO Mol Med.* 12(8): e11674
- Nirogi R, Goura V, Shanmuganathan D, Jayarajan P, Abraham R (2012) Comparison of manual and automated filaments for evaluation of neuropathic pain behavior in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 66(1): 8–13
- Nishiyama M, Hoshino A, Tsai L, Henley JR, Goshima Y, Tessier LM, Poo M, Hong K (2003) Cyclic AMP/GMP-dependent modulation of Ca²⁺ channels sets the polarity of nerve growth-cone turning. *Nature.* 423(6943): 990–5
- Omura T, Omura K, Tedeschi A, Riva P, Painter MW, Rojas L, et al (2015) Robust Axonal Regeneration Occurs in the Injured CAST/Ei Mouse CNS. *Neuron.* 86(5): 1215–275
- Paratcha G, Ledda F, Baars L, Couplier M, Besset V, Anders J, et al (2001) Released GFR α 1 potentiates downstream signaling, neuronal survival, and differentiation via a novel mechanism of recruitment of c-Ret to lipid rafts. *Neuron.* 29(1): 171–84
- Paratcha G, Ledda F, Ibáñez CF (2003) The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands. *Cell.* 113(7): 867–79