

Ⅱ－３ 細胞接着班形成制御を機序とする脊髄損傷治療薬の開発

富山大学・和漢医薬学総合研究所・神経機能学分野

助教 久保山 友晴

【研究目的と背景】

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、グリア性癍痕が形成される。断裂した神経軸索はグリア性癍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（グリア性癍痕形成部）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、グリア性癍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, 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 を再現した (Tom et al, 2004)。これにより、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。

私はこれまでに、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）の構成分子である paxillin が PKA 阻害によってリン酸化され、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明らかにした（投稿中）。

そこで私は、脊髄損傷下で再生不全に陥った軸索終末部の細胞接着斑の形成を制御することができれば、軸索再生が誘発され、脊髄損傷を治療することができるのではないかと考えた。そこで、細胞接着斑の形成制御作用を有する生薬及びその成分を同定し、その薬理作用を解析することにより、新たな脊髄損傷治療薬を開発することを目指している。本目標を達成するためには、CSPG 濃度勾配を検知し、細胞接着斑の形成を制御する鍵となる paxillin リン酸化の制御機構を解明することも重要となる。昨年度までに久保山は、p21-activated kinase (PAK) が paxillin をリン酸化して CSPG 濃度勾配

上の軸索再生を促進することを明らかにした。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 (Howe and Juliano, 2000)。以上のことから、CSPG 濃度勾配上の 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。そこで本年度は、dystrophic endball における PKA の活性を検討した。

【実験方法】

1. 細胞培養

Tom らの方法 (Tom et al, 2004) に準じて、培養皿上に CSPG の濃度勾配を作製した。次に成体ラットより後根神経節神経細胞を単離し、CSPG 濃度勾配を形成させた培養皿あるいは 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ laminin をコートした培養皿上に播種し、2% B-27 (Invitrogen) を含む Neurobasal A 培地 (Invitrogen) を用いて 37°C, 5% CO_2 条件下で培養した。

2. 免疫染色

培養 2 日後、戸島らの方法 (Tojima et al, 2007) に準じて細胞を固定した。実験 1 では、固定 5 分前に 20 μM forskolin (Sigma) あるいは溶媒を処置した。続いて PKA regulatory domain II (PKA RII) を認識するマウスモノクローナル抗体 (1:400, 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 (1:200, Epitomics) を 1 次抗体として用い、Alexa Fluor 488 結合型抗マウス IgG 抗体 (1:400, Invitrogen) 及び Alexa Fluor 594 結合型抗ウサギ IgG 抗体 (1:400, Invitrogen) を 2 次抗体として用い、免疫染色を行った。倒立蛍光顕微鏡 (Axio Observer Z1, Carl Zeiss) を用いて蛍光画像を取得した。軸索終末部における蛍光強度は AxioVision software (Carl Zeiss) を用いて定量した。

【実験結果】

1. 軸索終末部における PKA 活性の可視化

PKA は 2 つの catalytic subunit と 2 つの regulatory subunit (RI・RII) から構成される。RI と RII は catalytic subunit のキナーゼ活性を阻害する (Taylor et al, 1990)。cAMP が RI・RII に結合すると、RI・RII が catalytic subunit と解離し、catalytic subunit のキナーゼ活性が賦活化する。RII の 96 番目のセリン残基は自己リン酸化すると、cAMP 依存性の catalytic subunit と RII の解離が促進され、catalytic subunit のキナーゼ活性が賦活化する (Granot et al, 1980; Erlichman et al, 1983)。そのため、RII の 96 番目のセリン残基のリン酸化 (pS⁹⁶ PKARII) を認識する抗体を用いて PKA の活性化を検出する手法が既に報告されている (Mizuno et al, 2002)。そこで私は、pS⁹⁶ PKARII に対する抗体を用い、神経

軸索終末部における PKA の活性を蛍光免疫染色法により可視化する実験を行った。均一な laminin 基質上で後根神経節神経細胞を 2 日間培養した後、アデニル酸シクラーゼ賦活薬 forskolin (cAMP の産生を増加させることによって PKA を活性化する) あるいは溶媒を処置した。その後、pS⁹⁶ PKA RII に対する抗体及び PKA RII に対する抗体を用いて免疫染色を行った。軸索終末部における蛍光強度を定量した結果、forskolin 処置群では pS⁹⁶ PKA RII の発現量が溶媒処置群に比べて有意に増加していた。一方、PKA RII の発現量は forskolin 処置群と溶媒処置群の間で有意な差はなかった。また各軸索終末部において、pS⁹⁶ PKA RII の発現量に対する PKA RII の発現量の比を算出した結果、forskolin 処置群では溶媒処置群に比べて有意に増加していた。以上のことから、軸索終末部においても PKA が活性化する時に PKA RII の96番目のセリン残基のリン酸化が増加することが明らかになった。

2. Dystrophic endball における PKA の活性

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 濃度勾配上で培養した神経細胞の軸索終末部 (dystrophic endball) では、pS⁹⁶ PKA RII の発現量及び pS⁹⁶ PKA RII の発現量に対する PKA RII の発現量の比が、laminin 基質上の軸索終末部に比べて有意に増加した。一方 PKA RII の発現量は、いずれの基質上の軸索終末部でも有意な差が見られなかった。

【考察】

これまでの研究結果から、CSPG 濃度勾配上の dystrophic endball では PKA の活性が増加していることが示された。以前の久保山の研究で、PKA 阻害剤処置により CSPG 濃度勾配上の dystrophic endball が前方への移動を再開することを明らかにしており、PKA の活性化が軸索再生不全の要因となっている可能性が高い。CSPG 濃度勾配の下流シグナルを解析した研究はこれまでにほとんどなく、PKA の活性化が含まれることを示したのは本研究が初めてである。今後は CSPG 濃度勾配を検知する受容体を含めた PKA 活性化の機序を明らかにしていく予定である。そして CSPG 濃度勾配上で細胞接着班の形成を制御して軸索再生不全となる一連の分子機序を解明し、軸索再生誘発に重要となる分子を決定する。さらにその分子の活性を制御する薬物を本研究班の紺野博士と協力して生薬及びその成分中から見出し、本研究班の東田博士と協力して脊髄損傷モデル動物を用いた活性薬物の解析を行う予定である。

【参考文献】

Davies SJ, Goucher DR, Doller C, Silver J. Robust regeneration of adult sensory axons in degenerating white matter of the adult rat spinal cord. *J Neurosci*, 19 : 5810-5822, 1999.

- Erlichman J, Rangel-Aldao R, Rosen OM. Reversible autophosphorylation of type II cAMP-dependent protein kinase: distinction between intramolecular and intermolecular reactions. *Methods Enzymol*, 99 : 176-186, 1983.
- Granot J, Mildvan AS, Kaiser ET. Studies of the mechanism of action and regulation of cAMP-dependent protein kinase. *Arch Biochem Biophys*, 205 : 1-17, 1980.
- Howe AK, Juliano RL. Regulation of anchorage-dependent signal transduction by protein kinase A and p21-activated kinase. *Nat Cell Biol*, 2 : 593-600, 2000.
- Mizuno M, Yamada K, Maekawa N, Saito K, Seishima M, Nabeshima T. CREB phosphorylation as a molecular marker of memory processing in the hippocampus for spatial learning. *Behav Brain Res*, 133 : 135-41, 2002.
- Tojima T, Akiyama H, Itofusa R, Li Y, Katayama H, Miyawaki A, Kamiguchi H. Attractive axon guidance involves asymmetric membrane transport and exocytosis in the growth cone. *Nat Neurosci*, 10 : 58-66, 2007.
- Tom VJ, Steinmetz MP, Miller JH, Doller CM, Silver J. Studies on the development and behavior of the dystrophic growth cone, the hallmark of regeneration failure, in an in vitro model of the glial scar and after spinal cord injury. *J Neurosci*, 24 : 6531-6539, 2004.
- Taylor SS, Buechler JA, Yonemoto W. cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu Rev Biochem*, 59 : 971-1005, 1990.