

研究種目：若手研究 (S)

研究期間：2007~2011

課題番号：19679007

研究課題名 (和文) 損傷中枢神経回路の再生と可塑性を制御する分子機構

研究課題名 (英文) **Molecular mechanism of regeneration and plasticity of the injured central nervous system**

研究代表者

山下 俊英 (YAMASHITA TOSHIHIDE)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：10301269

研究代表者の専門分野：神経科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：機能脳神経外科学

1. 研究計画の概要

本研究の目的は中枢神経回路の修復機構の動作原理を明らかにすることである。研究代表者はこれまで中枢神経の再生阻害機構の解明を行った結果、中枢神経回路の損傷後に代償性回路が形成され、これが機能回復に寄与していることを見いだした。この発見はこれまでの常識に反して、中枢神経が可塑性のポテンシャルを有していることを示唆している。本研究では神経回路の再構成現象およびその分子メカニズムの解明を行う。これにより、中枢神経損傷後の機能回復がなぜ、どのように起こるのかを明らかにする。特に損傷という局所の刺激が空間的に広がり、中枢神経全体に回路の再編をもたらすに至るメカニズムを明らかにしたい。本研究は、まったく未知である領域において、新たな神経科学分野を創出し、神経再生治療開発への応用が期待される。

2. 研究の進捗状況

これまで我々は中枢神経軸索の再生を阻害する機序の解明に取り組み、オリゴデンドロサイトのミエリンに発現する複数の軸索再生阻害蛋白質とそれらにより惹起される細胞内シグナルを同定し、「中枢神経軸索再生阻害機序」の解明に成功した。本研究では、MAG, Nogo, OMgp の受容体である PIR-B が *in vivo* で神経回路修復阻害のキープレイヤーとして働いていることを証明した。具体的には、PIR-B ノックアウトマウスに脳挫傷を作成し、その後の運動機能の改善を判定したところ、wild-type マウスと比較して、PIR-B ノックアウトマウスで優位な機能改善が認

められた。さらに脳挫傷により損傷側の皮質脊髄路 (運動を司る回路) は脱落するが、健常側の皮質脊髄路が頸髄において対側に枝を伸ばし、propriospinal neurons および segmental interneurons を介して motor neurons に至る代償性神経回路を形成していることを形態的および電気生理学的に明らかにした。この代償性神経回路を切断すると、運動機能の悪化が認められたことから、当該代償性神経回路が運動機能の回復に寄与したことが証明された。Propriospinal neurons は頸髄内に細胞体があり、尾側方向に軸索を伸長させ、motor neurons に直接シナプスを形成している。一方、segmental interneurons は transverse の方向に軸索を伸ばし、同じ髄節内の motor neurons にシナプスを作っている。このような「予備の回路」を利用して、運動機能を回復させていることが明らかになった。そして PIR-B ノックアウトマウスにおいては、この代償性神経回路の形成が促進されていることを見いだした。すなわち PIR-B の阻止により、内在性の神経回路の修復能を効果的に引き出すことができることが明らかになった。以上の結果により、脳損傷後の運動機能改善の神経科学的な基盤を確立することができた。

さらに本研究では、PIR-B のシグナル伝達機構を明らかにした。MAG, Nogo が PIR-B に結合すると、PIR-B はニューロトロフィン受容体 Trk と結合し、受容体複合体を形成することを示した。さらに PIR-B によってリクルートされた SHP-1/2 が Trk を脱リン酸化し不活性化することで、軸索枝の伸展を阻止し神経回路の可塑性を抑制するという分子メカニズムを解明した。このシグナル伝達を阻止す

るブロッキングペプチド (SHP-1/2 と Trk との結合を阻止) を開発し、これが MAG, Nogo による効果を完全に遮断することを確認した。したがって当該ペプチドは神経回路の修復を促進する機能分子である。

また新規軸索再生阻害因子 RGM、Wnt-5、BMP-2 を単離し、そのシグナル伝達解析を行うとともに、in vivo で当該シグナルを抑制することによる効果を検証した。RGM の惹起するシグナル伝達の解明については、RGM が neogenin 受容体を介して再生阻害効果をもたらすに至るシグナル伝達機構の詳細を明らかにした。RhoA の活性化および Ras の不活性化が鍵となるシグナルであることを見だし、そのシグナル伝達機構を明らかにした。以下、具体的に得られた結果を列挙する。① RGM 受容体である neogenin と Unc5B が受容体複合体を形成し、Unc5B が RhoA の活性化を担う LARG と結合し、RGM のシグナルを神経細胞に伝えていることを明らかにした。② RGM 受容体である neogenin と FAK および p120RasGAP が結合し、Ras の不活性化シグナルを神経細胞に伝えていることを明らかにした。③ RGM の軸索再生抑制作用が、RhoA/Rho-kinase の活性化に基づくものであることはこれまでの研究でわかっていたが、その下流で Myosin IIA が活性化を受けること、また CRMP2 がリン酸化により不活性化を受けることが必要であることを明らかにした。④ BMP が生体において軸索再生阻害因子として働いていることを証明し、RGM がシグナル伝達に必要であることを明らかにした。さらにキーシグナルとしての LIM kinase の同定を果たした。以上の結果により、RGM および BMP が神経細胞に及ぼす再生阻害シグナルの全貌を明らかにすることができた。さらに本研究では Wnt-5a が軸索再生阻害因子であることを明らかにした。⑤ Wnt-5a がアストロサイトに働きかけ、神経回路の再生を強力に抑制していることを突き止めた。Wnt によりアストロサイトの Ryk (Wnt 受容体) が刺激されると、アストロサイトの増殖が促され、アストロサイトによる軸索再生阻害作用が高まる。抗 Ryk 中和抗体を脊髄損傷させた動物に投与すると、軸索の再生と運動機能の回復が認められた。以上の研究成果により、損傷した中枢神経回路の再生を抑制するシグナルの全貌を明らかにすることができた。

3. 現在までの達成度

① 当初の計画以上に進展している。

(理由) 当初計画では、平成 21 年度までに代償性神経回路の形成現象を明らかにし、それに関与する因子を見いだすところまでを到達目標としていたが、これまでに因子の同定のみならず、分子メカニズムをも明らかにすることができた。さらに PIR-B のシグナル

を抑制する分子を開発し、中枢神経損傷後に効率的に代償性回路を形成させる手法の確立に向けて研究を進めていくためのツールを取得することができた。

4. 今後の研究の推進方策

PIR-B を分子標的とする治療、あるいはリハビリテーションによって、代償性神経回路がどのように形成されるかについて検証を進める。本研究により、中枢神経に内在する再生阻害作用を除去したときに、どのように神経ネットワークが再構成されていくのかについて明らかにしたい。中枢神経は大人でも可塑性のポテンシャルを有しており、それを効率的に誘導してやることで、中枢神経損傷による機能障害はかなりの程度回復が期待できると考えられる。また中枢神経回路の再構成は、発生時の回路の形成とは大きく異なるものであることがわかってきた。本研究は中枢神経ネットワークの再構成という新たな学問分野を生み出すと期待される。

5. 代表的な研究成果

[雑誌論文] (計 3 2 件) 全て査読あり

- ① Hata, K., Kaibuchi, K., Inagaki, S. and Yamashita, T. (2009) Unc5B associates with LARG to mediate the action of repulsive guidance molecule. *J. Cell Biol.* 184, 737-750.
- ② Endo, M. and Yamashita, T. (2009) Inactivation of Ras by p120GAP via FAK dephosphorylation mediates RGMa-induced growth cone collapse. *J. Neurosci.* 29, 6649-6662.
- ③ Taniguchi, J., Fujitani, M., Endo, M., Kubo, T., Fujitani, M., Miller, F.D., Kaplan, D.R. and Yamashita, T. (2008) Rap1 is involved in the signal transduction of myelin-associated glycoprotein. *Cell Death Differ.* 15, 408-419.
- ④ Fujita, Y., Taniguchi, J., Uchikawa, M., Endo, M., Hata, K., Kubo, T., Mueller, B.K. and Yamashita, T. (2008) Neogenin regulates neuronal survival through DAP-kinase. *Cell Death Differ.* 15, 1593-1608.
- ⑤ Ohshima, Y., Kubo, T., Koyama, R., Ueno, M., Nakagawa, M. and Yamashita, T. (2008) Regulation of axonal elongation and pathfinding from the entorhinal cortex to the dentate gyrus in the hippocampus by the chemokine stromal cell-derived factor 1 α . *J. Neurosci.* 28, 8344-8353.

[学会発表] (計 5 5 件)

[その他]

2010 年 日本学術振興会賞

ホームページ

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