

平成 22 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19700301  
 研究課題名（和文）  
 損傷した中枢神経軸索再生のための基礎研究—プロテオグリカンの作用機序の解明  
 研究課題名（英文）A study for axon regeneration in the damaged CNS -clarification of  
 inhibitory mechanisms of chondroitin sulfate proteoglycan  
 研究代表者  
 久保山 友晴（Kuboyama Tomoharu）  
 独立行政法人理化学研究所・神経成長機構研究チーム・研究員  
 研究者番号：10415151

## 研究成果の概要（和文）：

脊髄損傷部位周辺ではコンドロイチン硫酸プロテオグリカン（CSPG）の濃度勾配が形成され、神経軸索の再生が阻害される。本研究は、CSPG 濃度勾配上で再生不全に陥った軸索の先端部を再現した培養系を用い、軸索が再生できない分子的原因を探ることを目的とした。本研究の結果、軸索先端部において細胞と基質側の接着を担う細胞接着斑の形成制御が、CSPG 濃度勾配上における軸索再生に重要な役割を果たすことを初めて示した。

## 研究成果の概要（英文）：

I attempt to molecularly clarify why axons cannot regenerate in the damaged spinal cord where a gradient of chondroitin sulfate proteoglycan (CSPG) is formed. I used a culture system that reproduced axon endings failing to migrate forward on the inhibitory CSPG gradient. In this study, I conclude that regulation of cell-matrix adhesion formation plays a critical role in axon regeneration across the inhibitory CSPG gradient.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	0	1,200,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	600,000	3,800,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学 ・神経科学一般

キーワード：コンドロイチン硫酸プロテオグリカン、プロテインキナーゼ A、細胞接着斑、パキシリン、軸索再生

## 1. 研究開始当初の背景

成体哺乳類の中枢神経組織において、神経軸索は損傷部位を越えて再生することがで

きない。1928年Cajalは、脊髄損傷部位近傍で軸索終末部が膨腫した球状体を呈して伸長が停止することを発見し、これを dystrophic endball と名づけた。Dystrophic endball の形成が軸索再生不

全の原因だと考えられているが、未だにその形成機序は明らかになっていない。損傷した中枢神経組織では、糖タンパクであるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG) の濃度勾配が、損傷部位を中心に形成される。研究代表者と共同研究を行なっている Case Western Reserve 大学 Silver 研では、移植神経細胞の軸索が損傷部位近傍の高濃度 CSPG に遭遇すると、終末部は dystrophic endball を形成し、伸長が停止することを報告した (Davies et al., J Neurosci, 1999)。

## 2. 研究の目的

本研究は、中枢神経組織の損傷部位近傍と同様の CSPG 濃度勾配存在下で神経軸索の終末部が dystrophic endball を形成して移動を停止することを再現した培養系を用い、dystrophic endball が前方への移動不全に陥る機序を解明し、軸索が再生できない原因を分子的に明らかにすることを目的とする。

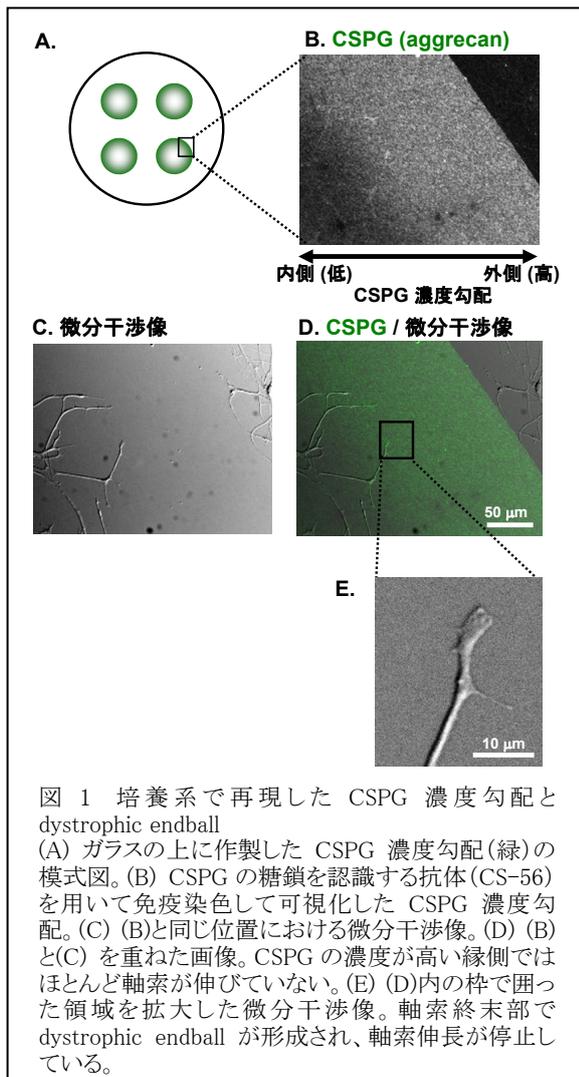


図 1 培養系で再現した CSPG 濃度勾配と dystrophic endball (A) ガラスの上に作製した CSPG 濃度勾配(緑)の模式図。(B) CSPG の糖鎖を認識する抗体 (CS-56) を用いて免疫染色して可視化した CSPG 濃度勾配。(C) (B)と同じ位置における微分干渉像。(D) (B)と(C)を重ねた画像。CSPG の濃度が高い縁側ではほとんど軸索が伸びていない。(E) (D)内の枠で囲った領域を拡大した微分干渉像。軸索終末部で dystrophic endball が形成され、軸索伸長が停止している。

## 3. 研究の方法

### 1) 細胞培養

培養皿上の CSPG 濃度勾配は、Silver 研の方法 (Tom et al., J Neurosci, 2004) に準拠して作製した (図 1)。成体ラット (Sprague-Dawley ラット、雌性、200 - 240 g) の後根神経節神経細胞を、上述した CSPG 濃度勾配上で培養した。培養 4 時間後、薬物を処置し、そのさらに 2 日後に細胞を固定し、神経細胞マーカーの  $\beta$ -tubulin III に対する抗体と、CSPG の糖鎖を認識する CS-56 抗体を用いて免疫染色を行なった。そして、CSPG 濃度勾配上を伸長する神経軸索の長さを計測した。また、薬物処置せず同様に培養して 2 日後、dystrophic endball が形成されているのを確認した後、薬物を処置し、dystrophic endball の挙動を明視野で観察した。

### 2) 変異遺伝子作製・導入

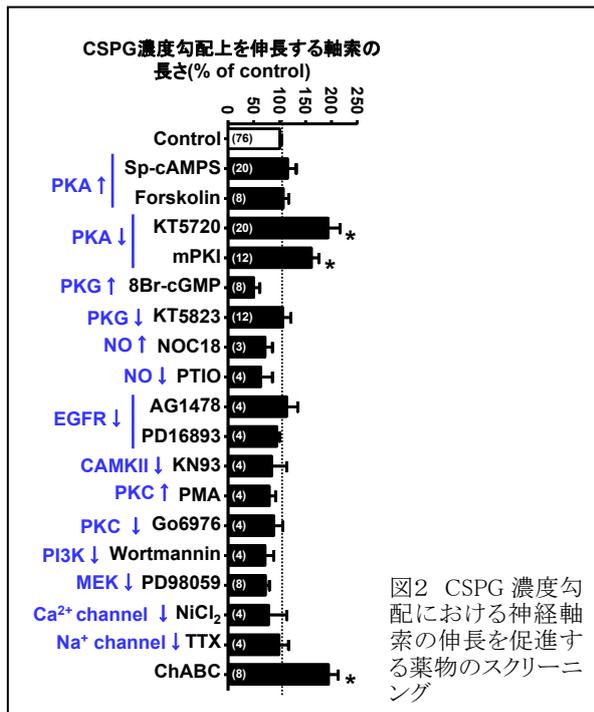
Paxillin の 301 番目のセリン残基をアラニン (S301A)、あるいはアスパラギン酸 (S301D) に置換した非リン酸化型模倣体、あるいはリン酸化型模倣体をそれぞれ作製した。そしてこれらに蛍光タンパクが融合して発現するプラスミドベクターを構築し、エレクトロポレーション法にて神経細胞に発現させた。

### 3) 全反射蛍光観察

基質に近い領域に存在する蛍光分子のみを励起し、蛍光観察することができる全反射蛍光顕微鏡を用い、蛍光 paxillin のライブイメージングを行なった。そして正常な軸索終末部及び dystrophic endball において、形成される paxillin 凝集のライフタイムを計測した。

## 4. 研究成果

Silver 研では、培養系の CSPG 濃度勾配において神経軸索の伸長を誘発させる活性があるかどうか、9 種の薬物について検討した結果、いずれの薬物にもその活性が見られなかった (Steinmetz et al, J Neurosci, 2005)。そこで本研究ではさらに 17 種の薬物について同様の検討を行なった。用いた薬物のうち、プロテインキナーゼ A (PKA) 阻害剤である KT5720 及び myristoylated PKI (14-22) (mPKI) を処置した場合のみで、CSPG 濃度勾配上を伸長する軸索の長さが有意に増加した (図 2)。この作用は、CSPG の糖鎖を分解する酵素 chondroitinase ABC (ChABC) を処置した時と同程度であった。



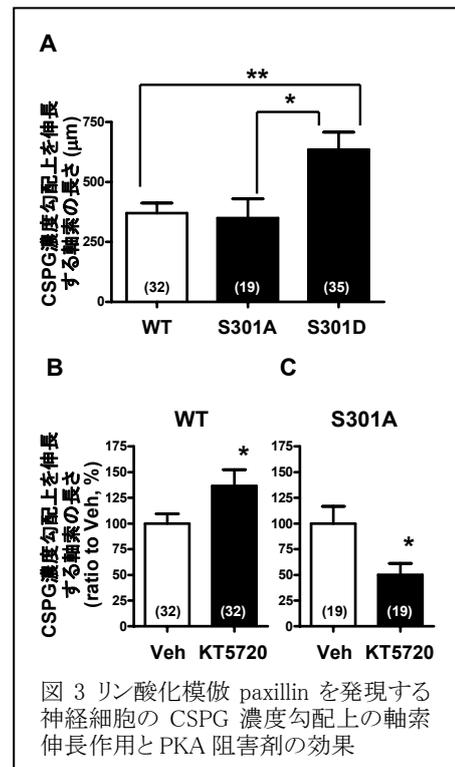
また、既に形成された dystrophic endball に対して PKA 阻害剤の KT5720 (表 1A) あるいは mPKI (表 1B) を処置した結果、溶媒 (Vehicle) を処置した場合に比べ、前方への移動を再開させる dystrophic endball の数が有意に増加した。以上のことから、PKA 阻害により、CSPG 濃度勾配存在下で軸索再生が誘発されることが明らかになった。

表 1 薬物処置後の dystrophic endball の挙動

A		Vehicle	KT5720
前方移動再開	8 (16.3%)	44 (57.1%)	
その場にとどまる	41 (83.7%)	33 (42.9%)	
薬物処置90分後		$p < 0.0001, \chi^2 = 20.58$	
B		Vehicle	mPKI
前方移動再開	3 (10.3%)	18 (46.1%)	
その場にとどまる	26 (89.6%)	21 (53.8%)	
薬物処置60分後		$p = 0.0016, \chi^2 = 9.992$	

近年、軸索先端部において、細胞と基質側の接着を担う細胞接着斑の形成制御が軸索伸長に重要な役割を果たすと、他グループより報告された (Woo et al., J Neurosci, 2009)。そこで本研究では、細胞接着斑構成分子であり、その形成を制御する paxillin に着目した。Paxillin は、p21-activated kinase (PAK) によって 301 番目のセリン残基がリン酸化され、その結果、細胞接着斑の形成・脱離のターンオーバーが増加し、細胞運動が活発になる (Nayal et al., J Cell Biol, 2006)。PAK

は、PKA によってリン酸化されることによりその活性が阻害される (Howe & Juliano, Nat Cell Biol, 2000)。以上のことから研究代表者は、dystrophic endball において、PKA 阻害により PAK の活性が増加し、paxillin がリン酸化され、細胞接着斑のターンオーバーが増加する結果、dystrophic endball が前方への移動を再開するのではないかと推測した。そこでまず、paxillin のリン酸化模倣体 (S301D paxillin) を神経細胞に発現させ、CSPG 濃度勾配下で 2 日間培養した。その結果、野生型 (WT paxillin) あるいは非リン酸化模倣体 (S301A paxillin) を発現させた場合に比べ、CSPG 濃度勾配上を伸長する軸索の長さが有意に増加した (図 3A)。また、野生型 paxillin を発現する神経細胞に PKA 阻害剤の KT5720 を処置した場合、溶媒処置群 (Veh) に比べて CSPG 濃度勾配上を伸長する軸索の長さが増加したが (図 3B)、非リン酸化模倣 paxillin を発現させた神経細胞に対して KT5720 を処置しても CSPG 濃度勾配上を伸長する軸索の長さは溶媒処置群に比べて増加しなかった (図 3C)。



最後に、全反射蛍光顕微鏡を用いて細胞接着斑構成分子である paxillin のライブイメージングを行い、細胞接着斑の形成制御を可視解析した。正常な軸索終末部において、リン酸化模倣 paxillin を発現させた神経細胞では、非リン酸化模倣 paxillin を発現させた場合に比べ、paxillin 凝集のライフタイムが有意に減少、つまり、細胞接着斑の形成・脱離のターンオーバーが増加した (図 4)。

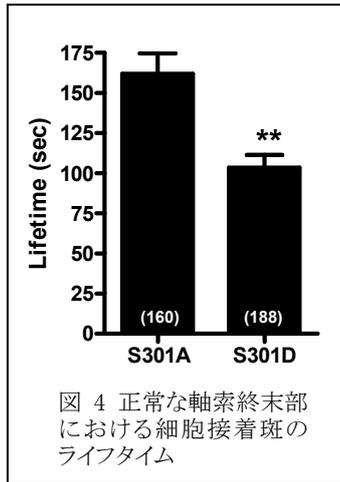


図4 正常な軸索終末部における細胞接着斑のライフタイム

次に、dystrophic endball に対して薬物を処置し、薬物処置 31 分前から 1 分前までの 30 分間 (pre) と処置 2 分後から 32 分後までの 30 分間 (post)、paxillin 凝集のライフタイムを計測した。溶媒処置群 (Veh) では、処置前と処置後で paxillin のライフタイムに有意な差が見られなかったが (図 5A)、PKA 阻害剤の KT5720 処置群の場合、処置前に比べて処置後は paxillin 凝集のライフタイムが有意に減少、つまり細胞接着斑のターンオーバーが増加した (図 5B)。

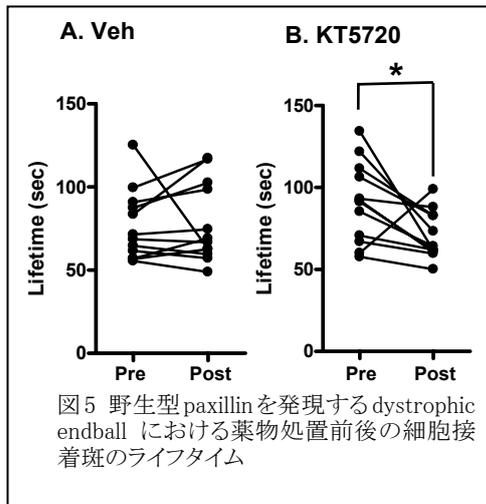


図5 野生型 paxillin を発現する dystrophic endball における薬物処置前後の細胞接着斑のライフタイム

KT5720 を処置した時、dystrophic endball が前方への移動を再開するまでに要した平均時間は、 $24.2 \pm 4.9$  分であった。よって、KT5720 処置による細胞接着斑のターンオーバーの増加は、前方移動を再開する前に生じていると考えられた。よって dystrophic endball では、細胞接着斑のターンオーバーが増加することにより、前方への移動が再開することが示唆された。次に、非リン酸化模倣 (S301A) paxillin を発現させた dystrophic endball に溶媒 (Veh) あるいは KT5720 を処置した場合、いずれも処置前と処置後で細胞接着斑のターンオーバーに変化がなかった (図 6)。よって、PKA 阻害により

paxillin がリン酸化されていることが示唆された。

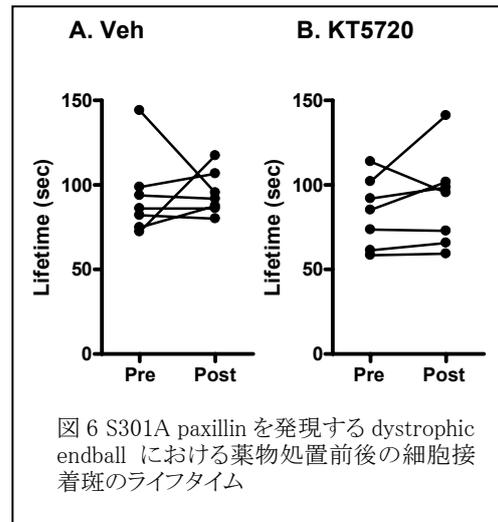


図6 S301A paxillin を発現する dystrophic endball における薬物処置前後の細胞接着斑のライフタイム

以上、PKA 阻害により paxillin がリン酸化され、細胞接着斑形成が制御されることにより、dystrophic endball が前方移動を再開することが強く示唆された。よって CSPG 濃度勾配下では、PKA 活性や細胞接着斑の形成制御に異常が生じていることが推測された。また本研究により、軸索再生における細胞接着斑形成制御の重要性が初めて示された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

1) 久保山友晴、Jerry Silver、上口裕之: パキシリンのリン酸化による軸索再生の制御、第 32 回日本神経科学大会 (名古屋)、平成 21 年 9 月 16 日～18 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

久保山 友晴 (Kuboyama Tomoharu)

独立行政法人理化学研究所・神経成長機構研究チーム・研究員

研究者番号: 10415151

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし