

# 神経切断が誘導する一過的異分化による軸索再生制御

名古屋大学大学院理学研究科生体機序論研究室

久本 直毅

## 1. 背景

神経細胞は軸索と呼ばれる長い神経繊維を介して神経シグナルを伝達している。外傷や手術によって軸索が切断されると、半身不随や麻痺などの運動障害や感覚障害が生じることがあり、そしてそれがしばしば治療不能であることは人口に膾炙した事実である。そのような切断を受けた軸索を修復し、機能的な状態にまで回復させる方法の探索は、患者の苦痛を緩和するだけでなく、介助削減や患者の社会復帰を通じて公共に益するものであり、社会的にも喫緊の課題と言える。

神経細胞は、基本的に切断された軸索を修復・再生する能力を持っている<sup>1</sup>。切断を受けた軸索は、まずその切断部の先端が速やかに退縮して短くなる。その後、退縮した軸索先端が成長円錐を形成して伸長し、標的となる細胞に再び到達することにより機能的な軸索を再形成する。これまでの培養細胞を用いた解析から、軸索再生の制御系は「切断を受けた神経の内在性シグナル」と、「神経外部からのシグナル」の2種類あることが示唆されており、それに関わる因子も複数同定されている。しかし、培養細胞を用いた解析系は *in vivo* での神経切断・再生過程を忠実に反映しているとは言えないため、本当に関与するかどうか知るためには個体レベルでの検討が必要となる。しかし、哺乳動物個体での軸索再生の解析は高度な技術と経験が必要であり、しかも手間と時間が掛かるため、実際にそこまで解析できている因子はごく僅かである<sup>2-5</sup>。

神経軸索再生は、無脊椎動物からヒトまで種を越えて普遍的に観察される現象である<sup>6,7</sup>。最近、我々は線虫 *C. elegans* の JNK 型 MAP キナーゼ経路 (JNK 経路) が、個体レベルで軸索再生を正に制御することを報告した<sup>8</sup>。最近、哺乳動物個体でも JNK 経路が軸索再生を制御することが報告され、軸索再生における本経路の種を越えた重要性が明らかになった<sup>9</sup>。更に我々は、遺伝学を絡めた独自の RNA 干渉スクリーニングにより、軸索再生制御因子の候補 (SVH 遺伝子) を網羅的に同定し、その機能についての解析を行い、成果として複数の論文を発表している<sup>10-15</sup>。

セロトニンは神経伝達物質またはホルモンとして働く低分子物質であり、精神の安定や食欲、生体リズムなどを制御しているが、神経軸索再生における役割についてはよくわかっていない。最近、Chen らは線虫の 654 個の変異体における PLM 神経の神経軸索再生を網羅的に検討することにより、再生が低下する変異体のひとつとして、トリプトファンからセロトニンの前駆体を生成する酵素 (トリプトファンヒドロキシラーゼ) をコードする *tph-1* 遺伝子の変異体を同定している<sup>16</sup>。しかしそれ以上の解析は全くなされておらず、本当に神経軸索再生においてセロトニンが関与しているのか、またその作用点や下流の経路はどのようなものなのか、詳細は不明のままであった。そこで我々は、セロトニンによる神経軸索再生制御の可能性について検討した。

## 2. 方法

線虫 *C. elegans* の変異体を適宜用いて、神経軸索再生に関わる因子の探索を行い、それがセロトニン産生およびその下流で働くかどうかについて遺伝学的に検証した。また、抗セロトニン抗体を用いた蛍光染色により、セロトニン産生の有無について検討した。さらにセロトニン合成酵素等のプロモーター活性について GFP を用いたレポーター遺伝子により検討した。DNA 操作や線虫の操作を含む他の実験手法についてはほぼ既存の方法を踏襲した<sup>17</sup>。

## 3. 研究成果

まず、*tph-1* 変異体における神経軸索再生の低下が PLM 神経以外でも起こるのか、運動神経である D 型運動神経を用いて検討した。その結果、*tph-1* 遺伝子欠損変異体では D 型運動神経においても軸索再生率の有意な低下が認められた<sup>17</sup>。またその低下は培地にセロトニンを添加することで有意に抑圧された。セロトニンはトリプトファンから 2 段階の酵素反応により合成され、TPH-1 はその 1 段階目を担うが、2 段階目は芳香族 L-アミノ酸デカルボキシラーゼ BAS-1 が担うことがわかっている<sup>18</sup>。さらに合成されたセロトニンはモノアミントランスポーター CAT-1 により輸送小胞に蓄積された後に分泌される<sup>19</sup>。そこでこれらの変異体においても神経軸索再生への関与を検討したところ、いずれも再生率が低下し、さらにその低下がセロトニンの培地添加によりいずれも抑圧された。よってセロトニンの合成と分泌が神経軸索再生の効率的な再生に必要であることが示唆された。

一般的に、分化した神経はその種類により産生する神経伝達物質がそれぞれ決まっており、セロ

トニン(セロトニン)はセロトニン産生神経と呼ばれる特定の神経で産生される<sup>20</sup>。線虫ではセロトニンはADF、NSMおよびHSNの3種類の神経で産生されることが報告されていることから<sup>21</sup>、これらのうちどの細胞で産生されるセロトニンが重要なのか、Cre-loxPを用いたそれぞれの細胞特異的な *tph-1* ノックアウト実験および細胞特異的プロモーターによるレスキュー実験を行った<sup>17</sup>。しかし、それらのうちどの神経細胞も軸索再生には関係ないという結果を得た。さらに驚いたことに、当初ネガティブコントロールとして行った、切断神経であるD型運動神経でのノックアウトおよびレスキュー実験により、*tph-1* が本来GABA産生性でありセロトニン産生神経でないはずのD型運動神経で機能するという結果を得た。このことは、本来セロトニン以外の神経伝達物質を産生するように分化していたはずの神経が、神経切断によりセロトニン産生細胞へと「異分化」する可能性を示唆している。そこでまず、切断神経が本当にセロトニンを産生しているのか、抗セロトニン抗体を用いた免疫蛍光染色により検討した。軸索を切断していない線虫では、セロトニンはADF、NSMおよびHSN神経でしか染色されない。しかし、D型運動神経の軸索を切断して検証したところ、切断後30分後に切断神経においてセロトニンの存在が認められた。また、グルタミン酸産生性であるがセロトニン産生性でないPLM感覚神経の軸索を切断した場合にも、切断後30分後に切断神経において同様にセロトニンの存在が認められた。これらのことから、神経軸索を切断された神経はセロトニンを含むようになることが示唆された。このセロトニンが、本当に切断神経が「異分化」することで産生されたものかどうか確認するために、セロトニン産生酵素の一つである *tph-1* のプロモーターの下流にGFPをつないだものを作成し、GFPの発現が切断神経細胞で起こるかどうか確認することで、切断神経が本当にセロトニン産生神経化したかどうかについて検討した。その結果、D型運動神経とPLM神経の両方において、切断後30分で切断神経においてGFPの発現が認められた。またその発現は3時間後には見られなくなったことから、確かに切断神経がセロトニン産生神経化すること、しかもそれが一過的であることが明らかになった。同様に、*cat-1* 遺伝子についても非セロトニン産生性神経での切断による一過的発現が観察されたことから、セロトニン産生・分泌に関わる一連の因子が、軸索切断により一過的に発現誘導されることが示唆された。続いてこの発現誘導がどのような転写因子により制御されるかについて検討した。これまで行われた網羅的解析により神経軸索再生に関わるとされた転写因子群について<sup>16,22</sup>、*tph-1* の切断特異的な発現誘導を指標に検討したところ、低酸素誘導因子 *hif-1* 変異体において軸索切断による発現誘導が消失することを見出した<sup>17</sup>。このことから、神経切断による一過的なセロトニン産生神経への異分化はHIF-1依存的事であることが示唆された。

次に、セロトニンがどのように神経軸索再生を制御するのか、その下流因子について探索した。まず線虫にある複数のセロトニン受容体の欠損変異体を用いて検討したところ、5-HT<sub>7</sub> 受容体ホモログである SER-7 の欠損変異において再生率の顕著な低下が認められた。さらにその下流のシグナル伝達経路として、三量体 G タンパク質 GPA-12、RhoGEF ホモログ RHGF-1、RHOA ホモログ RHO-1 からなる経路が、ジアシルグリセロールキナーゼ DGK-1 を負に制御することでジアシルグリセロール (DAG) 量を増加させ、それにより活性化した PKC ホモログ TPA-1 が JNK 経路の MAPKKK である MLK-1 の活性化ドメイン内のセリンをリン酸化することで、神経軸索再生経路を活性化することが判明した。さらに、SER-7 は同時に三量体 G タンパク質 GSA-1 を介してアデニル酸シクラーゼホモログ ACY-1 を活性化して cAMP 経路を活性化することで、神経軸索再生を促進することも明らかとなった。ちなみにこれらの因子はいずれも切断神経で機能することが、各種変異体の細胞特異的レスキュー実験により確認された。以上の結果から、切断神経が HIF-1 依存的な方法で一過的に「異分化」することでセロトニンが産生・分泌され、それが切断神経自身に働きかけることで JNK 経路と cAMP 経路の両方を活性化することにより再生を促進することが示唆された。

#### 4. 考察

われわれの結果は、いったん非セロトニン産生神経に分化した神経が、軸索切断によりセロトニン産生神経に一過的に異分化することを示唆している。これまでは、通常の神経は一旦分化すると別の神経に変わることはほとんどなく、変わるとされた少数の事例でも、ある特定の神経が別の特定の神経に変わる場合に限られていた<sup>23</sup>。したがって複数の種類の神経において軸索切断がいずれもセロトニン化を誘導するという今回の知見は非常に新しく、興味深いものである。また、低酸素誘導因子と知られるHIF-1が関与していたことから、低酸素状態が神経軸索再生の過程において生じることが、その後の再生に重要な役割を果たす可能性も考えられる。HIF-1は低酸素によって安定化することで下流因子の転写誘導を行うことがこれまでにわかっている<sup>24</sup>。しかし、HIF-1を安定化させる変異導入やHIF-1分化酵素の欠損を行っても非セロトニン産生神経での *tph-1* 遺伝子発現が起こらなかったことから<sup>17</sup>、HIF-1安定化以外の別のシグナルも切断神経における発現誘導に必要と考えられるが、その詳細については今後の課題である。

セロトニン依存的な軸索再生促進経路の因子として今回発見された因子群は、ヒトを含む哺乳動物にも全て存在していることから、同様の経路がヒトにおいても機能する可能性が考えられる。したがって、ヒトにおける切断神経の再生においても、セロトニンの産生が重要な役割を果たしていることが期待される。

5. 発表論文、参考文献  
(発表論文)

Alam, T., Maruyama, H., Li, C., Pastuhov, S.I., Nix, P., Bastiani, M., Hisamoto, N.  
(co-corresponding author), Matsumoto, K.

Axotomy-induced HIF/serotonin signaling axis promotes axon regeneration in *C. elegans*.  
**Nature Commun. 7, 10388 (2016).**

本研究成果は、中日新聞で紹介された。

Pastuhov, S.I., Fujiki, K., Tsuge, A., Asai, K., Ishikawa, S., Hirose, K., Matsumoto, K.,  
Hisamoto, N.

The core molecular machinery used for engulfment of apoptotic cells regulates the JNK  
pathway mediating axon regeneration in *Caenorhabditis elegans*.

**J. Neurosci. 36, 9710–21 (2016).**

本研究成果は、科学新聞で紹介された。また AAAS, AlphaGalileo を含む複数の欧米サイエンスネ  
ットメディアでも紹介された。

Hisamoto, N., Nagamori, Y., Pastuhov, S.I., Matsumoto, K.

The *C. elegans* discoidin domain receptor DDR-2 modulates the Met-like RTK-JNK signaling  
pathway in axon regeneration.

**PLoS Genet. 12, e1006475 (2016).**

本研究成果は、科学新聞で紹介された。

Pastuhov, S.I., Matsumoto, K., Hisamoto, N.

Endocannabinoid signaling regulates regenerative axon navigation in *C. elegans* via the  
GPCRs NPR-19 and NPR-32.

**Genes Cells, 21, 696–705 (2016).**

Fukuzono, T., Pastuhov, S.I., Fukushima, O., Li, C., Hattori, A., Iemura, S., Natsume, T.,  
Shibuya, H., Hanafusa, H., Matsumoto, K., Hisamoto, N.

The chaperone complex BAG2- HSC70 regulates localization of *C. elegans* Leucine-rich repeat  
kinase LRK-1 in the Golgi.

**Genes Cells, 21, 311–324 (2016).**

(参考文献)

1. Liu K, et al : Annu. Rev. Neurosci. 34, 131–152 (2011).
2. 山下俊英 : 脳 21 14, 108–113 (2011).
3. Lee JK & Zheng B : Exp. Neurol. 235, 33–42 (2012).
4. Neumann S & Woolf CJ : Neuron 23, 83–91 (1999).
5. Nikulina E, et al : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 8786–8790 (2004).
6. Yanik MF, et al : Nature 432, 822 (2004).
7. Bradke F et al., Nat. Rev. Neurosci. 13: 183–193 (2012).
8. Nix P, et al : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108, 10738–10743 (2011).
9. Tu NH et al : Eur. J. Neurosci. 48, 548–560 (2016)
10. Li C, et al : Nat. Neurosci. 15, 551–557 (2012).
11. Pastuhov SI, et al : Nat. Commun. 3, e1136 (2012).
12. Hisamoto N, et al : Cell rep. 9, 1628–1634 (2014).
13. Li C, et al : PLoS Genet. 11, e1005603 (2015).
14. Hisamoto N, et al : PLoS Genet. 12, e1006475 (2016).
15. Pastuhov SI et al., J. Neurosci. 36, 9710–9721 (2016).
16. Chen L et al : Neuron 71, 1043–1057 (2011).
17. Alam T, et al : Nat. Commun. 7, 10388 (2016).
18. Hare EE et al : BMC Evol. Biol. 4, 24 (2004).
19. Duerr JS et al : J. Neurosci. 13, 5407–5417 (1993).
20. Burnstock G. : Curr. Opin. Pharmacol. 4, 47–52 (2004).
21. Sze et al : Nature 403, 560–564 (2000).
22. Nix et al : J. Neurosci. 34, 629–645 (2014).
23. Spitzer NC : Neuron 86, 1131–1144 (2015).
24. Epstein ACR et al : Cell 107, 43–64 (2001).