

平成 30 年 10 月 23 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26440008

研究課題名(和文) 神経軸索損傷後の変性/再生誘導機構

研究課題名(英文) Degeneration- and regeneration-inducing mechanism in neuronal axon

研究代表者

平井 秀一 (Hirai, Syu-ichi)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：80228759

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)： 損傷を受けて変性した神経軸索を新たに再生する過程を、軸索の一次的な形成過程と比較しつつ、過去にマウスにおける大脳発生に必要なものとして独自に同定した遺伝子の機能を切り口に解析した。これにより、軸索の一次的な形成と再生は共通の分子機構に依存しつつも、これらを制御するシグナル伝達機構には固有のものがあることを示唆する結果が得られた。困難とされる脳脊髄神経の軸索再生を促す手法開発の新たな糸口となることが期待される。

研究成果の概要(英文)： We investigated axon regeneration as well as axon formation in developing neurons, from a point of view of the function of a gene that we have identified as a key molecule for the development of mouse cerebrum. The results indicate that common molecular mechanisms function in the formation and the regeneration of axons, and that such mechanisms are regulated via different signaling pathways. These notions suggest a new approach to promote axon regeneration in damaged central nervous system, that is still challenging.

研究分野：分子生物学

キーワード：軸索 微小管 シグナル伝達 大脳皮質

## 1. 研究開始当初の背景

細胞膜が損傷されると細胞は死滅するが、損傷の程度によってはこれが修復されることが知られている。ウニ卵や骨格筋を用いた修復過程の詳細な研究によると、細胞膜の破れはまず細胞内に存在する様々な膜構造体が patch を形成することで繕われ、その後これらが融合して細胞膜の再形成が進むとされる (McNeil et al, 2000, JCS 113:1891; Han & Campbell, 2007, Curr Opin Cell Biol 19:409)。神経細胞の軸索が損傷を受けた際にも同様の patch が形成されることが、アメフラシの巨大神経や哺乳類の感覚神経を用いて示されている (Fishman & Bittner, 2003, News Physiol Sci 18:115)、神経細胞の場合は単なる膜の修復に終わらず、その後様々な細胞応答を引き起こす。神経細胞の軸索が切断されると、切断部位から軸索の末端にかけての部分はワラー変性を引き起こして消失する一方、細胞体側の膜修復部位からはやがて成長円錐が形成され、軸索の再生が始まる。この軸索の再生にはカルシウムイオンの流入が必要であることが示されており、これにより細胞骨格の再編が進み、軸索再生が可能になるとされる (Bradke et al, 2012, Nat Rev Neurosci 13:183)。さらに、損傷を受けた軸索のワラー変性と再生の双方が、DLK と呼ばれるセリン・トレオニンキナーゼに依存することが明らかになってきた。DLK はストレス応答に関わる MAP キナーゼ関連酵素として知られる JNK の活性化を誘導する上流因子として過去に我々が同定した MAP3K である (Hirai et al, 1996, Oncogene 12:641)。我々はその後 DLK の発現が神経細胞に特異的であることに加え、ノックアウトマウスや培養神経細胞を用いた解析により、大脳皮質発生過程における投射神経の細胞移動や軸索形成を支える因子であることを報告してきた (Hirai et al, 2006, J Neurosci 26:1192; Hirai et al, 2011, J Neurosci)。DLK の発現は神経分化に伴って強く誘導されるのであるが、分化した神経細胞の軸索が損傷を受けた際にこの DLK はいかにしてそれを感知し、ワラー変性や軸索再生に必要なシグナル伝達を惹起するののかについては依然不明である。DLK-JNK 経路は微小管の制御や遺伝子発現制御を介して神経細胞の分化や死の制御に関わることが我々を含め多くのグループから報告されている (Tedeschi & Bradke, 2013, EMBO rep 14:605) ことから、軸索の再生やワラー変性においても同様の分子機構が機能していることが予想される。

## 2. 研究の目的

中枢神経の軸索は、末梢神経のそれと比べて損傷後の再生が困難とされる。この主たる要因としては中枢神経組織中に存在する種々のグリア細胞により産生されるプロテオグリカンなどの阻害因子の存在が挙げられている。一方、神経細胞自身の持つ再生能も中枢神経細胞においては低いとされ、近年電位依存性カルシウムチャネルが再生能抑制に関わっていることを示す結果が報告されている (Tedeschi et al, 2016, Neuron 92:419)。ただ中枢神経の再生に関する実験系は脊髄損傷モデルなど、in vivo の実験系を用いたものがほとんどであるため、中枢神経細胞自身に対する影響や中枢神経細胞内におけるシグナル伝達経路の解析は困難な状況と言える。本研究は中枢神経細胞初代培養を用いてこういった解析を行う実験系を確立するとともに、軸索の損傷、再生という局面で神経細胞に何が起きているかを軸索の形成、分枝、変性といった異なる局面と比較しつつ、これまでに我々が軸索形成への関与を示してきた DLK-JNK 経路を切り口に明らかにすることを目的とするものである。これにより神経細胞がその一部である軸索の損傷をどのように感知し、修復、再生へと繋げていくのかを、分子レベルで理解する重要な手掛かりが得られるものと期待される。

## 3. 研究の方法

中枢神経培養実験系としてマウス胚の大脳皮質神経細胞を分散培養した初代培養細胞を用いた。この系では培養開始後 2~3 日で一本の軸索が分化して伸長を始め、続いて樹状突起の伸長が進む。その後それぞれが伸長、分枝を続け、約 2 週間後にはシナプス形成が進みネットワークを形成ようになる。本研究では解析対象とする事象に応じた異なるタイミングにおいて、DLK、JNK といった軸索形成に関わるシグナル伝達タンパク質および微小管制御を介して直接軸索軸形成に関わる SCG10 タンパク質の、細胞内分布、shRNA ベクター導入による発現抑制効果、cDNA 発現ベクター導入による過剰発現効果などについて検証を進めた。また、DNA/JNK1 ノックアウトマウス胚より調製した大脳皮質神経初代培養細胞を用いた解析も行った。これまで中枢神経細胞の軸索の再生を in vitro で解析した例は限られており、その多くが特定の細胞の軸索を切断した後、再生過程を形態学的に記録するといったもので、定量的な解析や分子レベルでの解析は極めて

少なかった。本研究においては上記の方法を用いて *in vitro* でネットワーク形成まで進めた培養細胞シートの一部を切除し、その部分へ伸長してくる軸索を再生した軸索として定量的に解析する独自のシステムを立ち上げた。これにより軸索の形成過程の解析に用いた同じ培養系を軸索再生過程の解析に用いることが可能となり、特定のシグナル伝達を阻害する薬剤の効果やタンパク質の分布などを同じ条件下で比較することが可能となった。

#### 4. 研究成果

軸索の形成や再生は微小管の再構成が必須の要因とるが、これに関わる Stathmin ファミリータンパク質 SCG10 が JNK の基質となりリン酸化されることが報告されている。ただこのリン酸化が生理的にどのような意味を持つかははっきりしなかった。ここで我々は脳皮質神経細胞における DLK のノックダウン、JNK 阻害剤処理により SCG10 のタンパク質量が増加すること、さらに DLK/JNK1 ノックアウトマウス胚より調製した脳皮質神経細胞においてはコントロールマウス胚より調製したものと比べて SCG10 のタンパク質量が少ないことを見出し(図1)。このことが

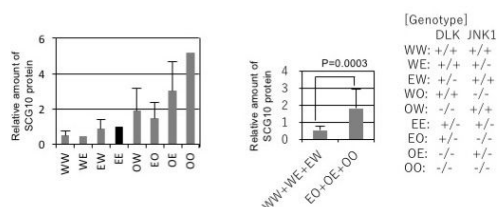


図1. DLK, JNK1 遺伝子量の SCG10 タンパク質量への影響  
 脳皮質神経細胞において DLK-JNK 経路は SCG10 のタンパク質量を制限するものであることがうかがえる。培養開始後早い時期(1DIV~2DIV)に SCG10 を高発現すると 3DIV の時点における軸索形成が阻害されることから DLK-JNK 経路が軸索形成を促す一つの方法が SCG10 タンパク質量の制御であると考えられた。樹状突起の発達や軸索の分枝が進む 4DIV 以降に SCG10 のタンパク質量は著しく増加する。この時点における SCG10 のタンパク質量を RNAi の手法で低く抑えると、継続的な軸索の伸長は影響を受けないにもかかわらず、樹状突起の発達や軸索の分枝は抑制される傾向が認められた。以上より、微小管制御因子 SCG10 の必要量は軸索や樹状突起形成の進行段階により異なり、DLK-JNK 経路はこれを適正な量に保つ働きがあると考えられた(図2)。

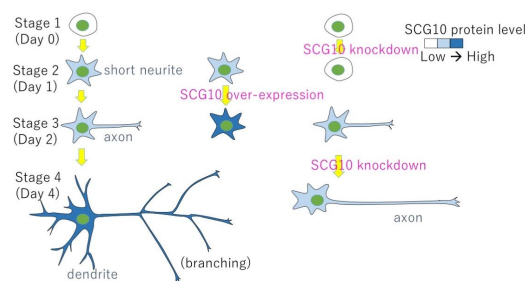


図2. SCG10 タンパク質量の発生段階による変化

発生途上にある脳皮質神経細胞において DLK は小胞に結合した状態で細胞体の中のゴルジ体周辺部および細胞突起の先端部近く、特に伸長初期の軸索の先端部近くに多く認められる。SCG10 も小胞に結合した状態で同様の分布を示すが、伸長初期の軸索の先端部には少なく、樹状突起や分枝を始めた軸索の先端部に多く認められる。前出の DLK-JNK 経路による SCG10 のタンパク質量制御のメカニズムについては不明であるが、タンパク質の安定性を制御している可能性を示す結果を得ており、このような細胞内分布に依存した局所的なシグナル伝達を介した制御が細胞形態の変化を可能にする分子機構の一部として重要な役割を担っているものと考えられる。軸索の再生という局面において、我々は DLK 及び SCG10 が retraction bulb に濃縮することを見出した。Retraction bulb は切断された軸索の断面が修復された後球状に肥大した部分で、ここから新たな成長円錐が形成され、軸索の再生が始まると考えられている。この部分には DLK 及び SCG10 の他、微小管形成タンパク質である  $\alpha$ -tubulin も濃縮することから、局所的に濃密なシグナル伝達が行われ、微小管の再構成が進むものと考えられる(図3)。

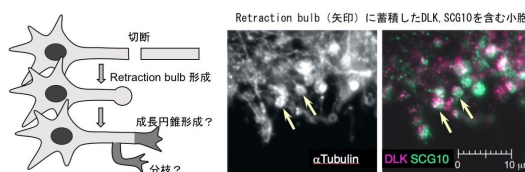


図3. 軸索切断部へのシグナル分子濃縮

一般に軸索の再生がカルシウムイオンに依存することは広く知られているが、その分子基盤については不明な点が多く、軸索の再生と再生不可となった軸索の変性、細胞死の誘導のいずれもカルシウムイオン濃度の上昇により引き起こされるといった一見矛盾する報告も散見される(Wang et al,2012,JCB 196:7)。本研究で扱っている DLK の活性は転写レベルでの調節の他、カルシウムイオンによる調節が示唆されている(Yan & Jin, 2012,

Neuron 76:534)。我々はあるカルシウムイオンチャネルの阻害剤の軸索形成に及ぼす効果を細胞分散後の軸索の形成と、切断後の再生の異なる二つの局面において検証した。軸索形成における効果は抑制的なものであったが、これは従来の知見と矛盾するものではない(図4)。

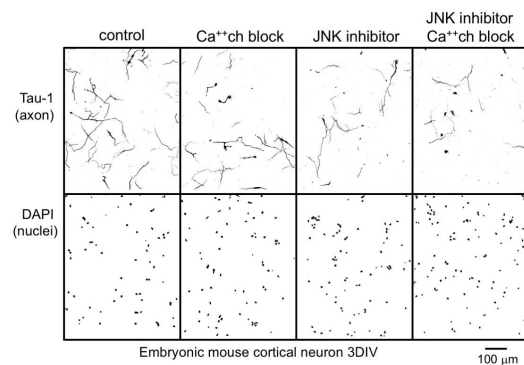


図4. 軸索形成に対するカルシウムチャネル阻害剤とJNK阻害剤の効果

一方、再生の局面においては促進的なものであった。ここで用いた実験系はほぼ神経細胞のみの培養系であるため、損傷されたグリアから放出される種々の阻害物質の影響ではなく、神経細胞自身もつ再生能を評価するものである。したがって、この結果は一見細胞内のカルシウムイオン濃度の上昇が軸索の再生を阻害することを示すものである(図5)。

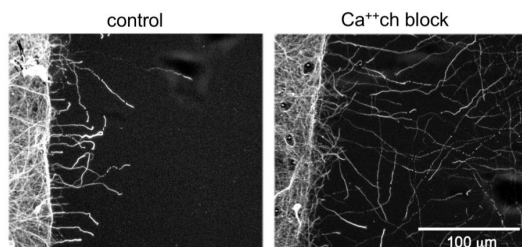


図5. 軸索再生に対するカルシウムチャネル阻害剤効果  
これに類する結果として、近年電位依存性カルシウムチャネルの  $\alpha 2\delta 2$  サブユニットの機能阻害が感覚神経(DRG)培養系及びマウス脊髄損傷モデルにおける軸索再生を促進するとの報告がなされた(Tedeschi et al, Neuron, 2016)。しかしその分子機構は不明であるとともに、ここで使用した阻害剤の特異性などからこれとの直接の関連は低いと考えている。いずれにせよ上記の結果は同様のシグナル伝達機構が軸索の形成と再生の局面において異なる役割を担うことを示すとともに、軸索の再生が単に新規形成の繰り返しでないことを示すものとして重要な意味をもつと考える。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

1. Simard-Bisson C, Bidoggia J, Larouche D, Guérin SL, Blouin R, Hirai S, Germain L. A role for DLK in microtubule reorganization to the cell periphery and in the maintenance of desmosomal and tight junction integrity. *J Invest Dermatol.* [査読有] 137:132-141 (2017).
2. Chen Q, Arai D, Kawakami K, Sawada T, Jing X, Miyajima M, Hirai S, Sakaguchi K, Furushima K. EphA4 Regulates the Balance between Self-Renewal and Differentiation of Radial Glial Cells and Intermediate Neuronal Precursors in Cooperation with FGF Signaling. *PLoS One.* [査読有] 10:e0126942 (2015).

〔学会発表〕(計5件)

Yamasaki H, Miyajima M, Ohono S, Hirai S

DLK-JNK regulates the protein level of SCG10/Stathmin-2 in cortical neurons.

ConBio2017 2017年12月 神戸

平井秀一

DLK-dependent JNK activation facilitates the axon formation in cortical neurons. シンポジウム：神経発生及び正の再生シグナルとしてのJNKシグナル。

第60回日本神経化学学会大会(招待講演) 2017年9月 仙台

山崎尚、宮嶋正康、大野茂男、平井秀一  
軸索と樹状突起はその伸長過程において異なる量の微小管制御因子 SCG10 を要求する

第89回日本生化学学会大会 2016年9月 仙台

Yamasaki H, Miyajima M, Ohono S, Hirai S

DLK-JNK pathway regulates the timing for axon formation and dendrite outgrowth.

BMB2015 2015年12月 神戸

山崎尚、大野茂男、平井秀一

JNK 依存的軸索形成における微小管制御因子 SCG10 の役割

第37回日本分子生物学会年会 2014年11月 横浜

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.wakayama-med.ac.jp/med/lasbiology1/Biology\\_Index.html](http://www.wakayama-med.ac.jp/med/lasbiology1/Biology_Index.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平井 秀一 (HIRAI, Syu-ichi)  
和歌山県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：80228759

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

山崎 尚 (YAMASAKI, Hisashi)  
和歌山県立医科大学・医学部・准教授  
(現)兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号：20212285

### (4) 研究協力者

( )