

# 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	岩田 達也
学位論文題目			
<b>Increased Expression of Microtubule Disassembly Molecules During Nerve Regeneration</b> (神経再生における微小管崩壊因子の発現促進)			
共著者名：濤川 一彦、本間 大、森 望、 八竹 直、木山 博資			
未公表			
研究目的			
<p>神経再生において、細胞骨格の再構成は必要不可欠で、再生の最先端である神経成長円錐では、アクチンフィラメントの伸長・分解がダイナミックに行われている。さらに、アクチン線維のダイナミックな再構成領域からわずかに離れた所では、微小管の安定化が起こり、これが延長した神経突起を維持するのに必須である。微小管の安定化・不安定化の分子メカニズムに関しては不明な点が多かったが、最近、<i>in vitro</i> での研究において、SCG10 ファミリーメンバー(SCG10, stathmin, SCLIP, RB3)が、微小管ダイナミクス (特に不安定化) の制御因子であることが明らかとなってきた。<sup>2),3)</sup> 本研究では、神経再生時にこれらの微小管制御因子の発現動態を明らかにするため、ラットの舌下神経損傷再生モデルを用いて SCG10 ファミリーメンバー mRNA の発現動態を検討した。</p>			
材料・方法			
<p>1. 動物</p> <p>6 周齢の雄 Wistar ラットを用いた。pentobarbital 麻酔下で、右舌下神経を切断し、術後 1,3,5,7,14,21,28,42,56 日目にそれぞれ 6 匹ずつ深麻酔下にて屠殺。直ちに脳を摘出し粉末状にしたドライアイスにて凍結後、クライオスタットにて 16 <math>\mu</math>m の厚さで新鮮凍結切片を作製した。得られた切片標本は、-80°Cにて要時まで保存した。</p>			

## 2. プローブ作製

サブクローニングしたラット cDNA フラグメント (SCG10:604-1500, stathmin:553-983, SCLIP:517-847, RB3:561-1233) を鋳型に、T7 RNA ポリメラーゼと  $\alpha$ - $^{35}\text{S}$  UTP を用いて、 $^{35}\text{S}$  標識された RNA プローブを作製した。

## 3. *in situ* ハイブリダイゼーション

新鮮凍結切片標本を乾燥後、4%パラホルムアルデヒドで 20 分間固定し、リン酸バッファー(PB)で洗浄した。さらに、proteinase-K(10  $\mu\text{g/ml}$ )で処理後、再び 5 分間固定した。DEPC 水で洗浄後、0.25%無水酢酸と 0.1M トリエタノールアミンで処理し PB で洗浄後、希釈系列のエタノールとクロロホルムで脱水・脱脂処理を行った。作製した RNA プローブを  $6 \times 10^5 \text{cpm}/\mu\text{l}$  の濃度でハイブリダイゼーションバッファー(50% formamide, 0.3M NaCl, 20mM Tris-HCl, 5mM EDTA, 10% dextran sulfate, 1 $\times$ Denhardt's solution, 0.2% sarcosyl, 200  $\mu\text{g/ml}$  salmon sperm DNA)に溶解し、80 $^{\circ}\text{C}$  2分間熱変性・氷冷後、切片と反応させた。ハイブリダイゼーションは 55 $^{\circ}\text{C}$ で 12 時間行った。終了後、5 $\times$ SSC、1%2-メルカプトエタノールにて 55 $^{\circ}\text{C}$ で、さらに high stringency buffer (50% formamide, 2 $\times$ SSC, 10%2-mercaptoethanol) で、65 $^{\circ}\text{C}$ 30 分間洗浄した。次に、RNase buffer(0.5M NaCl, 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA)で洗浄後、1mg/ml RNase-A で 37 $^{\circ}\text{C}$ 30 分間処理した。再度 high stringency buffer で洗浄を行い、2 $\times$ SSC、0.1 $\times$ SSC でそれぞれ室温 10 分間洗浄後、希釈系列のエタノールで脱水し風乾した。切片は、1 週間 X 線フィルムに曝露させた後(フィルムオートラジオグラフィー)、乳剤を塗布し 4 $^{\circ}\text{C}$ で 4 週間曝露した(乳剤オートラジオグラフィー)。

## 4. 画像処理

X 線フィルム(フィルムオートラジオグラム)上のシグナルの強度は、Image Analysis System (NIH Image : National Institutes of Health, USA)を用い、両側の舌下神経核でのシグナル強度を測定した。同時にバックグラウンドとして小脳灰白質を測定しそれを減じた値を“the optical density unit”と定義し、半定量化した。

## 成 績

健常な舌下神経核運動ニューロンにおいては、SCG10 と stathmin、SCLIP の mRNA が弱く発現していた。また、RB3 の mRNA の発現はほとんどみられなかった。神経軸索損傷により、全ての mRNA の発現が損傷運動ニューロンで増大していることが乳剤オートラジオグラフィー標本にて確認された。神経再生過程における mRNA の発現動態変化は X 線フィルム(フィルムオートラジオグラフィー)で検討した。神経軸索損傷後、全てのシグナルが増大していたが、その発現動態はそれぞれ異なっていた。

mRNA シグナルレベルを半定量化し分析した結果、SCG10 と RB3 の mRNA は、舌下神経核において、損傷後 1 日で mRNA 発現量が増大していたが、stathmin の mRNA はやや遅れて 3 日後に増大が認められた。また、mRNA の発現がピークに到達するまでの時間も異なっており、SCG10 の mRNA は損傷後 3 日でピークに到達し、stathmin は 5 日、RB3 は 7 日でピークに到達していた。SCLIP の mRNA は、損傷後 3 日でシグナルが増大している傾向にあったが、他の 3 者に比べると発現の程度は弱かった。全ての mRNA の発現は損傷後 4 週まで維持されており、その後コントロールレベルまで低下していた。

### 考 案

本研究は、末梢運動神経の再生過程における SCG10 ファミリーメンバーの遺伝子発現動態を明らかにした。コントロールレベルでも、SCG10 と SCLIP は mRNA の発現が認められた。また、神経障害に対しては、SCG10、stathmin、RB3 が強い反応を示した。しかし、他の細胞内シグナル伝達分子や、非アポトーシス分子などと比較すると、その反応は相対的にやや遅い。SCG10 ファミリーメンバーは神経損傷後、3 日から 7 日で発現が最高レベルに到達するが、前述の分子群は、大体 1 日から 3 日で最高レベルに到達することが知られている。未発表であるが、この舌下神経損傷モデルでは、損傷後 3 日で神経突起を活発に延ばし始めるデータも持っており、その点からすると SCG10 ファミリーメンバーの発現は、実際の突起伸長の時期と一致しているといえる。一方、アクチンフィラメントと微小管の制御は、神経再生における軸索の伸長と安定化に極めて重要である。アクチンフィラメントに関しては、Profilin や Cofilin が重合と脱重合に作用し、これらがいずれも再生時に発現上昇すること、さらに、神経成長円錐の形態をアクチン制御により変化させる Rho ファミリーのうち RhoA, Rac1, TC10 が、やはり神経再生時には発現促進することが明らかになっている。<sup>1)</sup>このように、アクチン線維のダイナミックな制御が神経再生時に見られるが、微小管のダイナミック制御に関しては長い間不明であった。最近、SCG10 ファミリーメンバーが神経成長円錐に多く存在し、チューブリン分子に結合し、微小管の脱重合を行うことが示され、微小管の不安定化因子であることが示された。<sup>2)</sup>従って、本研究は微小管崩壊因子群の発現が神経再生時に増大することを明らかにしたことになる。また、逆に微小管安定化因子の一部の分子の発現も神経再生時には促進することが判っており(Suzuki et al,未発表)、微小管の安定化と不安定化の両者にかかる分子群の発現が神経再生時には必要であると考えられる。なぜ、こういった逆の機能を有する分子群が神経再生時に同時に発現しなければならないか詳細は不明であるが、神経成長円錐先端で要求されるダイナ

ミックな形態変化には微小管の重合は不都合であり、不安定化を促進する分子が必要なのであろう。一方、神経成長円錐に続く領域では伸長軸索の安定化が必要であり、安定化に関与する分子の発現も必要になると考えられる。

## 結 論

1. SCG10、stathmin、SCLIP の mRNA は、健常な運動ニューロンにおいて発現が認められたが、RB3 は明らかではなかった。
2. SCG10、stathmin、RB3 の mRNA は、軸索損傷後、運動ニューロンにおいて著しい発現増加が観察されたが、SCLIP mRNA はわずかな発現上昇しか見られなかった。
3. 損傷運動ニューロンにおいて、SCG10 と RB3 の mRNA の発現が、stathmin、SCLIP よりも先行していたが、全般に本ファミリーメンバーの発現ピークは、他の神経損傷後に発現する細胞死防御遺伝子群の発現ピークより遅れる傾向があった。
4. 以上より、SCG10 ファミリーメンバーは、損傷軸索の再生時に発現し、神経成長円錐で微小管を不安定化する分子であり、これにより神経成長円錐のダイナミクスが保たれていると考えられる。

## 引用文献

1. Tanabe K, Tachibana T, Yamashita T, Che YH, Yoneda Y, Ochi T, Tohyama M, Yoshikawa H, Kiyama H.: The small GTP-binding protein TC10 promotes nerve elongation in neuronal cells, and its expression is induced during nerve regeneration in rats. *Journal of Neuroscience*. 2000; 20(11):4138-44.
2. Charbaut E, Curmi PA, Ozon S, Lachkar S, Redeker V, Sobel A.: Stathmin family proteins display specific molecular and tubulin binding properties. *Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276(19): 16146-54.
3. Gavet O, Ozon S, Manceau V, Lawler S, Curmi P, Sobel A.: The stathmin phosphoprotein family: intracellular localization and effects on the microtubule network. *Journal of Cell Science*. 1998; 111 : 3333-46.

## 参考文献

1. Abe K, Namikawa K, Honma M, Iwata T, Matsuoka I, Watabe K, Kiyama H (2001) Inhibition of Ras-Extracellular signal-regulated Kinase (ERK) mediated signaling promotes ciliary neurotrophic factor (CNTF) expression in schwann cells. *Journal of Neurochemistry* 77(2): 700-703.

## 学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	岩 田 達 也
審査委員長 飯 塚 一 ㊟  審査委員 八 竹 直 ㊟  審査委員 若 宮 伸 隆 ㊟			
学 位 論 文 題 目  Increased Expression of Microtubule Disassembly Molecules during Nerve Regeneration (神経再生における微小管崩壊因子の発現促進)			
末梢神経の再生において、再生軸索の最先端である神経成長円錐では、アクチンフィラメントや微小管がダイナミックに伸長、分解していることが古くから知られている。アクチンフィラメントに関しては安定化、不安定化の分子制御メカニズムは多くの点で解明されているが、一方、微小管の安定化、不安定化の機構に関してはほとんど明らかになっていない。ごく最近、培養細胞を用いたin vitroでの研究で、SCG10ファミリーメンバー(SCG10, stathmin, SCLIP: SCG10-like protein, RB3)が微小管脱重合の制御因子であることが明らかとなり注目されている。 本研究で、学位論文提出者らはラットの舌下神経損傷再生モデルを用いてSCG10ファミリーメンバーのmRNAの発現動態をin situ hybridization法により検討した。この舌下神経損傷モデルは本神経が、感覚神経を有さず、また非交叉			

性であるため、得られた結果の解釈が運動神経として単純化できるという利点がある。

学位論文提出者らの検討により、1) SCG10ファミリーメンバーのうち、SCG10, stathmin, SCLIP は、健常運動ニューロンにおいても発現していること、2) SCG10, stathmin, RB3は、損傷運動ニューロンにおいて著しい発現増加が認められるが、SCLIPはわずかであること、3) 損傷運動ニューロンにおいて、SCG10とRB3の発現が先行するが、その発現ピークは、Bcl群など他の細胞死防御遺伝子群より遅れる傾向にあるといった結果が得られた。これらの結果は、SCG10ファミリーの神経再生時における役割分担を示唆するとともに、定常状態における生理的機能も示唆している。in situ hybridizationにおけるbackgroundは、著者らのグループにより開発された方法により、極めて低いレベルに抑えられているため、これらSCG10ファミリーの発現パターンの変動は説得力のあるデータとなっている。

SCG10ファミリーメンバーは損傷軸索の再生時に発現し、神経成長円錐で微小管を不安定化する分子であり、これにより神経成長円錐のダイナミクスが保たれていると考えられる。本研究は、生体における末梢神経再生時に微小管崩壊因子群SCG10ファミリーの発現が増大することをin vivoで初めて明らかにしたもので、神経再生領域での新しい知見として極めて高く評価される。

神経系においては、再生可能な末梢神経系と比べ、中枢神経系は再生不能である。末梢神経系の再生メカニズムの詳細な解明は、中枢神経系再生への活路を見出す糸口となりうるため、本研究の新しい知見は、その点からも価値あるものと考えられる。

なお論文提出者に対する本論文の内容ならびに関連分野に関する諮問に対し、適切な解答が得られ、本審査委員会は本論文が十分学位論文に値するものと判定した。