

## 学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	鈴 木 康 博
<p style="text-align: center;"><b>学 位 論 文 題 目</b></p> <p style="text-align: center;">Collapsin response mediator protein (CRMP)-2 has potent neurite elongation activity in nerve regeneration.</p> <p style="text-align: center;">(CRMP-2 は神経再生時重要な神経伸長活性を有している。)</p> <p style="text-align: center;"><b>共 著 者 名</b></p> <p style="text-align: center;">中込 咲綾 濤川 一彦 桐生 寿美子 稲垣 直之 貝淵 弘三 相澤 仁志 菊池 健次郎 木山 博資</p> <p style="text-align: center;">未公表</p> <p><b>研究目的</b></p> <p>近年、神経の突起伸展には様々な分子が重要な役割を果たしていることが明らかになってきている。特に発生過程では、Collapsin Response Mediator Protein (以下 CRMP と略す。) が著しく発現し、軸索および成長円錐に局在しており、突起伸展での役割が示唆されている。また、培養海馬神経細胞において、CRMP-2 を過剰発現させると多数の軸索が形成されることが知られている。一方、CRMP-2 を抑制すると軸索形成が阻害される<sup>1</sup>。このような背景のもと、CRMP-2 が損傷神経の再生時にも再生軸索の伸展に関与している可能性が考えられた。そこで本研究では、今まで同定された CRMP-2 のファミリー分子 (CRMP-1~CRMP-5) 全てについて、ラット舌下神経損傷モデルを用いて検討すると共に、ウイルスベクターを用いた遺伝子導入を損傷運動ニューロンに行うことで再生を促進することが出来るかについても検討を行った。</p> <p><b>材料・方法</b></p> <p>本研究では雄性 Wistar rat を使用した。</p> <p>(1) 軸索損傷舌下神経核での CRMP mRNA 発現の検討</p> <p>右舌下神経を切断し一定期間の後、脳凍結切片を作成した。5 種類の CRMP</p>			

mRNA を特異的に検出するプローブを作成し In situ hybridization(ISH)法にて検討した。

## **(2) N1E-115 細胞における CRMP-1、CRMP-2 および CRMP-5 の突起伸展能**

N1E-115 細胞は 1% polyethylenimine でコーティングされたガラス上で培養した。myc-hCRMP-1、myc-rCRMP-2、myc-rCRMP-5 および LacZ を発現するプラスミドベクターを LipofectAMINE にてトランスフェクションした。トランスフェクション 72 時間後に細胞形態について検討した。

## **(3) 組み換え adenoviral vector の作成**

myc-rCRMP-2 (wild form)、myc-hCRMP-2  $\Delta$  C381 (dominant negative form) を発現する adenoviral vector を作成した。また、神経特異的プロモーター下で Cre recombinase を発現するウイルスベクターを作成した。対照群として LacZ を発現するベクターも作成した。

## **(4) 後根神経節 (dorsal root ganglion : DRG) の collagen gel を用いた器官培養**

生後 0 日目 (P0) の DRG を摘出し、アデノウイルスに組み込まれた CRMP-2 と Cre、CRMP-2  $\Delta$  C381 と Cre をそれぞれ共感染させた。対照として LacZ を感染させた。DRG を collagen gel に包埋し 3 日後突起伸展について検討した。

## **(5) CRMP-2 の再生軸索への局在**

右舌下神経を crush し定位脳固定機に頭部を固定後、CRMP-2 と Cre または LacZ と Cre を発現するアデノウイルスを両側舌下神経核に injection した。crush 後 3 日目に crush 近傍の舌下神経、2 週目に舌をそれぞれ摘出し検討した。

## **(6) 逆行性トレーサー(Fluoro-Gold: FG)を用いた神経再生動態の検討**

(5) と同様の方法で手術を行った。脳を摘出する 2 日前に両側舌に FG を 10  $\mu$ l ずつ injection し、1、2、3、4 週後に FG 陽性舌下神経運動ニューロンの割合を検討した。

## **成績**

### **(1) 舌下神経再生時、CRMP-1、-2 及び-5mRNA の発現が上昇した。**

片側舌下神経損傷後、損傷側の舌下神経核において著明な CRMP-1、CRMP-2、CRMP-5 mRNA の発現上昇が観察され、発現のピークは神経切断後 14 日目に認められた。半定量的検討では、それぞれの発現が非損傷側と比較し 3.5、2.5、

3.5 倍に上昇していた。CRMP-4 mRNA の発現上昇はほとんど認められなかった。CRMP-3 mRNA は損傷前後で発現は見られなかった。

**(2) CRMP-2 は N1E-115 細胞で神経突起形成を促進する。**

舌下神経再生時に発現の上昇が見られた CRMP-1、CRMP-2、CRMP-5 及び対照として LacZ 遺伝子を N1E-115 細胞に過剰発現させた。その結果、20 $\mu$ m を越える神経突起を有する細胞は CRMP-2 で有意に増加していた (Mann-Whitney's U test,  $p<0.01$ ) が、他では、このような突起伸展は見られなかった。

**(3) CRMP-2 は DRG の神経突起形成を促進した。**

胎生ラットより摘出した DRG に adenovirus vector を用いて、CRMP-2、CRMP-2  $\Delta$ C381 及び LacZ を過剰発現させた場合、CRMP-2 群は LacZ 群と比較して約 2 倍の長さの神経突起を形成した (Mann-Whitney's U test,  $p<0.01$ )。一方、CRMP-2  $\Delta$ C381 群では LacZ 群と比較して神経突起形成の抑制が観察された (Mann-Whitney's U test,  $p<0.05$ )。

**(4) in vivo において、CRMP-2 は再生している軸索に運ばれかつ再構築された神経終末まで到達した。**

舌下神経核に CRMP-2 を過剰発現させた場合、舌下神経損傷後 3 日目で CRMP-2 は傷害部位を越え再生している軸索に存在し、2 週目において舌筋の再構築された神経前シナプスまで新たに発現した CRMP-2 が到達していた。

**(5) CRMP-2 はラット運動神経再生を促進する。**

舌下神経 crush 後 1 週目では、舌より逆行性に取り込まれた FG 陽性の舌下神経運動ニューロンは CRMP-2 発現群、LacZ 発現群どちらにも認められなかった。2 週目に CRMP-2 発現群で 5-10 個の FG 陽性運動細胞が認められたが、LacZ 発現群では認められなかった。4 週目には CRMP-2 発現群で 80%、LacZ 発現群で 50%に FG 陽性細胞が認められた。神経再生の速度は CRMP-2 発現群が LacZ 発現群と比較して 20-30%上回っていた。

## **考察**

舌下神経損傷モデルにおいて、損傷神経細胞死防御に関与する遺伝子群は損傷後 3~5 日目に発現のピークを認めるのに対し、CRMP-1、-2 及び-5 mRNA は約 1 週間遅れて発現のピークを迎えている。この結果は CRMP family が細胞死よりもむしろ神経突起伸展や再生に関与していることを示唆していると考えられる。さらに、in vitro および in vivo レベルでの過剰発現系の実験から、CRMP

ファミリーのなかで CRMP-2 が神経突起形成や再生に最も関与していると考えられた。近年 CRMP-2 が軸索形成に関与していることが示されたほか<sup>1</sup>、CRMP-2 が tubulin の heterodimer と複合体を形成し、微小管の重合に重要な役割を果たしていることも指摘された<sup>2</sup>。これらの知見と今回の結果を考えると、CRMP-2 は再生軸索において微小管の重合及び伸展に関与し、軸索再生を促進しているものと考えられた。

## 結論

CRMP-2 は培養細胞レベルや発生段階のみでなく、神経再生においても重要な神経伸長因子である。CRMP-2 の神経再生時の分子メカニズムはまだ完全には解明されていないが、CRMP-2 による微小管の重合および安定化が動物レベルで神経再生を促進させることに貢献すると考えられる。

## 引用文献




1. Inagaki N, Chihara K, Arimura N, Menager C, Kawano Y, Matsuo N, Nishimura T, Amano M, Kaibuchi K (2001) CRMP-2 induces axons in cultured hippocampal neurons. *Nature Neurosci* 4: 781-782
2. Fukata Y, Itoh TJ, Kimura T, Menager C, Nishimura T, Shiromizu T, Watanabe H, Inagaki N, Iwamatsu A, Hotani H, Kaibuchi K (2002) CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly. *Nature Cell Biol* 4: 583-591

## 参考文献

1. Fawcett JW, Keynes RJ (1990) Peripheral nerve regeneration. *Annu Rev Neurosci* 13: 43-60
2. Wang LH, Strittmatter SM (1996) A family of rat CRMP genes is differentially expressed in the nervous system. *J Neurosci* 16: 6197-6207
3. Quinn CC, Gray GE, Hockfield S (1999) A family of proteins implicated in axon guidance and outgrowth. *J Neurobiol* 41: 158-164
4. Amano M, Fukata Y, Kaibuchi K (2000) Regulation and functions of Rho-associated kinase. *Exp Cell Res* 261: 44-51
5. Fukada M, Watakabe I, Yuasa-Kawada J, Kawachi H, Kuroiwa A, Matsuda Y, Noda M (2000) Molecular characterization of CRMP-5, a novel member of the collapsing

response mediator protein family. J Biol Chem 275: 37957-37965

## 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	鈴   木   康   博
<div style="display: flex; justify-content: flex-end; gap: 20px;"> <div>審査委員長 <u>吉田 成孝</u> </div> <div>審査委員 <u>松原和夫</u> </div> <div>審査委員 <u>菊池健次郎</u> </div> </div>			
<b>学   位   論   文   題   目</b>			
<p>Collapsin response mediator protein (CRMP)-2 has potent neurite elongation activity in nerve regeneration</p> <p>（CRMP-2 は神経再生時重要な神経伸長活性を有している。）</p>			
<p>本論文の概要</p> <p>本論文は損傷した運動神経軸索が再生する過程における CRMP-2 タンパク質の機能を明らかにすることを目的とし、ラットおよび神経系に関連する細胞を用いた研究に関するものである。</p> <p>研究方法の適切性</p> <p>本論文は舌下神経切断による運動神経再生、神経芽細胞の細胞株である N1E-115 を用いた突起伸長実験、後根神経節の組織培養を adenovirus による遺伝子組み替え技術と合わせて行っている。いずれも、確立された手法であり、得られたデータの処理方法とその解釈にも問題がないと判断できる。</p>			

#### 新規性

以前に得られていた CRMP に関する主な知見は次の通りである：(1) CRMP ファミリーは神経系の発生と成長に重要な役割を果たしている；(2) CRMP-2 の過剰発現で海馬の培養神経細胞での複数の軸索が形成される；(3) CRMP-2 は微小管の重合と安定化にはたらく；(4) 脊髄神経の損傷により発現誘導がある。本論文ではこれらに加え以下の知見を示した：(1) 舌下神経の損傷により CRMP-2 に加え CRMP-1、CRMP-5 も発現上昇した；(2) CRMP-2 の強制発現は N1E-115 細胞およびラット後根神経節の組織培養において突起伸展促進効果があった；(3) 舌下神経を損傷した後に舌下神経核に CRMP-2 を強制発現することにより CRMP-2 が再生軸索末端に輸送されると共に軸索再生が促進された。以上の様に本論文により軸索再生における CRMP-2 のはたらきに関する新たな重要な知見が加えられた。

#### 科学的小よび医学的意義

本論文は神経損傷および神経変性疾患の治療への展開に重要な論文と判断できる。

#### 論文の構成

本論文は適切に構成されている。

論文提出者に対して本論文および関連領域に関する試問に対し適切な応答が得られ十分な学力を有することが示された。

以上より、審査委員会は本論文を学位論文として適切なものであると判断した。