

早稲田大学大学院 先進理工学研究科

博士論文審査報告書

論文題目

**Functional Analysis of Collapsin Response Mediator
Protein 4 in Recovery after Neural Injury**

神経損傷後の回復における

Collapsin Response Mediator Protein 4 の機能解明

申請者

Jun Nagai

長井 淳

Department of Life Science and Medical Bioscience,
Research on Molecular Brain Science

July, 2015

脳・脊髄からなる中枢神経系の再生能力は乏しく、中枢神経系疾患の治療が困難である大きな要因となっている。神経細胞は一度失われると、その補充は極めて乏しく、増殖能の優れたグリア細胞に置き換わり、組織は瘢痕化する。また神経から伸びる軸索が切断された場合は、末梢神経に比べてもその伸長はわずかである。こうした低い再生能力の原因解明を目指した研究がなされる一方、新たに外部から神経細胞を補充する方法も動物モデルのレベルで試みられている。また、限局的ではあるがヒト成体脳においても新たに神経細胞が生み出され、神経回路に組み込まれて機能することが分かり、その内在的能力を増強させる研究が盛んに行なわれている。細胞補充においては、近年研究が加速している iPS 細胞の応用などの点から現実的な治療方法の確立に向けた研究が推進されている。

中枢神経系において神経の軸索伸長が乏しい原因を解明する研究において着目されているのが Collapsin Response Mediator Proteins (CRMPs) である。CRMPs は CRMP1-5 まであるファミリータンパク質で、中枢神経系で特に発達期に発現レベルが高く、CRMP1-4 はアミノ酸配列の相同性が高く、ヘテロテトラマーを形成しているとの報告があり、機能的な重複が考えられる。中枢神経系の神経再生が乏しい原因として、再生する軸索の伸長を抑制する因子の存在が報告されているが、今回の研究で着目した CRMP4 は、これらの因子の阻害作用を神経細胞内で伝達する分子として報告されている。CRMP4 は神経細胞内で微小管やアクチンといった細胞骨格タンパク質と結合して、その安定化に寄与しているが、阻害因子が受容体に結合すると CRMP4 がリン酸化を受け、結果として細胞骨格の不安定化を引き起こし、軸索の伸長が阻害される。このことから、CRMP4 が神経再生に対して負の働きをしている可能性が示唆されており、培養細胞レベルでの先行研究では、CRMP4 を RNAi により抑制することにより、阻害因子に対する反応性が失われるという実験結果が示されていた。本博士論文の研究内容は、遺伝的に CRMP4 を欠損したマウスを用いて、こうした先行研究を細胞培養系で確認するとともに、マウス個体レベルで神経再生を評価する実験系として脊髄損傷を用いることにより、さらに研究を進展させている。

本博士論文は5章からなる。第1章では、上記の中枢神経系の再生能力が乏しい原因についての研究をまとめ、その原因として考えられている阻害因子、またその細胞内シグナルを伝達する働きを有する CRMPs について先行研究を紹介しながら、今回の研究で着目した CRMP4 に関して記述している。*Crm4*^{-/-}マウスを用いた研究を行なうことにより、新たなアプローチで独自性の高い研究を遂行できる可能性を述べており、研究目的が明確に設定されている。

第2章では、今回の研究で用いた具体的な実験方法について記述している。

第3章で研究結果を記述している。2つに分けられ、前半が *Crm4*^{-/-}マウス由来細胞を用いた *in vitro* の実験結果についてである。神経軸索伸長阻害因子である MAG に対する軸索退縮反応が、*Crm4*^{-/-}マウスにおいては低下していることが示された。これは、新規の研究結果であり、*Crm4*^{-/-}マウスにおいて、神経再生能力が優れている可能性を示唆するものであり、学術的に評価できる内容である。後半は、中枢神経系の神経再生の評価系と

して、脊髄損傷モデルを用いた研究内容である。まず、脊髄損傷後の CRMP4 タンパク質の発現パターンを解析した結果が示されている。脊髄損傷により、阻害因子のシグナルを伝える CRMP4b という N 末側の配列が長いアイソフォームが出現することが示された。CRMP4 が神経伸長阻害に関連することを *in vivo* で示した新規の知見であり評価される。以降は野生型と *Crmp4*^{-/-}マウスとの脊髄損傷後の比較を組織学的、生化学的に行なった以下の 1)~8)までの結果が示されている。1) 脊髄損傷後の微小管の安定性に対する野生型と *Crmp4*^{-/-}マウスの比較において、*Crmp4*^{-/-}マウスでは脊髄損傷後も微小管の安定性が保たれる。2) *Crmp4*^{-/-}マウスでは野生型に比べて細胞死が減少していること、損傷部以下のレベルの脊髄において神経細胞数の減少及びミエリンの減少が低下している。3) *Crmp4*^{-/-}マウスでは脊髄損傷にて惹起されるアストロサイトやマイクログリアの活性化が減少している。4) この *Crmp4*^{-/-}マウスにおけるグリア細胞の活性化の低下は、Zymosan-A という炎症反応を惹起する薬剤に対する反応でも見られる。5) *Crmp4*^{-/-}マウスでは瘢痕形成が減少している。6) 再生神経のマーカである GAP43 が生化学的、組織学的に *Crmp4*^{-/-}マウスでは脊髄損傷回復期に多い。7) *Crmp4*^{-/-}マウスにおいて、raphespinal tract, corticospinal tract が損傷レベル以下の脊髄で多く観察される。8) *Crmp4*^{-/-}マウスでは下肢機能回復を数値化する BMS スコアが野生型に比べて有意に高い。*Crmp4*^{-/-}マウスの脊髄損傷後の回復が良かった原因として、CRMP4 欠損が再生神経軸索の伸長に有利に働くばかりでなく、アストロサイトやマイクログリアの活性化が減少して脊髄損傷の回復を妨げる瘢痕組織形成も減弱することを示している。こうした知見は、遺伝子欠損マウスを用いて初めて得られた結果で、学術的価値が高いと考えられる。解析も計画的に進められており、単に機能回復が優れているという結果だけでなく、その原因を明らかにしている点で評価できる。

第 4 章では、これらの結果について考察している。具体的には、CRMP4 の機能は再生に阻害的に働くため、CRMP4 を欠損させることで、脊髄損傷の神経再生が促進されたと考えられるが、マイクログリアの CRMP4 の機能を阻害することにもなり、炎症反応の低下や瘢痕形成の抑制につながったとの考察であった。先行研究を参考にして考察されており、当該分野の十分な学識が備えられていると考えられ評価される。

第 5 章で、今後の展開について、ヒト疾患への応用の可能性が示唆されることを、具体的なアプローチとともに記述している。ヒトにおいて、CRMP4 遺伝子を欠損させることは不可能であるが、CRMP4 の機能を阻害する薬剤を開発するなど、今回得られた結果を元に医療への応用が議論されている。

以上、本博士論文においては、CRMP4 が神経再生を阻害している因子として働くことを、まずは細胞培養系で示し、さらに *Crmp4*^{-/-}マウスの脊髄損傷モデルについて、機能的回復が良好であることから示している。さらに、CRMP4 欠損により免疫系グリア細胞の活性化が抑制され、損傷による瘢痕形成が抑制されていることが示されるなど新規の知見が含まれ、学術的に評価される。

公聴会での質疑・コメントと、申請者の対応は以下の通りであった。

1. CRMP4 と CRMP1,2,3 との関係についての質問に対して、申請者より「CRMP1-4 はアミノ酸配列の homology が高くヘテロテトラマーで機能するため、他の CRMP についても検証が必要と考えられる。今回の報告は CRMP4 のみであるが、CRMP2 遺伝子改変マウスを用いた脊髄損傷のプロジェクトも進めている。」との回答があった。
2. ヒトの CRMP と疾患との関係についての質問に対し、申請者より「アルツハイマー病患者で CRMP2 のリン酸化上昇が認められており、ALS の患者で CRMP4 遺伝子のミスセンス変異が確認されているなど、神経疾患と CRMP の関連はヒトにおいても示唆されている。」との回答があった。
3. 脊髄損傷後の感覚機能回復と感覚機能を司る上行性神経線維の再生についての質問に対し、申請者より「後根神経節(DRG)の感覚神経細胞に遺伝的に YFP 黄色蛍光で標識されているマウスを用いた損傷脊髄切片のデータがある。野性型マウスに比べて CRMP4 欠損マウスは DRG 神経細胞線維が多く投射していた。今後は hot plate test という行動実験を用いて温痛覚機能回復を検証する予定である。」との回答があった。
4. *in vitro* の DRG 培養細胞実験と *in vivo* の脊髄損傷モデルでの実験を併せた考察について質問があった。これに対し、申請者より「DRG 神経細胞体は末梢神経系に属するが、脊髄に投射した線維を取り囲む髄鞘は、中枢神経系特異的グリア細胞であるオリゴデンドロサイトによって形成される。*in vitro* 実験で示したように、CRMP4 欠損神経軸索はオリゴデンドロサイトに含まれる阻害因子への反応性が弱まっていたため、脊髄損傷後の神経軸索の投射が増加していたと考察される。」との回答があった。
5. CRMP4 の truncation と細胞死の関連についての質問に対し、申請者より「培養細胞に過酸化水素水やグルタミン酸を過剰投与した場合に、calpain 活性上昇に伴い CRMP4 の truncation が認められるという先行研究がある。しかしながら、CRMP4 の truncation が細胞死を引き起こしたのか、細胞死が CRMP4 の truncation を引き起こしたのかは不明である。」との回答があった。

以上の質疑を通して、申請者が本研究の意義と研究結果について十分な学識を有し、必要と考えられる考察を行っていることが分かった。

本研究は、脊髄損傷治療の標的分子をマウス個体のレベルで明らかにした点で、当該研究領域を発展させる優れたものであり、博士（理学）に相応しいものであると考える。

2015年6月24日

審査員

主査	早稲田大学教授	医学博士	山梨医科大学	大島 登志男
				<u>大島 登志男</u>
	早稲田大学教授	博士（医学）	大阪大学	井上 貴文
				<u>井上 貴文</u>
	早稲田大学教授	理学博士	東京大学	仙波 憲太郎
				<u>仙波 憲太郎</u>