

損傷中枢神経回路の再生と可塑性を制御する分子機構
Molecular mechanism of regeneration and plasticity
of the injured central nervous system

山下 俊英 (YAMASHITA TOSHIHIDE)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授



研究の概要

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。

研究分野：医歯薬学

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：頭部外傷学、脳血管障害学、実験脳外科学

1. 研究開始当初の背景

末梢神経軸索は再生するが、中枢神経軸索は再生しない。脳血管障害、脳損傷、脊髄損傷などにより神経回路網が傷害を受けると、もはや回復は望めない。この重篤な状況を脱するには神経回路の再建、すなわち細胞死を免れた神経細胞の軸索から標的ニューロンへの新たな軸索再生が不可欠であるが、中枢神経系には軸索の再生を阻害する機構が存在している。私たち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、「中枢神経軸索再生阻害機序」の解明に成功し、これを制御する複数の手法を確立した。これらにより従来まで不可能であった中枢神経軸索の再生を可能とした。私たちは最近の数年間、新規の軸索再生阻害蛋白を探索し、複数の候補蛋白質を捉えた。特に私たちの見いだした新規の軸索伸展阻害蛋白 RGM の機能を阻害することで、*in vivo* において損傷した軸索の再生が見られた。こうして中枢神経再生現象を解析することが可能になった。その結果、損傷中枢神経の軸索は広範囲に渡ってダイナミックに回路の再形成を行っていることがわかってきた。特に成体の中枢神経系ではシナプス形成を抑制するメカニズムが存在することが、私たちの研究から明らかになりつ

つある。これは全く新しい概念である。以上の基礎研究により、中枢神経系の神経回路の再形成という新たな分野を開拓したい。

2. 研究の目的

これまでの知見をもとに、軸索再生阻害機構の全貌を明らかにし、神経回路の再形成モデルを用いて再形成機構を形態学的、分子生物学的に明らかにすることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

以下の3項目について研究を進めた。

- A) 新規再生阻害蛋白の同定とシグナル解析
- B) 中枢神経回路再形成現象の解明-再生と可塑性
- C) 回路再形成の分子メカニズムの解明

4. これまでの成果

A) 新規の因子として RGM、BMP-2、Wnt5a を同定し、それらのシグナル伝達解析を行うことによって、再生阻害シグナルの全貌を明らかにすることができた。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。

さらに RhoA/Rho-kinase の下流のシグナルを同定し、細胞骨格制御機構についても明らかにした。また、抗 Ryk 中和抗体あるいは Noggin 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。

B) これまでの研究により、成体の中枢神経もある程度の可塑性を持ちうるということが明らかになってきたが、実際にどのように損傷された中枢神経回路が修復されるのかについて、まず現象面から明らかにした。マウスの片側大脳皮質の皮質脊髄路をすべて脱落させるモデルを用いた。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明らかにした。この代償性神経回路を特異的に切断すると、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。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。すなわち脳の損傷時に、損傷部より遠く離れた頸髄において、軸索枝の出芽がおこり、*interneurons* とのシナプス形成を経て、代償性神経回路が完成することを解明した。この再生モデルをもとに、分子メカニズムの解明へと進むことが可能になった。

C) 私たちはこれまで、軸索再生阻害因子として働く MAG、Nogo、OMgp の受容体を同定し、その下流のシグナル伝達機構を明らかにしてきた。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* マウスに比較して、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。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。以上の結果により、PIR-B ノックアウトマウスで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。さらに私たちは、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。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クペプチド (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。

5. 今後の計画

回路再形成の分子メカニズムの解析を目的として以下の実験を行う。

1) 再生軸索枝除去 (変性) のメカニズムの解析

in vitro の軸索変性評価システムを確立し、分子メカニズムの解明を行う。

2) シナプス形成についての解析

シナプスと運動機能の回復の相関について検討し、新たなシナプスの形成が運動機能の回復につながるのかどうかという点を明らかにする。さらに分子メカニズムの解析を行う。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

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. Taniguchi, J., Sawai, S., Mori, M., Kubo, T., Kanai, K., Misawa, S., Iose, S., Yamashita, T. and Kuwabara, S. (2009) CIDP sera inhibit axonal growth of mouse DRG neurons by activation of Rho-kinase. **Ann. Neurol.** 66, 694-697.

3. 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.

4. Tanaka, T., Ueno, M. and Yamashita, T. (2009) Engulfment of axon debris by microglia requires p38 MAPK activity. **J. Biol. Chem.** 284, 21626-21636.

5. 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.

6. 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.

7. Tohyama, D., Yamaguchi, A., and Yamashita, T. (2008) Inhibition of *eIF2B β F11A3.2* during adulthood extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. **FASEB J.** 22, 4327-4337.

2005年 Ameritec Prize (米国)

2010年 日本学術振興会賞

ホームページ等

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