

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700376

研究課題名(和文)細胞接着斑形成に着目した神経軸索再生法開発のための基礎研究

研究課題名(英文)Axonal regeneration via regulation of point contacts

研究代表者

久保山 友晴(KUBOYAMA, TOMOHARU)

富山大学・和漢医薬学総合研究所・助教

研究者番号：10415151

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：私はこれまでに、損傷した中枢神経組織で再生不全に陥った軸索を再現した培養系を用い、細胞接着斑のダイナミクスを増加させることによって軸索再生が誘発されることを明らかにしてきた。本研究ではその機序として、プロテインキナーゼA、p21-activated kinaseおよびパキシリンの活性制御が関与することを明らかにした。本成果は、脊髄損傷等において軸索再生を誘発させるための新たな分子ターゲットを提唱するものである。

研究成果の概要(英文)：I previously clarified that enhancing of point contact dynamics promoted axonal regeneration in cultured system that mimicked failure of axonal regeneration in the injured central nervous system. In this study, I showed that protein kinase A, p21-activated kinase and paxillin were involved in the above regeneration mechanisms. This study proposes novel targets for axonal regeneration in spinal cord injury, etc.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経科学一般

キーワード：細胞接着 脊髄損傷 軸索再生 プロテオグリカン プロテインキナーゼA パキシリン p21-activated kinase

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷などで中枢神経組織が損傷を受けると、損傷部位周辺で活性化アストロサイトが凝集し、グリア性瘢痕が形成される。断裂した神経軸索はグリア性瘢痕を越えて再生することができない。そのため、脊髄損傷では下肢麻痺などの機能障害が永続する。1928年 Cajal は、脊髄損傷部位（グリア性瘢痕形成部）近傍で軸索終末部が膨腫した球状体を呈して伸長が停止することを発見し、これを dystrophic endball と名づけた。Dystrophic endball の形成が軸索再生不全の原因だと考えられているが、未だにその分子的基盤は明らかになっていない。一方、グリア性瘢痕内では活性化アストロサイトから阻害因子のコンドロイチン硫酸プロテオグリカン（CSPG）が分泌され、これが濃度勾配を形成して沈着し、軸索再生を阻害する主たる原因の一つとなっている（Davies et al., J Neurosci, 1999）。Case Western Reserve 大学 Silver 博士の研究室では、CSPG 濃度勾配を形成した培養皿上で後根神経節神経細胞を培養することにより、dystrophic endball を再現することに成功し（Tom et al., J Neurosci, 2004）、CSPG による軸索再生不全を dystrophic endball 形成の視点から解析する妥当性が示唆された。本培養系を用いることにより、dystrophic endball の分子的基盤の解析が容易になり、これまで未解決であった“CSPG による軸索再生阻害の機序”の解明を大きく進めることができる。

私は、前述した dystrophic endball の形成を再現する培養系を用いて大規模な薬物スクリーニングを行なった結果、プロテインキナーゼ A (PKA) 阻害剤を処置することにより、dystrophic endball が前方への移動を再開することを初めて明らかにした。次に、細胞運動能に重要な役割を果たす細胞接着斑（細胞-基質間の結合形成部）に着目した。分生生物学的、細胞生物学的検討を行なった結果、PKA 阻害により細胞接着斑構成分子であるパキシリンがリン酸化され、これにより細胞接着斑のダイナミクスが亢進し、結果として dystrophic endball が CSPG 濃度勾配上で前方移動を再開することを世界に先駆けて発見した。

2. 研究の目的

CSPG 濃度勾配を何らかの分子が感知して PKA の活性化が生じ、これが細胞接着斑形成制御に影響を与え、軸索再生不全の原因となっている”、という申請者が立てた仮説を細胞生物学的、生化学的手法で証明し、CSPG 濃度勾配がどのように軸索再生不全を引き起こすのか、その機序を分子的に明らかにする。

3. 研究の方法

3-1. 遺伝子クローニング及び遺伝子変異体の作製

胎生 15 日齢 Wister ラット (SLC) の全脳から rat p21-activated kinase (PAK) の翻訳領域の全長をクローニングした。さらに、PAK の N 末端側に黄色蛍光タンパク Venus を結合させ、これを CAG プロモーター下で発現させるベクターを作製した。また、PAK の 298 番目のリジン残基をアラニンに置換した酵素活性のない変異体 (K298A PAK) 及び 422 番目のスレオニン残基をグルタミン酸に置換した酵素活性を増強した変異体 (T422E PAK) を発現するベクターも作製した。また、赤色蛍光タンパク TagRFP-T を融合させた paxillin を発現するようなベクターを同様に作製した。

3-2. 細胞培養

CSPG の濃度勾配を作製した培養皿上で成体ラットより単離した後根神経節神経細胞を培養した。また、Nucleofector (Lonza) を用いて遺伝子導入を行った。

3-3. 全反射蛍光顕微鏡観察

培地に 1% BSA 及び 1% N-2 添加物を含む L-15 培地を用い、全反射蛍光顕微鏡 (オリンパス) による蛍光観察を行った。

3-4. 免疫染色

神経マーカーのウサギ抗 β -tubulin III ポリクローナル抗体 (Sigma) 及びマウス抗 CSPG モノクローナル抗体 (CS-56, Sigma)、PKA regulatory domain II (PKA RII) を認識するマウスモノクローナル抗体 (BD Biosciences) 及び PKA RII の 96 番目のセリン残基のリン酸化 (pS⁹⁶ PKA RII) を特異的に認識するウサギモノクローナル抗体 (Epitomics) を用い、免疫染色を行った。

4. 研究成果

細胞接着斑の形成制御に関わるパキシリンの機能制御をすることが報告されている PAK が、本仮説に関与しているかどうかを検討した。まず、野生型あるいは、不活性化模倣、活性化模倣の PAK を作製し、それぞれ神経細胞に発現させ、CSPG 濃度勾配上で培養した。野生型あるいは不活性化模倣 PAK を発現させた場合、CSPG 濃度勾配を横切る軸索はほとんど存在しなかった。一方、活性化模倣 PAK を発現させた場合 CSPG 濃度勾配を横切る軸索再生が増加した。次に、野生型 PAK を発現する神経細胞に PKA 阻害剤を処置した結果、CSPG 濃度勾配を横切る軸索の長さが増加した。一方、不活性化模倣 PAK を発現する神経細胞に PKA 阻害剤を処置した場合 CSPG 濃度勾配を横切る軸索の長さは増加せず、PKA 阻害による軸索再生作用が阻害されていた。これにより、PKA 阻害によって PAK が活性化することが CSPG 濃度勾配上の軸索再生に重要であることが明らかになった。

PAK は PKA によってリン酸化されることによって不活性化されることが報告されている。以上のことから、dystrophic endball では PKA が活性化しているため PAK が不活性化し、paxillin のリン酸化が抑制されているの

ではないかと考えた。そこで dystrophic endball における PKA の活性を検討した。PKA 活性の指標となるリン酸化 PKA に対する抗体を用いて免疫染色を行い、軸索終末部における PKA の活性を可視化した。まず均一な laminin 基質上で成体ラット由来後根神経節神経細胞を培養した後、アデニル酸シクラーゼ賦活薬 forskolin を処置した結果、PKA のリン酸化が増加することが明らかになった。よって本手法で PKA の活性化を検出することが可能であることが示された。引き続き CSPG 濃度勾配基質あるいは laminin 基質上で培養した神経細胞の軸索終末部における PKA の活性を評価した。CSPG 濃度勾配上の dystrophic endball では、laminin 基質上の軸索終末部に比べて PKA のリン酸化が有意に増加した。以上、dystrophic endball において PKA の活性が増加することを初めて明らかにした。

続いて PKA の活性化機構を解明するための検討を行った。CSPG 濃度勾配下で培養した成体ラット後根神経節神経細胞に対して、cAMP のアンタゴニスト Rp-cAMPS、膜貫通型アデニル酸シクラーゼ阻害薬 2',5'-dideoxyadenosine、細胞質型アデニル酸シクラーゼ阻害薬 2-hydroxyestradiol を処置したが、いずれも濃度勾配を横切る軸索の長さが増加しなかった。またこれら阻害剤を処置した時、dystrophic endball における PKA の活性は減少しなかった。一方、直接 PKA の活性を阻害する KT5720 および mPKI を同様に処置したところ、PKA の活性は減少し、濃度勾配を横切る軸索の長さが増加した。以上のことから、CSPG 濃度勾配上の dystrophic endball では PKA の活性が増加しているが、これは dystrophic endball で cAMP の濃度が増加しているためではなく、何らかの機構で PKA が直接活性化されていることが推測された。

以上本研究により、CSPG 濃度勾配下で再生不全に陥った軸索を再生させる機序として、PKA 阻害による PAK、paxillin を介した再生機序を明らかにした。本成果は、脊髄損傷等において軸索再生を誘発させるための新たな分子ターゲットを提唱するものである。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)すべて査読あり

- 1) Shigyo M, Tanabe N, **Kuboyama T**, Choi S-H, Tohda C. New reliable scoring system, Toyama Mouse Score, to evaluate locomotor function following spinal cord injury in mice. *BMC Res Notes* (2014) 7(1):332.
- 2) **Kuboyama T**, Tohda C, Komatsu K. Effects of Ashwagandha (roots of *Withania somnifera*) on neurodegenerative diseases. *Biol Pharm Bull* (2014) 37(6): 892-897.
- 3) Tohda C, **Kuboyama T**. New perspective in pharmacology brought by studying traditional medicine. *Nihon Yakurigaku Zasshi* (2014) 143(2):73-77.
- 4) **Kuboyama T**, Luo X, Park K, Blackmore MG, Tojima T, Tohda C, Bixby JL, Lemmon VP, Kamiguchi H. Paxillin phosphorylation counteracts proteoglycan-mediated inhibition of axon regeneration. *Exp Neurol*, (2013) 248, 157-169.
DOI: 10.1016/j.expneurol.2013.06.011.
- 5) Teshigawara K, **Kuboyama T**, Shigyo M, Nagata A, Sugimoto K, Matsuya Y, Tohda C. A novel compound, Denosomin ameliorates spinal cord injury via axonal growth associated with astrocyte-secreted vimentin. *Br J Pharmacol*, (2013) 168, 903-919.
DOI: 10.1111/j.1476-5381.2012.02211.x.
- 6) Wang XH, Zhu H, Konno K, Tohda C, Kazuma K, **Kuboyama T**, Miyanaga S. Screening on functions from some Chinese herbs for spinal cord injury. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae* (2012) 18(12), 246-248.
- 7) Tohda C, Urano T, Umezaki M, Nemere I, **Kuboyama T**. Diosgenin is an exogenous activator of 1,25D(3)-MARRS/Pdia3/ERp57 and improves Alzheimer's disease pathologies in 5XFAD mice. *Sci Rep* (2012) 2:535
DOI: 10.1038/srep00535.
- 8) Tohda C, **Kuboyama T**. Current and future therapeutic strategies for functional repair of spinal cord injury. *Pharmacol Ther* (2011) 132(1):57-71.
DOI: 10.1016/j.pharmthera.2011.05.006.
- 9) Tohda C, Nakada R, Urano T, Okonogi A, **Kuboyama T**. Kamikihito (KKT) rescues axonal and synaptic degeneration associated with memory impairment in a mouse model of Alzheimer's disease, 5XFAD. *Int J Neurosci* (2011) 121(12), 641-648.
DOI: doi: 10.3109/00207454.2011.602809.

〔学会発表〕(計 31 件)

- 1) Yang Z., **Kuboyama T**., Tohda C. DR-induced cognitive enhancement in Alzheimer's disease model mice, 5XFAD, and underlying mechanisms. *Neuroscience 2014* (Washington, DC, U.S.A.), 2014, 11, 15-19.
- 2) Shigyo M., **Kuboyama T**., Tohda C. Extracellular vimentin promotes axonal growth via IGF1R. *Neuroscience 2014* (Washington, DC, U.S.A.), 2014, 11, 15-19.
- 3) Tanabe N., **Kuboyama T**., Kazuma K., Konno K., Tohda C. Improvement of motor dysfunction in acute and chronic phases in spinal cord injury mice by a crude drug-derived compound. *Neuroscience 2014* (Washington, DC, U.S.A.), 2014, 11, 15-19.
- 4) **Kuboyama T**., Lee Y., Nishiko H., Tohda C. Clathrin-mediated endocytosis is a key target for amyloid β -induced axonal degeneration and

- memory impairment. *Neuroscience* 2014 (Washington, DC, U.S.A.), 2014, 11, 15-19.
- 5) Shigyo M., **Kuboyama T.**, Chihiro T. Extracellular vimentin facilitates axonal growth by interacting with IGF1R. **第57回日本神経化学大会** (奈良) 2014, 9, 29-10,1.
 - 6) Yang Z., **Kuboyama T.**, Tohda C. DR improves memory impairment in Alzheimer's disease model mice, 5XFAD, and attenuates amyloid β -induced axonal atrophy. **第37回日本神経科学大会** (横浜)、2014, 9, 11-13.
 - 7) Shigyo M., Tanabe N., **Kuboyama T.**, Coi S.-H., Chihiro T. New reliable scoring system, Toyama Mouse Score, to evaluate locomotor function following spinal cord injury in mice. **第37回日本神経科学大会** (横浜)、2014, 9, 11-13.
 - 8) Tanabe N., **Kuboyama T.**, Kazuma K., Konno K., Tohda C. The recovery of motor function by a crude drug and its active constituent in spinal cord injured mice. **第37回日本神経科学大会** (横浜)、2014, 9, 11-13.
 - 9) **Kuboyama T.**, Lee Y., Nishiko H., Tohda C. Inhibition of clathrin-mediated endocytosis prevents amyloid β -induced growth cone collapse, axonal atrophy and memory impairment. **第37回日本神経科学大会** (横浜)、2014, 9, 11-13.
 - 10) 渡り英俊、執行美智子、田辺紀生、東田道久、Ki-Ho Cho、島田豊、柴原直利、**久保山友晴**、東田千尋: 日本および韓国で用いられている加味帰脾湯の記憶増強作用の比較、**第31回和漢医薬学会学術大会** (千葉) 2014年8月30日-31日.
 - 11) 甲田将章、上山健彦、執行美智子、**久保山友晴**、東田千尋、齋藤尚亮、甲村英二: 脊髄損傷後の機能回復に低分子量タンパク質 Rac が関与する、**日本脳神経外科学会 第72回学術総会** (横浜) 2013年10月16日-18日.
 - 12) 田辺紀生、**久保山友晴**、数馬恒平、紺野勝弘、東田千尋: 脊髄損傷の運動機能改善効果を持つ漢方生薬の研究、**第30回和漢医薬学会学術大会** (金沢) 2013年8月31日-9月1日.
 - 13) 執行美智子、**久保山友晴**、東田千尋: Ashwagandha 成分 Sominone の誘導体 Denosomin のアストロサイトを介した脊髄損傷改善作用、**第30回和漢医薬学会学術大会** (金沢) 2013年8月31日-9月1日.
 - 14) **Kuboyama T.**, Nishiko H., Tohda C: Endocytosis-mediated axonal growth cone degeneration induced by amyloid β . *Neuro2013* (京都) 2013年6月20日-23日.
 - 15) Tohda C, Urano T, Umezaki M, **Kuboyama T.** Diosgenin is an exogenous activator of 1,25D3-MARRS (Pdia3/ERp57) and improves memory dysfunction and axonal degeneration in Alzheimer's disease model 5XFAD mice. *Neuro2013* (京都) 2013年6月20日-23日.
 - 16) Shigyo M, Teshigawara K, **Kuboyama T.**, Nagata A, Sugimoto K, Matsuya Y, Tohda C: A novel compound, Denosomin, promotes axonal growth via astrocytes secreting vimentin after spinal cord injury. *Neuro2013* (京都) 2013年6月20日-23日.
 - 17) Tanabe N, **Kuboyama T.**, Miyanaga S, Kazuma K, Konno K, Tohda C: Investigation of crude drugs effective for spinal cord injured mice. *Neuro2013* (京都) 2013年6月20日-23日.
 - 18) **久保山友晴**、執行美智子、東田千尋 新規化合物 denosomin はアストロサイトからの vimentin 放出を促進して脊髄損傷マウスの運動機能を回復させる **平成 25 年度神経糖鎖生物学 夏の班会議** (守山、滋賀) 2013年7月23日-25日
 - 19) **Kuboyama T.** A novel compound, denosomin ameliorates spinal cord injury via axonal growth associated with astrocyte-secreted vimentin. *1st Joint Symposium Between Natural Products Research Institute, College of Pharmacy, Seoul National University and Institute of Natural Medicine, University of Toyama* (Toyama), Dec 15, 2012.
 - 20) Tohda C, Urano T, Umezaki M, Nemere I, **Kuboyama T.** Diosgenin is an exogenous activator of 1,25D3-MARRS (Pdia3/ERp57) and improves memory dysfunction and axonal degeneration in Alzheimer's disease model 5XFAD mice, *Neuroscience2012* (New Orleans, LA, U.S.A.), Oct 13-17, 2012.
 - 21) Shigyo M, **Kuboyama T.**, Teshigawara K, Sugimoto K, Matsuya Y, Tohda C: Denosomin improves SCI via axonal growth by increasing astrocyte-secreted vimentin, *Neuroscience2012* (New Orleans, LA, U.S.A.), Oct 13-17, 2012.
 - 22) **Kuboyama T.**, Teshigawara K, Shigyo M, Sugimoto K, Matsuya Y, Tohda C: A novel compound, Denosomin induces vimentin-secretion from astrocytes, resulting in promotion of axon elongation, *Neuroscience2012* (New Orleans, LA, U.S.A.), Oct 13-17, 2012.
 - 23) Tohda C, **Kuboyama T.**, Teshigawara K, Shigyo M: Novel mechanism of functional recovery from spinal cord injury., *14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry* (Kyoto), Aug 26-29, 2012.
 - 24) **久保山友晴**、Vance Lemmon、Jerry Silver、東田千尋、上口裕之 障害性プロテオグリカンによる軸索再生障害機構の解明 **2012 年度 包括脳ネットワーク夏のワークショップ** (仙台) 2012年7月24-27日.
 - 25) **久保山友晴** コンドロイチン硫酸プロテオグリカン濃度勾配による軸索再生障害のシグナル伝達機構 **第2回「神経糖鎖生物学」領域会議** (淡路、兵庫) 2012年2月17

- 18 日.

- 26) **久保山友晴** コンドロイチン硫酸プロテオグリカンによる軸索再生阻害のシグナル伝達機構 **軸索再生連絡会議**(和光、埼玉) 2011年11月29-30日
- 27) Nakada R, **Kuboyama T**, Tohda C: Kamikihi-to improves memory impairment and axon degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease, 5XFAD. **第54回日本神経化学学会大会**(加賀、石川) 2011年9月26日-28日.
- 28) Shigyo M, Nagata A, Teshigawara K, **Kuboyama T**, Matsuya Y, Tohda C: Denosomin enhances axonal regrowth associated with motor function recovery in spinal cord injury. **第54回日本神経化学学会大会**(加賀、石川) 2011年9月26日-28日.
- 29) Teshigawara K, **Kuboyama T**, Matsuya Y, Tohda C: 1-deoxy-nor-sominone (Denosomin) improves hindlimb dysfunction in spinal cord injury and promotes neurite outgrowth through astroglia-mediated signaling. **第54回日本神経化学学会大会**(加賀、石川) 2011年9月26日-28日.
- 30) **Kuboyama T**, Silver J, Tohda C, Kamiguchi H: Signal transduction underlying chondroitin sulfate proteoglycan-mediated inhibition of axon regeneration. **第54回日本神経化学学会大会**(加賀、石川) 2011年9月26日-28日.
- 31) Wang X, **Kuboyama T**, Miyanaga S, Kazuma K, Konno K, Satake M, Tohda C: Searching for natural medicines that improve spinal cord injury, **第28回和漢医薬学会学術大会**(富山) 2011年8月27-28日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保山 友晴 (KUBOYAMA, Tomoharu)
富山大学・和漢医薬学総合研究所・助教
研究者番号: 10415151