

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430043

研究課題名(和文) CRMPの神経回路形成および神経再生における役割の解明と脊髄損傷治療への応用

研究課題名(英文) Elucidation of roles of CRMP in neural circuit formation and regeneration and application for the treatment of spinal cord injury

研究代表者

大島 登志男 (Ohshima, Toshio)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：20311334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではCRMPの機能について、神経回路形成における役割と神経再生に関わる役割に着目し、遺伝子改変マウスを用いて解析した。神経発生期のCRMPの役割については、CRMP1とCRMP4が脳皮質5層神経のbasal dendriteの発達に関与すること、CRMP2のリン酸化が樹状突起スパイン形成に影響を与えることを明らかにした。脊髄損傷モデルを用いた解析により、CRMP2のリン酸化を抑制することにより、運動機能と感覚機能の脊髄損傷からの回復が良好となることを示すと同時に、LKEを投与することにより脊髄損傷後の運動機能回復が良好となることを報告した。

研究成果の概要(英文)：In present study, we analyzed the role of CRMP family proteins in brain development and neural regeneration by using mutant mice of CRMP genes. We reported orientation abnormality of basal dendrites of layer V neurons in cerebral cortex of CRMP4 KO mice and this phenotype became worse in CRMP 1/4 double KO mice (Takaya et al., 2017). We also reported the involvement of CRMP2 phosphorylation in dendritic spine formation (Jin et al., 2016). In neural regeneration, we found that suppression of CRMP2 phosphorylation promoted functional recovery of motor and sensory system after spinal cord injury (Nagai et al., 2016). We further showed that LKE, which modified the function of CRMP2, also promoted recovery of motor function after spinal cord injury (Kotaka et al., 2017). These results indicate the importance of CRMP family proteins in brain development and their involvements in neural regeneration.

研究分野：神経科学

キーワード：脳皮質形成 樹状突起形成 スパイン形成 神経再生 脊髄損傷

## 1. 研究開始当初の背景

(1) CRMP2 は軸索ガイダンス分子 Sema3A の細胞内シグナル制御分子として同定されたが、軸索の退縮のみならず、神経細胞極性、樹状突起伸長やシナプス形成に関与することが明らかにされてきた。CRMP は CRMP1-5 のメンバーを有するファミリータンパク質で、中枢神経系形成期にオーバーラップして発現していることが示されている。

(2) 我々は Sema3A の反応過程で、Cdk5 による CRMP2 の Ser522 リン酸化が軸索退縮反応に必須であることを示した。さらに GSK3 により Thr509, Thr514, Thr518 がリン酸化され、チュープリンダイマーとの結合能が低下して軸索の退縮が起きることを示した。このリン酸化部位の Ser を Ala に 1 アミノ酸置換した CRMP2knockin(KI)マウスを作出した。以上の経緯から、CRMP が神経細胞の発達に重要であるとの仮説を立てた。また、脳発達期の CRMP の機能を解明するには、重複した CRMP 遺伝子欠損を持つマウスの作成と解析が必要であると考えた。

(3) Alabed らは、培養神経細胞を用いて、神経再生阻害物質である MAG の細胞内シグナル伝達に CRMP4 が関与している可能性を示した。我々は、CRMP4 欠損マウス由来の後根神経節細胞(DRG)を用いて、CRMP4 欠損由来 DRG は MAG への反応性が低下していることを確認した。また軸索切断時に起きるワーラー変性時に、ユビキチンリガーゼ ZNFR1 が CRMP2 のリン酸化を制御していることが示されているが、マウス個体を用いた実験は行なわれていない。

## 2. 研究の目的

神経発達特に神経回路形成に重要な働きが示唆されている軸索ガイダンス細胞内シグナル制御分子 " CRMP " の機能について、遺伝子改変マウスを用いて解明する。さらに、

CRMP4 の発現と CRMP2 のリン酸化を抑制することで脊髄損傷が顕著に改善することを見出し、神経再生における CRMP の機能を詳しく解析することで、CRMP およびそのリン酸化をターゲットとした脊髄損傷治療へ新たな治療法の開発に寄与することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) CRMP の神経発生における役割の解明

・ CRMP1KO, CRMP2KI, CRMP4KO の多重変異マウスの作成: これらの遺伝子変異マウスの神経細胞移動の解析、樹状突起、軸索形成、スパイン形成などの神経回路形成の解析を行なう。

### (2) CRMP の神経再生における役割の解明とその応用

・ CRMP4KO, CRMP2KI マウスの脊髄損傷後の回復について 1) BMS スコアによる評価 2) 組織学的評価、3) 生化学的評価を行なう。  
・ リン酸化阻害剤など薬剤による CRMP2 リン酸化阻害による脊髄損傷回復の評価を、1) BSA スコアなどの行動解析、2) 組織学的解析、3) 生化学的解析について行なう。

## 4. 研究成果

### (1) 神経発達における役割の解明

CRMP1-5 の機能的重複のために、単独の機能欠損では明らかな異常があらわれないことが分かっているため、CRMP1, CRMP2, CRMP4 の遺伝子改変マウスを組み合わせで欠損しているマウスを作成した。この際、CRMP2 に関しては、CRMP2KI を用いた。CRMP4 欠損では、basal dendrite の下向き傾向があり、CRMP1 欠損との 2 重欠損でこの異常が増悪されることを明らかにした。また、CRMP2 のリン酸化が樹状突起スパイン形成に与える影響について CRMP2KI マウスを用いて明らかにした。

(2) CRMP4 欠損は脊髄損傷後の回復を促進する

脊髄損傷後の回復を、組織学的解析に加え機能的回復を BMS スコアと感覚機能の回復を hot plate テストで行ない、野生型と CRMP4 欠損マウスで比較した。その結果、CRMP4 欠損マウスでは、軸索伸長の促進と炎症反応の低下が観察され、運動機能と感覚機能の回復が良好であることが明らかとなった。

### (3) CRMP2 のリン酸化抑制は脊髄損傷後の回復を促進する

CRMP2 のリン酸化の抑制が脊髄損傷からの回復に有利に働くとの仮説を立てて、Cdk5 による CRMP2 のリン酸化が起きない CRMP2KI マウスを用いて検証した。脊髄損傷後に Cdk5, GSK3 $\beta$ による CRMP2 のリン酸化が起きることが確認できた。次に、CRMP2KI と野生型のマウスに脊髄損傷を起こして、運動機能回復を BMS スコアで、感覚機能の回復を hot plate での温度上昇に対する反応として、それぞれ術後 4 週間検討した。その結果、野生型に比べ、CRMP2KI では、運動機能及び感覚機能の回復が顕著に良好であった。また、DRG ニューロンの CSPG に対する反応が減弱していること、BDNF への反応が上昇していることなどが分かった。これらの事が、感覚機能回復に寄与していると考えられ、機能回復は組織学的検討でも裏付けられた

### (4) CRMP2 機能調整薬 LKE は脊髄損傷後の回復を促進する

LKE を投与した群では対照群に比べて、軸索伸長が良好で、炎症反応も抑制されていた。BMS スコアによる評価で、運動機能の回復も良好であることが判明した(図 1)。

以上より、本研究により CRMP2 及び CRMP4 の機能修飾が脊髄損傷などの治療ターゲットになり得ることを明らかとなった。

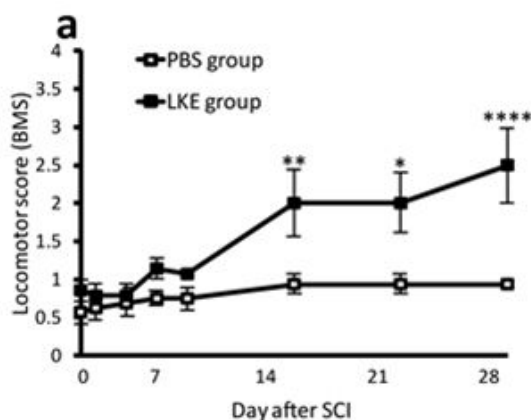


図 1 LKE の運動機能回復に対する効果  
\*\*\*,  $p < 0.001$

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Takaya R, Nagai J, Piao W, Niisato E, Nakabayashi T, Yamazaki Y, Nakamura F, Yamashita N, Kolattukudy P, Goshima Y, Ohshima T. CRMP1 and CRMP4 are required for proper orientation of dendrites of cerebral pyramidal neurons in the developing mouse brain. *Brain Res* 1655:161-167, 2017、査読有  
DOI: 10.1016/j.brainres.2016.11.003.

Kotaka K, Nagai J, Hensley K, Ohshima T. Lanthionine ketimine ester promotes locomotor recovery after spinal cord injury by reducing neuroinflammation and promoting axon growth. *BBRC* 483:759-764, 2017、査読有  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.12.069.

Nagai J, Takaya R, Piao W, Goshima Y, Ohshima T. Deletion of *Crmp4* attenuates CSPG-induced inhibition of axonal growth and induces nociceptive recovery after spinal cord injury. *Mol Cell Neurosci*. 74:42-48, 2016、査読有  
DOI: 10.1016/j.mcn.2016.03.006

Nagai J, Owada K, Kitamura Y, Goshima Y, Ohshima T. Inhibition of CRMP2 phosphorylation repairs injured CNS by reducing inhibitory response and enhancing sensitivity to neurotrophic factor. *Exp Neurol* 277, 283-295, 2016、[査読有](#)  
DOI: 10.1016/j.expneurol.2016.01.015

Jin X, Sasamoto K, Nagai J, Yamazaki Y, Saito K, Goshima Y, Inoue T, Ohshima T. Phosphorylation of CRMP2 by Cdk5 regulates dendritic spine development of cortical neuron in the mouse hippocampus. *Neural plasticity* Article ID 6790743, 2016、[査読有](#)  
DOI: 10.1155/2016/6790743

Nagai J, Kitamura Y, Owada K, Yamashita N, Takei K, Yoshio Goshima Y, Ohshima T. Genetic deletion of *Crmp4* promotes axonal regrowth after spinal cord injury by reducing microtubule destabilization and inflammatory responses. *Sci. Rep* 5:8269, 2015、[査読有](#)  
DOI: 10.1038/srep08269.

〔学会発表〕(計 7 件)

小高 謙, Kenneth Hensley, 大島 登志男 「ランチオニンケチミンエステルによる神経炎症抑制と軸索伸長を介した脊髄損傷後の後肢運動機能の向上」第 39 回日本分子生物学年会、2016/12/02、横浜

Jun Nagai, Kazuki Owada, Yoshiteru Kitamura, Yoshio Goshima, Toshio Ohshima “CRMP2 dephosphorylation induces locomotor and sensory recovery

after spinal cord injury”, BMB2015、2015/12/04、神戸

Jun Nagai, Kazuki Owada, Yoshiteru Kitamura, Yoshio Goshima, Toshio Ohshima “Dephosphorylation of CRMP2 enhances recovery after spinal cord injury”, SfN Annual Meeting “Neuroscience 2015、2015/10/20、シカゴ・USA

Jun Nagai, Yoshiteru Kitamura, Kazuki Owada, Yoshio Goshima, Toshio Ohshima “Dephosphorylation of CRMP2 enhanced recovery after spinal cord injury”, 第 58 回日本神経化学学会大会、2015/09/11、大宮

長井 淳、北村 圭輝、大和田 一喜、五嶋 良郎、大島 登志男 「CRMP 遺伝子変化は細胞骨格不安定化と炎症反応を抑えることにより中枢神経系損傷後回復を促進する」第 37 回日本分子生物学会年会、2014/11/26、横浜

Jun Nagai, Yoshiteru Kitamura, Kazuki Owada, Yoshio Goshima, Toshio Ohshima “Genetic modifications of *Crmp* enhance axonal regrowth after spinal cord injury by reducing cytoskeletal destabilization and inflammatory responses”, *Neuroscience* 2014、2014/11/18, Washington DC, USA

長井淳, 北村圭輝, 大和田一喜, 五嶋良郎, 大島登志男 「中枢神経系損傷後の再生における軸索ガイダンス分子 CRMP の機能解明」日本生理学若手の会フォーラム、2014/07/26、東京

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ohshima.biomed.sci.waseda.ac.jp/>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

大島 登志男 (OHSHIMA, Toshio)

早稲田大学 理工学術院 教授

研究者番号：20311334

### (2)研究協力者

長井 淳 (NAGAI, Jun)