

解 説

「中枢神経軸索はなぜ再生しないのか？」

坂元 一真

名古屋大学大学院医学系研究科 分子生物学講座 准教授

御紹介いただきましたとおり、僕は名古屋大学の医学部を卒業したんですけれども、そのときに第二生化学教室の教授をやられておられたのが古川先生です。医学部の2年生で生化学の講義があるんですけれども、そのときから古川先生のごことは存じ上げて、古川鋼一先生、それから古川圭子先生の授業をちょっとだけ一緒に受けていました。

今回、このような貴重な機会をいただいて、古川先生初め関係者の皆さんに厚くお礼申し上げます。

今日のタイトルは「中枢神経軸索はなぜ再生しないのか？」という話です。神経のこととか、専門外の方がおられるかもしれませんので、ちょっとゆっくり、基礎的なところからお話できればと思います。

これはことしのニュースの一画面ですけれども、夏場から秋にかけて、台風とかいわゆるゲリラ豪雨とかで非常にインフラが破壊されたのは、皆さんもまだ覚えているかと思います。特に千葉では台風15号の影響がひどくて、ここにあるとおり停電とか断水が続いておりました。2週間以上なかなか復旧しないということで、こんなことは今までなかったわけなんですけれども、このときの被害はすごく大きかったと思います。

ここで壊れたのが電線と水道のシステムですけれども、こういったシステムというのは僕たちの体の中でも同じようになっているかと思えます。例えるなら、電線のシステム、電気をワイヤーで送るというシステムは僕たちの神経系に当たりますし、水道は水を運んでくれるシステムですので、もしかしたら循環器系。いろんな意見があるかと思いますが、そういうふうに置きかえて

みてもいいかもしれません。

今日は、この電線のシステムに似た神経系について簡単に御説明します。

富永先生も神経のお話をされたので、もしかしたら皆さんももう大丈夫と思うかもしれないですけれども、神経系を構成している一番主な細胞が、神経細胞という細胞になります。神経細胞というのは、細胞の核がある細胞体と通常一本の軸索という長い突起によって構成されています。樹状突起という短い突起がこの細胞体のところから出ていて、基本的には樹状突起で情報を受け取って、軸索の中を電気信号で情報を送って、軸索の末端で次の細胞あるいは組織といったものに情報を伝達するという構造をとっています。

皆さん、実際に細胞を目で見られた経験がどのくらいあるかわかりませんが、一般に細胞というのは非常に小さいです。体重60kgの人のの中では大体60兆億個の細胞がありますので、言いかえると1個1個の細胞は非常に小さくて、血液の中を流れている赤血球なんていうのは、この直径が大体7μmです。神経細胞も、細胞体自体はそんなに大きくはないですけれども、ここから伸びる軸索という電気を送る、情報を送る突起が非常に長いケースがあります。

例えば、これはキリンの絵ですけれども、このキリンが後ろ足をちょっと動かしたいと思ったときにどういうふうに脳から指令が行くかというと、脳の運動野というところにある神経細胞がまず1つの神経細胞で、腰のあたりの次の神経細胞まで情報を送るわけです。頭から腰のあたりで1個の神経細胞です。キリンの長い首は、ちょうどこのところに軸索というのが走っているということになります。

ですので、細胞は非常に小さいですけれども、神経細胞に着目した場合に軸索というものの長さも考慮すると、場合によっては2～3m。僕たち人間でも同じ状況ですので、頭の先端から腰のあたりまで、約1m近い軸索が存在することになります。

さっきも言ったように、私たちの神経系というのは電柱と電線の関係に非常に似ているかなと思っております。神経細胞があって、細胞体から軸索の先端方向に情報が伝達されます。次の神経細胞とか筋肉とか分泌腺なんかにある種の細胞の結合をつくるわけですが、この結合のことをシナプスと言います。ちょうど軸索がこの電線に相当するかなと、シナプスがそれぞれの電柱に相当するかなと、僕の印象ではしております。

神経細胞はわかったけれども、それが実際にどうなっているのかというのを示せたのが、神経回路を示すのがこの写真になります。これは人の脳を脳底部から見たもので、右側が前で左側が後ろですけれども、大体人の脳の中には神経細胞が2,000億個あると言われていています。この前の画像ではシナプスが1対1、1つの神経細胞が1つにつながっていると書きましたけれども、実際そういうシナプスはまれで、通常は1個の神経細胞が大体1万個のシナプスを、ほかの神経細胞などをつくると言われています。

ですので、神経細胞は平均このような数のシナプスをつくりますので、脳全体でシナプスの数がどのくらいあるかということ、計算すると銀河1,600個分の星の数ということになります。これがどういう数字かわからないですけれども、僕たちの直感として、星の数は無限にあつてというのがわかりますので、どれだけ膨大な数のシナプスがあるのかがこれでわかるかなと思います。

要は、シナプスとシナプスを結ぶのが神経細胞の軸索に当たるところで、人の脳では軸索を線としてあらわす、回路を線としてあらわすと、こういうふうに見えることになります。

軸索は長くて細いけれども、そういったものは

どういった悪い点があるかという、さっきの台風とか雨のときに電線が切れて停電したように、神経の軸索も非常に切れやすいということです。そのような状況を軸索損傷と呼んでいます。軸索が切れてしまう状態です。

これが体の中でどういう状況で起こりやすいかということ、一番代表的なのは脊髄損傷という病気になります。脊髄というのは背骨の中を通っている神経の束ですけれども、外傷なんかによって、骨を骨折して、中の軸索、脊髄が断裂してしまうことがあります。脊髄損傷です。どれくらいの患者さんがいるかということ、日本で10万人の患者さんが今いると言われていて、年間5,000人ぐらいの新しい患者さんが出てきてしまっているという状況です。

ちょっと見えにくいですが、横軸が年齢で、縦軸が発症件数になります。通常病気というのは、子供のときになりやすいか、大人になってからあるいは年老いてからなりやすいという傾向があるんですけれども、脊髄損傷というのは非常に特徴的で、20歳前後、多分学生さんの年代のころと年をとってから多くなる。若年者と高齢者の二峰性という特徴があります。

これはなぜかということ、皆さん想像がつくと思うんですが、20歳前後の年代で車に乗り始めたりオートバイに乗り始めたりとか、そういう若い人の交通外傷でこうなってしまうということです。あと1つ多いのはスポーツ外傷です。この時期、冬になってきましたけれども、特にスキーとかスノーボードとかいうウィンタースポーツでこういう損傷を受けてしまう人が多い。この前までワールドカップをやっていたけれども、ラグビーみたいなスポーツでも若い人が受傷してしまうことがあるということで、このような発生頻度となっています。

皆さん御存じのように、こういった状態になってしまうと車椅子とか、これが首のところ、頸髄というところに起こりますと、基本的には手の麻痺も出てきますので、そうなる寝たきりとか、

介護が必要な状態で非常に大変です。ほとんど回復する見込みもなく、治療法もなく、社会復帰できる人、職場に戻れたり学校に戻れたりという人は10%にも満たないと言われております。例えば20歳前後で車椅子になってしまったり寝たきりになってしまうと非常に大変な思いをするわけです。繰り返しになりますが、治療法は全くだoesしません。

軸索損傷、軸索が切れたときに、細胞レベル、神経レベルではどうなっているのかというのを見たのがこちらの図になります。先ほど申し上げたとおり、神経細胞が神経細胞にシナプスをつくっております。ここに外傷ですとか虚血ですね、そういったものでダメージが加わりますと、このところで軸索が切断されてしまいます。

通常、切れたところから末端側の軸索というのは、ワーラー変性（Wallerian degeneration）という変性を経まして、やがてこの組織から除去されます。ミクログリアですとかこのような貪食細胞が細胞の断片を食べてしまって、ここの部位は完全になくなってしまいます。

皆さんにここで覚えておいてほしいのは、大抵の場合に神経細胞本体はまだ生きていうことです。死んじゃうわけではなくて、神経細胞は大体のケースで生きています。ただ、神経回路はごらんのように断絶されていますので、足を動かそうと思ってもその命令は行きませんし、その結果、麻痺などになってしまうわけです。

千葉の停電のときは、時間がかかりましたけれども電気会社の人が電線をつなぎ直してくれて停電は復旧するわけです。もし僕たちの神経細胞ももう一回ここからこのように伸びてくれて、もう一度もとあったような神経回路を形成してくれれば、先ほどお見せしたような麻痺とかいった状況は起こらないわけです。ただ、この現象というのは僕たちの中枢神経では絶対に起こらないとされています。

中枢神経というのは脳とか脊髄です。僕たちの腕とか足にも神経は走っていて、そういった末梢

神経でこういったことが起きると再生は可能ですけれども、脳、脊髄でこういった神経の損傷、軸索の損傷があると、軸索が再生するということは絶対に起こりません。なぜかといいますと、中枢神経、脳、脊髄では、軸索損傷後軸索再生阻害因子というのが主にほかのグリア細胞から出てきて軸索の再生をとめてしまうからです。

こちらのムービーは、ラットに腰のところで脊髄損傷を起こしたものです。左側は何も治療をしなかったラットで、右側はある軸索再生阻害因子を分解してあげたラットです。

左側から見てみますけれども、お尻のところで神経回路が断絶しているので、両後ろ足を引きずって、尻尾もだらんとしている状態です。人間でいえば車椅子に乗らないと移動できないような状態かと思います。右側は、軸索再生阻害因子の1つを分解してあげたという治療を施したラットになります。そうすると、まだちょっとおぼつかなくはあるんですけども後ろ足も辛うじて動かして、しっかりと歩けるといのがわかると思います。

僕たちの中枢神経系ではいろいろな種類の軸索再生阻害因子が出てきまして、軸索の再生をとめてしまうということが知られています。

軸索再生阻害因子には、糖鎖であったりタンパク質であったり、いろんな種類があるんですけども、主にグリア細胞が損傷後こういった分子を産生します。結果として軸索の再生を阻害してしまうわけです。

よく質問に出るんですけども、じゃあ何でこんなことをしているの。こういった分子は軸索が再生してしまうのを邪魔するばかりで、こんな分子要らないんじゃないかと質問を受けるわけですが、実際にはこういった分子にもよい機能というのがありまして、それをちょっと考えてみますと、1つは異常な軸索再生あるいは異常なシナプス形成を抑制するということです。

もしこういった分子がなくて軸索再生がうまく起こってくれたとしても、もしかしたら変な回

路ができてしまうことも考えられます。本来は右足を動かす神経なのに左足のほうへ行ってしまったなんていうことが起こるわけです。そうすると、僕たちが右足を出そうと思ったときに、もしかしたら左足が出てしまうような、変な神経活動につながってしまうかもしれません。そういうことでは非常に困りますので、もしかしたら僕たちの体は、こういった分子を出すことで変な治り方をするのであれば、もう治らなくていいやという選択をしている可能性はあります。

あと、脊髄、あるいは脳に外傷を受けていますので、単純に外傷を塞いで瘢痕化を促進するという機能もこの分子にはあります。当然、中枢神経系が外の世界と傷を通じて交通があるのは非常にまずいので、感染なんかを防御するためにこういった分子がその傷を塞ぐと言われております。

あと1つ大事なのが、血液脳関門の破綻を修復するということです。血液脳関門というのは、我々の脳を初めとする中枢神経系の血管と脳の実質にあるバリアのことです。血液の中には神経細胞にとってさまざまな有害物質が含まれているんですけども、そういった物質が簡単に脳に入っていくようにするために脳内の血管というのは非常にタイトにできていて、決まった分子しか通さないとなっております。入国管理が厳しいような感じだと思います。

脊髄損傷のときなどは当然血液脳関門も物理的に壊れてしまうので、体の悪いものが脳に入ってしまう。ただ、こういった分子は急速にグリア細胞に産生されて血液脳関門の修復を促進するとされておりますので、こういった分子はこういった分子で、軸索再生阻害因子という名前はついていますが、なければならないで困るんじゃないかというような機能もしております。

イントロはここぐらいまでにしまして、僕たちが最近やった仕事で、特にコンドロイチン硫酸という軸索再生阻害因子の機能解析を行いましたので、今日はそれをちょっと御紹介したいと思います。

まず、そもそもこういった軸索再生阻害因子があると、神経細胞、神経軸索がどうなっちゃうかを見たのが、サンティアゴ・ラモン・イ・カハール（Santiago Ramon y Cajal）さんという非常に有名な神経解剖学者です。この方はもう100年以上前に、切れた神経軸索の先端部を観察しましてこういう絵を描きました。通常の神経と違って、先端部が膨らんで空胞を抱えているということです。カハールさんはこの構造を **Dystrophic endball** と名づけました。彼はこの構造の形成が神経軸索が再生しない、伸びていかない原因だろうと述べています。

最近の研究で、軸索再生阻害因子の中でもコンドロイチン硫酸が **Dystrophic endball** という異常構造をつくるということがわかってきました。

これは脊髄を横から見た図だと考えてください。ここに何か外傷が加わって脊髄が傷害を受けたとします。コンドロイチン硫酸は、この損傷部を中心にこういうふうに濃度勾配をもってグリア細胞によって産生されます。切れた軸索は再生しようとするんですけども、高い濃度のコンドロイチン硫酸に出会うとこういうふうに丸まって **Dystrophic endball** をつくとされてきました。

この **Dystrophic endball** という構造は非常に重要で、実際に僕たちも見てみたわけですけども、先ほどと同じようにラットに脊髄損傷を起こして、皮質脊髄路（Corticospinal tract）という運動神経の神経回路を染めたものです。ちょっと白く色が抜けているところが損傷を与えた部分です。皆さん見てわかるように、軸索の先端部が膨れて丸まって、空胞みたいなものを抱えていることが見えるかと思います。軸索が全部切れていて、ここでとまっているということです。

これはほかのグループからの報告ですけども、人の患者さんの脊髄です。脊髄損傷の既往がある患者さんの脊髄の切片になります。この患者さんは脊髄損傷を受傷されてから42年後にほかの病気で亡くなられて、その脊髄を見てみると、

こういった **Dystrophic endball** が損傷部にそのまま残っていたということです。つまり、この **Dystrophic endball** の構造は慢性的、永続的な構造であることを示したものです。

この **Dystrophic endball** というのは、細胞培養の上でも再現できます。ここで使っている神経細胞は大人の後根神経節 (**Adult dorsal root ganglion**)、感覚神経の細胞を培養していますけれども、我々と同じ大人の神経細胞です。左側は、この神経細胞を、ラミニン (**laminin**) という基質ですが、神経細胞に非常に優しい培養基質の上でカルチャーしたときの絵です。

このときは軸索の先端部が手のひらみたいな形になりまして、グロースコーン (**Growth cone**)、成長円錐と言うんですけれども、きれいな形をしながら軸索がしっかりと前に進めると、再生できることを示しております。ここで言いたいのは、例えば大人の神経細胞であっても、何ら軸索再生阻害因子がなければ、ちゃんとこういうふうに再生できるということです。

一方、右側の絵では、先ほどから出てきています軸索再生阻害因子の1つであるコンドロイチン硫酸を細胞培養のディッシュにこういうふうに濃度勾配を持つように塗ったんです。それで同じようにこの脳神経細胞を培養してみました。そうすると形が全然違って、丸まって空胞も抱えまして、この軸索も、伸びよう伸びようとはしているけれども、全然コンドロイチン硫酸の壁を越えられないというのが観察できました。

もう一回お見せしますけれども、伸びよう伸びようする意思はあるけれども、丸まって空胞を抱え込んでとまってしまふ、伸び切れない。また下がってしまうということです。

この絵は先ほどお見せしました、人の中の **Dystrophic endball** ですとかネズミの中、あと、カハールさんが描いたこういった絵をモデルにして、この **Dystrophic endball** がどういうふうにできてくるのか、あるいはどうしたらこれをできないようにすることができるのかを数年前から

研究として始めたわけです。

実は、ここにコンドロイチン硫酸がありますけれども、コンドロイチン硫酸の受容体というのが既に報告されていまして。それが受容体型のチロシンフォスファターゼ (**receptor-type protein tyrosine phosphatase**) という分子に属する **PTPR σ** という分子です。コンドロイチン硫酸がこの **PTPR σ** に結合すると **PTPR σ** を活性化します。**PTPR σ** という分子は、ここに書いてある受容体型チロシンフォスファターゼという酵素活性を持っています。チロシンフォスファターゼというのは、あるチロシンリン酸化タンパクからこのリン酸基を外す、こういうチロシンキナーゼ (**tyrosine kinase**) と真逆の活性を持った分子です。

受容体であることはわかった。で、こういうモデルが考えられたんですけれども、なぜコンドロイチン硫酸が **PTPR σ** を活性化できるのか。それから、例えばここで脱リン酸化される基質は何であるのかはわかりませんでした。あと、最終的に何でこういうふうに丸まってしまふのかということもわかりませんでした。なので、僕たちはこちら辺を狙って実験を行ったわけです。

皆さん、もし可能でしたら、この **PTPR σ** あるいは受容体型チロシンフォスファターゼという分子は多量体化で酵素活性がなくなる、単量体化するとこういうふうに活性化するということが覚えておいてください。ただ、コンドロイチン硫酸がなぜこの **PTPR σ** を単量体化あるいは活性化するかというのはわかりませんでした。

今日はヘパラン硫酸 (**HS**) の話はしませんので、あまり気にしないでください。

成長円錐が、コンドロイチン硫酸があるだけでこういうふうに変わってしまいます。これは **PTPR σ** を介してることがわかったんですけれども、なぜコンドロイチン硫酸が **PTPR σ** を活性化できるのか、あるいはここで何が起きているのかは全くわかりませんでした。

繰り返しになりますけれども、僕たちは、

Dystrophic endball は本質的には何か、あるいはこの中で何が起きているのかを研究目標としました。何でコンドロイチン硫酸は PTPR σ を制御できているのかというのもまた一つ興味ある問題でした。あと、最終的には Dystrophic endball の中で PTPR σ によって脱リン酸化されている基質を見つけないかというふうに、この3つの目標を持って研究を行っていました。

最初の疑問からです。

Dystrophic endball が何かと思ったときに、さっきのムービーとかあるいはサンティアゴ・ラモン・イ・カハールの漫画とか、非常によく空胞が見えたのが1つ特徴でした。Dystrophic endball の中に泡がたくさんある、泡が出てきては消えているなと思って、そこを切り口にしました。これはオートファゴソーム (Autophagosome) だろうなとそのとき思いまして、電顕なんてやったことがないんですが、できる人に頼みましてやってもらいました。

Dystrophic endball がここにありまして、ここにコンドロイチン硫酸の濃度勾配があります。そこに差しかかって endball になったやつを電顕で観察してみますと、こういう空胞がやっぱり電顕の電子顕微鏡でも見える。よく見ると二重の膜を持っていて、細胞質と空胞の中身の電子密度というか色の濃さがほとんど同じだということで、こういう特徴を持つ膜構造はオートファゴソームと言われる構造であると教わりまして、これはオートファゴソームで間違いないだろうと結論づけました。

もう1つ同じような実験ですけれども、今度は LC 3 というオートファゴソームのマーカーになる分子で Dystrophic endball を染色しました。マーカー分子というのはこの構造に特異的に見えるある分子です。ごらんのようにラミニンの上で非常に伸びている、活発に伸びている成長円錐ではこのオートファゴソームはそれほど見られなかったんですけれども、コンドロイチン硫酸の上で Dystrophic endball になっている神経細胞の

先端部では、こういうふうに LC 3 のシグナルが非常に蓄積していると。言いかえますと、オートファゴソームが蓄積しているという図が得られました。

今のはカルチャーの実験ですので、本当に脊髄の中でも、Dystrophic endball でもそういったことが起きているかどうかということで、またマウスの脊髄損傷をつくりまして、Dystrophic endball の中にオートファゴソームがたまっているかどうかを見たのがこの図です。

これは脊髄を横から見たもので、左側が頭になります。やはり CST という皮質脊髄路という神経回路を染めています。実は、この緑に染めているのがコンドロイチン硫酸になりまして、皮質脊髄路の先端部がこういった丸まった Dystrophic endball という構造をとっているのがわかるかと思います。

やはり LC 3 というオートファゴソームのマーカーで染色しますと、Dystrophic endball の先端部にオートファゴソームがたくさんたまっていることがわかりましたので、オートファゴソームの蓄積、Dystrophic endball でのオートファゴソームの蓄積は、ビトロのモデルでも見えますし、実際ビボの脊髄損傷モデルでも見える普遍的な現象と判断しました。

オートファゴソームは、ちょっと何年前か忘れましたがけれども大隅先生がノーベル賞を取られましたので、皆さん、御存じの方も多いかと思いますが、これは細胞の中で起こるタンパク質分解機構の1つになります。タンパク質ではなくて、古くなった細胞内小器官なども包み込んで分解する機構です。

オートファゴソームのまた別の方の電顕写真になりますけれども、こういった二重膜にミトコンドリア (mitochondria) ですとか小胞体、あとは恐らくほかのタンパクなんかが包み込まれて、最終的にこのオートファゴソームというのはライソゾーム (Lysosome) という別の小器官と融合してこの中身が分解されます。そうしたことで、

古くなった小器官や要らなくなったタンパク質を分解してアミノ酸に戻して再利用するという、細胞内の分解機構、あるいはリサイクル機構です。

今話したことを簡単にまとめてあるのがこの図です。

オートファジー (Autophagy) では隔離膜という膜が生じてきて、これがミトコンドリアなどを包み込んで膜が閉じて、オートファゴソームとなります。オートファゴソームはライソゾームと融合しまして Autolysosome となります。ライソゾームの中にはさまざまな分解酵素が含まれていますので、ライソゾームと融合することによって内容物が分解されてオートファジーが完了するということです。

僕たちは、Dystrophic endball の中にオートファゴソーム、ちょうどこの構造がたまっているということを見つけたんですけれども、それには2つ説明があります。オートファゴソームが蓄積している。

1つは、オートファジー自体が活性化した場合です。このオートファジーの経路がすごく活発で、何回も何回も繰り返す起こるとか、そういった状況になると当然オートファゴソームがたくさん見えてきます。あともう1個忘れてはいけないのは、オートファジーが渋滞した場合です。あるいはオートファジーが破綻した場合です。よくありますが、このオートファゴソームがライソゾームと融合するところが障害されてしまうと、交通渋滞のようにその前段階のオートファゴソームがたまってくるということがあります。なので、この2つの可能性を逐一調べなければなりません。

結論から言いますと、Dystrophic endball で起きているのは2番のオートファジーの渋滞、破綻でした。

この免疫染色は、成長円錐と Dystrophic endball でオートファゴソームとライソゾームの二重染色をしたものです。成長円錐ではオートファゴソームとライソゾームが隣り合っている、あ

るいは共局在する絵がたくさんとれました。つまり、この状態がたくさん観察されたんですけれども、Dystrophic endball ではその共局在が基礎で、オートファゴソームとライソゾームのシグナルが独立しているケースが多かったです。つまり、Dystrophic endball ではここの融合がうまくいっていない、オートファゴソームとライソゾームの融合がうまくいっていないのではないかということがこの実験で示唆されました。

ちょっと複雑なシステムですけれども、また別の方法でこのことを確認しました。RFP・GFP・LC3 という融合タンパク質を細胞に発現させると、このオートファジーの流れをモニターできます。この融合タンパクはオートファゴソームに局在しますが、このときには緑の蛍光も赤の蛍光も生きておりまして、写真を撮りますと、黄色いシグナルが見えます。オートファゴソームは黄色くラベルされます。

このオートファゴソームがライソゾームと融合しますと、ライソゾームの低い pH、酸性条件によって Autolysosome もオートファゴソームと比べて少し低い pH に落ちます。そうすると、RFPというのは酸性にも抵抗性があるんですけれども、GFPというのは低い pH に弱くてここでクエンチされてしまって、Autolysosome では赤と青の蛍光を発することになります。この方法でオートファゴソームと Autolysosome を区別できるわけですが、これを発現させて成長円錐、Dystrophic endball で確認すると、成長円錐では赤いシグナルもしっかりと見えた。つまり、Autolysosome までこの過程が進んでいる像が得られましたが、Dystrophic endball で見えるのは黄色いものですね、オートファゴソームが非常にたくさん見えてきましたので、やはり Dystrophic endball でオートファゴソームがたまっているのはこの過程が障害されているという結論をしました。

一方、成長円錐で人為的にオートファジーを渋滞させる、破綻させることもできます。

Chloroquine (CQ) とか Bafilomycin (Baf) という薬剤を細胞にかけますと、こういった薬剤はライソゾームを壊しますので、オートファゴソームとライソゾームの融合も阻害できます。こういった薬剤を成長円錐にかけますと、先端部が丸まりまして中にオートファゴソームをためてきて、まさしく **Dystrophic endball** になりました。また、このときに軸索の伸びも非常に抑えられますので、先ほど見た現象の裏の実験を見ることができたということです。

これも同じ実験になりますけれども、オートファゴソームとライソゾームが融合するときに、VAMP8、SNAP-29、それから siSTX17 という3つのスネア (SNARE) タンパクという、要は係留になる、こういうふうに相手と相手を認証する目印みたいなタンパクが必要なわけですが、それをロックダウンすることによってのオートファゴソームとライソゾームの融合は阻害できます。そういうふうにしてスネアタンパクをロックダウンすることにより **Dystrophic endball** を誘導すると、やはり先端部にオートファゴソームがたまって軸索の再生が阻害されるという **Dystrophic endball** の特徴を再現することができましたので、やはりオートファゴソーム、ライソゾームの融合の障害が **Dystrophic endball** で起きている細胞生物学的な現象なのかなと思っています。オートファジーが破綻するというのが **Dystrophic endball** で起きているということです。

ちょっと長くなりましたが、2番目、コンドロイチン硫酸はどのように PTPR σ を制御しているのかということです。

簡単にコンドロイチン硫酸というのを説明しますと、コンドロイチン硫酸というのは、ここで水色で示した長い糖鎖になります。糖の鎖です。通常はコアタンパクというタンパク質に共有結合して、あわせてコンドロイチン硫酸プロテオグリカンと呼んだりもします。

このコンドロイチン硫酸ですけれども、D-グルクロン酸 (GlcA)、N-アセチル-D-ガラクトサミン

(GalNAc) という2糖の繰り返しになります。大体一個の鎖が 50 糖から 100 糖、これが 25 回から 50 回ぐらい繰り返しているわけです。そういう非常に長い糖鎖になります。

注意していただきたいのは、コンドロイチン硫酸は名前からもわかるように2糖の特定の部位が硫酸化され得るということです。硫酸化されないかもしれませんし硫酸化されるかもしれません。一本の鎖の中で硫酸化されているものもあるし硫酸化されていないものもある、そういう糖鎖です。

これがなぜ PTPR σ を単量体化、活性化できるのか調べました。それをやるときに、コンドロイチン硫酸を核としますと、一本の鎖が 50 糖、100 糖しかないけれども、硫酸化パターンによって全然構造も違うドメインがたくさんあるはずですよ。

僕たちが考えたのは、このコンドロイチン硫酸の特定の部位の硫酸化パターンが受容体と結合しているんじゃないか。100 糖あるんですけども、100 糖全部が受容体との結合に必要ということではなくて、このうちの特定の構造が受容体との結合に重要なのではないかということを考えて、これを決めれば何かわかるんじゃないかということで実験を行いました。

これはビアコア (Biacore) という実験で、この場合には PTPR σ をセンサーチップの上にのけておいて、そこに Analyte という、ここではコンドロイチン硫酸が Analyte になるわけですが、それを添加します。もしこの分子がリガンド、PTPR σ と Analyte のコンドロイチン硫酸が相互作用しますと、相互作用した分だけそのセンサーチップの質量が増えますので、それを縦軸で読み出しています。このレスポンスが上昇したら相互作用があったということです。

調べますと、先ほど申し上げたとおり、コンドロイチン硫酸は硫酸化パターンがいろいろありまして、代表的にはコンドロイチン硫酸 O とか A とか C とか E とかあります。ですので、それぞれの硫酸化パターンごとに調べたんですけど

も、コンドロイチン硫酸 E というタイプのみが PTPR σ と結合することがわかりました。

今まで、コンドロイチン硫酸がリガンドということがわかっていたんですけども、ここで初めて、コンドロイチン硫酸は何でもいいわけではなくて、コンドロイチン硫酸 E という構造でないとだめだということがわかったわけです。

これは天然物のコンドロイチン硫酸ですけども、化学合成したコンドロイチン硫酸でも同じような結果が出ました。

皆さんここで覚えておいてほしいのが、コンドロイチン硫酸 E という硫酸化パターンは非常にレアな硫酸化パターンです。コンドロイチンは長い糖鎖ですけども、大体その中の 3 % ぐらいしかない。3 % 未満の本当にレアな糖鎖になります。

コンドロイチン硫酸 E が大事だということがわかりましたので、次に、どういった長さが受容体の結合に必要なのかということで、8 糖、6 糖、4 糖と落としていきまして、少なくとも 4 糖の長さがあると PTPR σ と十分な相互作用があるということがわかりました。これを 2 糖までもう一つ短くしてしまうと結合は全くなくなります。100 糖あるわけですけども、その中の非常に非常にレアなコンドロイチン硫酸 E の 4 糖というところでコンドロイチン硫酸は PTPR σ と結合できると考えられます。

これが最終的に僕たちが考えたことで、もちろんこれを証明する実験も何個もやったんですけども、コンドロイチン硫酸は PTPR σ を単量体化して活性化します。なぜこれができるかというと、結合できる領域が鎖の中で本当に少ししかない。もしこれがたくさんあったら、クラスター化、多量体化してしまうんですけども、コンドロイチン硫酸に限っては結合できる領域が非常に少ない。1 本の鎖の上にたかだか 1 カ所しか PTPR σ と結合できないということを示すことができ、こういった機構で PTPR σ を活性化しているんだろうと結論することができました。非常に少ない CS-E が大事だということになります。

最後に、PTPR σ は受容体型チロシンフォスファターゼでありますけれども、特異的基質、チロシンを脱リン酸化する、その基質はどれかということが最後の疑問だったわけです。

ちょうどタイムリーに大阪大学の吉森先生たちのグループからこういう論文が出ました。これはオートファゴソームとライソゾームの融合を調べた論文ですけども、この融合過程にリン酸化 Cortactin、チロシンリン酸化 Cortactin が重要な役割をしているということを報告した論文です。

リン酸化 Cortactin、Cortactin がチロシンリン酸化されるとライソゾームの膜上に来て、そこでアクチン (Actin) を安定化させてオートファゴソームとライソゾームを融合させるというものです。これが脱リン化しちゃうと活性はありません。

この論文を見たときに、Cortactin が σ の基質になっているんじゃないかということで実験を行いました。この実験は、リン酸化 Cortactin を生成した PTPR σ の酵素ドメインとまぜますとチロシンの脱リン酸化が起きることを見たものです。

これは、PTPR σ をノックダウンすると Cortactin のリン酸化があると。PTPR σ を強制発現すると Cortactin 脱リン酸化が起きて、またコンドロイチン硫酸 E で増強されるということを示したウエスタンブロットになります。あわせて Cortactin が PTPR σ の直接の基質ではないかということを示したものです。

成長円錐と Dystrophic endball で見比べますと、成長円錐の中では見られた Cortactin のリン酸化が Dystrophic endball では完全に消失している。逆に Cortactin をノックダウンすると、さっき Chloroquine、Bafilomycin あるいはスネアタンパクのノックダウンで見たように Dystrophic endball の構造が誘導されるということで、Cortactin が PTPR σ の基質で Dystrophic endball の形成にもかかわっているんじゃないか

という結果を出すことができました。

今日こっちの話はあまりしませんでしたけれども、コンドロイチン硫酸が **PTPR σ** を活性化すると。ここの活性化の基盤も明らかにできましたし、**Cortactin** を脱リン酸化するのも明らかにできました。また、その結果、**Autolysosome** の形成がだめになってしまって、**Dystrophic endball** というものができる。これが神経の再生を阻害しているということを証明できました。

この論文が出たときに、台湾のチームとの共同研究でしたので、台湾で記者会見をすることができました。「千と千尋の神隠し」の舞台がすぐ近くにあったんですけれども、そこまで行って、すごくおいしい小籠包とすごく強いお酒を楽しみました。彼は英語の添削とかで非常に優秀なフィリピンの人で、すごく仲よくなれてよかったです。

あと、簡単に今何をやっているか。今のは終わった話で、何をやっているかということを5分ぐらいで話したいと思います。

1つは、**PTPR σ** を阻害すれば軸索の再生は起るんじゃないかということは皆さん考えつくかと思います。その話と、あと、今回 **PTPR σ** というものについて、特異的基質として **Cortactin**、たまたま運がよく見つけたんですけれども、こんな方法ではいけませんので、もっと効率よくこの分子の基質をとれないかということを考えていますので、紹介します。

イレッサとかクリゾチニブという薬ですけれども、受容体型チロシンフォスファターゼのちょうど逆の分子と言っているのかわかりませんが、受容体型チロシンキナーゼというのが特にがんの領域で創薬のターゲットになっていて、そういう薬が山ほどあるわけです。**EGFR** の阻害剤であるイレッサ、あるいは **ALK** の阻害剤であるクリゾチニブは創薬のすごいターゲットになって、こういう薬が本当にたくさん出ています。

ただ、不思議なことに、受容体型チロシンフォスファターゼといった薬はありません。実験室レ

ベルで使われる阻害剤というのはあるんですけれども、人に使えるような薬剤としてはまだ一個も出ていません。

なので、今回この **PTPR σ** を標的に、それを抑えることができる阻害剤ができるといいんじゃないかということで、一時期製薬会社と、名大の中にあるベンチャーの小さな会社ですけれども一緒にやっていたので御紹介します。

PTPR σ の特異的な低分子の阻害剤。脊髄損傷なんかに使えるといいなということで一応トライしてみました。ほとんどの実験は会社でしてもらったんですけれども、今回なぜこれできたかという、僕が **Cortactin** が基質であることを見つけたので、これを使って活性系が構築できたということです。この実験では、**Cortactin** という分子のリン酸化、チロシンリン酸化ペプチドと生成タンパク、精製 **PTPR σ** を用いてこういうスクリーニング系を構築しました。**PTPR σ** により **Dose dependent** に **Cortactin** の脱リン酸化が起こる、あるいは時間依存的に起きるということで非常にいいアッセイ系になるだろうということで、ライブラリーとしては少ないですけれども、大体2万個以上の既存薬のライブラリーをスクリーニングしまして、この中のどういった薬剤が **PTPR σ** による **Cortactin** 脱リン酸化を阻害できるかということで、3ヒット、2万個以上やって3つだけですけれどもヒットが得られました。

これを細胞に使ってみますと、**Cortactin**、**PTPR σ** を細胞に発現させると **Cortactin** 脱リン酸化が起きる。名前は出せないんですが、このお薬を入れておくと脱リン酸化がちょっと阻害されるんじゃないかということで。実はこの後、神経細胞を使った実験であまりうまくデータが出ていないので、これ以上お見せすることは今できませんけれども、こういうことをやっています。

もう1個は、受容体型チロシンフォスファターゼはなかなか基質が見つからないので、さっき言ったような創薬としての可能性もすごく狭まってしまうということで、この状況を何とかしたい

ということで、PTPR σ のキットを使って網羅的な基質同定法ができないかなということです。

最近はやっているんですけども、このビオチンリガーゼ (BirA) 融合タンパクという方法を使っています。今回はPTPR σ にビオチンリガーゼという酵素を融合させた融合タンパク質を細胞に発現させます。PTPR σ の基質分子なんかがこのPTPR σ に近接したときに、このビオチンリガーゼがすかさずビオチン化してくれるということです、この基質分子も。

通常、酵素基質の複合体は非常にトランジェントで非常に弱い結合で、免疫沈降なんかに落としてくると無理なわけですけども、この方法だとビオチンリガーゼの反応が速いので、弱い結合であってもこういう方式がつくれると。ビオチン化された基質あるいは相互作用タンパク質を簡単に生成してきて *in vitro* 分析で決めることができるということです。そうすると、PTPR σ は既に Trio とか Liprin- α とか既知の相互作用タンパク質があるんですけども、そういった分子もしっかりというか、1位2位でひっかかってくると。

あと、僕がただ単にラッキーであれば Cortactin もこの方法でひっかかってくるということで、こういった方法をうまく使えばこの基質の同定も簡単になるんじゃないかと思って今やっています。

本研究はいろんな共同研究者の方との成果になります。さっき新学術の話も出たんですけども、このプロジェクトも、神経動作生物学という新学術領域研究で始まった研究でして、そのとき古川先生も計画研究の中におられたので、たくさん議論させていただいて、大変ありがたく思っております。

今日はありがとうございます。(拍手)

○古川 どうもありがとうございました。

非常に基本的なところからわかりやすくお話いただきました。皆さんの中で、コメント、質問、何でも結構ですからどうぞ。

○質問者1 とても素晴らしいお仕事で、研究つ

てこうあるべきだなというくらい、堅実というかきれいなデータで、ありがとうございます。

聞きたいことがたくさんある状態ですが、少し。

まず、今回はコンドロイチン硫酸というふうに見ていたんですけど、一番最初にいろいろな阻害因子を挙げられて、今回、その1個の阻害ということであそまでのこと、その1つを見ているんですけど、実際にラットとかでやっても、要はコンドロイチン硫酸の機構をとめることだけではそれは難しい。

○坂元 非常に難しいところで、あれだけ阻害因子があるので1つだけとめてもどうかというのは確かにあるんです。ただ、実際やってみると1つだけ消すって、なくすって、さっきムービーで見たように出ますし、今回コンドロイチン硫酸にフォーカスしたというのは、**Dystrophic endball**をつくる活性があるというのはコンドロイチン硫酸だけなので、これが一番大事じゃないかということで、この機構を明らかにしようと思いました。

○質問者1 ありがとうございます。

いいですね、いろいろ。

話を聞いていて、**Dystrophic endball**ですけども、要はコンドロイチン硫酸があることによってそうなる。それがオートファゴソームの蓄積ということなんですね。グロースコーン、普通の正常で見るとき、オートファジーの網ってすごく起きるということですか。

○坂元 そうですね、非常に活発に起きています。

なぜ起きているかというのと、1つは、ミトコンドリアを除去するためです。軸索が進んでいくというのはすごいエネルギーを使うことで、ミトコンドリアは絶えず順行性に輸送されてそこで使われていくんです。古くなったミトコンドリアがたまっていきますので、恐らくそれを除去するためにオートファジーが非常に活発なんじゃないかなと思っています。それがとまってしまうと、ああいうふうに目に見えてたまっていく、見えるということです。

○質問者1 ありがとうございます。

最後ですけれども、最後、創薬ということですね、PTPR σ の結合の活性化なんてあるんですけれども、あれはモノマーであることによって活性化する。ダイマー、多量化して阻害する。本来というかふだん、要は外側にプロテオグリカンがないときというのはどういう状態でうろろしているんですか。

○坂元 実験的に本当によく言われて、レビューで査読のときも言われたんですけれども、僕が考えているのは、結構細胞表面ってヘパラン硫酸が多いんですね、膜タンパクとして。今日はお話ししませんでしたが、ヘパラン硫酸はクラスター化させることができるんです。なので、ふだんは細胞表面のヘパラン硫酸で σ はクラスター化しているのかなと考えております。

○質問者1 例えばそこでオートファジーが起きたいときとか、あるいはそれが解除されるような何かが起きて、外からのそういう刺激が来ないとオートファゴソームが起きないということですか。

○坂元 いや、起きてはいると思います。ただ、コンドロイチン硫酸が来るとそれをとめてしまう、オートファジーをとめてしまうということだと思います。

○質問者1 なるほど。

本当にいろいろ聞きたいことがあるんですけれども、1人でいろいろ聞いちゃうとあれなので。本当にきれいなデータありがとうございます。

○古川 ほかにいかがですか。

○質問者2 応用生物化学科の堤内です。ありがとうございます。

PTPR σ との結合ができるのが、コンドロイチン硫酸でもEのタイプだということで、しかも、4糖でも発現しちゃうということは、硫酸基の配置というのがすごく厳密に効いていると。

○坂元 と思っています。Eというタイプは2糖2硫酸というタイプで、2糖に対して硫酸基が2つつくというものですけれども、その硫酸基が効

いているというか。

○質問者2 結構そのサイトは大体予測がついているんですか。

○坂元 サイトですか。

○質問者2 そうです。バインドサイトみたいな。

○坂元 σ のほうのバインドサイトはわかっています。トップというか、一番上のN末のところのリジンのクラスターがあるんですね。

KKGKKという。やっぱり硫酸基の電気的な結合だろうなというのは思っていましたけれども。

○質問者2 やっぱりそれはコンドロイチン硫酸でないとフィットしないような。

○坂元 そうですね。

今日はお見せしなかったんですけれども、ヘパラン硫酸も同じところにくつつくんです。ヘパラン硫酸はどんな硫酸化構造、あるいはゼロ硫酸でも結合しちゃうんで、こういった使い分けに効いているんじゃないかというのが最終的な結論になります。糖化のバックボーンも大事なと思います。

○質問者2 ありがとうございます。

○古川 ほかにいかがですか。

今の絵で僕もひっかかっていたんですけれども、ヘパランがくつついてフォスファターゼ活性が落ちるというのは、PTPR σ の分子自身としては特に何か分子変化があるんじゃないかと、あそこでブロックしているような話として思っていますか。

○坂元 そうですね。非常に難しい話で。

フォスファターゼ活性がなくて恐らく何もしていないのか、あるいはこういった現象に何らかほかの意味があつてこういったシグナルを待っているのか。そういうふうに考えております。

○古川 ほかによろしいですか。いいですか。

先生どうもありがとうございました。

○坂元 ありがとうございました。(拍手)

○古川 それでは、6時も近くなつてまいりましたので、このフォーラムを終わりたいと思いますが、よろしいですか。

「中枢神経軸索はなぜ再生しないのか？」

だんだん寒くなってまいりましたので、皆さん
風邪を引かないように気をつけてお帰りくださ
い。どうもありがとうございました。