

総説

哺乳類中枢神経系の新しい神経回路形成機構： 神経束形成因子 LOTUS の発見

竹居 光太郎

神経系の発生や再生の過程において、伸長する軸索の先端には成長円錐と呼ばれる特殊な構造体が存在し、脳内環境を認知するセンサーの役割を演じながら結合すべき標的細胞を正確に見いだしてシナプスを形成する。この現象は軸索ガイダンスと呼ばれ、成長円錐の形態・運動は種々の軸索ガイダンス分子によって制御される。我々は、光照射分子不活性化法を用いた独自の機能的スクリーニングによって、マウス嗅覚情報2次伝導路である嗅索の形成を担う軸索ガイダンス分子として機能する膜タンパク質 LOTUS を発見した。LOTUS は嗅球ニューロンの軸索や成長円錐に発現し、同部位に発現する Nogo 受容体と相互作用する。Nogo 受容体は中枢神経系の再生阻害因子群に共通する受容体で、神経再生を困難にする主要因と考えられている。LOTUS は Nogo 受容体の機能を阻害する内在性の拮抗物質として機能し、その作用を介して嗅索の神経束形成に寄与することが判明した。この新しい軸索伸長機構を利用した神経再生法の創成が期待される。

1. はじめに

神経回路形成には、主として細胞間や細胞・細胞外基質間の相互作用および神経活動が深く関与する。中枢神経系での細胞間相互作用は、細胞外基質と同様に、神経細胞やグリア細胞が脳内の細胞外環境として神経細胞に提示され、神経細胞の極性形成、神経突起（軸索）伸長、軸索ガイダンス現象、そしてシナプス形成といった一連の神経回路形成過程を制御する（図1）。伸長中の神経突起の先端には成長円錐と呼ばれる扇形の特殊な構造体が存在し、成長円錐は脳内環境を感知するセンサーの役割を演じながら、標的細胞を正確に見いだしてシナプスを形成する。この現象は軸索ガイダンスと呼ばれ、神経回路形成における主体的な現象である。成長円錐が感知して反応する軸索ガ

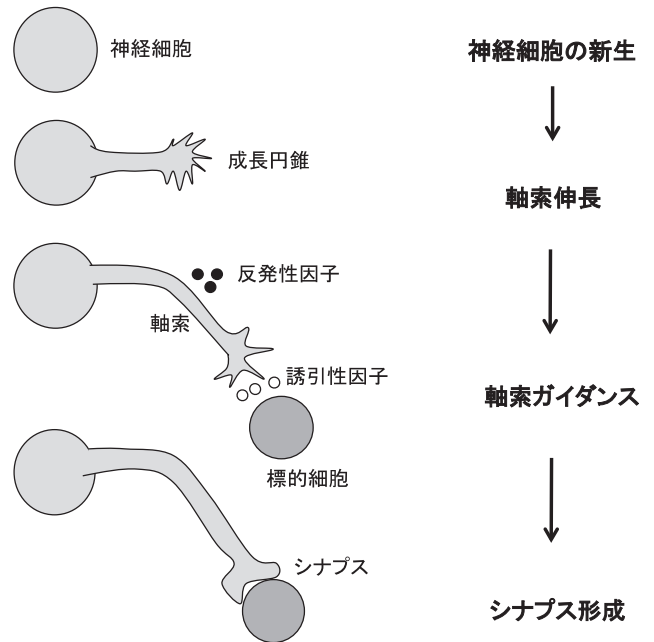


図1 神経回路形成の素過程
最終分裂を終えて適切な場所に移動した神経細胞は、軸索を伸長し、伸長する軸索先端には成長円錐が形成される。成長円錐は反発性や誘引性の脳内環境因子を感受して軸索の伸長方向を制御し、目的の標的細胞を見だし、シナプスを形成する。

横浜市立大学大学院生命医科学研究科生体医科学部門
(〒236-0004 横浜市鶴見区末広町 1-7-29)

Novel mechanism of neural circuit formation in the mammalian central nervous system: Discovery of LOTUS serving for axon tract formation

Kohtaro Takei (Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University, Suehiro-cho 1-7-29, Tsurumi Ward, Yokohama 230-0045, Japan)

イダンス分子はネトリン、スリット、エフリン、セマフォリンの4種に大別される。これらの軸索ガイダンス分子を感受した成長円錐は誘引的あるいは反発的な応答を示し、環境因子の正負の制御によって標的細胞に到達する。すなわち、神経回路形成には、脳内の軸索ガイダンス分子によって成長円錐の運動性が正負に制御され、軸索伸長の伸長度や方向性が規定されるといった基本的メカニズムが存在する。本稿では、筆者らが独自開発した機能的スクリーニング法で見いだした新規軸索ガイダンス分子 LOTUS を介した今までとは異なる新しい神経回路形成機構について概説する。

2. 成長円錐

神経系の発生時や再生時には、伸長する神経突起の先端に手のひらを広げたような扇形の成長円錐と呼ばれる特殊な構造体出現する(図1)。成長円錐の形態は動物種、細胞種、培養基質によって異なるが、同じ細胞であっても接触する接着分子や細胞外基質の種類の違いに応じてその形態を迅速に変化させる。このことから、成長円錐は様々な脳内の環境因子と相互作用して刻々とその形態を変化させながら到達すべき標的細胞に導かれると考えられる。その場合、種々の環境因子による局所的な細胞内シグナル伝達の違いによって各々の特徴的な形態が作り出されると考えられている。

成長円錐は、突出したマイクロスパイク状の糸状足を活発に動かして周囲の環境を手探りするように感知する。例えば、反発性軸索ガイダンス分子として知られる Sema3A を被覆した微小ビーズが糸状足に接触すると、成長円錐はビーズを回避するように旋回したり、成長円錐全体が針状のように強く退縮(崩壊)して軸索伸長が停止する。一方、誘引性軸索ガイダンス分子であるネトリンを離れた場所から微量に与えると、成長円錐はそれを感受して投与された方向に向かって軸索を伸長させる。このように、成長円錐は感受した外界の脳内環境の情報を処理・決定し、細胞内の細胞骨格系を制御して自身の運動や形態を変化させる。

3. 軸索ガイダンス分子に対する反応性

軸索ガイダンス分子として知られる分子は、前述のように、ネトリン、スリット、エフリン、セマフォリンの4種に大別される。その中でもセマフォリンはエフリンと並んで最も多様な分子群で、20種あまりのセマフォリン分子が存在し、分泌型のセマフォリン 3A (Sema3A) は神経系のみならず、免疫系や骨格系などの他の器官系で多種多様の生理機能を示す。

神経回路形成において、これら軸索ガイダンス分子などの脳内環境因子による刺激によって成長円錐が正負の特異的な反応性を示すことが重要な素過程であることは疑いの

ない事実であるが、誘引性と反発性の環境因子に対して臨機応変に応答するためには、各々の反応性を ON-OFF 制御するような別の機構が存在するとより効率的である。事実、成長円錐内のカルシウムイオンやサイクリックヌクレオチドの濃度の違い、カルシウムイオンではその供給源の違いに応じて、同じ環境因子でも成長円錐の応答性が変化することが知られている。古くからよく知られた例としては、アフリカツメガエルの培養脊髄神経細胞の成長円錐において、細胞内の guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cGMP) は Sema3A による反発作用を誘引作用へと変換させる¹⁾。また、神経成長因子 (NGF) の濃度が増加すると Sema3A による反発作用 (成長円錐退縮応答) が減弱するが、この NGF 作用の修飾にはプロテインキナーゼ A が関わる²⁾。これらのことは、細胞内の cGMP や cAMP によって Sema3A シグナルが変化することを示す。このように、神経細胞の成長円錐に発現する種々の分子が環境因子に対する反応性の ON-OFF (強弱) 制御を行ったり、異なる反応に変換したりするような機構の存在が知られている。

4. 新たな軸索ガイダンス分子の探索

上述のように、4種に大別される軸索ガイダンス分子を代表格とした脳内環境因子が神経回路形成に重要であることは明らかな事実であるが、これらの軸索ガイダンス分子による誘引・反発作用だけで複雑緻密な神経回路形成がなされるのであろうか? 例えば、多数の軸索が束化して神経束を形成する機構やその生理的意義に関する知見は非常に少ない。そこで、筆者らはマウスにおける新たな神経回路形成因子を探索することを目的に、美しい神経束をなす嗅索 (lateral olfactory tract : LOT) の形成に関わる新規分子の探索を計画した。

嗅上皮で受け取った嗅覚情報は、大脳先端から突出した嗅球に位置する神経細胞を介して脳内に伝えられる。その嗅球神経細胞に発する軸索は終脳表層の限られた狭い領域を伸長し、LOT と呼ばれる神経束を形成する。LOT 形成をモデル実験系としたのは、LOT は脳表面からその形成状態を容易に観察することができること、終脳側面に真っすぐに伸びた神経束として形成される LOT は形成異常を評価することが簡単であること、そして器官培養下で嗅索形成を観察することができること³⁾が理由である。更には、マウスなどのげっ歯類にとって嗅覚情報は個体生存にとって非常に重要な感覚であることも考慮した。器官培養下では、LOT の形成時に実験的な操作を行うことができるため、まさにオンタイムでの人為的な操作と解析ができるという大きな利点がある。前述したように、神経細胞が成長円錐で脳内環境を感知しながら軸索を伸長させる時間と場所において、軸索ガイダンスを担う重要な分子の機能が発

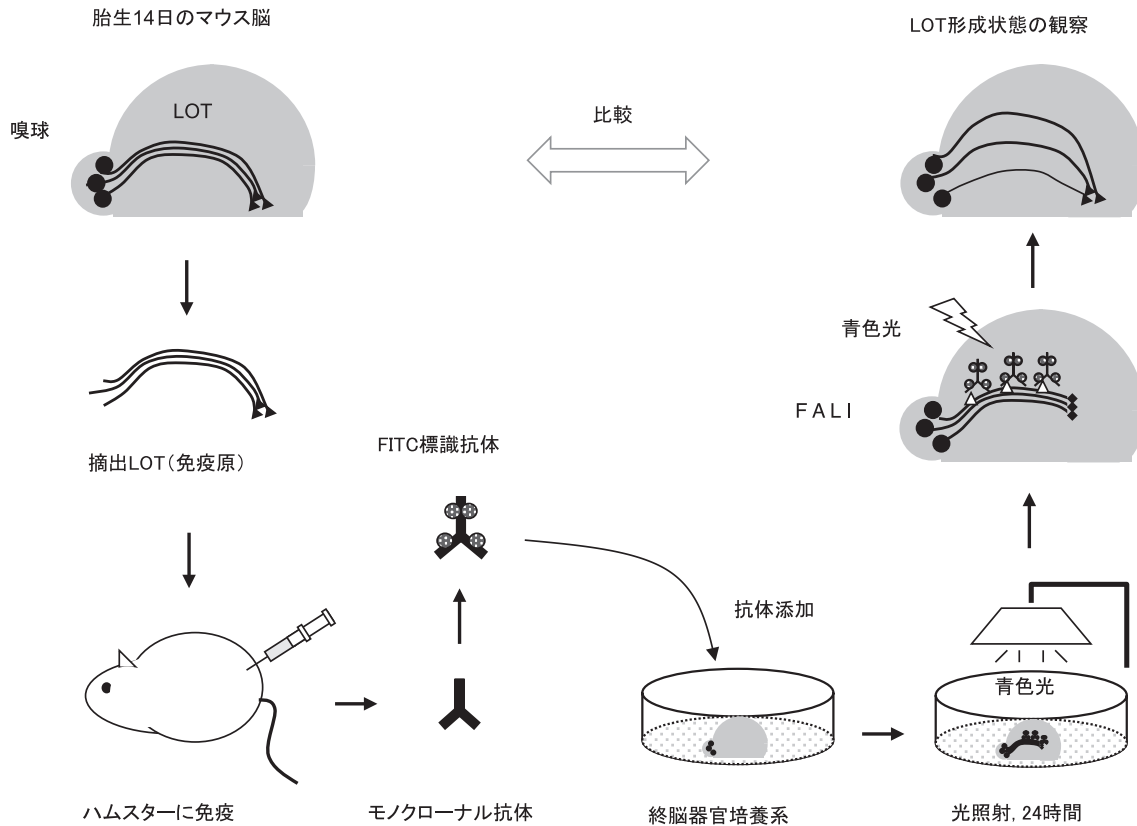


図2 嗅索 (LOT) 形成因子の機能的スクリーニング

嗅索 (LOT) を抗原として網羅的に作製したモノクローナル抗体から細胞表面抗原をエピトープにする抗体を選別した後、FITC色素を標識して胎生期12日目のマウス終脳の器官培養系に添加して24時間青色光を照射する。FITC色素標識した抗体が認識する特定分子をFALI法によって機能阻害した時のLOT形成状態を観察し、当該抗原分子の機能的関与を検討する。

揮されるはずである。したがって、軸索ガイダンスが起こっている場所と時間で機能分子を探索することを目的に、LOT形成時に網羅的に機能分子を探索・同定する特殊な方法を考案した(図2)。最初に、形成されたばかりのマウスのLOTを抽出してタンパク質溶液とした後、これを抗原として異種動物であるハムスターに免疫し、LOTに含まれる様々な分子に対するモノクローナル抗体を網羅的に作製した。前述したように、脳内環境因子との分子間相互作用によって軸索ガイダンスが行われるので、得られた抗体の中から、LOT(嗅球神経細胞の軸索)の細胞表面上に発現する分子に対する抗体を免疫組織化学的手法で選別した。次に、器官培養下に抗体を添加してLOT形成に異常を起こすものをスクリーニングした。添加した抗体が認識する分子の機能を阻害するような機能阻害抗体(中和抗体)であれば、抗体の影響でLOT形成に異常を来すことが期待される。我々の共同研究者は、この方法で膜タンパク質M6aがLOT形成に関わる機能分子であることを見いだした⁹⁾。しかしながら、機能阻害しない抗体の場合、この方法で目的の分子を見いだすことはできないため、機能阻害しない(特異的に結合するだけの)抗体を

機能阻害抗体に変換させる技術、光照射分子不活性化法(fluorophore-assisted light inactivation: FALI法)を導入した(図3)。

蛍光色素FITC (fluorescein isothiocyanate) は、490 nm波長の励起光を吸収すると活性酸素(一重項酸素)を発生させることが知られている。FALI法は、FITC標識抗体が抗原抗体反応によって抗原と結合した状態で励起光照射を受けると、抗体に標識されたFITC色素から発生した活性酸素の強い酸化反応によって、最も近傍(一重項酸素がその半減期の中に拡散する距離: 約40 Å)内にある抗原分子に構造変化が生じ、その結果、抗原分子の機能を阻害させるといった技術である(図3)。したがって、FALI法では、単に結合するだけでは抗原の機能を阻害しない抗体でも、抗原分子を機能阻害することができる^{5,6)}。我々は、FITC励起用フィルターを挿入したメタルハライドライトの光ファイバー光源装置に平面ライトガイドを連結させて、6ウェルプレートに最大2,000ルクスの490 nm波長の青色光をムラなく均一に照射するシステムを作製した。この6ウェルプレート内に胎生期12日目のマウス終脳半球を丸ごと器官培養し、FITC色素を標識したLOTの細胞

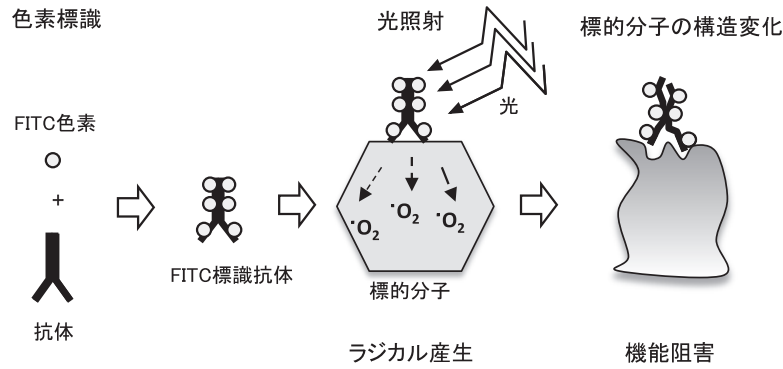


図3 FALI法の原理
 抗体に FITC 色素を化学的に標識し、抗原抗体反応で標的分子に標識抗体が結合している状態に波長 490 nm の青色光を照射すると励起された色素団から一重項酸素 (活性酸素) が発生し、ラジカルの強い酸化反応による影響 (約 40 Å以内) で標的分子の構造変化が誘起され、機能阻害を起こす。

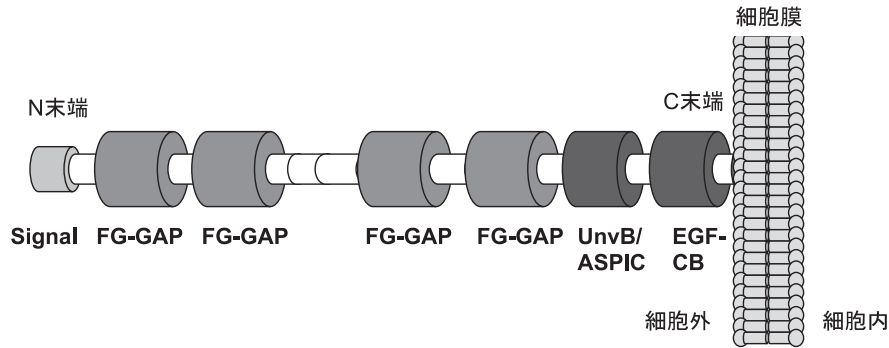


図4 膜タンパク質 LOTUS の1次構造

表面分子を抗原として作製されたモノクローナル抗体を添加して青色光を 24 時間照射し続ける実験系を構築した(図 2)。無論、光照射や非特異的 IgG に FITC 色素標識して光照射するコントロール実験では、器官培養下での LOT 形成には何ら影響を与えない実験条件の下で行う。LOT 形成が行われるオンタイムである特定のタンパク質 (LOT 表面上に発現する膜タンパク質など) を機能阻害した時、LOT 形成に何らかの異常が生じれば、添加した抗体の抗原は LOT 形成に必要な機能分子であると推測される。このような FALI 法を用いた機能的スクリーニングを行い、機能分子を認識するモノクローナル抗体を選別する。その後、嗅球の発現 cDNA ライブラリーによって当該抗原分子を同定し、LOT 形成因子を同定することを試みた (図 2)。

5. 新規神経回路形成因子 LOTUS の発見

網羅的に作製されたモノクローナル抗体を用いて上記の機能的スクリーニング法で LOT 形成の異常表現型を探索する中、LOT を構成する軸索が正常よりも広い範囲を伸長し、LOT の神経束がバラバラになるといった脱束化状態を引き起こすモノクローナル抗体 (H24G11 mAb) を見

いだした。この抗体による免疫染色の結果、抗原分子はマウス終脳の LOT や培養嗅球神経細胞の軸索上に発現していたので、嗅球の発現 cDNA ライブラリーから、発現させると株細胞に抗体が結合する cDNA クローンをスクリーニングして抗原遺伝子 cartilage acidic protein-1B (Crtac-1B) を同定した。この分子は、軟骨前駆細胞のマーカー分子として報告⁷⁾がなされていた Crtac-1 のスプライシングバリエーションであったが、その生理機能は全く不明だった。更に、マウスでは Crtac-1B のみが発現するといった特異性があった⁷⁾、マウスの Crtac-1B が中枢神経系のみで発現するといった特徴があったため⁸⁾、筆者らはマウスの Crtac-1B を Lateral Olfactory Tract Usher Substance (LOTUS) と名付けた。LOTUS は N 末端にシグナルペプチドを有し、C 末端に膜貫通領域と思われる疎水性領域を有する膜タンパク質で、細胞内領域はほとんど存在しない分子であった (図 4)。in situ hybridization 法によって LOTUS の mRNA の発現領域を調べると、胎生期 16 日目の胎仔では、嗅球、大脳皮質、海馬、視床、視床下部、脊髄などに高発現していた。成体においてもその発現パターンは基本的に同様であった。次に、理化学研究所発生・再生科学総合研究センターとの共同研究で LOTUS 遺伝子欠損

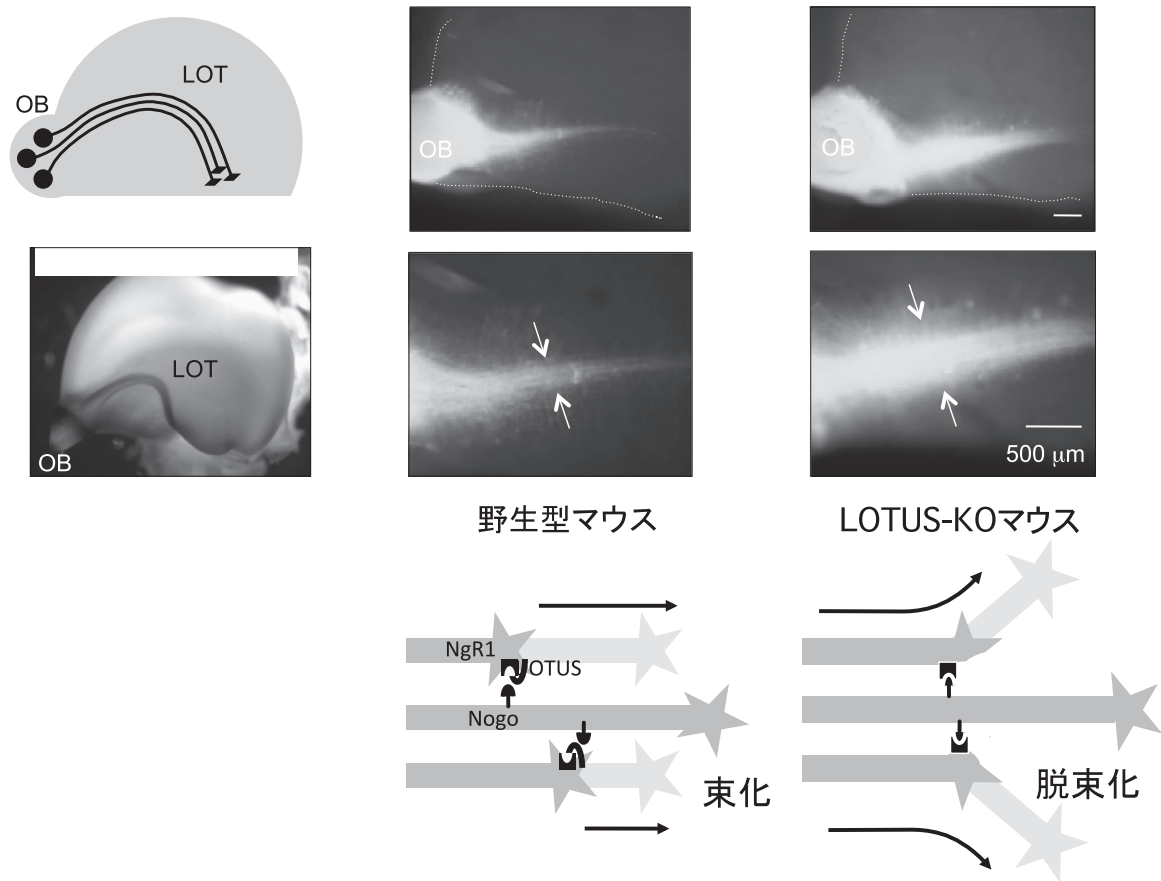


図5 LOTUS-KO マウスにおける LOT 神経束の脱束化

左図：マウス胎生期 14 日目の脳外側面を示す。吻側に突出した脳領域が嗅球 (olfactory bulb: OB) で、嗅索 (LOT) は OB に存在する嗅球神経細胞の軸索束である。LOT 特異的なマーカー分子 Neuropilin-1 で免疫染色した像を示す。右パネル：野生型および LOTUS-KO マウスの OB に蛍光色素 DiI を注入して LOT を可視化した蛍光染色像。下段は上段の拡大写真。LOTUS-KO マウスの LOT は野生型に比して軸索が脱束化し走行領域の幅が広がっていた (矢印)。下図：野生型マウスにおける LOT 神経束の束化および LOTUS-KO マウスにおける LOT 神経束の脱束化現象の概念図。LOTUS-KO マウスでは、LOT 上に発現する Nogo が Nogo 受容体 (NgR1) に結合し、Nogo による反発性シグナルによって脱束化が生じる。野生型では、NgR1 のアンタゴニストである LOTUS が発現して NgR1 に結合しているため、Nogo は NgR1 に結合できずに束化が起こらずに束化する。

(LOTUS-KO) マウスを作製した。LOTUS-KO マウスの LOT に H24G11 mAb が結合しないことも確認した。LOT は、マウス胎生期 12~14 日に初期の神経束が形成され、その後に軸索数を増加しながら軸索側枝を付加して胎生期 18 日目頃に完成する。LOT が完成した胎生期 18 日目の LOTUS-KO マウスの嗅球に蛍光色素 DiI を注入して LOT を可視化して観察したところ、機能的スクリーニングで見いだされた表現型と類似の脱束化した LOT が観察された (図 5)。このことは、我々が開発した機能的スクリーニングで見られた表現型の妥当性を示唆し、同時に我々の開発した機能的スクリーニング法の有効性が示された。

6. LOTUS の結合分子の同定

LOTUS は、その一次構造から細胞内領域を有しない膜タンパク質であると推察されたので、LOTUS が生理機能

を發揮するには細胞外で相互作用する結合分子が存在すると予想し、そのような分子の同定を試みた。最初に LOTUS 結合分子の発現部位を検討するため、C 末端の膜貫通領域を除いた LOTUS と N 末端側にアルカリホスファターゼ (AP) を融合させた融合タンパク質 (AP-LOTUS) を作製し、器官培養した終脳と反応させて AP の酵素活性を指標に結合領域を検討した。AP-LOTUS は終脳表面の LOT に特に強く結合したので、LOTUS 結合分子は LOT に発現している膜分子であると考えられた。そこで、再び嗅球の発現 cDNA ライブラリーの中から、発現させると株細胞に AP-LOTUS が結合する cDNA クローンをスクリーニングした結果、LOTUS 結合分子として Nogo receptor-1 (NgR1) を同定した。LOTUS と NgR1 の結合は免疫沈降実験によっても生化学的に確かめられた。AP-LOTUS は NgR1 遺伝子欠損 (NgR1-KO) マウスの LOT に

結合しないことから、LOT上でLOTUSと結合する分子はNgR1だけであると考えられた。更に、LOTUSとNgR1は同じLOTの軸索上および軸索先端の成長円錐上に発現していることが免疫染色によって確かめられた。

7. LOTUSの細胞機能

LOTUS結合分子であるNgR1は、髄鞘由来の軸索伸長阻害因子として知られるNogo, myelin-associated glycoprotein (MAG), oligodendrocyte myelin glycoprotein (Omgp), およびBリンパ球の分化や炎症反応に関連するB lymphocyte stimulator (BLys)に共通する受容体で、これら4種のリガンド分子とNgR1の結合はいずれも細胞骨格系に作用して成長円錐の構造を崩壊させる(成長円錐の崩壊)。すなわち、NgR1のリガンド分子はどれも軸索伸長を強く阻害することが知られている⁹⁻¹³⁾。NgR1のリガンドであるNogoがLOTに発現していることが報告されていたので¹⁴⁾、LOTUS結合分子として同定されたNgR1がLOTに発現していたことに驚きを隠せなかった。というのも、軸索伸長阻害に働くシグナルのリガンド(Nogo)と受容体(NgR1)の双方の発現が見られるLOTが、どうしてこれらの分子間相互作用による軸索伸長阻害作用の影響を受けることなく正常にLOT形成がなされるのか?という素朴な疑問が生じたからである。そこで、Nogo, NgR1, LOTUS三者の生理的な関係について検討するため、受容体NgR1を発現させた株細胞(COS7細胞)に対してAPを融合したNogo-66(軸索伸長阻害活性を有するNogoの66アミノ酸領域)を作用させてAP-Nogo-66とNgR1のリガンド・受容体結合度をAP活性測定によって正確に定量化する実験系を構築した。NgR1だけを発現する株細胞で見られるAP-Nogo-66結合は、NgR1とLOTUSを共発現させた株細胞ではほとんど検出されないことが判明した。すなわち、LOTUSとNgR1が同一細胞上で結合すると、NgR1のリガンドであるNogoがNgR1にほとんど結合しないことが明らかになった。更には、LOTUSを発現する野生型マウスの培養嗅球神経細胞から伸長する軸索の成長円錐ではNogo-66に対して退縮反応が見られないのに対し、LOTUS-KOマウスの成長円錐は退縮反応を示した。次に、LOTUSを発現していない鶏卵胚の培養後根神経節細胞の軸索はNogoに対する成長円錐崩壊や軸索伸長阻害を示すのに対し、LOTUSを強制発現させた軸索に限ってそのような細胞応答は見られなかった。これらの実験結果から、同一細胞上でのLOTUSとNgR1との結合は、NgR1のリガンド分子Nogoとその受容体NgR1との結合をほぼ完全に阻害してNogo-NgR1結合で誘起される成長円錐崩壊や軸索伸長阻害を強く抑制することが明らかになった。このことから、LOTUSは内在性のNgR1に対する拮抗物質(アンタゴニスト)であると結論された。

次に、筆者らはLOTUSの機能ドメインを同定した。LOTUSはN末端側からシグナルドメイン、四つのFG-GAPドメイン、UnvB/ASPICドメイン、EGF-calcium binding (EGF-CB)ドメインから構成される膜タンパク質である(図4)。各ドメイン欠失変異体を作製してNgR1との結合を調べたところ、C末端側のUnvB/ASPICドメインとEGF-CBドメインが各々単独で結合領域として同定された。これら2種のドメインを有するUnvB/ASPIC・EGF-CBドメインは全長LOTUSよりも強くNgR1と結合した。そこで、このUnvB/ASPIC・EGF-CBドメインとNgR1をCOS7細胞に共発現してNogo-66のNgR1に対する結合能を検討すると、全長LOTUSと全く同様に完全な拮抗作用を示し、更にはこのドメインだけをLOTUSの発現がない鶏卵胚後根神経節細胞に強制発現させるとNogoによる成長円錐崩壊が完全に抑制された。これらのことから、C末端側のUnvB/ASPICドメインとEGF-CBドメインがNgR1に対する拮抗作用を示す機能ドメインであると結論した¹⁵⁾。

8. LOT形成におけるLOTUSの機能

LOTUS-KOマウスのLOTは神経束がバラバラになる脱束化を示した(図5)。これは、LOTの軸索がNgR1を発現しており、LOT内でその周囲の軸索上に発現するNogoによる伸長阻害シグナルがLOTUSの欠損によって受容されるようになったため、周囲の軸索を避ける方向(本来の軸索の東の外側)に伸長して神経束がバラバラになったものと考えられた。その傍証の一つとして、LOTUS-KOマウスの脳標本にAP-Nogoをふりかけて結合活性を見ると、野生型では見られなかった結合が観察された。また、マウスの嗅球の細胞塊を培養すると、野生型では嗅球神経細胞の軸索は東化しながら伸長する様子が観察されるが、LOTUS-KOマウスの嗅球神経細胞の軸索では東化が減少してバラバラになって(脱束化して)軸索が伸長した。そして、その条件下でNogo-66を添加すると成長円錐崩壊が起こって軸索伸長が停止した。これらのことから、Nogoのような軸索伸長阻害因子が周囲に多く存在すると成長円錐崩壊が起こって軸索はどの方向にも伸長できないが、阻害因子が局在しているような場合はそれを避けるように伸長する。すなわち、LOTUS-KOマウスでは、LOTの軸索上にNogoが局在するため、LOTUSが欠損してNogoの作用を受けるようになると、その反応に応じて軸索同士が反発的に回避するような軸索伸長が起こった結果、LOTの脱束化が生じたと考えられた。ところが、NgR1-KOマウスではLOT形成はほぼ正常であった。これはNgR1が欠損するためにNogoの伸長阻害シグナルが受容されないためであろう。これらの考え方を証明するため、LOTUSとNgR1の二重欠損マウス(ダブル-KOマウ

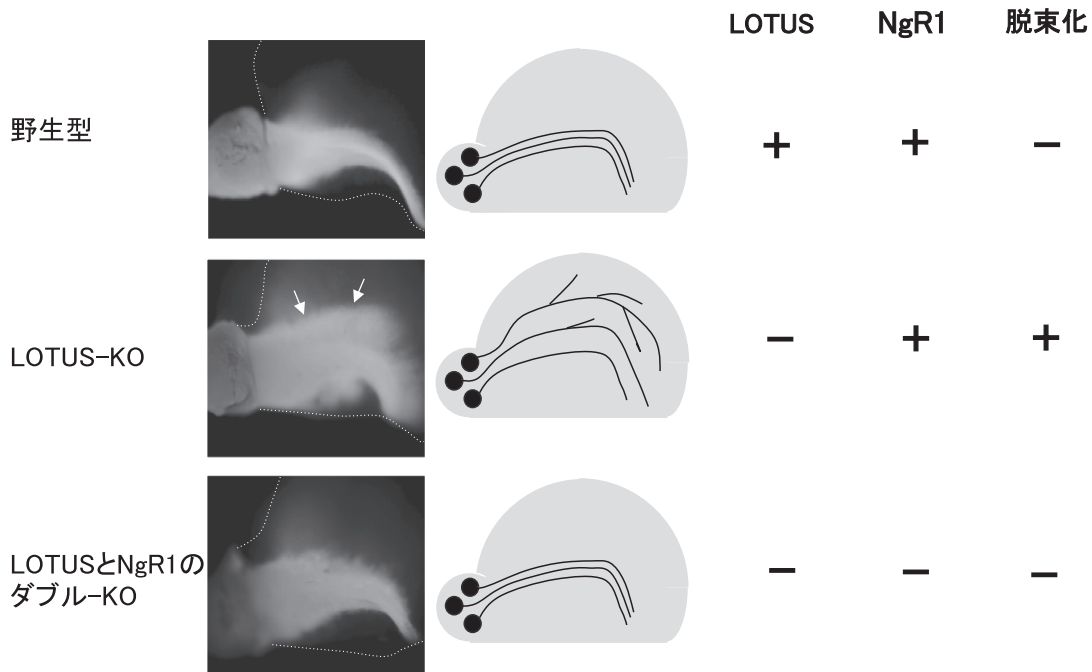


図6 *lotus/ngr1* ダブル-KO マウスの LOT

左パネルは図5と同様の嗅球に DiI 色素を注入して LOT を可視化した蛍光染色像を示す。LOTUS-KO マウスでは、図5と同様に野生型マウスに比して LOT の神経束が脱東化して走行幅が広がっていたが、*lotus/ngr1* 遺伝子の両方を欠損させたダブル-KO マウスでは野生型とほぼ同程度まで脱東化が回復していた。これは、LOTUS は Nogo-NgR1 を介した作用による LOT の脱東化を抑制することを示している。

ス) を作製して同様に解析したところ、LOTUS-KO で見られた LOT の脱東化はほぼ正常に近いレベルまでレスキューされていた (図6)。これらの結果は、LOTUS は、LOT 上で NgR1 が結合することで NgR1 と Nogo との結合を抑制して (Nogo による NgR1 を介した軸索伸長阻害シグナルを抑制して) LOT 形成に寄与していると考えられ、前述の考えを支持する (図6)。

以上より、筆者らは神経再生を阻む主要因と考えられている Nogo-NgR1 分子間相互作用を LOTUS によって抑制することで、LOT の神経束形成に寄与することを明らかにした¹⁶⁾。これは、成体において神経再生を阻む作用をマスクすることで発生時の神経回路形成を実現させていると考えられ、今までにない新しい神経回路形成機構であると考えられた。しかし、なぜ、神経再生を阻む機構が神経回路形成時に存在するのであろうか？ 筆者らは、Nogo-NgR1 分子間相互作用はむしろ神経回路形成機構において必要な作用の一つではないかと考えている。というのも、LOT の神経束が形成された後、神経束から軸索側枝が多数神経束の外側に向けて伸長して投射路を形成するが、LOTUS-KO マウスでは野生型に比して軸索側枝が有意に増加するからである (未発表)。LOTUS の発現変動はこの分子間相互作用の ON・OFF 制御を可能にするため、LOT の神経束形成においては OFF 制御を行い、その後起こる軸索側枝形成には ON 制御を行うのではないかと想定し、現在解

析を進めている。

9. LOTUS の神経再生への応用

哺乳類の中枢神経系は、外傷、脊髄損傷、脳虚血などによって神経回路が破壊されてそれによる神経症状を呈するようになると、神経症状の回復は極めて困難である。この理由として、哺乳類の中枢神経系には破壊された神経回路を再生・修復することを阻む機構が存在することが考えられている。中枢神経の軸索鞘 (ミエリン) を形成するオリゴデンドロサイトには、2回膜貫通型の Nogo、免疫グロブリンのスーパーファミリーに属する MAG、そして GPI アンカー型の *Omgp* といった3種の膜タンパク質が存在し、これらが軸索再生阻害因子であることが知られている⁹⁻¹²⁾。構造が異なるこれら3種のミエリンタンパク質は、どれも神経細胞上に発現する NgR1 を共通の受容体として結合する。NgR1 は p75 受容体と Lingo-1 を共受容体とした複合体を形成し、p75 受容体から生じる細胞内シグナル伝達系で神経突起伸長を強く阻害する^{17,18)}。これらのリガンドが NgR1 に結合すると、p75 受容体は small GTPase の一種である RhoA を活性化し、次に活性化 RhoA は Rho キナーゼを活性化してアクチンやミオシン、またはチューブリンを制御して軸索伸長を阻害する。Rho や Rho キナーゼの阻害剤は、この軸索伸長阻害作用を抑制することができ、神経再生促進作用に奏功する¹⁷⁾。しかしながら、Rho

や Rho キナーゼの作用が神経回路形成に必要な局面も存在するため、一概に再生治療への応用を考えるには難しい点がある。

前述のように、神経回路形成時においては LOTUS による Nogo-NgR1 分子間相互作用の抑制が神経束形成に寄与した。脊髄損傷などの神経損傷モデル動物において NgR1 の機能抑制が神経再生を向上させる報告が数多くなされていることから¹⁹⁻²³⁾、NgR1 に対する拮抗作用を有する LOTUS は神経再生の促進に奏功する可能性がある。最近、Nogo 以外の NgR1 のリガンド分子 (MAG, Omgp, BLYS) による軸索伸長抑制作用に対する LOTUS の作用を検討したところ、LOTUS は Nogo を含めた全ての NgR1 リガンド分子に対して強い拮抗作用を示し、強力なアンタゴニストであることが判明した (未発表)。これらのことから、LOTUS の拮抗作用を利用した神経再生治療の創成が期待される。

10. おわりに

神経回路形成の各々の素過程における分子機構においては、まだ未解明の部分が数多く残されている。失われた神経機能の再建 (神経再生) には、発生時に起こる神経回路形成の過程を忠実に再現する必要がある。しかし、神経再生における軸索ガイダンス現象では、発生時における脳内環境とは異なる環境因子との相互作用を考慮する必要があり、成体における脳内環境や、損傷や病態における脳内環境で再生軸索が遭遇する環境因子との相互作用を詳しく解析しなければならない。失われた神経細胞は、幹細胞生物学の進展によって iPS 細胞や ES 細胞などによる補填が現実的になってきた。その補填の後に実現させなければならない素過程 (軸索伸長, 軸索ガイダンス, シナプス形成) の分子機構について、発生時の脳内環境のみならず、成体や損傷・病態における脳内環境下で更に攻究する必要がある。これら双方の研究進展によって神経再生医療の基盤が構築されると思われる。

尚、本稿で紹介した筆者らの研究は、横浜市立大学大学院医学研究科分子薬理神経生物学教室の五嶋良郎教授らの協力の下で行われた。この紙面を借りて深謝申し上げたい。

文 献

1) Song, H.-J., Ming, G.-L., He, Z., Lehmann, M., McKerracher,

- L., Tessier-Lavigne, M., & Poo, M.-M. (1998) *Science*, 281, 1515-1518.
- 2) Dontchev, V.D. & Letourneau, P.C. (2002) *J. Neurosci.*, 22, 6659-6669.
- 3) Sugisaki, N., Hirata, T., Naruse, I., Kawakami, A., Kitsukawa, T., & Fujisawa, H. (1996) *J. Neurobiol.*, 29, 127-137.
- 4) Sato, Y., Mita, S., Fukushima, N., Fujisawa, H., Saga, Y., & Hirata, T. (2011) *Dev. Neurobiol.*, 71, 733-746.
- 5) Surrey, T., Elowitz, M.B., Wolf, P.-E., Yang, F., Nedelec, F., Shokat, K., & Leibler, S. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 4293-4298.
- 6) Beck, S., Sakurai, T., Eustace, B.K. Beste, G., Schier, R., Rudent, F., & Jay, D.G. (2002) *Proteomics*, 2, 247-255.
- 7) Steck, E., Benz, K., Lorenz, H., Loew, M., Gress, T., & Richter, W. (2001) *Biochem. J.*, 353, 169-174.
- 8) Steck, E., Bräun, J., Pelttari, K., Kadel, S., Kalbacher, H., & Richter, W. (2007) *Matrix Biol.*, 26, 30-41.
- 9) Fournier, A.E., GrandPré, T., & Strittmatter, S.M. (2001) *Nature*, 409, 341-346.
- 10) Liu, B.P., Fournier, A.E., GrandPré, T., & Strittmatter, S.M. (2002) *Science*, 297, 1190-1193.
- 11) Yiu, G. & He, Z. (2006) *Nat. Rev. Neurosci.*, 7, 617-627.
- 12) Wang, K.C., Koprivica, V., Kim, J.A., Sivasankaran, R., Guo, Y., Neve, R.L., & He, Z. (2002) *Nature*, 417, 941-944.
- 13) Zhang, L., Zheng, S., Wu, H., Wu, Y., Liu, S., Fan, M., & Zhang, J. (2009) *J. Neurosci.*, 29, 6348-6352.
- 14) Tozaki, H., Kawasaki, T., Takagi, Y., & Hirata, T. (2002) *Mol. Brain Res.*, 104, 111-119.
- 15) Kurihara, Y., Arie, Y., Iketani, M., Nishiyama, K., Sato, Y., Nakamura, F., Mizuki, N., Goshima, Y., & Takei, K. (2012) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 418, 390-395.
- 16) Sato, Y., Iketani, M., Kurihara, Y., Yamaguchi, M., Yamashita, N., Nakamura, F., Arie, Y., Kawasaki, T., Hirata, T., Abe, T., Kiyonari, H., Strittmatter, S.M., Goshima, Y., & Takei, K. (2011) *Science*, 333, 769-773.
- 17) Yamashita, T., Higuchi, H., & Tohyama, M. (2002) *J. Cell Biol.*, 157, 565-570.
- 18) Yamashita, T. & Tohyama, M. (2003) *Nat. Neurosci.*, 6, 461-467.
- 19) GrandPré, T., Li, S., & Strittmatter, S.M. (2002) *Nature*, 417, 547-551.
- 20) Kim, J.-E., Liu, B.P., Park, J.H., & Strittmatter, S.M. (2004) *Neuron*, 44, 439-451.
- 21) Li, S., Liu, B.P., Budel, S., Li, M., Ji, B., Walus, L., Li, W., Jink, A., Rabacchi, S., Choi, E., Worley, D., Sah, D.W.Y., Pepinsky, B., Lee, D., Relton, J., & Strittmatter, S.M. (2004) *J. Neurosci.*, 24, 10511-10520.
- 22) Freund, P., Schmidlin, E., Wannier, T., Bloh, J., Mir, A., Schwab, M.E., & Rouiler, E.M. (2006) *Nat. Med.*, 12, 790-792.
- 23) Cafferty, W.B., Duffy, P., Huebner, E., & Strittmatter, S.M. (2010) *J. Neurosci.*, 30, 6825-6837.