

厚生労働科学研究費補助金
障害保健福祉総合研究事業

再生医療による脊髄の歩行パターン発生能力と
脊髄損傷者の歩行再獲得可能性に関する研究

平成16年度～18年度 総合研究報告書

主任研究者 赤居 正美

平成19(2007)年4月

目 次

I. 総合研究報告

再生医療による脊髄の歩行パターン発生能力と脊髄損傷者の歩行再獲得 可能性に関する研究-----	1
--	---

赤居 正美

(資料)

Spinal Motor Neuron 軸索伸張の分子メカニズムに関する基礎的研究-----	6
--	---

II. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	42
-------------------------	----

III. 研究成果の刊行物・別刷-----	44
-----------------------	----

厚生労働科学研究費補助金（障害保健福祉総合研究事業）
総合研究報告書

再生医療による脊髄の歩行パターン発生能力と脊髄損傷者の歩行再獲得可能性に関する研究

主任研究者 赤居 正美 国立身体障害者リハビリテーションセンター病院 副院長

研究要旨

本研究は、再生医学による損傷脊髄部分での軸索再生と末梢の残存脊髄機能の可塑性を研究することにより、脊髄損傷者の歩行再獲得を最終目的としている。その実現に向け、概ね以下の3つを目標におく。A：神経生理学的研究により、信号の受け手側である損傷脊髄以下に残った機能回復能を調べる。B：再生医学に基づく細胞工学的手法により、上位信号の送り手側である損傷部位での軸索再生を計る。C：上記により得られた理論に立脚した、歩行能再獲得に向けた新たなリハビリテーション方法を開発する。

分担研究者

中澤公孝

（国立身体障害者リハビリテーションセンター
研究所 室長）

山本真一

（国立身体障害者リハビリテーションセンター
研究所 主任研究官）

A. 研究目的

本研究は近年の中枢神経系の再生能力に関する証明と残存脊髄機能の再活性に関する新知見より、脊髄損傷者の歩行再獲得を最終目的に、新たなリハビリテーション体系の開発を目指す。

目標としては、①人間の脊髄に基本的な歩行パターンを生み出す能力および学習能力がどの程度あるのかを探求し、②近年発達のめざましい再生医学による脊髄の軸索延長と組み合わせて、治療モデルを作る。③それを基に、対麻痺患者のための新たなリハビリテーションにつなげる。

近年のめざましい再生医学の進歩は、従来再生能力はないとされた脊髄組織にも実際には軸索の伸長能があり、周囲組織の阻害によって再生が阻まれている事実を明らかにしつつある。加えて、近年の神経生理学を中心とした基礎医学の進歩は、損傷後脊髄に従来考えられていた以上の回復能力・可塑性があることを示している。しかし先行研究からは、動物にて少しずつ報告例が蓄積されつつある軸索再生をもってしても、損傷部位を越えて元のような点对点投射は困難と考えられる。他方不全損傷患者での臨床経験からは、歩行様トレーニングによる繰り返し刺激入力脊髄歩行中枢の改善に結びつく可能性を示している。ごくわずかであっても中枢からの情報伝達を再建出来れば、いかにすれば完全損傷を不全損傷に変える事が出来れば、臨床への発展性は

あると考えた。

我が国における脊髄損傷の現状には、年間5000人に達する新たな患者発生があり、医学的、社会的、心理的に重大な障害が残存するという課題が存在している。交通事故等の外傷性脊髄損傷によって毎年多くが四肢麻痺や対麻痺となり、その後の長い人生を車椅子生活で過ごすことを余儀なくされている。人間を対象とした研究は端緒についたばかりであり、まだまだ検証すべき点が多い。上記再生医学の知見と神経生理学的な脊髄の可塑性、学習能力を結びつけ、実際の患者における機能再建につながる一歩とする。

B. 研究方法

（1）神経生理学的研究により、信号の受け手側である損傷脊髄以下に残った機能回復能を定量的に把握する。

① ヒトの脊髄に歩行パターンを自立的に生み出す能力がどの程度あるのかを調べる。

② それは末梢からの感覚刺激に対してどの程度適応的に変化する能力があるのかを調べる。

その能力は上位中枢とどのような結合状態を取っているかを調べる。

このための、損傷脊髄以下のトレーニングにともなう再組織化能力を明らかにする臨床的アプローチとしては、①下行性入力の有無と脊髄反射経路の再組織化、②歩行トレーニングによる皮質脊髄路興奮性変化と機能回復の関係を、臨床症例にて検証した。

（2）再生医学に基づく細胞工学的手法により、上位信号の送り手側である損傷部位での軸索再生を計る。

① 神経細胞の再生シグナルを神経軸索断端からの遺伝子導入によって活性化し、軸索伸長を促進させる。

② 再生軸索の足場として最適な表現形を持つ細胞を損傷部に誘導する。具体的には局在のグリア細胞への遺伝子導入を検討する。

これらの実現のための基礎的アプローチとしては、①神経栄養因子シグナル活性化による神経軸索伸長、②髄鞘形成細胞増殖、の分子機構を、初代培養系と脊髄損傷動物モデルの組織解析から検討した。

平成16年度では以下の研究を行った。

・脊髄損傷者を対象とし、歩行トレーニングに伴い脊髄神経回路と大脳運動野からの下行性指令がいかに変容するのかを解明するための実験環境の整備と予備実験を開始した。

・脊髄神経再生能力に関する細胞・動物を用いた基礎実験を行うための遺伝子操作を含む実験環境を整えた。

平成17年度では以下の研究を行った。

・立位歩行トレーニングの経時変化追跡を行った。不全および完全対麻痺者を対象として、トレッドミル上での歩行トレーニング中及び安静時に経頭蓋磁気刺激(TMS)を加え、それに対する下肢麻痺領域の応答を評価した。さらに下肢麻痺領域の脊髄反射を誘発し、これらがトレーニングによりどう変化するかを縦断的に調べた。

・ラット胎生14日の脊髄腹側細胞を選択的に採取し、脊髄運動ニューロンの初代培養を行った。BDNFによる軸索伸長効果と細胞内シグナル伝達経路に関して各種阻害剤を用いて検討した。

・マウス胎生16日の大脳由来オリゴデンドロサイト前駆細胞の初代培養を行った。

・米国PSI社のInfinite Horizon Impactorを購入し、コンピュータ制御下にラット脊髄圧挫損傷モデルを作成した。Olig2/BrdU二重陽性細胞の挙動を解析した。

平成18年度では以下の研究を行った。

・17年度同様の実験を継続し、結果をまとめる。すなわち、大脳運動野との結合が残存するか否かの違いが、脊髄歩行中枢の出力改善にどの程度影響するのかを明らかにした。

・前年度に得られたニューロンあるいはオリゴデンドロサイト前駆細胞の細胞内シグナルの知見を、遺伝子導入実験・マイクロアレイなどで検証した。損傷脊髄内のオリゴデンドロサイト前駆細胞の分布変化を解析した。

(倫理面への配慮)

この研究において、人間を対象として行われる種々の検査、実験に対麻痺者あるいは健常者が参加することに関する倫理上の問題点については、国立身体

障害者リハビリテーションセンター倫理審査委員会で審査を受け、その許可を得た。各実験、検査においては、事前に被検者に内容を十分説明し、インフォームドコンセントを得ると共に、実験、検査の中止は被検者の意志が最優先であり、いかなる場合においてもそれらを即時中止できることを徹底した。

C. 研究結果

平成16年度として

(1) 完全対麻痺患者、不全対麻痺患者および健常者を比較することで、上位中枢からの下行性入力 of 喪失が脊髄神経機能に及ぼす影響を電気生理学的に測定し、下腿おける伸張反射とH-反射にみられる3者間の違いを定量的に計測した。

(2) 脊髄損傷者での実験プロトコルを作成し、倫理審査委員会の審査を受けた。しかし、ロボット型トレーニング機購入のための事務手続きが遅れ、次年度にずれ込んだ結果、体性感覚入力を用いた介入実験の開始が遅れた。

(3) 脊髄・神経再生能に関する遺伝子操作を含む細胞・動物を用いた基礎的実験を行う実験環境の整備が概ね整った。

平成17年度として

(1) 脊髄損傷者の麻痺下肢に発現する歩行様筋活動とその血流動態に関する実験結果について報告をまとめた。

(2) 10月にロボット型歩行トレーニング機が導入され、同機を用いたトレーニング実験の実験系を整備した。受動歩行中の筋電図の記録と経頭蓋磁気刺激を行う環境を整え、健常者での実験を開始した。

(3) 脊髄損傷患者を対象としたトレーニング介入実験を行うための倫理審査を終えた。ロボット型歩行トレーニング機の運用規定も制定し、8週間にわたるトレーニングを順次開始し、まず完全脊髄損傷者1名を対象としたトレーニングを行った。

(4) 脊髄運動ニューロン(Islet1発現細胞)は全細胞中約20%の濃度で選択的に培養可能であった。対照群に対し、BDNFを加えた場合約2.5倍軸索が伸長した。またMEK, PI3Kなどの各種阻害剤を加えた場合、BDNFの軸索伸長効果はいずれもコントロール群と同程度またはそれ以下に阻害された。

(5) オリゴデンドロサイト前駆細胞が増殖因子(FGF2/PDGF)存在下に約85%の純度で培養可能となった。増殖因子下流のMEKの機能が確認された。

(6) Olig2/BrdU二重陽性を呈する前駆細胞の増殖は脊髄損傷部近傍で顕著に見られるものの、損傷後1週間の間にその6割が失われていることが明らかとなった。

平成18年度として

(1) 臨床的アプローチ (神経生理) の成果

- ① ロボット式下肢歩行補助装置であるLokomatを導入し、不全および完全対麻痺者を対象としてトレッドミル上での歩行トレーニング中に経頭蓋磁気刺激 (TMS) を行い、それに対する下肢麻痺領域の応答を計測した。不全対麻痺者において、トレーニング後の歩行能力の改善とTMSに対する応答の増大を確認した。
- ② 立位歩行トレーニングを継続した上、大脳運動野との結合が残存するか否かの違いが、脊髄歩行中枢の出力改善にどの程度影響するのかを計測した。運動野との結合が無い完全対麻痺ではステップング時に誘発される歩行様の筋活動がステップング時間経過と共に減弱すること、不全対麻痺にはこれが見られないことを確認した。この傾向はトレーニングによっても大きく変化しないことを明らかにした。
- ③ これらの結果は、先行研究に一致し、トレーニングの効果は完全麻痺者と不全麻痺者とは明確に異なる結果となった。
- ④ 本研究の不全麻痺者では座位安静時には同筋のMEPは誘発できなかったが、弱い随意収縮中およびLokomatによる歩行中 (図2) には誘発された。さらにトレーニングによってその応答は増大した。このことはTAを支配する大脳運動野と脊髄との神経指令伝達がトレーニングによって改善したことを意味する。

(2) 基礎的アプローチ (再生医学) の成果

- ① 脊髄運動ニューロンは、恒常活性化型MEK導入によって、BDNFと同様に軸索を伸長した。
- ② DNAマイクロアレイによる解析から、Raggef4 (別名EPAC2) などの増殖関連候補遺伝子を同定した。
- ③ Olig2/BrdU二重陽性前駆細胞の分布変化の解析からは、損傷部位へ向けての細胞遊走は確認されなかった。

D. 考察

本年度の結果は従来の報告どおり免荷式受動歩行トレーニングが完全麻痺者には効果が無いことを支持する結果であった。しかし不全麻痺者では効果が得られ、それには大脳運動野と脊髄をつなぐ皮質脊髄路の伝達特性あるいは脊髄反射の強度変調が関与することが示唆された。本年度の結果はさらにそれがトレーニングによって増強することを示唆するものである。また今回の不全麻痺者の結果から、脊髄損傷をきっかけとして増大した脊髄反射強度もトレーニングによって低下され得ることを示すことができた。これは今後、リハビリテーションによる痙性など不随意運動の抑止と随意運動能力の回復メカニズム解明に関わる重要な結果であった。

他方、健常者を対象とした受動歩行時のMEPの結果から、受動的歩行において、TAの皮質脊髄路興奮

性が促通するという新たな知見が得られた。今後脊髄損傷者のトレーニング中に同様な検査を行う予定であるが、その基盤となるきわめて重要な結果を得ることができた。

脊髄運動ニューロンにおいては、BDNFの下流でMEK-ERK経路が軸索伸長に関与している可能性が考えられた。またオリゴデンドロサイト前駆細胞においても、増殖因子下流でMEK-ERK経路が機能していると考えられた。内在するオリゴデンドロサイト前駆細胞の治療応用のためには細胞数の維持と損傷部への誘導が必要であると考えられた。

3年間の研究をまとめると

(1) 達成度について

最終目的である脊髄損傷者の歩行再獲得に直ぐにつながる治験を得るわけにはいかないが、受動的トレーニングを行う動物実験を導入することにより、ヒトでの脊髄可塑性に関する治験を反映させた実験系を組上げることが出来つつある。細胞レベルにおける再生医療実験の成果を臨床に結びつける方向性が出て来た。

(2) 研究成果の学術的意義について

再生医学の目覚ましい進歩をもってしても、人間を対象とした研究は端緒についたばかりであり、まだまだ検証すべき点が多い。上記の脊髄神経細胞での知見と神経生理学的な脊髄の可塑性、学習能力を結びつけ、実際の患者における機能再建につながる一歩としたい。

(3) 研究成果の行政的意義について

最終目的である脊髄損傷者の歩行再獲得には未だ道遠しである。しかし年間5000人に達する新たな脊髄損傷患者の発生に対し、国として研究を進めつつあるということは大切と考える。一部の不全損傷者への立位歩行トレーニングはある程度の臨床的改善が期待され、痙性制御といった治療効果の検証が可能になろう。

E. 結論

平成18年度は6名の脊髄損傷者の歩行トレーニング実験を行った。不全麻痺者において皮質脊髄路機能の回復、伸張反射の低下など神経学的改善と歩行の回復が観察された。

脊髄運動ニューロンの初代培養系を確立し、BDNFの軸索伸長効果とその細胞内シグナルを検討した。オリゴデンドロサイト前駆細胞の初代培養系を確立し、増殖に関わる細胞内シグナルを検討した。ラット脊髄圧挫モデルにおいて、Olig2/BrdU二重陽性オリゴデンドロサイト前駆細胞の挙動を観察した。

再生医学と臨床での神経生理分析との2つのアプローチは、現状では直ぐに結びつくものではない。し

かし受動的トレーニングを行う動物実験を2つの中間に置くことにより、末梢感覚情報と下行性入力の相互作用および脊髄歩行中枢の可塑性との関係を解析する新たな枠組みを構築し、そこに軸索再生による脊髄回路の部分修復の可能性を取り入れることが出来そうである。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Nakazawa K, Kakihana W, Kawashima N, Akai M, Yano H. Induction of locomotor-like EMG activity in paraplegic persons by orthotic gait training. *Experimental Brain Research*. 157, 2004, p.117-123.
- Kawashima K, Nakazawa K, Ishii N, Akai M, Yano H. Potential impact of orthotic gait exercise on natural killer cell activities in thoracic level of spinal cord-injured patients. *Spinal Cord*. 42, 2004, p.420-424.
- 中澤公孝, 河島則天, 岩谷力. 立位歩行訓練による損傷脊髄機能最大化の試み. *脊椎脊髄ジャーナル*. 17, 2004, p.1035-1041.
- 河島則天, 中澤公孝, 岩谷力. 脊髄損傷者の健康維持・増進のための立位歩行訓練. *脊椎脊髄ジャーナル*. 17, 2004, p.1043-1050.
- 田口大介, 河島則天, 太田裕治, 中澤公孝. 脊髄損傷者の装具歩行における股関節動作の動力補助; 動力補助による装具歩行動作、エネルギーコストの変化. *日本義肢装具学会誌*. 21, 2005, p.36-41.
- 中村耕三, 三浦俊樹, 大堀靖夫, 荒居聖子, 星地亜都司, 田中栄, 緒方徹, 山本直哉, 山本真一, 中福雅人. 脊髄再生の試みと現状. *リハビリテーション医学*, 42, 2005, p.45-49.
- 山本真一. 整形トピック; 内在性神経前駆細胞を用いた脊髄再生誘導. *整形外科*, 56, 2005, p.304.
- Kawashima N, Akai M, Nakazawa K. Muscle oxygenation of the paralyzed lower limb in spinal cord-injured persons. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 37, 2005, p.915-921.
- 中澤公孝. 歩行の中枢とCPG. *老年医学*, 43, 2005, p.93-98.
- Nakazawa K, Kawashima N, Akai M. Enhanced stretch reflex excitability of the soleus muscle in incomplete rather than persons with complete chronic spinal cord injury. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, 87, 2006, p.71-75.
- Kawashima N, Taguchi D, Nakazawa K, Akai M.

Effect of lesion level on the orthotic gait performance in individuals with complete paraplegia. *Spinal Cord*, 44, 2006, p.487-494.

- Higuchi Y, Kitamura S, Kawashima N, Nakazawa K, Iwaya T, Yamasaki M. Cardiorespiratory responses during passive walking-like exercise in quadriplegics. *Spinal Cord*, 44, 2006, p.480-486.
- Ohori Y, Yamamoto S, Nagao M, Sugimori M, Yamamoto N, Nakamura K, Nakafuku M. Growth factor treatment and genetic manipulation stimulate neurogenesis and oligodendrogenesis by endogenous neural progenitors in the injured adult spinal cord. *Journal of Neuroscience*, 26, 2006, p.11948-11960.
- 中澤公孝. 歩行困難者への工学的支援. *ウオーキング研究*, 10, 2006, p.31-35.

2. 学会発表

- Kawashima N, Nozaki D, Abe M, Nakazawa K, Akai M. Inter-limb coordination contribute to amplify locomotive neural output in spinal cord injured persons. *EBM in Neurorehabilitation*. Zurich, 2004-09-30/10-02. *Neurologie & Rehabilitation*. 4, 2004, S16.
- 中澤公孝. 脊髄損傷者の歩行-トレーニングによる回復可能性-. 第12回運動生理学会. 千葉, 2004-7-31/8-1.
- 山本真一, 大堀靖夫, 山本直哉, 緒方徹, 中福雅人, 中村耕三. 内在性神経前駆細胞を用いた脊髄再生誘導 (パネルディスカッション: 脊髄再生を目指した先端的基礎神経科学). 第19回日本整形外科学会基礎学術集会, 東京, 2004-10-21/10-22.
- 河島則天, 野崎大地, 阿部匡樹, 中澤公孝, 赤居正美. 歩行運動出力の発現に貢献する脊髄神経回路. 第19回生体生理工学シンポジウム, 大阪, 2004-11-01/11-03, 第19回生体生理工学シンポジウム論文集, 2004, p.277-278.
- 緒方徹, 田中栄, 中福雅人, 中村耕三, 赤居正美, 山本真一. 損傷脊髄における内在性オリゴデンドロサイト前駆細胞の経時的局在変化の解析. 第20回日本整形外科学会基礎学術集会, 三重, 2005-10-20/10-21. *日本整形外科学会雑誌*, 79, 2005, S857.
- 山本真一, 大堀靖夫, 緒方徹, 荒居聖子, 伊藤順一, 山本直哉, 赤居正美, 中福雅人, 中村耕三. 内在性神経前駆細胞を用いた脊髄再生誘導 (シンポジウム: 脊髄損傷研究に関する最新知見). 第40回日本脊髄障害医学会, 東京, 2005-11-11/

11-12.

- ・中澤公孝. 脊髄歩行パターン発生機構と脊損者の新しい歩行トレーニング. アカンサス研究会, 名古屋, 2005-12-15.
- ・荒居聖子, 緒方徹, 山本直哉, 中村耕三, 山本真一. Spinal Motor NeuronのBDNFによる軸索伸長効果と細胞内シグナル伝達. 第49回日本手の外科学会学術集会, 浜松, 2006-4-20/4-21. 日本手の外科学会雑誌, 23(1), 2006, S71.
- ・大堀靖夫, 山本真一, 緒方徹, 荒居聖子, 伊藤順一, 上野高明, 山本直哉, 赤居正美, 中福雅人, 中村耕三. 損傷組織内で増殖するグリア前駆細胞からの脊髄再生誘導. 第25回日本運動器移植・再生医学研究会, 東京, 2006-9-23.
- ・中澤公孝, 移動型受動歩行訓練機の開発. 第45回日本生体医工学会, 福岡, 2006-5-16.
- ・中澤公孝, 受動歩行中の皮質脊髄路の興奮性. 生体医工学会専門別研究会“脊髄損傷のME”, 岡山, 2006-5-18.
- ・中澤公孝, 上林清孝, 尾方寿好, 赤居正美. ロボット型歩行訓練機を用いた受動歩行の効果-神経系、呼吸循環系に対する効果-. 福祉工学シンポジウム2006, 柏, 2006-9-13.
- ・中澤公孝. 脊損者の最新歩行リハビリテーション-理論と実際-. 在宅リハビリテーション研究会レッツ講演会, 所沢, 2006-5-13.
- ・中澤公孝, 赤居正美. 移動型歩行訓練装置-その神経生理学的背景-. 日本リハビリテーション医学会, 東京, 2006-6-1.
- ・中澤公孝. ロコモーションにおける反射の役割. 第19回日本バイオメカニクス学会, 所沢, 2006-6-9-15.
- ・中澤公孝. 歩行困難者への工学的支援. 第10回記念日本ウオーキング学会シンポジウム“最近10年間に見られるウオーキング研究の進歩”. 東京, 2006-6-24.
- ・中澤公孝. 脊髄歩行パターン発生機構と脊損者の新しい歩行トレーニング. 東海リハ工学研究会, 名古屋, 2006-11-17.
- ・中澤公孝. シンポジウム“歩行と姿勢制御の神経機構はどこまでわかったか” 受動歩行中の皮質脊髄路興奮性. 第36回日本臨床神経生理学会, 横浜, 2006-11-29.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他

資料

Spinal Motor Neuron 軸索伸張の分子メカニズムに関する基礎的研究

Spinal Motor Neuron 軸索伸張の分子メカニズムに関する基礎的研究

要約

末梢神経損傷では、軸索伸張阻害因子が豊富な中枢神経系とは異なり、比較的良好な軸索再伸長が期待できる。但し、損傷部位と標的器官の距離が長い場合、脱神経による変性を回避すべく、迅速な軸索再伸長が良好な機能回復には重要である。すなわち、末梢神経系においてはニューロン自体の軸索伸張活性を制御する機構の解明が重要と考えられる。これまで、後根神経節細胞や交感神経節細胞では、nerve growth factor などの神経栄養因子の刺激によって軸索伸長が促進されることが知られており、その細胞内シグナル伝達として MEK-ERK 経路が主要な役割を担うと報告されている。一方、末梢神経系を構成するもう一つの主要なニューロンである Spinal Motor Neuron (SMN) に関しては、研究が殆どなされていない。本研究においては、胎生期 SMN の選択的培養系を用いて、brain derived trophic factor (BDNF) による軸索伸張とその細胞内シグナル伝達経路を検討した。その結果、SMN 軸索伸張においては MEK-ERK-Gsk3 β /Cdk5-MAP1b 経路が重要な役割を担っていることが明らかとなった。

緒言

末梢神経損傷においては、軸索伸張阻害因子が豊富な中枢神経系とは異なり、適切な処置によって比較的良好な軸索再伸長が期待できる。但し、損傷部位と標的器官の距離が長い場合、長期間の脱神経による Schwann 細胞や骨格筋の変性を回避するために、迅速な軸索再伸長が良好な機能回復には重要と考えられている (Höke, 2006)。現在まで、損傷脊髄など中枢神経系においては、Nogo、myelin-associated glycoprotein (MAG)、chondroitin sulphate proteoglycans (CSPGs) など軸索伸張阻害因子の細胞内シグナルに関する研究が主流である (Yiu and He, 2006)。一方、末梢神経系では、ニューロン自体が内在的にもつ軸索伸張活性を制御する機能、特に軸索伸張能を促進する機構の解明が重要と考えられる。

これまでに、末梢神経系を構成する後根神経節細胞 (dorsal root ganglion、DRG) や交感神経節細胞では、nerve growth factor (NGF) などの神経栄養因子の刺激によって軸索伸長が促進されることが知られており、その細胞内シグナル伝達には MEK-ERK 経路が主要な役割を担うとされ、もう一つの伝達経路である PI3K-Akt 経路は、軸索径や分岐に関与すると報告されている (Markus et al., 2002b)。このように、同じ栄養因子下流の細胞内シグナルである MEK-ERK 経路と PI3K-Akt 経路が、細胞内で異なる作用を持つ現象は、Schwann細胞などでも知られている (Ogata et al., 2004 ; Ogata et al., 2006)。

末梢神経を構成するもう一つの主要なニューロンである Spinal Motor Neuron (SMN) の軸索は、中枢神経系に含まれる脊髄前角に位置する細胞体から前根を経て、DRG からの後根と合流して、神経根・叢を形成し末梢へと走行している。SMN 軸索伸長の研究は、大脳皮質・海馬など他の中枢神経系ニューロンと異なり単離培養が困難なためか、これまで殆どなされていなかった。そこで我々は胎生期SMNの選択的培養を

行い、その神経栄養因子となるbrain derived trophic factor (BDNF) による軸索伸張とその細胞内シグナル伝達経路を検討した。シグナル阻害剤や遺伝子導入実験などによる検討から、SMN軸索伸張にはMEK-ERK経路からGsk3 β あるいはp35/Cdk5を介したMAP1bのリン酸化が重要な役割を担っていることが明らかとなった。

実験材料と方法

SMN の単離

SMN の選択的培養は、Camu and Henderson (1992) の手法を一部改変して行った。

Sprague-Dawley 妊娠ラット (Charles River Inc., Yokohama, Japan) を diethyl ether (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan) で麻酔・開腹し、胎生 14.5 日胚を得た。手術用顕微鏡下に胎児脊髄腹側組織のみを分離し、artificial cerebro-spinal fluid (aCSF) (124 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.3 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 26 mM NaHCO₃, 10 mM D-glucose) 中に既報に基づいて回収した (Yamamoto et al., 2001a, b)。脊髄組織を小断片に分散した後、0.1% (w/v) trypsin (Sigma, St. Louis, MO)、0.67 mg/ml hyaluronidase (Sigma)、0.1 mg/ml deoxyribonuclease I (Roche, Basel, Switzerland) を含んだ、low Ca²⁺、high Mg²⁺ aCSF [124 mM NaCl, 5 mM KCl, 3.2 mM MgCl₂, 0.1 mM CaCl₂, 26 mM NaHCO₃, 10 mM D-glucose, 100 units/ml penicillin (Banyu Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan)、100 µg/ml streptomycin (Meiji Seika, Tokyo, Japan)] 中で 37°C にて 10 分保温した。その後、0.7 mg/ml ovomucoid (Sigma)、penicillin、streptomycin を含む等量の aCSF を加えることで trypsin を中和し、さらに物理的な攪拌により単一細胞にまで分散した。得られた細胞懸濁液を nylon mesh (40 µm, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) を用いて濾過し、さらに Nycodenz (Sigma) 濃度勾配遠心法を用いて SMN を高率に含む分画を既報に基づいて得た (Camu and Henderson, 1992)。すなわち、8.4% Nycodenz 2ml 上に濾過した細胞濾過液を重層し、500 x g、室温にて 15 分遠心して、SMN が濃縮されることが知られている中間層を採取した。さらに、死細胞や神経網の細片を上清中に除去する目的で 4% bovine serum albumin (BSA ; Sigma) 2 ml 上に重層し、200 x g、

室温にて 10 分遠心して、生細胞を BSA クッション下に沈殿として回収した。回収した細胞は、penicillin, streptomycin を含む Dulbecco's modified Eagle's medium と F-12 medium (GIBCO、Rockville、MD) の 1:1 混合培養液で二回洗浄後、一部を Trypan Blue (Sigma) で染色し、生細胞数を計測した。得られた生細胞を標準培養液 [上記混合培養液に B-27 culture supplement (1:50、GIBCO)、1mg/ml BSA、10 μ M forskolin (Sigma) を添加] 中に 1 x 10⁵ 個 /ml の密度で懸濁した。

SMN の培養と阻害剤投与

回収した生細胞を、Poly-D-Lysine / Laminin で予めコートされている 8-well CultureSlides (Becton Dickenson Biosciences、Bedford、MA) 上で、37°C 5%CO₂ にて、5 x 10⁴ 個 / well の密度で単層培養した。一部の培養では、培養開始 3 時間後に human BDNF (50 ng/ml、Sigma) 単独あるいは以下のシグナル伝達系阻害剤を組み合わせ添加し、さらに 3 時間後あるいは 24 時間後に 4% (w/v) paraformaldehyde (PFA; Chiyoda-jyunnyaku、Tokyo、Japan) にて固定した。用いたシグナル伝達系阻害剤 : U0126 (20 μ M、Sigma)、PD98059 (30 μ M、Cell Signaling、Beverly、MA)、LY294002 (20 μ M、Cell Signaling)、Lithium chloride (LiCl ; 2mM、Sigma)、GSK-3 inhibitor IX (10 μ M、Merck KGaA、Darmstadt、Germany)、roscovitin (10 μ M、Sigma)、SB203580 (20 μ M、Merck KGaA)、KT5720 (20 μ M、Sigma)。細胞死の抑制実験においては、培養 3 時間後に BDNF 50ng/ml、各シグナル阻害剤とともに、Caspase 阻害剤である Z-VAD-FMK (Z-VAD ; 40 μ M、Sigma)を加え、さらに 72 時間培養した。

プラスミド作成と遺伝子導入

遺伝子導入を目的に、ラット MEK、Akt、p35、Cdk5 の相補的 DNA を polymerase chain reaction (PCR) にて単離した。恒常活性化型 MEK (ca-MEK) として、MEK

の 218 番目と 222 番目のセリン残基をグルタミン残基に変える S218E・S222E の変異を導入した (Mansour et al., 1994)。恒常活性化型 Akt (myr-Akt) として、Akt1 の N 末端にミリスチン付加配列を導入した (Resh, 1994)。恒常不活性化型 Cdk5 (dn-Cdk5) として、Cdk5 の 144 番目のアスパラギン酸残基をアスパラギンに変える D144N の変異を導入した (Nikolic et al., 1996)。これらを発現ベクター pCAGGS に組み込んだ。対照としては、挿入断片を有しない発現ベクターを用いた。

培養開始時に上記ベクターを electroporation (電気穿孔法) 法で生細胞に導入した。electroporation 法には、Amaxa 社 Nucleofector™ II (Koeln, Germany) の Rat Neuron Nucleofector Kit を用いた。同時導入のマーカーとして pCAGGS-DsRED を使用し、目的遺伝子を含む発現ベクターと併せて計 10 μ g のプラスミド DNA を使用した。electroporation 後 3 時間で標準培養液に交換し、さらに 48 時間後に PFA 固定した。導入効率は 30-40% で、pCAGGS-DsRED と pCAGGS-GFP の同時導入により確認した遺伝子の共発現の効率は 90% 以上であった。

抗体と免疫細胞染色

Islet-1 (39.4D5, 1:50) と nestin (Rat401, 1:500) に対する抗体 [mouse monoclonal antibody (mAb)] は、Iowa University の Developmental Studies Hybridoma Bank より入手した。また、以下の市販抗体を使用した: β -tubulin type III [TuJ1: mouse mAb, 1:500; rabbit polyclonal antibody (pAb), 1:1000, COVANCE, Berkeley, CA]、phospho-ERK (mouse mAb, 1:1000, Santa Cruz Biotech. Inc., Santa Cruz, CA)、phospho-Akt (rabbit pAb, 1:100, Cell Signaling)、p35 (rabbit pAb, 1:100, Santa Cruz Biotech. Inc.)、Cleaved Caspase 3 (rabbit pAb, 1:100, Cell Signaling)、SMI31 (mouse mAb, 1:1000, COVANCE)。

培養細胞の免疫細胞染色は、既報に従って行った (Yamamoto et al., 2001a, b)。

細胞を 4%PFA にて固定後、一次抗体と反応させ、Alexa Fluor 350、488、568 (1:400、Molecular Probe、Eugene、OR) にて標識された蛍光標識二次抗体と反応させた。1 μ g/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Invitrogen、Carlsbad、CA) にて細胞核を染め、細胞数を計測した。

神経突起長・数定量と統計学的検定

神経突起長の定量的結果は、NIH image にて全神経突起の長さの合計あるいは最長の神経突起（軸索）の長さを、3-5 回実験で各 20 細胞計測し、平均および標準偏差により示した。神経突起数として、細胞体長径以上の長さの突起の数を、3 回実験で各 20 細胞計測し、同様に示した。統計学的有意差の検定には、unpaired t-test を用いた。

結果

SMN の選択的培養と BDNF 細胞内シグナルの活性化

胎生 14.5 日ラット胚の脊髄腹側組織から回収した全生細胞中、 $88.0\pm 3.3\%$ ($n=3$) が TuJ1 陽性のニューロンであり、残りの殆どは nestin 陽性の未分化前駆細胞であった。本培養においては、SMN を選択的マーカーである Islet1 陽性細胞として同定した。Islet1 陽性 SMN は、脊髄腹側組織から回収した全生細胞中には数%程度しか含まれないが、既報の濃度勾配遠心法を用いることで、その純度を $23.1\pm 2.0\%$ ($n=3$) にまで上げることができた (図 1A : この図そのものは純化過程を直接示していない)。これまでの報告では、immunopanning 法をさらに併用することで、より高純度の Islet1 陽性 SMN を回収している (Hanson Jr et al., 1998)。しかし、長時間を要する単離行程は細胞の生存率を低下させると考え、本研究では濃度勾配遠心法のみを採用した。

成体 SMN では、receptor tyrosine kinase である BDNF 受容体 : TrkB が軸索損傷後の再伸張を制御していることが知られている (Boyd and Gordon, 2001)。そこで、胎児由来の SMN における BDNF シグナル下流の MEK、PI3K 経路の活性化を、免疫細胞染色によって確認した (Markus et al., 2002a)。BDNF 存在下 3 時間で、リン酸化された活性化型 ERK、Akt (以下、pERK、pAkt と表記) を発現する Islet1 陽性 SMN が出現した。さらに、MEK の阻害剤である U0126、および PI3K の阻害剤である LY294002 を添加すると、pERK、pAkt 発現は各々対照レベルにまで低下した (図 1B)。以上の結果から、Islet1 陽性 SMN においては、BDNF の下流で MEK-ERK 経路と PI3K-Akt 経路が活性化されると考えられた。

BDNF による神経突起伸長に対する細胞内シグナル阻害剤の効果

24 時間培養を継続すると、SMN に数本の神経突起が伸長した。この全神経突起長

を、NIH イメージソフトウェアを用いて計測した。BDNF 存在下では、SMN 神経突起伸張が対照に比べ有意に促進された（対照比： 5.3 ± 1.3 、各 20 細胞 5 回実験、図 2A, B）。しかし、MEK、PI3K に対する阻害剤（U0126、LY294002）存在下では、いずれも伸長が対照と同程度にまで阻害された（図 2A, B）。別の MEK 阻害剤である PD98059 を用いても、同様の結果であった（data not shown）。一方、他の種類のニューロン群を用いた報告とは異なり、p38、PKA に対する阻害剤（SB203580、KT5720）には、伸張阻害効果は認められなかった（Morooka and Nishida, 1998；Neumann et al., 2002、data not shown）。

これまでに神経栄養因子による軸索伸張の細胞内シグナルの解析に関していくつかの報告があるが、MEK-ERK 経路と PI3K-Akt 経路の下流で機能すると考えられている Gsk3 β と p35/Cdk5 のリン酸化酵素としての役割は、報告により異なっている（Goold and Gordon-Weeks, 2004；Zou and Snider, 2005）。

Gsk3 β に関しては、MEK-ERK 経路下流で Gsk3 β が活性化され軸索が伸張する（Goold and Gordon-Weeks, 2005）、あるいは PI3K-Akt 経路下流での Gsk3 β の不活化が軸索伸張に必要（Zhou et al., 2004）との報告がある。そこで、Gsk3 β の関与について、特異的阻害剤である LiCl を用いて検討したところ、BDNF 依存性の SMN 神経突起伸長を強く阻害することが明らかとなった（図 2A, B）。別の Gsk3 β 阻害剤である GSK-3 inhibitor IX を用いても、同様の結果であった（data not shown）。

また p35/Cdk5 に関しては、MEK-ERK 経路下流で p35/Cdk5 が活性化され神経突起が伸張する（Harada et al., 2001）、あるいは Cdk5 は Gsk3 β とともに神経突起伸張を阻害している（Yoshimura et al., 2005）との報告がある。実際、我々の培養系においては、BDNF 存在下 3 時間で SMN において p35 の発現の増強が観察された。この BDNF による p35 の発現は MEK 阻害剤 U0126 を添加すると対照レベルにまで減弱するが、PI3K 阻害剤 LY294002 によっては抑制されなかった（data not shown）。そこで、Cdk5

の関与について、特異的阻害剤 roscovitin を用いて検討したところ、Gsk3 β 阻害剤と同様に、BDNF 依存性の SMN 神経突起伸長を強く阻害することが明らかとなった (図 2A, B)。

上記いずれの報告においても、MEK-ERK 経路下流では Gsk3 β と p35/Cdk5 は活性化され、一方、PI3K-Akt 経路下流では Gsk3 β は不活性化されていると考えられる。このように Gsk3 β と Cdk5 阻害剤のいずれもが神経突起伸張を阻害したことから、SMN において BDNF 刺激下の神経突起伸張には、Gsk3 β および p35/Cdk5 の活性化が必要であり、その上流では主に MEK-ERK 経路が働いていると考えられた。

PI3K-Akt 経路による生存維持効果と突起伸長の関連

一方、PI3K-Akt 経路は、ニューロンを含め細胞の生存維持に重要な役割を果たすことが広く知られている (Brunet et al., 2001)。したがって、上記の PI3K 阻害剤 LY294002 による神経突起伸張阻害は、細胞の生存維持阻害による二次的な影響の可能性が考えられた。確かに、本培養系では、培養 72 時間で、一部の細胞は核の fragmentation を生じ、Cleaved Caspase3 を発現していることから、apoptosis による細胞死が起こっていると考えられた ($23\pm 4.1\%$, $n=3$, 図 3A, B)。BDNF 存在下ではこの核の fragmentation は強く抑制された ($5.5\pm 4.2\%$, $n=3$, $p<0.01$, 図 3B)。この BDNF の生存維持効果は、LY294002 添加により抑制された ($21\pm 5.1\%$, $n=3$, $p<0.01$, 図 3B)。MEK 阻害剤 U0126 には、このような BDNF 依存性の生存維持に対する抑制効果は認められなかった ($7.6\pm 3.5\%$, $n=3$, 図 3B)。さらに apoptosis 誘導に必須である Caspase の活性を阻害する Z-VAD を添加すると、LY294002 の生存維持の抑制効果は打ち消された ($1.9\pm 0.8\%$, $n=3$, $p<0.01$, 図 3B)。また、Z-VAD 存在下での BDNF の神経突起伸張効果 (培養 24 時間) は、LY294002 添加で抑制された (対照比: 11.7 ± 5.8 , 1.1 ± 0.3 , 各 20 細胞 3 回実験, $p<0.05$, 図 3C)。以上の結果より、PI3K-Akt 経路は生存維持効

果を介して間接的に神経突起伸張に関与しているのではなく、突起伸張過程に直接関与していることが示唆された。

遺伝子導入による神経突起伸長シグナル系の解析

上記の薬理的な手法を用いた解析に続いて、種々の活性化型細胞内シグナル伝達因子を遺伝子導入することで、SMNにおける神経突起伸長機構を解析した。

MEK-ERK 経路と PI3K-Akt 経路を各々恒常的に活性化する ca-MEK と myr-Akt を発現するベクターを作成し、electroporation 法を用いて DsRED と共に培養細胞に遺伝子導入した。DsRED の発現を指標に同定した ca-MEK や myr-Akt を発現している Islet 陽性 SMN では、対照と比べ有意に神経突起は伸長したが、両者に有意な差はなかった（対照比 ca-MEK : 4.8 ± 0.6 、myr-Akt : 3.1 ± 1.1 、各 20 細胞 3 回実験、 $p=0.063$ 、図 4A, B）。しかし、myr-Akt を発現している SMN では、細胞体から伸長している神経突起の総数が多い傾向が認められた（対照 : 2.1 ± 0.2 本、ca-MEK : 2.9 ± 1.1 本、myr-Akt : 4.8 ± 1.7 本、各 20 細胞 3 回実験、 $p=0.052$ 、図 4C）。そこで、SMN の最長の神経突起、すなわち軸索に注目して、その長さを計測すると、ca-MEK 発現細胞の方が myr-Akt 発現細胞に比べ有意に長かった（対照比 ca-MEK : 6.1 ± 1.1 、myr-Akt : 1.3 ± 0.1 、各 20 細胞 3 回実験、 $p<0.01$ 、図 4D）。したがって、上記の阻害剤を用いた実験結果と併せて考えると、SMN 神経突起伸長には MEK-ERK 経路および PI3K-Akt 経路の両者が関与しているが、MEK-ERK 経路の強い活性化によって特に軸索の伸張が促進されることが示唆された。

MEK-ERK 経路の下流で機能すると考えられる p35/Cdk5 経路の関与を検討するため、p35 と Cdk5 を同時に SMN に強制発現させた。しかし、この場合には ca-MEK とは異なり、神経突起伸長効果は認められなかった（Nikolic et al., 1996、data not shown）。しかし、リン酸化機能を欠落し、野生型に対して恒常不活性化に働くとされる