

神経個性化ラボ

(Newt Lab.)

研究項目：神経細胞の個性化と機能獲得メカニズムの研究

研究期間：平成9年度～平成13年度

1. 当該研究の背景

中枢神経系は、外傷・変性疾患・虚血等によりひとたび損傷を受けると再生できず、外科・内科的治療も効果がなく、機能を再び回復させる事は不可能である。ところが、ある特定の生物は、中枢神経組織の再生能力が備わっており、神経組織が破壊された後でも組織が完全に再生し、機能を取り戻す事ができる。本研究では、この特定生物の再生能力のメカニズムを解明し、それを応用する事により本来再生不可能な損傷神経組織を再生させる技術の開発を目指している。

2. これまでの研究経過と現状

成体イモリの神経網膜を除去すると残った色素上皮細胞から網膜が再生される。色素上皮細胞は、網膜の傷害を契機に脱分化して網膜前駆細胞となり増殖し、網膜の種々の細胞に分化して完全に機能的な網膜を再構築する。まず、この神経再生過程を分子生物学的レベルから研究するために、cDNAライブラリー、RNAプローブの作成を行い、神経細胞の分化決定因子の発現パターンを調べ、再生時の神経分化の機序を解明することをめざした。

イモリの網膜再生において、神経回路網形成初期の神経前駆細胞にナトリウムチャンネルが発現している事を電気生理学・生化学的に証明した神経再生現象を分子生物学的に研究していくための基本材料となる網膜のcDNAライブラリーを作成し、それを用いて網膜神経回路の再生時に発現する遺伝子を分子生物学的に単離・同定した。ナトリウムチャンネルのクローニング・全長アミノ酸配列決定に成功し、そのフグ毒耐性が、たったひとつのアミノ酸により決定される事を解明した。

神経系転写因子Pax-6のイモリでのクローニングに成功し、網膜神経回路網再生過程での発現パターンを

インサイチュハイブリ法により調べた。その結果、Pax-6が、再生初期の分裂中の神経前駆細胞、再生中期のシナプス部、再生後期・再生完了期の神経節細胞で発現していることを見出した再生中期のPax-6のシナプス部での大量発現が、シナプス形成タンパク質の発現の開始と同時であることを証明し、Pax-6がシナプス形成にかかわっている可能性を提案した。

再生中における網膜神経細胞のアポトーシス(プログラムされた細胞死)が頻繁に起こることを証明し、その発生の時空間パターンを明らかにすることに成功した。特に、細胞分裂が終了した直後のアマクリン細胞・神経節細胞が、シナプス形成の相手先細胞とのコンタクトをする時期に、多くのアポトーシス細胞が観察された(図1)。このことは、細胞分裂が終了し細胞分化した直後の細胞にとって、アポトーシスを逃れるためには、適切な細胞間相互作用・シナプス結合でのターゲット獲得が重要であることを意味している。

再生過程各ステージの網膜における全網膜(whole retina)、網膜周辺部(periphery)、視細胞層(ONL)、内顆粒層(INL)および神経節細胞層(GCL)でもアポトーシス細胞の密度。再生各ステージは、初期(early)、中期(inter)、後期(late)、手術後50日、手術後80日に分けた。

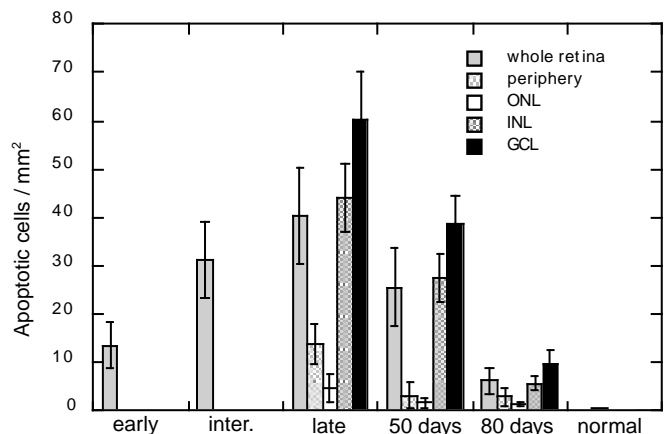


図1 イモリ網膜再生過程でのアポトーシス細胞の変化

細胞間相互作用因子Notchのイモリ再生網膜でクローニングし、網膜神経回路網再生過程での発現パターンをインサイチュハイブリ法により調べた。Notch発現による細胞間コミュニケーションと再生の進行の相関を明らかにした。

3. 期待される波及効果

本研究では、神経再生能力のメカニズムを解明し、それを応用する事により本来再生不可能な損傷神経組織を再生させる技術の開発を目指している。現在では、中枢神経系は、外傷・変性疾患・虚血等によりひとたび損傷を受けると再生できず、外科・内科的治療も効果がなく、機能を再び回復させる事は不可能である。本研究の成果は、全く新しい神経再生治療の道を拓くものとして期待されている。

4. 今後の研究展開の方向

網膜神経回路の再生時に働く機能分子・細胞分化因子・細胞間相互作用因子を単離・同定した。単一細胞レ

ベルでの増殖細胞の標識および分化をつかさどる遺伝子の発現確認の技術を開発・確立し、イモリの網膜神経回路網再生時の増殖・分化因子の発現のタイミング・相関関係を明らかにし、増殖・分化の機序の決定を行った。更に次のステップに入るにあたっては、神経系の再生をうながす極めて微量で短期間のみ発現する重要因子を単離・同定する事が必要不可欠となってくる。この作業は、従来の手法では極めて困難であり、その目的達成のためには、全く新しい手法の開発を必要としている。極めて多くの候補の中から、目指す物質を選択し、それを同定し、その性質を決定するには、従来の精製技術に頼る方法では不可能である。目指す物質が極めて微量しか存在しない事、またその特異性が際立って大きいわけではない事がその理由である。この問題を解決するには、はじめから目指す物質をいきなり精製しようとするのではなく、それを含む似た性質を持つ物質のグループを選択し、そのグループのみを特異的に増幅する。次に、そのグループの中でさらに似た性質を持つ物質のサブグループを選択し、そのサブグループのみを特異的に増幅するという操作を繰り返し行う事によって、精製不可能なほど微量な

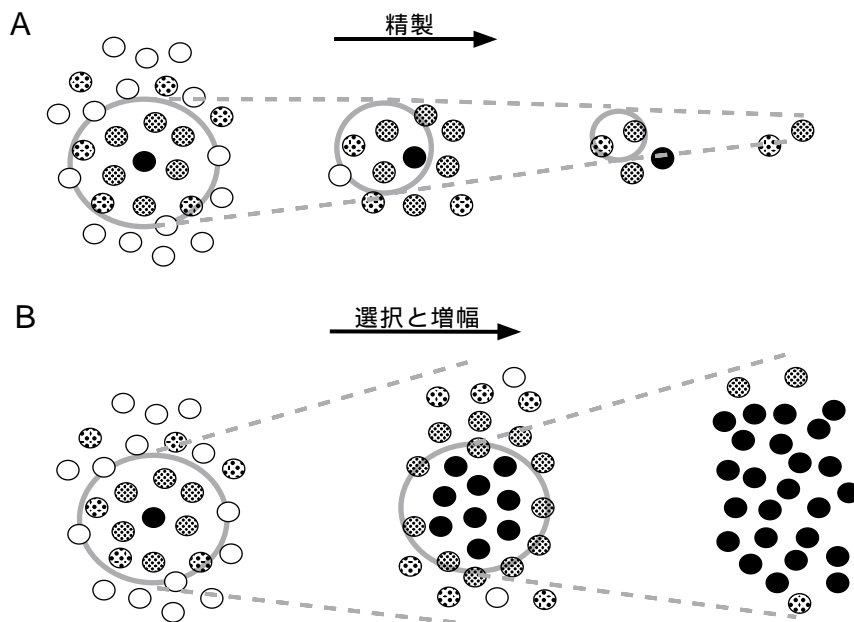


図2 目的とする物質の2つの獲得方法

A 従来の精製方法。

この方法では、最終的にその物質を解析に十分な高い精製度で必要量を得る事が不可能な場合が圧倒的に多い。が目的の物質、性質の似ているものを似た色であらわした。

B 選択と増幅を繰り返す新しい方法。

目的の物質(●)を解析のために必要な非常に高い精製度で十分な量を得る事ができる。

物質を大量に生産し、同定することができるのである
(図2)。

この実験手法の基本技術となるのは、遺伝子の変異とその産物蛋白質の選択・増幅を繰り返して目的の性質を持つ産物を得る進化分子工学という非常に新しい技術である。この技術を改良し、細胞の遺伝子発現・信号伝達系の特定遺伝子の発見に応用できるよう技術開発し、再生を可能にする因子を同定することが今後の研究において、非常に重要となる。

参考文献

- 1) Y. Kaneko, G. Matsumoto and Y. Hanyu : The occurrence of apoptosis during retinal regeneration in adult newts, *Developmental Brain Research*, 117(2):225-228 (1999)
- 2) Y. Kaneko, G. Matsumoto and Y. Hanyu : Pax-6 expression during retinal regeneration in the adult newt, *Development Growth & Differentiation*, 41, 723-729(1999)
- 3) K. Hirota, Y. Kaneko, G. Matsumoto and Y. Hanyu : Cloning and distribution of a putative tetrodotoxin-resistant Na channel in newt retina, *Zoological Science*, 16, 587-594 (1999)

当該研究担当者等

- 1) ラボ構成員(総数3名)
職員(2名) 羽生義郎*、広田潔憲(超分子部)
職員以外(1名) 金子優子(理研・脳研センター)
- 2) その他の研究協力者
松本 元(理研・脳研センター)

* ラボリーダー