

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月20日現在

機関番号：34438

研究種目：若手研究(B)

研究期間：平成22年度～平成23年度

課題番号：22790289

研究課題名（和文） 神経細胞軸索内輸送の制御による中枢神経再生

研究課題名（英文） CNS regeneration by regulating axonal transport

研究代表者

羽田 克彦 (Hata Katsuhiko)

関西医療大学保健医療学部・研究員

研究者番号：60506228

研究成果の概要（和文）：

我々は *in vitro* において、ラットの胎生海馬ニューロンの軸索を切断すると軸索新生が起こる現象を観察した。この現象には dynein-dynactin 複合体の形成が関与し、逆行性軸索輸送が関わっていることが示唆された。また、軸索切断後に importin β が損傷部位で局所翻訳されることが示唆された。さらに importin β と逆行性輸送蛋白質の dynein との複合体が軸索切断1時間後に増加していることも確かめられた。以上の結果から、海馬ニューロンでは、軸索が切断されると importin β が損傷部位から逆行性軸索輸送機構に乗って細胞体まで運ばれ、新たな神経突起新生につながっていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We observed the phenomenon of axotomy-induced axonogenesis in rat embryonic hippocampal neurons *in vitro* and showed the involvement of retrograde transport by dynein-dynactin complex in this phenomenon. Moreover, Importin β was locally translated after axotomy followed by the interaction with the dynein-importin α complex. These findings suggest that local translation and retrograde transport system in injured axons play an important roles in the axotomy-induced axonogenesis of embryonic hippocampal neurons.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成22年度	1,600,000	480,000	2,080,000
平成23年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般
キーワード：再生医学

1. 研究開始当初の背景

本研究の目的は、中枢神経損傷後の側枝形成のメカニズムを解明することによって新たな中枢神経再生治療法の開発に繋げることである。これまで成体の中枢神経の軸索はいったん損傷を受けると再生しないと信じられてきたが、申請者はそれに対し、強力に中枢神経軸索再生を促す方法を開発した。しかしそれだけでは完全な機能回復には至らなかった。そこで申請者は軸索を切断された神経細胞は新たな側枝を伸ばすことで回路を再形成できることに着目し、その機序を解明すれば新たな中枢神経再生治療法の開発に繋がるのではと考えた。申請者は逆行性軸索輸送分子群が損傷部位から側枝形成部位へ損傷シグナルを送っているという仮説を検証したいと考えている。

2. 研究の目的

申請者は中枢神経再生現象を解析する中で、損傷を受けた中枢神経の軸索は側枝を形成して他の神経細胞と連絡し回路の再形成を行っている現象に着目した。この現象は、治療操作を施していない動物の中枢神経系においてもある程度起こっていることが分かった。このことから、損傷した神経細胞を再び神経ネットワークに組み込む（再生）ためには二つの戦略があることが分かる。即ち、(1) 損傷軸索の再伸長：切れた軸索が再び伸びて標的に至る。(2) 損傷した神

経細胞からの新たな側枝形成：切れた軸索とは別の軸索を新たに発芽し、標的への回路を再形成する。(1) はこれまでの申請者らの研究によりある程度達成されつつある。

一方、(2) は抗 RGM 抗体投与によっても十分に促されず、軸索再生阻害とは異なるメカニズムで起こっていることが示唆される。しかし現時点では、その解明は全く行なわれていない。そこで申請者は、この側枝形成のメカニズムを解明することによって新たな中枢神経再生治療法の開発に繋げることを目的として研究を行ないたいと考えている。

3. 研究の方法

in vitro で培養した神経細胞の軸索を切断すると、細胞体や切断部位よりも近位の軸索から新たな側枝が発芽する。この現象に逆行性軸索輸送蛋白質である dynactin が関わっていることを示す。次に、dynactin が運ぶであろう「切れたという情報」を担う分子の同定を行なう。軸索切断した神経細胞とコントロールの神経細胞から、dynactin 抗体の内在性複合体を単離し複数の分子の同定を行ない、その中から最も側枝形成に重要な分子を siRNA 法などによって同定する。同定した候補分子に対する中和抗体や市販の阻害剤の候補分子の機能に対する阻害効果を *in vitro* と *in vivo* で評価する。

4. 研究成果

我々は *in vitro* において、ラットの胎生海馬ニューロンの軸索を切断すると軸索新生が起こる現象を観察した。この研究の動機は、胸髄損傷した後、頸髄の皮質脊髄路から灰白質に向かって分枝が発芽する組織像を観察したことから、これに似た現象を *in vitro* でも再現できないかと考えたことにある。事実、我々は *in vitro* で3日間培養し極性を獲得した海馬ニューロンの軸索を切断したところ新しい神経突起が神経細胞体から発芽し伸長することを time-lapse 顕微鏡下にて観察した。新生神経突起は軸索マーカーの Tau-1 ポジティブとなる一方、切断された軸索は Tau-1 の発現が弱くなった。これらのニューロンに P50 を強制発現させて dynein-dynactin 複合体の形成を阻害すると、新生軸索が出来るまで時間が長くなるようになった。このことから、逆行性軸索輸送が軸索新生に関わっていることを示唆される。さらに軸索切断1時間後に importin β が切断部位より近位側で発現上昇しているのが観察された。しかも、この発現上昇は CHX によって蛋白質合成をブロックすると完全に抑えられるのに対して、AMD によって転写をブロックしても完全には抑えられなかった。よって、importin β は損傷部位で局所翻訳されることが示唆された。さらに importin β と逆行性輸送蛋白質の dynein との複合体が軸索切断1時間後に増加していることが co-IP 法によって確かめられた。以上の結果から、海馬ニューロンでは、軸索が切断され

ると「軸索が損傷を受けた」という情報を担う importin β が損傷部位から逆行性軸索輸送機構に乗って細胞体まで運ばれ、新たな神経突起新生につながっていることが示唆された。

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2件)

Ohara, R., Fujita, Y., Hata, K., Nakagawa, M. and Yamashita, T. (2011) Axotomy induces axonogenesis in hippocampal neurons through STAT3. *Cell Death Dis.* 2, e175.

Ohara, R., Hata, K., Yasuhara, N., Mehmood, R., Yoneda, Y., Nakagawa, M. and Yamashita, T. (2011) Axotomy induces axonogenesis in hippocampal neurons by a mechanism dependent on Importin β . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 405, 697-702.

[学会発表] (計0件)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

羽田 克彦 (Hata Katsuhiko)
関西医療大学保健医療学部・研究員
研究者番号：60506228

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：