The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Akt/PKB prevents injury-induced motor neuron death and accelerates axonal regeneration
Author(s)	濤川, 一彦
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41836
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【4】

氏　　名	濤川一彦（なみかわかずひこ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　15209　号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生理系専攻
学位論文名	Akt／PKB prevents injury-induced motor neuron death and accelerates axonal regeneration. （Aktによる損傷運動ニューロンの細胞死防御と軸索再生促進）
論文審査委員	（主査） 教　授　遠山　正彌 （副査） 教　授　内山　安男　　教　授　三木　直正

論文内容の要旨

【目的】

運動神経軸索損傷後において、ニューロンが細胞死を回避し、再生するためには細胞外からの栄養因子のシグナルが細胞内へ入ることが重要であると考えられている。これまで我々は、栄養因子受容体の下流で活性化されると考えられる、細胞内情報伝達系に属する一連の分子群の発現促進が起こっていることを、損傷運動ニューロンにおいて明らかにしてきた。それらはRas－ERK系、あるいはPI3K－Akt系の2つのpathwayのいずれかに属する分子群である。培養系において、これらの経路の活性化によって、栄養因子除去後の神経細胞死が抑制されることが、既に明らかになっている。そこで、組換えアデノウィルスベクターを用いて、これらの経路をそれぞれ活性化、あるいは阻害する分子を損傷運動ニューロンに遺伝子導入し、in vivoにおけるこれらの経路の効果を検討した。

【方法ならびに成績】

運動神経損傷モデルとして、ラットの片側舌下神経損傷動物を用いた。舌下神経損傷時において、成熟ラットの損傷ニューロンは細胞死を回避し再生するが、生直後ラットのニューロンは細胞死をおこすことが知られている。そこで、まずラットの損傷運動ニューロンにおけるAktの発現変動を検討するため、in situハイブリダイゼーション法や、活性型Aktを認識する抗リン酸化Akt抗体を用いた免疫組織化学を行った。その結果、成熟ラットの損傷運動ニューロンにおいては、Akt1 mRNA、リン酸化Akt蛋白ともに発現上昇するのに対し、生直後ラット（生後3日）ではAkt1 mRNA、リン酸化Akt 蛋白ともに発現減少することが明らかになった。以上のことから、成熟ラットの損傷運動ニューロンにおいては、Aktが発現上昇し、活性化されることによって細胞死が防御されるが、生直後ラットではその活性化が起こらず細胞死にいたるということが示唆された。そこで、生直後ラットの損傷運動ニューロンでPI3K－Akt系、さらにRas－ERK系を活性化させることによって、これら2つの経路の細胞死防御効果を検討する事を試みた。Ras－ERK系、あるいはPI3K－Akt系をそれぞれ活性化させるため、活性型Aktアデノウィルス、活性型MAP kinase kinase（MEK）アデノウィルスを作製した。また、既に損傷運動ニューロンに対して細胞保護効果が示されているBcl－2の発現アデノウィルスも作製した。生後1日のラット片側舌よりアデノウィルスを逆行性輸送により取り込ませ、ニューロンに感染させた。その2日後に同側の舌下神経を切断し、さらにその12日後に脳切片を作製し、健常側に対する損傷側の運動ニューロンの生存率を検討した。その結果、活性型MEK感染動物での生存率は約20％となり、対照群であるLacZアデノウィルス感染動物との間に有為差はみられなかった。一方、

活性型 Akt アデノウィルス感染動物では生存率約35%となり，Bcl－2アデノウィルス感染動物と同程度の生存効果がみられた。以上のことから、損傷運動ニューロンにおいて Akt 系は細胞死防御効果をもつが、ERK 系にはその効果がないことが明らかとなった。

さらに、我々は活性型 Akt アデノウィルスを分化前のPC12細胞に感染させることによって、突起伸展が起こることを見いだした。そこで、Akt の in vivo における軸索再生促進効果を検討するため、神経損傷後に軸索再生が認められる成熟ラット損傷ニューロンに、活性型 Akt アデノウィルスを感染させ、損傷ニューロンの舌への軸索再投射を経時的に検討した。逆行性トレーサーである Fluolo Gold（FG）を両側舌に注入し、舌下神経終末からニューロンに取り込みを行い、健常側に対する損傷側の FG 陽性ニューロンの比率を再生の指標として用いた。その結果、各時点において活性型 Akt アデノウィルス感染動物では、対照群である LacZ 感染動物に比べFG陽性の損傷ニューロンが約20%有為に多いことが確認された。すなわち、活性型 Akt アデノウィルス感染動物では、損傷ニューロンの軸索再生が促進されていることが明らかとなった。

【総括】

損傷運動ニューロンでは、Akt が活性化し細胞死を防御するとともに、軸索再生を促進していることが、in vivo において明らかとなった。損傷ニューロンにおいて、どのような分子群が Akt の基質としてリン酸化されこのような現象が引き起こされるかが、今後の課題として残される。

論文審査の結果の要旨

本論文では、アデノウィルスベクターによる遺伝子導入を用いて、成長因子受容体の下流で活性化されると考えられる細胞内情報伝達系の Ras－ERK 系と PI 3 K－Akt 系を、ラット舌下神経切断後の損傷運動ニューロンで活性化あるいは不活化し、in vivo での効果の比較を行っている。まず、神経損傷後に細胞死を起こす幼弱ラットの運動ニューロンに損傷を与え、活性型 Akt（PI 3 K－Akt 系の活性化)、活性型 MEK（Ras－ERK 系の活性化）を発現させた。これにより、Akt には生存促進効果があるが、MEK にはその効果がないことを明らかにした。さらに、幼弱ラットの損傷運動ニューロンに Akt の dominant negative 変異体を発現させ PI 3 K－Akt 系を阻害すると、細胞死が促進される事を示した。以上のことから、PI 3 K－Akt 系は損傷運動ニューロンの生存に優位に働くことが明らかとなった。さらに、神経損傷後に細胞死を回避し再生が見られる成熟ラットの損傷運動ニューロンへも、dominant negative Akt を発現させている。その結果、成熟ラット損傷運動ニューロンでは、Akt 系を阻害しても細胞死が誘導されないことを明らかにした。このことは、成熟ラットの損傷ニューロンでは PI 3 k- Akt系に加え、Akt 非依存性の生存経路が存在することを示唆している。これまで、これら経路の生存効果に関する研究は in vitro の系を用いて行われたが、in vivo では神経系に限らず全く報告例がなく、とりわけ注目に値する。また、本論文は PC12細胞に活性型 Akt を発現させることによって、神経突起伸展が見られるという新たな現象を見いだしている。さらに成熟ラット損傷運動ニューロンに活性型 Akt を発現させることによって、in vivo において Akt が神経再生促進を引き起こすことも明らかにしている。以上の結果は、損傷ニューロンで細胞内情報伝達分子を遺伝子操作する事によって、新たな再生治療の可能性を提示している。以上より、損傷ニューロンの細胞死防御・再生の研究分野において、国際的な見地からみても本論文は高く評価されるべきものである。よって、本論文は学位論文に値するものと考えられる。