

＜シンポジウム 3—2＞中枢神経系の再生・次なる半世紀

遺伝子導入による損傷神経の温存再生促進

—その治療標的の多様性—

木山 博資

(臨床神経, 49 : 827—829, 2009)

Key words : 温存再生, 神経損傷, 遺伝子発現, ウイルスベクター, 神経再生

機能修復への温存的戦略

損傷中枢神経の機能再生には、神経幹細胞などを補充することにより機能修復をめざす方法(補充的方法)と、損傷後の神経細胞の変性を最小限にとどめ、中枢神経が潜在的に有する再生能を引き出すことにより機能修復をめざす方法(温存的方法)とに大きく分類される。このほか中間的方法として内因性の幹細胞の分化増殖を促進する手法がある (Fig. 1)。ES 細胞や iPS 細胞から分化した神経幹細胞などを移植することにより損傷中枢神経の修復をめざす補充的再生は、脚光を浴び意欲的に研究が進められているが、実際にヒトへの応用にはまだ問題点が残されている。損傷神経の機能修復をめざすには、補充的再生と温存的再生がいわば車の両輪として、両者の均衡のとれたボトムアップが不可欠である。このような背景のもと、私たちは温存的再生の立場から研究を進めている。とくに神経細胞の生存メカニズムや軸索再生促進の分子メカニズムにかかる知見は最近急速に蓄積されつつある。本稿では神経温存再生の立場から、各種の遺伝子を導入することにより機能修復をめざす研究について紹介する¹⁾²⁾。

神経再生にかかる分子の探索

神経再生にかかわる分子メカニズムを解明するには、複雑な中枢神経をいきなり取り扱うよりは、系の単純な末梢神経系をもちいる方が明確な結果がえられやすい。末梢神経再生の分子メカニズムを多角的に解析することは、様々な切り口の中枢神経再生戦略を提示してくれると考えられる。このため、各種の末梢神経損傷モデルを検討し、その中から舌下神経損傷モデルに着目した。舌下神経損傷モデルは神経損傷の手法が簡単なことや起始核の組織が取り出しやすいこと、さらには遺伝子導入がおこないやすいことなど多くの利点がある。またラット運動神経をもちいるばあい、幼弱なラットでは神経損傷後1週間程度で運動ニューロンは細胞死にいたるが、成熟ラットではそのような神経細胞死はみられない³⁾。さらに、C57BL/6J のような系統のマウスでは、成熟マウスでも

運動ニューロンは軸索損傷に脆弱であり、半数以上の運動ニューロンは神経損傷後1カ月ほどの間に緩やかな細胞死を呈する⁴⁾⁵⁾。私たちはラットやマウスの舌下神経損傷モデルをもちいて、損傷後に運動ニューロンやグリア細胞で発現する多くの分子について、生存と変性するばあいで何がことなるのか、あるいはこのような動物モデルに特定の遺伝子を導入することにより細胞死を抑制できるか、また軸索再生を促進できるかを検討してきた。

細胞死防御と軸索伸展にかかわる分子群

えられた膨大な結果を眺めてみると、損傷を受けた神経細胞のなかでは生か死を決める分子群のせめぎあい、あるいは軸索再生の過程においては軸索伸展と崩壊のせめぎあいが多数の分子群によってくりひろげられていることがみえてきた (Fig. 2)。神経損傷は、神経細胞を死に導く遺伝子群と同時に再生へ導く遺伝子群の両者を発現させる。損傷にตอบสนองして細胞死を誘導する因子としては、グルタミン酸毒性、活性酸素などのラジカルの発生、ER ストレス、p53 の活性化などにかか

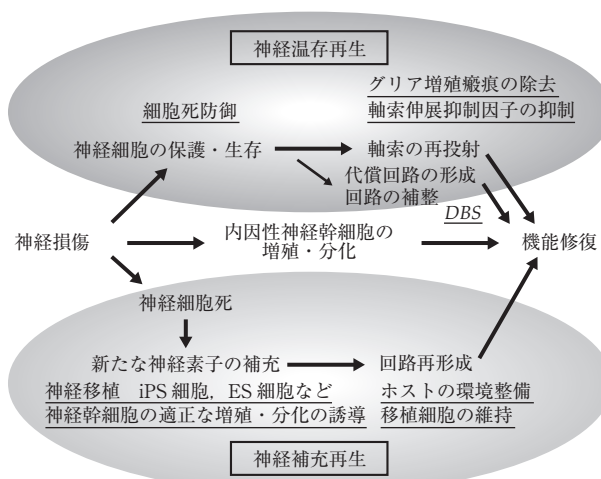


Fig. 1 損傷神経の機能修復をめざす戦略

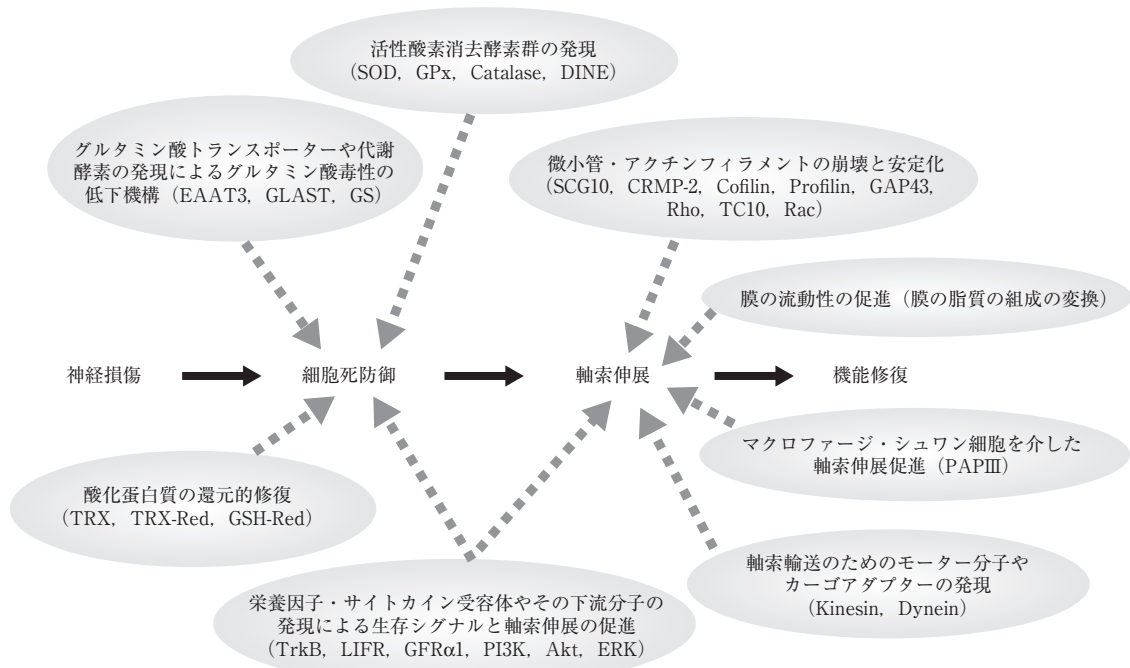


Fig. 2 損傷神経の生存と軸索再生は別の分子群が作動する

る分子群が同定された。一方、神経を生存させるために発現する分子として、神経栄養因子の受容体群、生存シグナルを伝える細胞内シグナル分子群、細胞内のレドックス環境を維持し分子を還元的に修復する分子群、ER ストレスに対抗するための分子シャペロンやユビキチン・プロテアゾーム系分子などがあげられる。たとえば、幼弱なラットでは細胞死を促進する分子の発現が圧倒的に増加し、細胞保護分子の発現が抑制される。その結果運動ニューロンの細胞死が急速に進行する。成熟マウスでは、軸索損傷後細胞死分子に加えて多くの生存分子の発現もみられるが、一部分の生存分子の発現が抑制される。あるいは細胞死をひきおこす分子がマウスにおいてだけ発現する。これらの結果、緩やかに運動ニューロンは死を迎える。このように、発現変化する分子機能のトータルバランスが生と死のどちらにどの程度傾くかで、死あるいは生存への運命が決定されると考えられる。

一方、損傷軸索の再生についても同様に、軸索の伸展を促進する分子と抑制する分子のせめぎ合いがみられる。軸索伸展時には、軸索や成長円錐の細胞骨格であるアクチン線維・中間径線維・微小管の重合促進や安定化にかかわる分子と、逆に崩壊不安定化にかかる分子群がバランスよく発現する。これにより成長円錐の運動性が維持されながら軸索を伸展させることができると考えられる。また、膜の流動性を向上させる分子機序も作動する。その他、軸索再生時には、軸索の伸展やメンテナンスに必要な材料やエネルギー産生にかかるミトコンドリアなどのオルガネラが、軸索流によって再生軸索へ運ばなければならない。そのため、モーター分子やカーゴアダプターなどの分子群の発現が一斉に亢進する。様々な分子群がバランスよく発現することにより、軸索の伸展は促進さ

れる。

遺伝子治療標的の多様性

損傷後の生死のバランスや軸索伸展にかかわると考えられる分子が治療標的として妥当であるかどうかは、動物レベルで遺伝子導入やノックアウトなどをもちいて検証することができる。実際多くの生存関連分子を一つ一つ生体に遺伝子導入してみると、一つの遺伝子を発現あるいは活性化させるだけで神経細胞の損傷後の生存率が上昇することが多い。すなわち治療標的は、様々な種類の分子に求めることができる。たとえば神経栄養因子受容体の過剰発現またはその下流の細胞内情報伝達分子の活性化により、損傷神経細胞をレスキューできる。あるいはラジカルのスカベンジャー分子を発現させても同様の保護作用がみられる。この事実、損傷後の生存をめざすために着目すべき分子の条件として、結果的に生と死のシグナルのバランスを動かすことができるものであれば良いことを示唆している。また、このような多様な遺伝子発現による温存効果は中枢神経系の損傷モデルでも実際効果があることが実験で示された。したがって、実際の治療標的となる分子は、かなり広汎な中から選択できることになり、むしろ遺伝子導入のためのプロモーターの特異性やデリバリーシステムが実際の問題となると考えられる。

これからの問題点

遺伝子導入による神経機能再生治療をおこなうにあたり、その治療標的となる遺伝子は多様であることを実験動物で示

したが、ヒトへの応用には大きな問題点が残っている。現在遺伝子の導入にはアデノウイルスやアデノ随伴ウイルスなどが多用されているが、このようなウイルスベクターの安全性の確保が必要である。また、ウイルスベクターで導入できる遺伝子の大きさには限界があることから、あまり大きな遺伝子は導入しづらい。さらに細胞の種類によってはウイルスベクターが感染しにくく遺伝子導入効率がいちじるしく低下する。また、導入遺伝子の発現を制御し特定の細胞種にのみ遺伝子導入をめざすためには特異性の高いプロモーターが必要である。以前われわれは神経特異的なプロモーターとしてSCG10のプロモーターに複数のneuron-restrictive silencer element (NRSE) を付加した人工プロモーターを作成したが³⁶⁾、このような用途特異的かつコンパクトな多種のプロモーターを揃えることが必要である。この他、遺伝子導入による方法は、神経細胞を温存させ軸索再生をうながすだけでなく、神経幹細胞などを移植する際に、ホストの側のコンディショニングをおこなうことにも応用できる。遺伝子導入により、ホスト側から移植細胞の生存促進あるいは腫瘍化抑制などが近い将来可能になると考えられる。このように、補充再生と温存再生が近い将来一体となって、失われた神経機能の修復治療が発展することを期待したい。

文 献

- 1) 木山博資：損傷神経生存のバイオロジー。細胞工学 2005；24：1200—1205
- 2) 木山博資：脊髄損傷の治療へ向けてのストラテジー。脳 21 2007；10：131—133
- 3) Namikawa K, Honma M, Abe K, et al: Akt/Protein kinase B prevents injury-induced motor neuron death and accelerates axonal regeneration. *J Neurosci* 2000; 20: 2875—2886
- 4) Kiryu-Seo S, Hirayama T, Kato R, et al: Noxa is a critical mediator of p53-dependent motor neuron death after nerve injury in adult mouse. *J Neurosci* 2005; 25: 1442—1447
- 5) Kiryu-Seo S, Gamo K, Tachibana T, et al: Unique anti-apoptotic activity of EAAC1 in injured motor neurons. *EMBO J* 2006; 25: 3411—3421
- 6) Namikawa K, Murakami K, Okamoto T, et al: A newly modified SCG10 promoter and Cre/loxP-mediated gene amplification system achieve highly specific neuronal expression in animal brains. *Gene Therapy* 2006; 13: 1244—1250

Abstract

The preservative therapies of injured central nervous system by gene transfer

Hiroshi Kiyama, PhD

Department of Anatomy & Neurobiology, Graduate School of Medicine, Osaka City University

The central nervous system (CNS) injury causes severe loss of functions, and the development of therapies to recover the functions can be an important target. The present study highlighted the preservation-oriented therapy by transferring genes to the injured neurons. To identify therapeutic targets for the preservative therapies of injured CNS, we focused on clarifying the mechanism underlying the degeneration and regeneration of neurons after injuries using nerve injury models of animals. We have identified several genes, some of which were the survive-promoting and others were death-promoting molecules. In addition another subset of genes were assumed to be associated with promoting nerve regeneration. The single expression of variety of molecules by a viral vector was proved to have the potential to rescue and recover, and this was also confirmed in CNS injury model. We assumed that the most important issue was the balance of levels between the pro-survive and pro-death molecules, which expressed in response to nerve injury. Those suggest that variety of molecules could be a therapeutic target for neurodegenerative disease as well as the neuron protection after traumatic injury. Combining both the transplantation-oriented and the preservation-oriented strategies would give us more potent therapeutic possibilities.

(*Clin Neurol*, 49: 827—829, 2009)

Key words: preservative therapy, nerve injury, gene expression, viral vector, nerve regeneration