

# AMCoR

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

脳21 (1998.04) 1巻:13～20.

【損傷神経の再生と機能修復】  
損傷神経の生存と再生に關与する遺伝子群

木山博資

## 損傷神経の再生と機能修復

### 損傷神経の生存と再生に 関与する遺伝子群

きやまひろし | 旭川医科大学第一解剖学 (〒078-8307 旭川市西神楽4線5-3-11)

#### SUMMARY

中枢神経系は損傷に対して脆弱であるが、末梢神経系は損傷に対し耐性がある。この違いの分子基盤を解明することによって、損傷中枢神経の細胞死を抑え機能修復を行うための何らかの方策を得ることは極めて重要な課題である。このために、われわれは神経損傷後の末梢運動神経細胞にみられる遺伝子発現動態をディファレンシャルディスプレイ法をはじめとした様々な手法で探索し、得られた結果を統合することによって、損傷神経の生存・再生の分子メカニズムの解明をめざしている。特定の細胞内情報伝達系やグルタミン酸毒性の低下のための分子群、フリーラジカルスカベンジャー、レドックス制御関連分子などが、神経損傷に応答して発現が亢進していることが今までに明らかになった。これらはいずれも神経の損傷に対する防御反応や軸索伸展のための重要な分子群であり、これらの発現を制御することによって神経損傷における新たな治療法の開発が期待される。

#### はじめに

神経細胞は極めて長期間生存することのできる細胞であるが、成熟した神経細胞は分裂・増殖能を失っている。分裂増殖しない故に定常的な神経回路ができていると考えられるが、逆に一旦障害が生じ細胞が死んでしまうとそれを補う細胞が新たに増殖しないため、継続的な機能障害を引き起こしてしまう。脳卒中や脳の外傷が多くの生理機能を一瞬にして奪ってしまうが、実際には神経細胞は障害後直ちに死に至ってはいない。しかし、障害は神経細胞の死へのタイマーのスイッチをONにし、軸索が再び伸びることをブロックしてしまう。一刻も早くこのタイマーをOFFにして軸索再生を促進させ、脳の修復を行いたい。これがいまもっとも求められていることである。われわれは、この目標に向かって現在研究を行っているが、一言に損傷後の神経の修復をめざすといっても、乗り越えなければならぬ多くの山があり、アプローチの方法もいくつかある。われわれは、次のようなアプローチの方法を取っている。一般に損傷に対して中枢神経細胞は脆弱であるが、例外的に末梢神経系特に末梢の運動ニューロンは軸索に損傷を与えても生き残り再生することができる。末梢運動ニューロンが損傷に対していわば耐

#### KEY WORDS

神経細胞死  
軸再生  
ディファレンシャルディスプレイ  
グルタミン酸毒性  
舌下神経

性ともいえるものを持っているのは、耐性を引きだすためのなんらかの分子的なメカニズムが作動するからであり、そのメカニズムを解明すれば、損傷に対して脆弱な神経細胞を救出することができると考えている。そこで現在、末梢の運動ニューロンに損傷を与えたときに発現が変化する遺伝子群をディファレンシャルディスプレイ法をはじめ複数の方法で検索し、得られた分子を統合再構築し、そのメカニズムの理解をめざしている。

## ◆◆ I. 遺伝子探索の方法

### 1. ディファレンシャルディスプレイ

ディファレンシャルディスプレイ法 (DD 法) は異なる 2 群以上の細胞や組織で発現している mRNA 量の違いを一度に比較する方法として知られており、従来からよく用いられているサブトラクション法と同様にある条件下で発現量が変化している遺伝子を探索する方法である。DD 法はサブトラクション法に比べて簡便であり一度に多くの候補遺伝子断片を得ることができるが擬陽性が多い。一方サブトラクション法は最終的に得られる候補クローンは少ないが比較的着実に目的のものが得られるのが特長である。われわれのストラテジーには DD 法が適していると考えられ、手技が簡単なこともあってこの方法を用いることにした<sup>1-3)</sup>。

われわれはラットの舌下神経の損傷モデル動物を用いて研究を行ってきた経緯があり、この系を DD 法に適用した(図 1)。舌下神経はそのほとんどが運動神経からなり、延髄にある起始の神経核からは完全に同側に投射する。したがって片側の神経に損傷を与えれば、同側の舌下神経核に存在する運動神経細胞はすべて障害を受けることになる。ラットの片側の舌下神経を切断し、一定の期間の後に術側と健常側の舌下神経核をそれぞれ切り出し RNA の精製を行った。ラット一匹あたりの舌下神経核は微量であり、十分な RNA

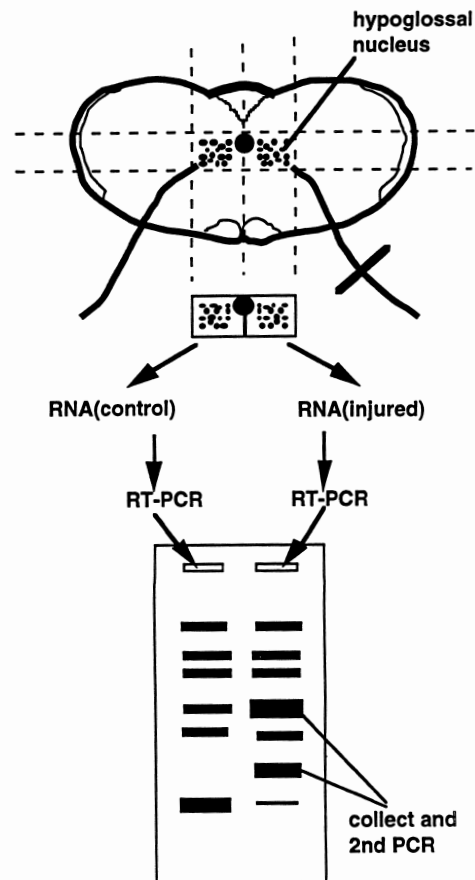


図 1 ディファレンシャルディスプレイによる神経損傷関連遺伝子の探索

片側の舌下神経を切断後、健常側と損傷側の舌下神経核(hypoglossal nucleus)を切り出し、RNA をそれぞれの組織から回収する。放射性物質標識したヌクレオチドを基質に加え RT-PCR を行った後、ゲル上に展開しオートラジオグラフィーを行うと、PCR 産物がラダー状にみられる。

を得るためには約 70 匹ほどのラットからの神経核を集める必要があった。術側および健常側から得られた RNA を cDNA にした後、それを鋳型に任意のプライマーを用いて PCR を行った。このときプライマーとして、当初は dT プライマーとランダムプライマーの 2 本を用いていたが、これだと 3' 側のノンコーディングのみが得られるために全長をクローニングしてみないと得られたものがなんであるかがわからない

ことが多かった。結局、10 から 12 塩基ほどのランダムな配列を有するプライマー 1 本のみを用いる方法に落ちついた。1 本のプライマーがフォワードとリバースの両プライマーとして働き、しかも 1 kb 以下の PCR で増幅が可能な短い cDNA 断片を中心に増幅されることになる。ここで PCR を行うときにアイソトープ標識した dNTP を加えることによって PCR 産物は標識され、電気泳動で展開後にオートラジオグラフィを行うことによって PCR 産物はラダー状のパターンを示す。術側と健常側から得られたサンプルで行った PCR 産物を隣のレーンで電気泳動する。得られたラダーパターンは健常側と術側でほとんど同じであるが、その中で術側においてバンドが濃くなったり、健常側にはみられないが術側において新たにバンドが得られるものが存在する(図 1)。これが目的の神経損傷により発現が増加または新たに発現してきた遺伝子の候補 cDNA 断片となるわけである。以上の過程をプライマーを代えて繰り返すことによって数多くの候補遺伝子断片が得られた。先に述べたように DD 法の欠点は擬陽性が多いことである。したがって、得られた候補を引き続き何らかの方法によってスクリーニングする必要がある。われわれはここで、組織学的なスクリーニングを行った (*in situ* ディスプレイ)。すなわち、あらかじめ片側の舌下神経を切断しておいたラットの延髄の組織切片を用意しておき、DD 法で得られた候補遺伝子断片をプローブとして *in situ* ハイブリダイゼーション法を行った。これにより、損傷側の舌下神経核で実際に mRNA の発現が上昇しているものを選び出すことができた。本スクリーニングにより、DD 法によって得られた候補のうち約 7 割強が擬陽性であることが明らかになった。このようにして最終的に残った cDNA 断片は塩基配列を決定するとともに、データベースへアクセスし、既知のものであるか未知のものであるかを検索し、さらに解析を行うかどうかを判断した。

### 2. ランダムクローニング

DD 法によって得られた遺伝子断片のなかに、神経の損傷に極めて特異的で、発生の途上や他の臓器での発現が全くみられず、通常の cDNA ライブラリーを用いて全長を得ることが極めて困難なクローンがあった。この遺伝子のクローニングには、どうしても損傷運動神経核より得られたライブラリーを用いる必要性があった。このため、われわれは約 1,000 匹の片側舌下神経損傷ラットを作製し、それらから舌下神経核を回収した。これより作製されたライブラリーを用いることによって、従来のライブラリーでは得られなかった遺伝子の全長が得られたわけであるが、このライブラリーからランダムに 500 クローン程を拾いだし、塩基配列を決定するとともに、一部 *in situ* ハイブリダイゼーション法を行ってみた(図 2)。その結果 2 割強のクローンにおいて損傷舌下神経核での発現上昇が確認できた。この割合は、DD 法によって最終的に陽性クローンを得るよりも効率がよく、神経損傷時に発現する遺伝子探索にはこのライブラリーが極めて効果的であることが明らかになった。本ライブラリーから約 500 クローンをランダムにクローニングし塩基配列を決定してみると、同じクローンに数回ヒットすることがある。1 回から 5 回まで、複数回ヒットする確率は指数関数的に低くなるが、複数回ヒットしたものはそれほど多く発現していたことになる。最も多くヒットしたものはミトコンドリアのエネルギー合成系の分子で、次は蛋白合成に関与するリボソーム関連の分子であった。これらは、もともと発現量のかなり多い分子であり神経損傷と直接関連のないものも多く含まれていたが、一部は神経損傷後に強い発現促進を受けていた。神経損傷後には様々な蛋白合成が盛んになり、さらにこれには莫大なエネルギーを必要とするため、このような分子群の発現上昇が必要なのだろうと予想される。このほか、チューブリンなどの細胞骨格分子や細胞死抑

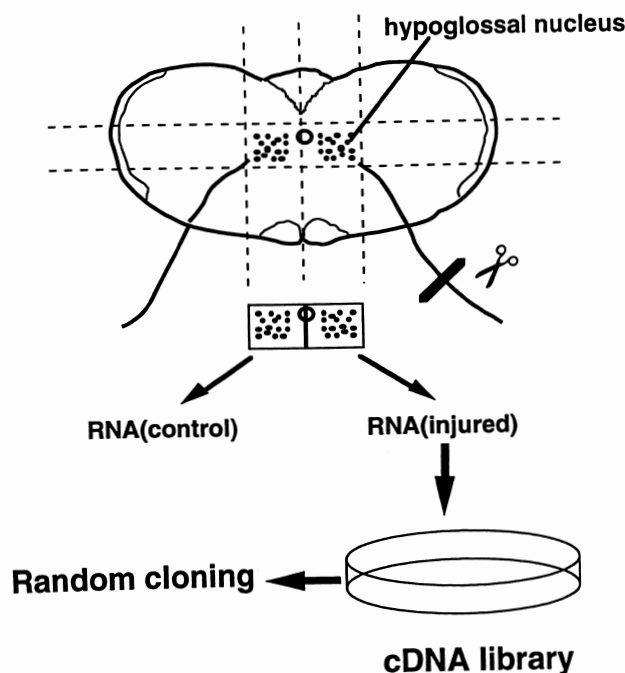


図2 ランダムクローニングの概略

傷害を与えた後の舌下神経核を切り出し、ライブラリーを作製する。その中からランダムにクローンを取りだし、神経損傷後の発現変化を *in situ* ハイブリダイゼーション法で検討する。

制因子、各種のプロテアーゼやそのインヒビターなど多彩な遺伝子群が得られた。もちろんこれに加えて極めて多くの未知遺伝子も得られており、それらの解析が待たれている。

### 3. フォスホリレーションディスプレイ

前述の2つの方法は遺伝子から探索する方法であるが、蛋白機能から探索する方法もわれわれは試みている。DD法などによって遺伝子探索をしていると多く細胞内情報伝達系の遺伝子群が得られる。その多くはキナーゼやフォスファターズであり、これらのリン酸化や脱リン酸化を指標にして新たな分子を同定できないだろうか考えている。その一つの試みとしてフォスホリレーションディスプレイがある。あらかじめ

リン酸化基質となりうるペプチドを含んだゲルに蛋白を泳動し、ゲル内でアイソトープ標識した  $\gamma$ ATP を用いてリン酸化を行うゲル内リン酸化法をそのまま応用したものである<sup>4)</sup>。片側の舌下神経を切断したラットの術側と健常側の舌下神経核を切りだし、ホモジェネートし、合成した基質ペプチドを含むゲルで電気泳動する。このとき、健常側と術側の蛋白を隣のレーンに流すことによってリン酸化の度合いを検出することができる。これにより神経損傷後にリン酸化活性の変化した分子を同定することができる。本方法は実際にキナーゼ活性を指標に分子を検出できる点で前述の方法とは全く異なるアプローチとなるが、最終的にターゲットの分子を精製するまでにはかなりの生化学的な熟練を要する点、またゲルを再生したときにキナーゼ活性を回復させることのできるキナーゼに限られる点が今のところ問題点である。

## ◆◆◆ II. 細胞内情報伝達系の再構築

上述のような方法を駆使することによって、多くの分子が神経損傷後に発現促進をしていることが明らかになったが、これらの分子群には機能的に関連するものが多い。われわれのスクリーニングによって浮かび上がってきたのは特定の細胞内情報伝達系である(図3)。特に神経成長因子受容体の下流として知られる Ras 以下の情報伝達系は発現が著しく促進している。神経成長因子受容体自身の中にも BDNF の受容体として知られる TrkB や p75NGFR, さらに GDNF 受容体などが神経損傷後に運動神経で発現促進する。これら受容体のアダプター分子である Shc も同時に発現が促進する。Shc ファミリーには神経型の N-Shc と末梢型の Shc さらに両者にみられる SCK の3分子が知られているが、興味深いことに、神経損傷後、通常運動神経で発現している N-Shc の発現は低下し、逆に発現がほとんど認められない Shc の発現が著しく

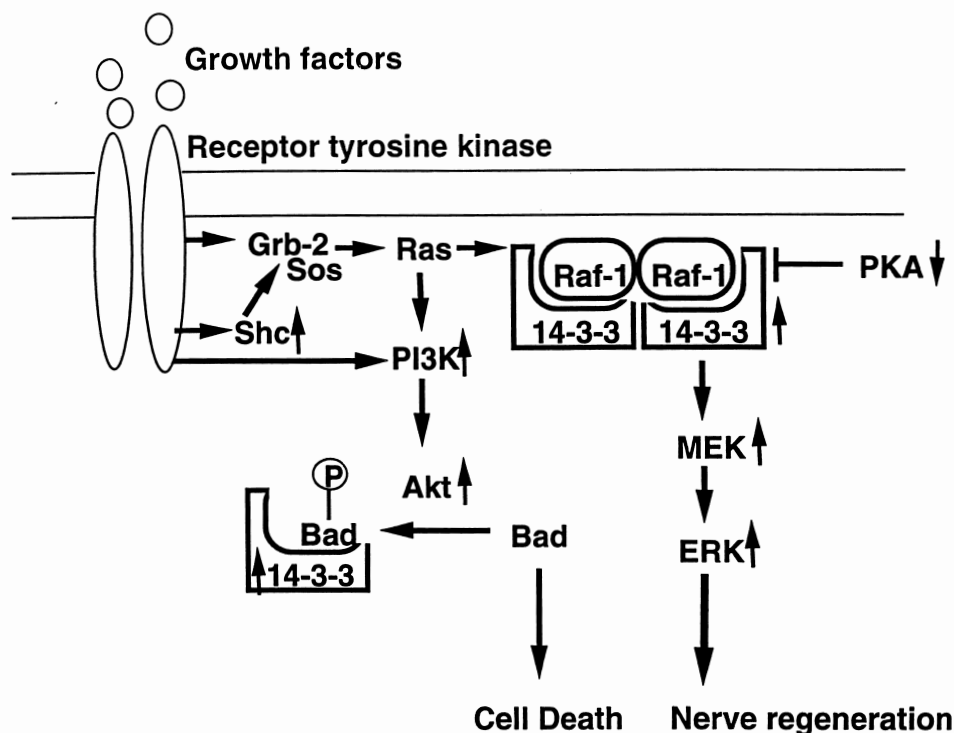


図3 神経損傷後にみられる細胞内情報伝達系分子群の発現変化

増加する<sup>5)</sup>。アダプターレベルでのスイッチングを連想させる。また、Ras 以降の分子群にも神経損傷に対してダイナミックな応答がみられる。Ras の下流に位置する Raf 自身の発現は変化しないが Raf の活性を抑制する PKA (解媒サブユニット) の発現は低下し、逆に Raf を活性化する 14-3-3 の発現が上昇してくる<sup>6)</sup>。さらに下流の MEK1 の発現、それに引き続く ERK1 の発現がいずれも上昇する<sup>7)</sup>。一方、神経成長因子受容体からのもう一つのルートである PI3K やその下流の Akt などにも著しい発現上昇が認められる<sup>10,11)</sup>。最近この Akt がさらに細胞死に関係する Bad をリン酸化しそれに 14-3-3 が結合することにより細胞死へのカスケードを停止させていることが示され極めて興味深い。

神経成長因子受容体の下流に加えて、一部のサイトカイン受容体とそれに引き続く JAK ファミリーにも

発現が促進するものがあることが明らかになった。サイトカイン受容体のうち IL-6 や CNTF, LIF, IL-11, オンコスタチン M などの受容体に共通でシグナルを伝えるために必須の gp130 が発現上昇することが明らかになった<sup>8)</sup>。gp130 の下流は前述の Ras-ERK 系へ繋がるほか、JAK1, JAK2, Tyk2 などの JAK ファミリーのメンバーが関連していることが明らかにされている。このうち神経損傷後には JAK2 の発現が上昇するとともに、JAK3 の発現も著しく上昇する<sup>8)</sup>。実際に gp130 のシグナルの活性化が神経損傷後にどのような影響を与えるかを検討するために、IL-6 と IL-6R $\alpha$  の両者を過剰に発現しているトランスジェニックマウスを用いて舌下神経に損傷を与えてみると、明らかな神経再生速度の上昇がみられた<sup>9)</sup>。このことから、サイトカインを介した情報伝達系の活性化が神経の再生にはポジティブに作用していることが明らかになった。

◆◆ III. 神経細胞死防御

一般に中枢神経系は神経損傷に対して極めて脆弱であり、損傷を受けた細胞の多くが細胞死に至ってしまう。一方、われわれが用いている末梢運動神経系は神経損傷に対して極めて耐性があり、これには何らかの神経細胞死に対する防御機構が存在すると考えられる。実際遺伝子探索を行ってみると神経細胞死防御に関連すると思われる遺伝子が多数検出された。細胞死抑制因子をはじめ、グルタミン酸毒性を低下させるような分子群、細胞内のフリーラジカルのスカベンジャー分子群も発現が上昇していることが明らかになった。DD法によって最初に得られた分子はグルタミン酸トランスポーターであった<sup>1)</sup>。グルタミン酸トランスポーターにはグリア型と神経細胞型があるが、このうち神経細胞型であるEAAC1（ヒトではEAAT3）発現が著しく上昇していることが明らかになった。さらに他のグループによりグリア型のGLASTの発現も上昇していることが報告された<sup>13)</sup>。このほか、小脳に特異的に発現しているEAAT4も神経傷害後には運動ニューロンに新たに発現する(未発表データ)。このように神経損傷後には、細胞外にあってはきわめて毒性の高いグルタミン酸を取り込むためのトランスポーター群の発現が神経細胞でもグリアでも増加するようである(図4)。さらに、DD法で得られた別の分子にグルタミン合成酵素がある。グルタミン合成酵素は通常アストロサイトやオリゴデンドロサイトに存在して細胞外より取り込まれたグルタミン酸をグルタミンに変換する酵素で、神経細胞には発現していない。これが神経損傷後には運動神経で発現していたのである。この生理学的な意義を検討するために通常EAAC1(EAAT3)を発現しグルタミン合成酵素を発現していないHEK細胞にグルタミン合成酵素を発現させ、細胞外のグルタミン酸の取り込みにどのような影響を

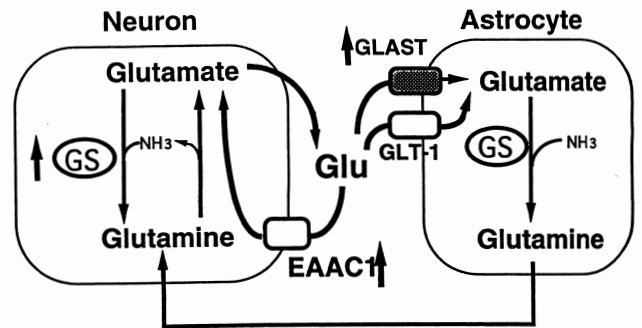


図4 神経損傷後の細胞外グルタミン酸スカベンジシステムの活性化  
GLAST, GLT-1: グリア型 Glu トランスポーター, EAAC1: ニューロン型 Glu トランスポーター, GS: グルタミン合成酵素 (本文参照)

及ぼすかを検討した。グルタミン合成酵素が新たに発現することによってグルタミン酸の取り込み効率率は約20%増加した。このことから、神経損傷後にはEAAC1の発現上昇に加えてグルタミン合成酵素が新たに発現することによって、神経細胞へのグルタミン酸の取り込みが活発になっていると考えられる<sup>14)</sup>。このほか神経細胞死防御機構としてフリーラジカルのスカベンジャーも著しく発現上昇していると考えられる。その一例としてMn-SODの発現促進が報告されている<sup>10)</sup>。また、細胞内の酸化による各種蛋白の機能不全を防御するために細胞内で最も重要な還元系であるグルタチオン系の賦活化が認められる。すなわち神経損傷後は、グルタチオンを合成するために必須であるシステインの細胞外からの取り込みが活性化すると同時に、グルタチオン還元酵素などが一斉に発現上昇する。また、他の還元剤であるチオレドキシンの発現も上昇する。このように神経に損傷を与えた直後には、神経細胞は死から免れるためにラジカルの消去系や還元系を作動させていると考えられる。

## ◆ ◆ おわりに

われわれは末梢運動神経損傷後にみられる神経細胞内での様々な分子の動態を探り、そこから障害に対して脆弱な中枢神経系を生存させ、さらに修復へと向かわせるための何らかの方法を見いだすことをめざしているが、神経修復のための分子間の相互作用やカスケードの詳細を分子レベルで理解するには未だ時間を要すると思われる。しかし、その中の骨格となりえるものがいくつか明らかになりつつあることは間違いない。本稿では遺伝子探索により得られたもののうち既知の分子を中心に述べてきたが、未知の分子も数多くとれている。現在このうち、興味深い発現を示すものについてその機能を解析中であり、この中からまた新たな骨格をなすものが得られると期待している。このような損傷後の神経の生存や修復の分子メカニズムを理解することとは別に、いかに治療へ結び付けるかといった点の研究も重要である。特に必要な蛋白分子の発現を補うための遺伝子導入法が重要である。いかにして、目的の神経細胞またはグリア細胞のみに遺伝子を一時的に導入するか、空間的・時間的ターゲティングが重要な要素となる。損傷を受けた神経系へ一時的に遺伝子を導入するための最も効率のよいベクターは今のところアデノウイルスベクターであると考えられる。もちろんこれにも短所はあるが神経細胞への導入効率はかなり高いと考えられる。実際、神経成長因子をアデノウイルスで導入することによって損傷後死に向かう神経細胞の生存に成功したという報告が最近いくつかなされている。われわれの検索から得られた遺伝子を導入することによって、損傷後に死に向かいつつある細胞をレスキューし、脳の修復を促進できないかとの治療を視野に入れた研究も積極的に推進して行きたい。

## 謝辞

本稿で紹介した研究は、旭川医科大学解剖学第一教室の桐生寿美子、濤川一彦、蘇慶寧、Karil Mansur、加藤英政、中込咲綾の諸先生方、旭川医科大学生化学第一教室の亀下勇助教授、東京医科歯科大学難治研の田賀哲也教授、大阪大学医学部第二解剖学教室の田辺勝久先生、大阪大学医学部分子脳教室の今井祐二先生をはじめ多くの方との共同研究の結果の一部であることを述べ、関係各位に感謝いたします。

## 参考文献

- 1) Kiryu S, Yao GL, Morita N, Kato H, Kiyama H: Nerve injury enhances rat neuronal glutamate transporter expression: identification by differential display PCR. *J Neurosci* 15: 7872-7878, 1995.
- 2) Morita N, Kiryu S, Kiyama H: p53 independent cyclin G expression in a group of mature neurons and its enhanced expression during nerve regeneration. *J Neurosci* 16: 5961-5966, 1996.
- 3) Su QN, Namikawa K, Toki H, Kiyama H: Differential display revealed transcriptional upregulation of the motor molecules for both anterograde and retrograde axonal transport during nerve regeneration. *Eur J Neurosci* 9: 1542-1547, 1997.
- 4) Kameshita I, Ishida A, Fujisawa H: A new peptide conjugate as a highly specific substrate for MAP kinase. *J Biochem* 122: 168-172, 1997.
- 5) Tanabe T, Kiryu-Seo S, Nakamura T, Mori N, Tsujino H, Ochi T, Kiyama H: Alternative expression of Shc family members in nerve injured motoneurons. *Mol Brain Res*, 53: 292-297, 1998.
- 6) Namikawa K, Su Q, Kiryu S, Kiyama H: Enhanced expression of Raf-1 activator, 14-3-3, in injured motoneurons. *Mol Brain Res*, in press, 1998.
- 7) Kiryu S, Morita N, Ohno K, Maeno H, Kiyama H: Regulation of mRNA expression involved in Ras and PKA signal pathways during rat hypoglossal nerve regeneration. *Mol Brain Res* 29: 147-156, 1995.
- 8) Yao GL, Kato H, Khalil M, Kiryu S, Kiyama H: Enhancement in expression of cytokine receptor and its intracellular signaling molecules after peripheral nerve injury. *Eur J Neurosci* 9: 1047-1054, 1997.
- 9) Hirota H, Kiyama H, Kishimoto T, Taga T: Accelerated nerve regeneration in mice by upregulated expression of



- IL-6 and IL-6 receptor after trauma. *J Exp Med* **183**: 2627-2634, 1996.
- 10) Yoneda T, Inagaki S, Hayashi Y, Nomura T, Takagi H: Differential regulation of manganese and copper/zinc superoxide dismutases by the facial nerve transection. *Brain Res* **582**: 342-345, 1992.
- 11) Ito Y, Sakagami H, Kondo H: Enhanced gene expression for phosphatidylinositol 3-kinase in the hypoglossal motoneurons following axonal crush. *Mol Brain Res* **37**: 329-332, 1996.
- 12) Owada Y, Utsunomiya A, Yoshimoto T, Kondo H: 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* **9**: 27-33, 1997.
- 13) Yamashita T, Kohmura E, Yuguchi T, Shimada S, Tanaka K, Hayakawa T, Tohyama M: Changes in glutamate/aspartate transporter (GLAST/GluT-1) mRNA expression following facial nerve transection. *Mol Brain Res* **38**: 294-299, 1996.
- 14) Toki H, Namikawa K, Su Q, Kiryu-Seo S, Sato K, Kiyama H: Enhancement of extracellular glutamate scavenge system in injured motoneurons. *J Neurochem* (in press), 1988.