

AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

脳の科学 (1998.11) 20巻11号:1205~1211.

【神経系の再生】
運動神経の損傷に対する耐性と修復機構

木山博資, 瀬尾寿美子, 濤川一彦

運動神経の損傷に対する耐性と修復機構

木山博資*, 瀬尾寿美子*, 濤川一彦*

抄録 末梢運動ニューロンは中枢神経系のニューロンには見られない傷害に対する強い耐性を有している。この耐性はいかなる分子メカニズムに基づいているのか、分子レベルでの理解が求められている。これは中枢神経系の再生を目指すうえで極めて重要な問題である。このような分子メカニズムを解明するために、我々は末梢神経損傷後に発現動態が変化する遺伝子を分子生物学的な方法で広くスクリーニングし、多くの既知および未知の分子群を得た。このスクリーニングにより、損傷神経の細胞死を防御するための応答やグリアとのコミュニケーションなどいくつかの重要な応答が浮かび上がってきた。

脳科学 20: 1205-1211, 1998

key words: *regeneration, axotomy, hypoglossal, motor neuron, cell death*

はじめに

中枢神経は損傷に対して脆弱である。脳虚血や外傷などの傷害により容易に神経細胞は死へ至る。これに比べて末梢運動神経系は損傷に対して耐性を有し再生修復することができる。この耐性のメカニズムを解明することは、中枢神経系の神経細胞を損傷から守るための治療方法の開発につながる事が期待され、いわゆる「脳を守る」立場から社会的意義の高いことであると考えられる。末梢神経の損傷に対する耐性のメカニズムを明らかにするために、われわれは軸索損傷後に生じている現象を観察するところからはじめ、以下に示すような仮説をたて、その分子的な裏付けを試みている。現象を分子的に説明するには、既知の分子だけでなく未知の分子も含めて、広く多くの分子群をスクリーニングする必要がある。この

ため我々は舌の運動を支配している舌下神経の損傷モデルを用い、遺伝子探索を試みた。

I. 遺伝子探索

舌下神経は同側性に投射しているため、片側の神経を切断することにより同側の舌下神経核に存在するすべての運動ニューロンに傷害を与えることができる。したがって片側の神経を切断後、延髄の舌下神経核を左右別々に切り出すことによって、損傷運動ニューロンが豊富に含まれる組織とそのコントロールとして非損傷運動ニューロンが豊富に含まれる組織の両者を同時に得ることができる。これらの組織を用いてディファレンシャルディスプレイやcDNAライブラリーを作成し、遺伝子スクリーニングを行った⁴⁾。このようにして得られた遺伝子断片は *in situ* ハイブリダイゼーション法で発現の変化を確認した。得られた既知の遺伝子を眺めてみるとミトコンドリアの呼吸鎖関連、転写・翻訳関連分子、補体関連の免疫系分子群、プロテアーゼとそのインヒビターなどが多く見られた。未知の分子群ももちろん多く得られたが、それらに関しては機能を解析中である。

Molecular mechanisms in survival and repair of injured motoneurons.

*旭川医科大学医学部解剖学第一

[〒078-8510 旭川市西神楽4-5-3-11]

Hiroshi Kiyama, Sumiko Seo and Kazuhiko Namikawa :
Department of Anatomy, Asahikawa Medical College. 4-5-3-11 Nishikagura, Asahikawa, 078-8510 Japan.

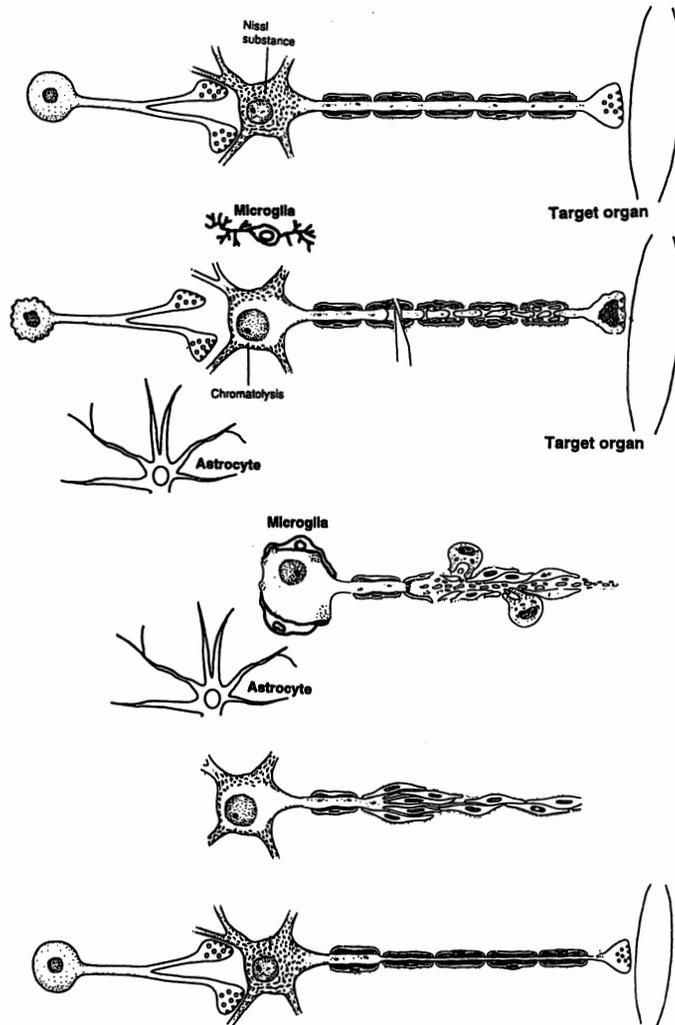


図1 運動ニューロンの軸索損傷と再生・修復の過程

II. 損傷神経生存・再生モデル

運動神経軸索損傷後、実際に生体ではいかなる現象が生じているのであろうか。通常脊髄や脳に存在し軸索を末梢の骨格筋へ投射している運動ニューロンは、当然上位の中枢からの神経支配を受けており、随意運動を制御している(図1)。末梢運動神経すなわち運動ニューロンの軸索に傷害が加えられると、損傷部位より末梢側は変性する(いわゆる Waller 変性)。中枢神経系の細胞では損傷部位から逆行性に神経変性を起こし神経細胞死に至るが、運動ニューロンの場合にはこれが生じず、

神経細胞は生存することができる。変性した末梢側の軸索はマクローファージなどにより貪食され取り除かれる。また、損傷後のかなり早い時期から切断端の中枢枝からは側枝が発芽し、末梢側に残ったシュワン細胞の基底膜に沿って軸索を伸展してゆく。一方、細胞が神経損傷後、細胞体のある脊髄や脳の中では様々な現象が観察される。まず、ニッスル小体の消失(虎斑融解: chromatolysis)が見られる。さらに、損傷神経細胞体の近傍に存在するミクログリアが活性化し、神経細胞体へ移動して細胞体を包み込む。これにより、上位のニューロンと形成していたシナプスが外れる。この神経細胞に接するミクログリアは決して貪食作用

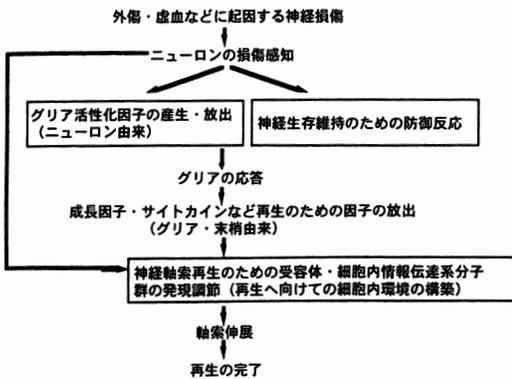


図2 損傷神経生存・再生のモデル

を示さず、1～2週間このような形態をとった後、再び神経細胞体から離れてゆく。ミクログリアの活性化から少し遅れてアストロサイトが活性化し、その突起を損傷神経細胞体の方へ伸ばしてゆく。ミクログリアが神経細胞体から離れた後はこのアストロの突起が神経細胞表面を被う。このときアストロサイトは決して分裂増殖しない。これが中枢神経系の損傷時と大きく異なる点の一つである。脳の損傷などではアストロサイトの増殖がみられいわゆるグリアスカーを形成する。これが障害となって再生神経軸索の再投射を妨げる。運動神経軸索に傷害が起こった場合はグリアに投射を妨げられることなく再生軸索が標的の骨格筋に再投射し、再び髄鞘が形成され、ニッスル小体の出現、上位ニューロンとのシナプスの再形成がみられ、修復が完了する。これら一連の現象や損傷後の分子発現動態を考慮すると、図2に示すような仮説が考えられる。まず、軸索損傷が生じると運動ニューロンは損傷を感知しなければならない。これが引き金となって様々な分子群の発現調節が作動する。細胞体から遠く離れた軸索の損傷はどのようにして細胞体へ伝えられ、各種の遺伝子発現を惹起するのか、これについてはいまだ明確な答えは得られていない。急激な膜電位の変化、カルシウムトランジェント、特定分子の逆行性輸送の障害など、いくつかの仮説はあるものの、十分な証明はまだない。軸索損傷に反応して、運動ニューロンでは各種の分子を発現するが、発現する分子群は何らかのルールに従っているように思

える。最初に必要と考えられるものは、急激な外乱により生じた内部および外部環境の変化に対応するための反応、いわば防御反応である。これにはグルタミン酸毒性に対する応答、フリーラジカルの消去系の賦活化、酸化蛋白の還元修復などが含まれると考えられる。さらに、近傍のグリアに対しては何らかの因子を産生・放出することにより、グリアを活性化し、成長因子やサイトカインの放出を促進させると考えられる。また、通常の状態では運動ニューロンの本来の機能を発揮するために必要だった分子（アセチルコリン合成やカルシウム依存性開口放出に関連する分子群）は損傷時には一時的に不要になり、別の受容体やその細胞内情報伝達系の分子の産生が行われる。このように通常とは全く異なった細胞内の情報伝達系にかかわる分子群が発現することによって、損傷神経細胞では周辺のグリアや末梢の組織から放出された因子などに応答しやすく、自らの内部環境を変化させていると考えられる。このような一連の反応が巧妙にコントロールされて、生存・修復が可能になると考えられる。

III. グリア活性化因子

現在まで、損傷に反応して運動神経からグリアへと放出され、グリアを活性化させる因子に関してはそれほど多くは明らかになっていない。このなかで最も興味深いのは、シュワン細胞の mitogen である Reg2 と呼ばれる分子が神経損傷後にニューロンからシュワン細胞に向けて放出されることである⁹⁾。Reg2 は脾や消化管で最初に見つかった分泌型の蛋白で、通常末梢や中枢神経系には全く発現が見られない。神経系では末梢の運動ニューロンや後根神経節の知覚ニューロンに損傷が与えられたときのみ発現し、虚血や脳の外傷などの損傷時にはその発現は認められない。これ以外のシュワンの mitogen として、neuregulin のファミリーが知られているが¹¹⁾、これらは発生の途上や成熟動物でも常に発現しており、損傷には応答しない。この点でも Reg2 は極めて典型的な損傷ニューロンからグリアへ発信される因子の一つと考えられる。このほか、損傷を受けた運動

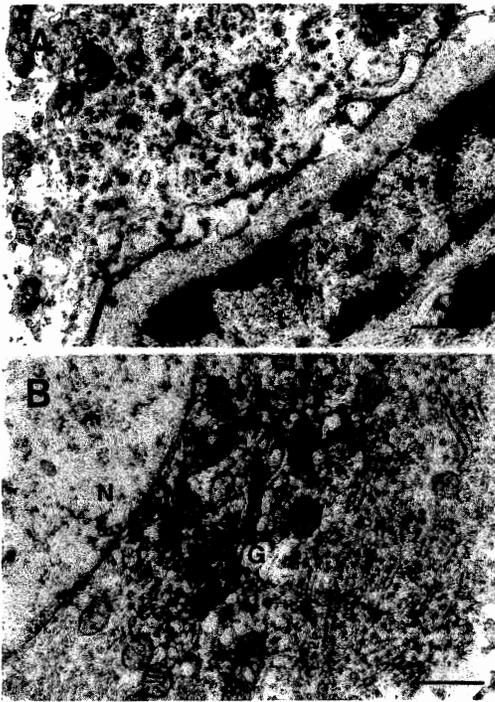


図3 損傷運動ニューロントマイクログリアの間に発現するSBA結合分子
 A: 舌下神経損傷後5日目のマイクログリア (M) と近接する舌下神経運動ニューロン。矢印はグリアとニューロンの間にSBA結合分子の局在を示す。
 B: 運動神経内のゴルジ装置 (G) 近傍に認められるSBA陽性反応。Nは核を示す。

ニューロンからインターフェロン γ 様の分子が放出され、マイクログリアのIL-1産生を促進するという報告がある⁹⁾。これも損傷ニューロンからグリアへ向けて発信される因子の一つとして考えることができる。我々はこのようなグリアとニューロンのインタラクションに関連する分子を探索したいと考え、膜の表面に発現している蛋白の多くが糖鎖の修飾を受けていることに着目し、特定の糖鎖を認識するレクチンを用いてレクチン組織化学を行ってみた。16種のレクチンを用いて、レクチン結合分子が運動神経損傷後に発現するかどうかを検討した。その結果ダイズレクチンのSBAが結合する分子が神経傷害後に新たに運動神経の周りに発現していることが明らかになった。電子顕微鏡で観察してみると、SBA陽性反応は損傷を受けた運動神経とマイクログリアの細胞間隙にのみ

発現していた(図3)。さらに運動ニューロンのゴルジ装置近傍にも発現が認められたことから、このSBA結合分子は、軸索損傷によって運動ニューロンで新たに合成され、マイクログリアとの接着や何らかのインタラクションに関係していると考えられる⁹⁾。残念ながら本分子のクローニングはされていないが、このようなマイクログリアと運動ニューロンのインタラクションに関連する分子が発現していることは間違いないと考えられる。これらのほかにもまだ多くのニューロン/グリア間の介在因子の存在は十分に考えられるので、今後ケモカインファミリーを含めて広く検討することが必要と思われる。

IV. 神経生存維持のための防御反応

神経細胞が死に至るには多くの原因や経路が考えられる。しかし、現在最も多くの研究者によって得られているコンセンサスはグルタミン酸毒性による神経細胞死とスーパーオキシドを始めとするフリーラジカルによる神経細胞死であると考えられる。グルタミン酸は主要な興奮性神経伝達物質であり、細胞内の濃度が極めて高い一方、細胞外では極めて低濃度に抑えられている。虚血や外傷など損傷が生じた時には細胞外のグルタミン酸の濃度が急激に上昇することが知られており、ほとんどの神経細胞は何らかのグルタミン酸受容体を有していることから、細胞外のグルタミン酸の上昇は神経細胞の過興奮につながり神経細胞死に至ると考えられている。細胞外のグルタミン酸の濃度をコントロールしているのは、ニューロンやグリアに存在するグルタミン酸トランスポーターで、これらが積極的にグルタミン酸を細胞内へくみ上げることが必要である。我々の遺伝子検索で見つかったものの一つに神経細胞に発現しているグルタミン酸トランスポーター (EAAT3/EAAC1) がある⁴⁾。また、別のグループはグリア型グルタミン酸トランスポーターのGLASTがアストロサイトで発現上昇することを報告した¹⁴⁾。さらに我々のスクリーニングにおいて、取り込んだグルタミン酸をグルタミンに変換するグルタミン合成酵素 (GS) が検出された。GSは通常

アストロサイトやオリゴデンドロサイトに発現しており、ニューロンでは発現していない。しかし、神経に損傷が生じるとGSが損傷ニューロンで発現し、グルタミン酸の取り込みの効率を上げることが *in vitro* で示された¹³⁾。最近、グリア型のグルタミン酸トランスポーターであるGLT-1/EAAT2のノックアウトでは癲癇症状や損傷に対してニューロンが傷害を受けやすいという報告がTanakaらによってなされた¹²⁾。さらにALSの患者の60~70%の患者で30~40%のEAAT2の蛋白量の減少があることがRothsteinらのグループで発見された。これはEAAT2mRNAのスプライシング異常が原因であるとされている⁹⁾。これらの最近の知見を考え合わせると、損傷運動ニューロンでみられるグルタミン酸取り込み系の賦活化は神経細胞が生存するために極めて重要な役割を担っていると考えられる。もう一つの主要な神経傷害因子であるフリーラジカルに関しては、以前より家族性ALSの原因遺伝子としてスーパーオキシドディスムターゼ(SOD)のミューテーションが見つかっており、さらに変異SODを過剰発現させるとALS様の症状が見られることなどは明らかになっている。運動神経損傷系ではSODのうちMn-SODの著しい発現亢進が見られるほかCu/Zn-SODは運動ニューロンではベースでかなり高い発現が見られる。SODによって産生される H_2O_2 はさらにペルオキシゾーム内のCatalase (Cat)によって、細胞質ではグルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)が H_2O へと代謝する。これらの酵素群も神経損傷後にはすべて発現上昇を示す(図4)。また、神経損傷によって多くの蛋白質は強い酸化ストレスにさらされるが、これらの還元的な修復に働くと考えられている酵素群も発現の亢進を示す。細胞内で最も主要な還元剤はグルタチオン(GSH)であるが、GSHをリフレッシュするグルタチオン還元酵素の発現も著しく増加する。また別の還元剤として知られるチオレドキシン(TRX)も同様に発現が促進される。このように損傷によって発生したスーパーオキシドはヒドロキシラジカルに移行しないための消去系や酸化蛋白の還元的修復のための酵素群が活発

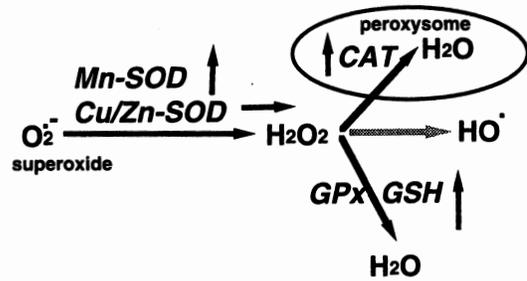


図4 スーパーオキシドの消去系とそれら酵素群の発現変化
SOD; スーパーオキシドディスムターゼ,
CAT;カタラーゼ, GPxGSH;グルタチオンペルオ
キシダーゼ。上向きの矢印は神経損傷後に発現が上
昇することを示す。

に産生され細胞死を防御していると考えられる。

V. 生存のための細胞内情報伝達系の構築

損傷を受けたニューロンの細胞死の一部は Bcl_2 -caspase系を介してであるとされている。事実、 Bcl_2 の過剰発現動物や細胞死シグナルのBax欠損ミュータントでは、損傷により惹起される細胞死(axotomy induced cell death)の一部を防げるという報告がある^{1,2)}。我々のスクリーニングでは成長因子受容体の下流に位置する情報伝達分子の一群が得られている。一般に成長因子受容体はチロシンキナーゼドメインを細胞内に有しShcやGrb2などのアダプターを介してRas-ERKへと行く経路とPI3Kへ至る経路が知られている(図5)。最近PI3Kの下流にAkt/PKBが位置しBadをリン酸化され、リン酸化Badが14-3-3に結合することによってBad以下の細胞死のカスケードを抑制することが *in vitro* で示された⁹⁾。運動神経損傷系ではこのうちPI3K, Akt, 14-3-3がいずれも発現上昇することが明らかになり^{7,10)}、細胞死を抑制するための細胞内情報伝達系が発現していることが考えられる。またAktのリン酸化抗体を用いた実験では運動神経損傷後に強いリン酸化Aktの反応が観察された(未発表)。このことからこの経路の活性自身も促進していると考えられる。また、PI3Kの活性亢進によりPC12では神経突起の伸展も認められており、この経路の活性化は細胞死防御だけでなく、突起伸展においても

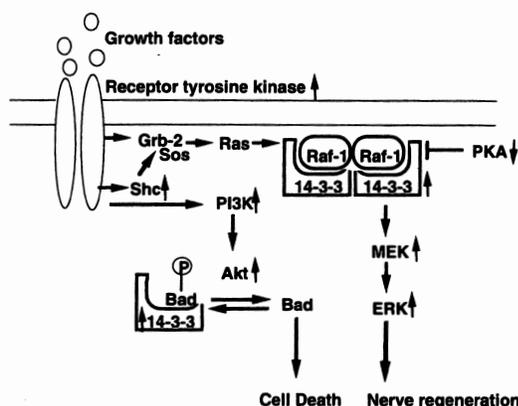


図5 運動神経損傷後の成長因子受容体下流の分子群の発現動態

上向きの矢印は神経損傷後に発現が上昇することを示す。PKAの触媒サブユニットは発現が低下する。

何らかの役割を担っている可能性がある。

おわりに

運動ニューロンの再生現象を分子レベルで説明することを目指して我々は研究を進めているが、遺伝子の探索は一応の成果を挙げつつあると思われる。今回神経損傷後に発現が亢進する既知の分子群は、それなりに説明ができるものも多い。しかし、それらが神経再生に本当に必要不可欠であるかは、今後さらに研究を進めてゆく必要がある。また、今回のスクリーニングにおいて、多くの未知の遺伝子群も得られている。これらの機能的な役割に関してはいまだ説明できないものがほとんどであることも事実である。これら多くの要素を統合して神経再生の分子メカニズムを説明できるように今後の研究の発展に努力しなければならないと考えている。また、神経再生領域の研究を行う上でいくつか留意すべき点も明らかになってきた。昨今の発生工学の発達によりノックアウトやトランスジェニック動物を用いた研究が多くされているが、これらはマウスを用いている点で留意しなければならない。マウスは、系統により神経再生の効率がかなり異なる。特に好んでバッククロスに用いられるC57/B6の系は60%~70%の運動神経しか再生しない。これはラットとは大きく異なる点である。また、知覚神経と運動神経では

ここに示した分子群の中にはまったく逆の発現調節をうける分子群も多い。知覚神経の神経再生を考えるときには、損傷部位(末梢枝または中枢枝)の違いを含めて留意する必要がある。また最近、再生と発生を同じように論じることが多いが、ここにも注意すべき点がある。発生と再生は軸索が伸展し回路を形成するという点では同じように見えるかもしれないが、発生の巧妙なカスケードは再生では当てはまらないことが多い。以上、本領域で研究を展開するにあたって、いくつかの問題点はあるものの、将来的な治療法の確立や神経変性の防御・予防といったことも視野に入れ、効率的な遺伝子や薬剤の導入法の開発に関する研究も導入してゆきたいと考えている。

文 献

- 1) Alberi, S., Raggenbass, M., de Bilbao, F., et al.: Axotomized neonatal motoneurons overexpressing the bcl2 proto-oncogene retain functional electrophysiological properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93 (9): 3978-3983, 1996.
- 2) Deckwerth, T. L., Elliott, J. L., Knudson, C. M. et al.: BAX is required for neuronal death after trophic factor deprivation and during development. *Neuron*, 17 (3): 401-411, 1996.
- 3) Franke, T. F., Kaplan, D. R., Cantley, L. C.: PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell*, 88 (4): 435-437, 1997.
- 4) Kiryu, S., Yao, G. L., Morita, N. et al.: Nerve injury enhances rat neuronal glutamate transporter expression: identification by differential display PCR. *J. Neurosci.*, 15 (12): 7872-7878, 1995.
- 5) Lin, C. L., Bristol, L. A., Jin, L. et al.: Aberrant RNA processing in a neurodegenerative disease: the cause for absent EAAT2, a glutamate transporter, in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron*, 20 (3): 589-602, 1998.
- 6) Livesey, F. J., O'Brien, J. A., Li, M. et al.: A Schwann cell mitogen accompanying regeneration of motor neurons. *Nature*, 390 (6660): 614-618, 1997.
- 7) Namikawa, K., Su, Q., Kiryu-Seo, S. et al.: Enhanced expression of 14-3-3 family members in injured motoneurons. *Brain Res. Mol Brain Res.*, 55 (2): 315-320, 1998.
- 8) Olsson, T., Kristensson, K., Ljungdahl, A. et al.: Gamma-interferon-like immunoreactivity in

- axotomized rat motor neurons. *J. Neurosci.*, 9 (11) : 3870-3875, 1989.
- 9) Ohshige-Hayashi, Y., Kiyama, H. : Expression of Glycine max (soybean agglutinin) binding molecule in injured motoneurons and its specific localization in the extracellular matrix between injured neurons and microglia. *Neurosci. Res.*, Mar ; 27 (3) : 271-275, 1997.
- 10) Owada, Y., Utsunomiya, A., Yoshimoto, T. et al. : Expression of mRNA for Akt, serine-threonine protein kinase, in the brain during development and its transient enhancement following axotomy of hypoglossal nerve. *J. Mol. Neurosci.*, Aug ; 9 (1) : 27-33, 1997.
- 11) Peles, E., Yarden, Y. : Neu and its ligands : from an oncogene to neural factors. *Bioessays*, Dec ; 15 (12) : 815-824, 1993.
- 12) Tanaka, K., Watase, K., Manabe, T. et al. : Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science*, Jun 13 ; 276 (5319) : 1699-1702, 1997.
- 13) Toki, H., Namikawa, K., Su, Q. et al. : Enhancement of extracellular glutamate scavenge system in injured motoneurons. *J. Neurochem.*, 1998, 71 (3) : 913-919.
- 14) Yamashita, T., Kohmura, E., Yuguchi, T. et al. : Changes in glutamate/aspartate transporter (GLAST/GluT-1) mRNA expression following facial nerve transection. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, Jun ; 38 (2) : 294-299, 2113, 1996.