

令和元年5月29日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06891

研究課題名(和文)小胞体を起点とした神経軸索再生の制御機構解明

研究課題名(英文)The role of ER-derived signaling in axonal regeneration

研究代表者

大竹 洋輔(Ohtake, Yosuke)

大阪大学・医学系研究科・特任研究員(常勤)

研究者番号：40405915

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：末梢神経軸索損傷後に細胞内小胞体よりカルシウムが放出され枯渇することが引き金となり、小胞体ストレス応答が惹起され、結果として神経軸索再生応答に寄与することを明らかにした。このとき、小胞体ストレス応答関連因子により神経軸索内小胞体の恒常性維持、および神経軸索末端部位のアクチン細胞骨格構造の機能維持により、軸索再生応答に寄与することを示唆した。また、中枢神経においては損傷後に小胞体ストレス応答が抑制されることが示唆されたが、活性化することで中枢神経皮質脊髄路の再生が促進されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、これまで盲点であった小胞体シグナルを起点とする軸索再生制御と、細胞の機能維持・制御に重要な役割を担う小胞体ストレス応答系を結びつけたものであり、神経機能研究の分野に新たな概念を提示し、パラダイムシフトをもたらすことが期待される。さらに、小胞体機能が軸索再生の新規ターゲットとして確立されることにより、神経損傷だけでなく難治性の脳神経系疾患の革新的な治療法の開発に結びつくブレイクスルーとなることも期待され、国民の健康・福祉レベルの向上にもつながることから、社会的にも大きな意義を持つ研究である。

研究成果の概要(英文)：We revealed that peripheral axonal injury-dependent calcium release from the endoplasmic reticulum (ER) activated unfolded protein response (UPR) signaling, resulting in axonal regeneration after the injury. The local induction of UPR signaling leads to axonal regeneration through the regulation of axonal ER morphology and growth cone formation. In central nervous system, UPR activation by the genetic modulation enhances the growth capacity of mature neurons, although UPR signaling is decreased in response to spinal cord injury.

研究分野：神経科学

キーワード：小胞体 小胞体ストレス応答 神経再生 軸索損傷

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

神経軸索の変性や機能変化は外的要因による損傷だけでなく、様々な神経変性疾患においても多く認められ、軸索再生の詳細な制御機構や軸索機能の維持機構の解明は、疾患治療の観点からも国内外において注目されている。しかし、軸索再生能を有する末梢神経系においてもその再生機構は不明な点が多く、軸索再生研究の分野においては従来と異なった観点によるアプローチの必要性が求められている。神経細胞においても、神経軸索内で複雑な伸長と分岐を繰り返している小胞体から発信されるシグナルが末梢・中枢神経系の双方において軸索の再生や機能維持に寄与している可能性が考えられる。しかしながら、神経細胞の軸索内で高度なネットワークを構築している小胞体から発信されるシグナルが、神経軸索の再生・伸長や機能維持に寄与するメカニズムの全貌は未だ不明な点が多いのが現状である。

### 2. 研究の目的

神経軸索の変性や機能変化は、外的損傷によるものだけではなく様々な神経変性疾患でも認められる。しかしその詳細な分子機構は不明な点が多く、軸索の再生制御・機能維持の機構解明は疾患治療の観点からも大変重要である。軸索内においては高度に分岐・伸長した小胞体で満たされており、小胞体から発信されるシグナルは神経軸索再生や機能維持に深く関与する可能性が示唆されている。本研究課題では、神経細胞軸索内で高度に発達したネットワークを構築している小胞体を起点とする神経軸索再生機構に焦点を当て、軸索損傷後のカルシウムオシレーションや損傷部における急性的な修復シグナルを解析し、小胞体ストレス応答系が惹起されるメカニズムを明らかにすると共に、軸索損傷に応答して活性化される小胞体ストレス応答系の各経路を調べ、軸索損傷・再生応答として最も主要な経路を明らかにすることを目的としている。

### 3. 研究の方法

本研究課題では、神経軸索で高度に発達したネットワークを形成している小胞体を起点とする軸索再生機構に焦点を当て、小胞体ダイナミクスに連動した時空間的な小胞体ストレス応答シグナルの発生と軸索再生調節機序との関連性を明確にするると共に、中枢神経系における軸索再生制御の足掛かりとするために、(1) 神経軸索の再生を制御する小胞体ストレス応答シグナルの解明、(2) 軸索再生時における小胞体ダイナミクスの解析と生理的意義の解明、(3) 小胞体ストレス応答シグナルを起点とした中枢神経系の軸索再生機構の解明、を試みる。

#### (1) 神経軸索の再生を制御する小胞体ストレス応答シグナルの解明

神経軸索損傷後のカルシウムオシレーションや損傷部位における急性的な修復シグナルを解析することにより、小胞体ストレス応答系が惹起されるメカニズムを明らかにする。

主要な小胞体ストレスセンサータンパク質 IRE1、PERK、ATF6 が軸索損傷に応答して活性化するか検討し、軸索再生シグナルがどの経路に依存しているか追究する。

#### (2) 軸索再生時における小胞体ダイナミクスの解析と生理的意義の解明

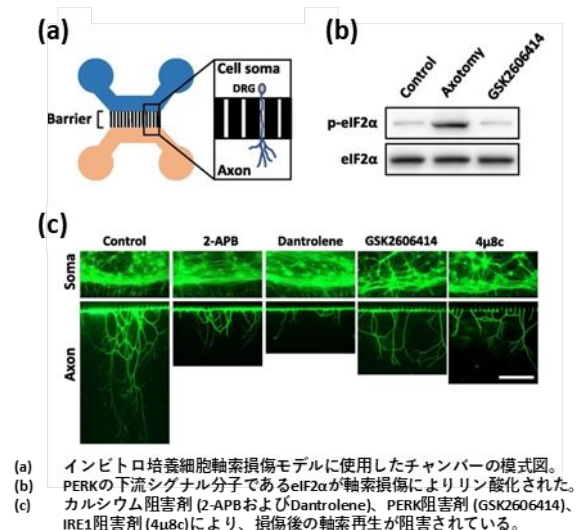
既存の小胞体膜タンパク質の蛍光ラベルにより小胞体のダイナミックな挙動を時空間的にトレースできる系を確立すると共に、小胞体膜と細胞膜、あるいはその他の細胞内小器官とのコンタクトサイトの増減や局在部位を調べることで、その生理的意義を解析する。

#### (3) 小胞体ストレス応答シグナルを起点とした中枢神経系の軸索再生機構の解明

神経軸索における小胞体ストレス応答関連因子の局在、および軸索損傷に応答して活性化される主要な経路の探索を、インビトロではマウス初代培養後根神経節細胞や初代培養神経細胞、インビボではマウス坐骨神経損傷モデル、視神経損傷モデル、および脊髄損傷モデルを用いて調べる。

### 4. 研究成果

(1) インビトロ神経軸索損傷モデルを用いて小胞体ストレス応答の活性化経路を調べ、軸索損傷とそれに引き続く軸索再生応答との関連性について検討した。カルシウム阻害剤を用いた実験結果から、培養脊髄後根神経節細胞の軸索損傷後に小胞体より IP3 受容体およびリアノジン受容体を介してカルシウムが細胞質に放出されることによる小胞体内カルシウムの枯渇により、IRE1、PERK の主要経路を介した小胞体ストレス応答が惹起されることを示唆する結果が得られた (右図)。

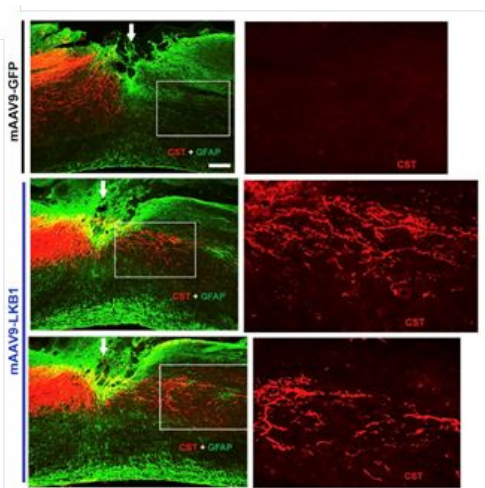


(2) インビボ神経軸索損傷モデルである坐骨神経挫滅モデルマウスを用いて、軸索損傷時における小胞体ストレス応答の活性化と、軸索再生応答との関連性について検討した。その結果、IRE1 および PERK について軸索損傷後に活性化しており、この活性化は小胞体内カルシウムの動態を受容体阻害剤を用いて阻害することにより、抑制されることが分かった。これらの結果から小胞体内カルシウム濃度の変化が一つの引き金となって小胞体ストレス応答が惹起され、神経軸索再生応答に寄与することが示唆された。

(3) 神経軸索損傷に反応して活性化する小胞体ストレス関連分子がどのように軸索再生応答に寄与するかそのメカニズムの解明を試みた。培養神経細胞において小胞体ストレス応答関連分子に対する特異的阻害剤を用いた実験で、IRE1 および PERK の特異的阻害剤を添加したとき、神経軸索内に大量に連続的に存在して分布する小胞体が、断片化していることがわかった。さらに、神経軸索末端部位の growth cone において、アクチン構造の崩壊によるチップ構造の破綻が見られた。以上の事から、神経細胞の細胞体や軸索内において高度なネットワークを構築している小胞体や軸索伸長に強く関わる軸索末端のチップ構造において、小胞体ストレス応答関連分子はその生理的条件下における生体維持において非常に重要な役割を担っていることが示唆された。

(4) 中枢神経損傷モデルである脊髄損傷モデルマウスを用いて、小胞体ストレス応答に関連したシグナルの軸索再生におよぼす影響について検討した。その結果、脊髄損傷後において、小胞体ストレス応答を惹起することで知られる AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) が、そのマスター制御因子であるリバーキナーゼ B1 (LKB1) の活性化の低下に伴い、府に制御することがわかった。

(5) 脊髄損傷後の LKB1 の役割を解明するため、アデノ随伴ウイルスを用いて LKB1 を過剰発現させたところ、皮質脊髄路の高度な再生が認められた (右図)。病態モデルマウスの行動学的試験の結果から、この軸索再生に伴い、運動機能の回復も認められた。このとき、LKB1 の下流因子である AMPK、NUAK ファミリーキナーゼ、SAD キナーゼなどの活性化も認められたことから、小胞体ストレス応答の活性化経路を含めた LKB1 経路が中枢神経系の損傷後軸索再生に寄与することが示唆された。



アデノ随伴ウイルス (AAV) を用いた LKB1 の発現により、皮質脊髄路 (CST) が損傷部位 (GFAP によりラベルされる周囲部分) を乗り越えて再生しているのがわかる。

(6) 小胞体ストレス応答関連因子だけではなく、小胞体ストレス応答の機能を修飾するような分子もまた創薬のターゲットになり得ることを示すことができた。さらに、小胞体機能が軸索再生の新規ターゲットとして確立されることにより、神経損傷だけでなく難治性の脳神経系疾患の革新的な治療法の開発に結び付く可能性を秘めており、国民の健康・福祉レベルの向上にも繋がるのが期待される。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 2 件)

Yosuke Ohtake, Armin Sami, Xinpei Jiang, Makoto Horiuchi, Kieran Slattery, Lena Ma, George M. Smith, Michael E. Selzer, Shin-ichi Muramatsu, and Shuxin Li, Promoting Axon Regeneration in Adult CNS by Targeting Liver Kinase B1, *Molecular Therapy*, 27, 2019, 102-117, doi: 10.1016/j.ymthe.2018.10.019. 査読有

Yosuke Ohtake, Koji Matsuhisa, Masayuki Kaneko, Soshi Kanemoto, Rie Asada, Kazunori Imaizumi and Atsushi Saito, Axonal Activation of the Unfolded Protein Response Promotes Axonal Regeneration Following Peripheral Nerve Injury, *Neuroscience* 375, 2018, 34-48, doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.02.003. 査読有

### 〔学会発表〕(計 3 件)

Yosuke Ohtake, Atsushi Saito, Kazunori Imaizumi, Signaling of the Unfolded Protein Response is Critical for Axon Regeneration after Nerve Injury, 日本神経化学学会大会, 2017.

Yosuke Ohtake, Atsushi Saito, Koji Matsuhisa, Kazunori Imaizumi, Retrograde

propagation of signaling regulated by UPR branches promotes peripheral nerve regeneration, Consortium of Biological Sciences 2017.

Yosuke Ohtake, Atsushi Saito, Kazunori Imaizumi, Axon Regeneration Promoted by Signaling of the Unfolded Protein Response in Peripheral Nerve Injury, Neuroscience Annual Meeting, 2017.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/molneu/>

## 6 . 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。