

# ラット顔面神経損傷時に働く シグナル分子の解析

2024 年 3 月

石嶋 貴志

目次	ページ (pp)
1. 序論	1-4
2. 材料及び方法	
2.1. 抗体と試薬	5-6
2.2. 動物と顔面神経傷害手術及び投薬	6-9
2.3. イムノブロッティング	10
2.4. 免疫組織化学	10-11
2.5. 新生仔ラット初代脳培養の調製	11
2.6. ミクログリアの調製	11-12
2.7. 統計処理	12
3. 結果及び考察	
3.1. IEGs (c-Jun、c-Fos) の変動と局在	13-21
3.2. CREB/ATF ファミリーの変動と局在	22-30
3.3. MAPKs の変動と局在	
3.3.1. ERK1/2	31-34
3.3.2. JNK	35-38
3.3.3. p38	39-45
3.4. M-CSF によるミクログリアの p38、CREB、ATF2 の活性化	46-47
3.5. 修復促進物質 (RPS) の探索	48-51
3.6. 損傷運動ニューロンに対する RPS 投与の効果	52-64
3.7. ミクログリアの増殖に対する RPS 投与の効果	65-77
4. 総合考察	
4.1. 神経傷害・修復・再生とミクログリア増殖に働く遺伝子	78-80
4.2. 傷害運動ニューロンとミクログリアの細胞間相互作用	81-83
5. 結論	84
6. 謝辞	85
7. 参考文献	86-92

## 1. 序論

損傷を受けた神経の機能回復は、神経科学領域で注目を集める研究トピックの一つである。ニューロンは細胞分裂をしないため細胞数が増えない上に、非常に死にやすい細胞であり、神経損傷や、神経変性疾患の治療は困難を極めている。特に、中枢神経系のニューロンは修復・再生がほとんど進まず死に至るので問題となるが、その中枢ニューロンの修復・再生を、末梢神経を利用して促進するアイデアが提唱されている。すなわち、修復・再生を進めることのできる末梢神経系とできない中枢神経系の違いを分子レベルで解明することで、中枢神経系においても効率良く神経再生を実現できるのではないかと期待されているのである。また近年、神経が傷害を受けた際に、ミクログリアやアストロサイトといったグリア細胞が神経の生存・修復を補助する役割を果たすことが明らかになり、ニューロン-グリア間の細胞間相互作用を理解することが求められている。

の神経損傷-修復-再生過程で起こる神経系細胞の応答および細胞間相互作用を解析する実験系の一つに、顔面神経傷害モデルがある。顔面神経傷害モデルは、ラットやマウスといったげっ歯類の顔面神経を傷害する動物実験系として確立されてきた (Moran and Graeber, 2004)。顔面神経は、脳から出る 12 対の脳神経のうち第VII脳神経であり、表情筋を動かす運動神経、涙腺や唾液腺の分泌に関与する副交感神経、舌の味覚に関与する味覚神経から構成される。そのうち、茎乳突孔と呼ばれる孔から中枢を出る神経軸索束は運動ニューロンのものであり、末梢神経に分類される。顔面神経の細胞体が集合している顔面神経核は、脳幹の左右に存在しており、それぞれが同側の表情筋を支配している。この顔面神経核内には、運動ニューロンの細胞体以外に、ミクログリアやアストロサイトが存在している。顔面神経傷害モデルでは、顔面神経核が左右独立していることを利用し、片側の顔面神経を茎乳突孔の位置で傷害し、傷害していない側の顔面神経核と比較をしながら、神経損傷-修復-再生の過程で見られる細胞個々の応答性や運動ニューロン-グリア間およびグリア-グリア間の細胞間相互作用を調べることができる。また、茎乳突孔での傷害は、頭蓋骨の外側での神経傷害であり、神経核内を傷つけることはない。また軸索傷害を行っても、神経核内の血液・脳関門は正常に維持されることが明らかになっている。従って、傷害側の神経核内には、血液から単球やマクロファージが流入しないため、神経系実質の

みの反応を見ることができる。これは傷害研究にとって大きな利点である。

これまでに、ラットの顔面神経傷害モデルでは、軸索切断された顔面神経核内において、傷害された運動ニューロンは、生存を維持しつつ、神経伝達物質であるアセチルコリンの合成酵素である choline acetyltransferase (ChAT)、合成されたアセチルコリンをシナプス小胞に詰める機能を担う vesicular acetylcholine transporter (VAChT)、代謝型アセチルコリン受容体の一つである m2 muscarinic acetylcholine receptor (m2MAchR)、抑制性神経伝達物質 GABA のチャンネル型受容体である GABA<sub>A</sub> receptor subunit (GABA<sub>A</sub>R $\alpha$ 1) といった、運動ニューロンの機能分子を減少させることが知られている (Ichimiya et al., 2013; Kikuchi et al., 2018)。一方で、上述のような機能分子の減少とは反対に、傷害された運動ニューロンで、グリコーゲン、グリコーゲン合成酵素、グルコーストランスポーター4、8 (glucose transporter ; GLUT 4, -8) といったエネルギー代謝に関わる分子が増加することが報告されている (Takezawa et al., 2014, 2015)。この傷害運動ニューロンにおけるグルコース代謝の亢進は、軸索を再生させ、標的筋肉へ再投射することにエネルギーを集中させる戦略なのではないかと考えられている。また、運動ニューロンの傷害は、運動ニューロン細胞体周辺のミクログリアの増殖 (Graeber et al., 1988; Yamamoto et al., 2010; Ishijima and Nakajima, 2023) およびアストロサイトの活性化 (Graeber and Kreutzberg, 1988) を引き起こす。これらの顔面神経傷害に伴う細胞応答は、運動ニューロンの生存や修復にとって非常に重要な現象である (Nakajima and Ishijima, 2022)。ミクログリアは、Neurotrophins (Elkabes et al., 1996; Nakajima et al., 2001) や glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) (Matsushita et al., 2008) をはじめとして多種にわたる神経栄養因子を産生・分泌する能力を持つ。傷害顔面神経核では、ミクログリアが損傷運動ニューロン細胞体を覆うように集積し、運動ニューロンに対して神経栄養因子を供給し、神経の生存・修復を補助していると推測される。反応性アストロサイトも様々な神経栄養因子を産生することから、傷害顔面神経核で、損傷運動ニューロンに対して神経栄養因子を供給し、神経の生存に貢献すると考えられている (Gehrmann et al., 1994)。

このように、傷害顔面神経核では、実に様々な傷害に対する細胞応答を観察することができる。しかし、これらの細胞応答が、どのようなシグナル系を介して起こっているのか

についてはほとんど解析されておらず情報も少ない。そこで本研究では、ラットの顔面神経傷害モデルを使用し、軸索を損傷した時に同側の傷害顔面神経核で起こるシグナル分子の増強または抑制と、それらがどの細胞種に局在しているのかを詳細に解析した。解析の対象分子として、細胞の初期応答に関連している immediate early genes (IEGs) の c-Jun と c-Fos (Sng et al., 2004)、神経機能に深く関わる CREB/ATF ファミリーとして、cAMP response element binding protein (CREB) (Carlezon et al., 2005; Landeira et al., 2018; Amidfar et al., 2020) と同ファミリーに属し、DNA 損傷やアポトーシスなどに関連している activating transcription factor 2 (ATF2) (Yuan et al., 2009) を選んだ。また、細胞機能に広く関連している mitogen activated protein kinase (MAPK) として extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2)、 c-Jun N-terminal kinase (JNK) および p38 (Thomas and Huganir, 2004; Liu et al., 2011) を選択した。本研究を遂行した結果、傷害運動ニューロンの IEGs、CREB/ATF ファミリーおよび MAPKs の各分子が、それぞれ特徴的な経時変化を示すことが明らかになり、これらの中で、生存維持に関与する転写調節因子 (c-Jun) および機能分子の発現に関与する転写調節因子 (p-CREB、p-ATF2) や MAPKs (ERK、JNK) を探り当てることができた。一方、この時、ミクログリアでは、p-CREB、p-ATF2 および p-p38/p38 が顕著に増加し、これらが増殖反応に関与することを明らかにした。このように、傷害運動ニューロンの機能低下とミクログリアの増殖という現象をシグナル分子の変動および活性化/不活性化から説明できるようになったことは、傷害・修復反応を理解する上で大きな意義がある。

上記のシグナル分子の解析に加え、運動ニューロンの傷害程度がミクログリアの増殖性に関連するかどうかを調べる実験も行った。ミクログリアの増殖は、顔面神経傷害後に見られる細胞応答の中でも、特に顕著な応答の一つである。このミクログリアの増殖は、顔面神経傷害モデル以外にも、坐骨神経傷害、脊髄傷害、脳外傷など、様々な神経傷害モデルでも観察される現象であり、研究対象として広く注目を集めてきた。軸索損傷時に見られるミクログリアの増殖は、損傷運動ニューロンを介して惹起されると考えられてきたが、運動ニューロンの傷害程度がミクログリアの増殖性に関連するかどうかについては不明であった。この関連性を調べる研究は、神経損傷-修復過程で起こる異種細胞間相互作用の解明に繋がる重要な意味を持っている。そこで、傷害運動ニューロンで起こるシグナル分子

の活性変動および量的変動を軽減する修復促進物質 (repair promoting substance; RPS) を探し出し、それらを傷害運動ニューロンに投与することにより、「運動ニューロンの傷害度とミクログリアの増殖レベルの関連性」を調べることにした。この検討は、長年取り残されてきた疑問の解消に貢献するものである。本研究では、RPS として神経保護作用や、細胞ストレスの軽減効果があることが知られている物質の中から、神経栄養因子の GDNF、抗酸化ストレス剤として N-acetyl-L-cysteine (NAC)、抗小胞体ストレス剤として Salubrinal (Sal) を使用した。RPS を神経傷害部に投与した結果、運動ニューロンの機能分子レベルが回復し、さらにミクログリアの増殖が抑制されることが明らかになったが、この研究によって、ミクログリアの増殖は一律・一定のものではなく、ニューロンの傷害程度によって調節されることを初めて示すことができた。ニューロンの傷害度とミクログリア増殖性の関連性については長年議論され取り残されてきた問題であったが、本研究によって解答が得られたことになる。

以上、本研究によって得られた知見並びに手法は、今後のニューロン修復・再生研究の進展に、また、ニューロン・グリア相互作用の研究に貢献すると考えられる。

## 2. 材料および方法

### 2.1. 抗体と試薬

抗 ChAT 抗体 (MAB5270) および抗 ChAT 抗体 (AB144P) は、それぞれ、Millipore (Temecula, CA) および Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO)から購入した。抗 VACHT (sc-7717)、抗 c-Jun (sc-1694)、抗 $\beta$ -Actin (sc-47778)、抗 ATF2 (sc-6233)、抗 MSK1 (sc-9392)、抗 GFAP (sc-33673) および抗 cFms (sc-692) 抗体は Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX) から購入した。イムノブロットング用の別の抗 c-Jun (#PC06) 抗体は Oncogene Science (Uniondale, NY) から購入した。免疫組織化学用の抗 Iba1 (ab5076) 抗体およびウエスタンブロットング用の抗 Iba1 抗体 (016-20001) は、それぞれ abcam (Cambridge, UK) および Fuji Film Wako (Osaka, Japan) から購入した。抗 c-Jun (#9165)、抗 c-Fos (#2250)、抗 p-CREB (#9196)、抗 CREB (#9197)、抗 p-ERK1/2 (#4370)、抗 ERK1/2 (#4695)、抗 p-JNK (#4668)、抗 JNK (#9258)、抗 p-p38 (#9215)、抗 p-p38 (#9212) および抗 p-MSK1 (#9591) 抗体は、Cell Signaling Technology (Danvers, MA) から購入した。免疫組織化学用の抗 p-CREB (Y011052) 抗体は abm® (Vancouver, Canada) から購入した。免疫組織化学用の抗 p-JNK (AF1205) 抗体は R&D Systems (Minneapolis, MN) から購入した。抗 CD11b (MCA275GA) 抗体は、Bio-Rad (Hercules, CA) から購入した。抗 GDNF (G8035) 抗体は Sigma-Aldrich®から購入した。抗 PCNA (#NA03) 抗体は Calbiochem® (San Diego, CA) から購入した。

Horseradish peroxidase (HRP) 結合抗ヤギ IgG (sc-2056) は Santa Cruz Biotechnology から購入した。HRP 結合抗ウサギ IgG (711-035-152)、HRP 結合抗マウス IgG (715-035-150)、Alexa Fluor® 488 結合抗ウサギ IgG (711-545-152)、Alexa Fluor® 488 結合抗ヤギ IgG (705-545-147)、Alexa Fluor® 594 結合抗マウス IgG (715-585-150) は、Jackson Immuno Research (West Grove, PA) から購入した。Alexa Fluor® 488 結合抗マウス IgG (A11001) および Alexa Fluor® 568 結合抗ウサギ IgG (A11011) は、Life Technologies™ (Carlsbad, CA) から購入した。Alexa Fluor® 568 結合抗ヤギ IgG (ab175704) は abcam から購入した。

ABC kit は Funakoshi (Tokyo) から購入した。3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) は Wako (Tokyo) から購入した。VectaMount™ は Vector Laboratories (Burlingame, CA) から入手した。Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) は、Thermo Fisher Scientific (Waltham,

MA) から入手した。M-CSF (M9170) は Sigma-Aldrich®から入手した。Aqua-Poly/Mount (18606) は Polysciences (Warrington, PA) から購入した。GDNF (G1401) は Sigma-Aldrich®から、N-acetyl-L-cysteine (NAC) (106425) は Calbiochem®から、Salubrinal (Sal) (HY-15486) は MCE® (Monmouth Junction, NJ) からそれぞれ購入した。Propidium iodide (PI) (343-07461) は富士フィルム和光純薬から購入した。

## 2.2. 動物と顔面神経傷害手術及び投薬

動物実験には、生後 8 週齢の雄の Wistar ラット (同腹子) を使用した。ラットは、餌と水を自由に摂取できる、12 時間の明暗サイクルに設定された環境で飼育された。すべての動物実験は創価大学の倫理規定に従って実施された。動物実験は創価大学倫理委員会の承認を得た。

シグナル分子の変動解析に向けて、イソフルラン麻酔下で、ラットの右顔面神経を茎乳突孔で切断した (Fig. 1)。軸索切断後 1.5、3、6、12 時間、または 1、3、5、7、14 日後に、ラットを麻酔下で断頭し、全脳を取り出した。

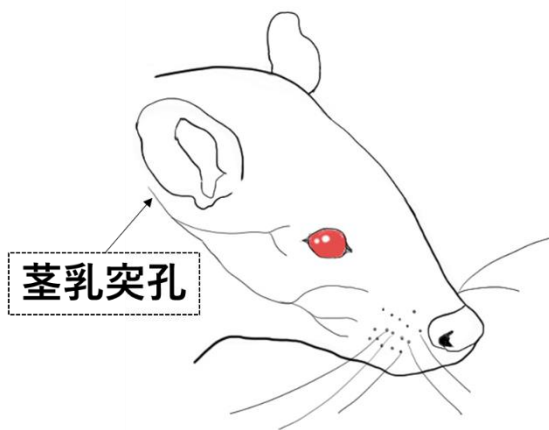
また、軸索切断された運動ニューロンに対する RPS (GDNF、NAC または Sal) の効果を評価する時は、茎乳突孔で左右両方の顔面神経を軸索切断し、左側の切断部位には溶媒を浸透させた Gelfoam を投与した ([Cut+vehicle])。一方、右側の切断部位には RPS 溶液を浸透させた Gelfoam を投与した ([Cut+RPS])。この手術系、すなわち、両側の軸索を切断し、片側切断部には溶媒、もう一方の切断側に RPS を投与する実験系は、 $[v^+Cut\ Cut^{+RPS}]$ 系と表示した (Fig. 2A,B,C)。20 ng/ $\mu$ L GDNF/PBS、100 mM NAC/PBS または 5 mM Sal/DMSO は、滅菌フィルター (0.2  $\mu$ m) に通し、RPS として使用した。一方、溶媒 (vehicle) としては、フィルター滅菌したリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) またはジメチルスルホキシド (DMSO) を使用した。

動物実験は、前述の $[v^+Cut\ Cut^{+RPS}]$ 系に加えて、さらに 3 種類行った。1 つ目は[Sham Sham]系で、両側の顔面神経に対して偽手術を施した (Fig. 2D)。2 つ目は[Sham Cut]系で、右側の顔面神経を切断し、他方 (左) には偽手術を行った (Fig. 2E)。3 つ目は[Cut Cut]系で、両側の顔面神経を切断した (Fig. 2F)。

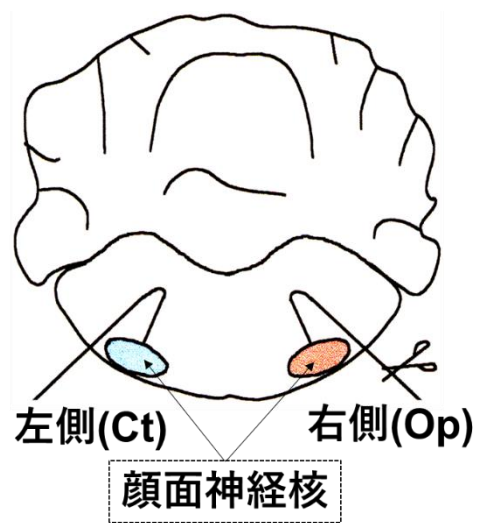


以上のように手術したラットは、損傷後 5 日目に、麻酔下に断頭し脳を回収した。神経損傷後 5 日という時点は、運動ニューロン機能分子とシグナル伝達分子のレベルが最低まで減少する時期であり、一方ミクログリア関連分子は最大になる時間である。回収した全脳は、使用するまで-80°Cに保存した。

A



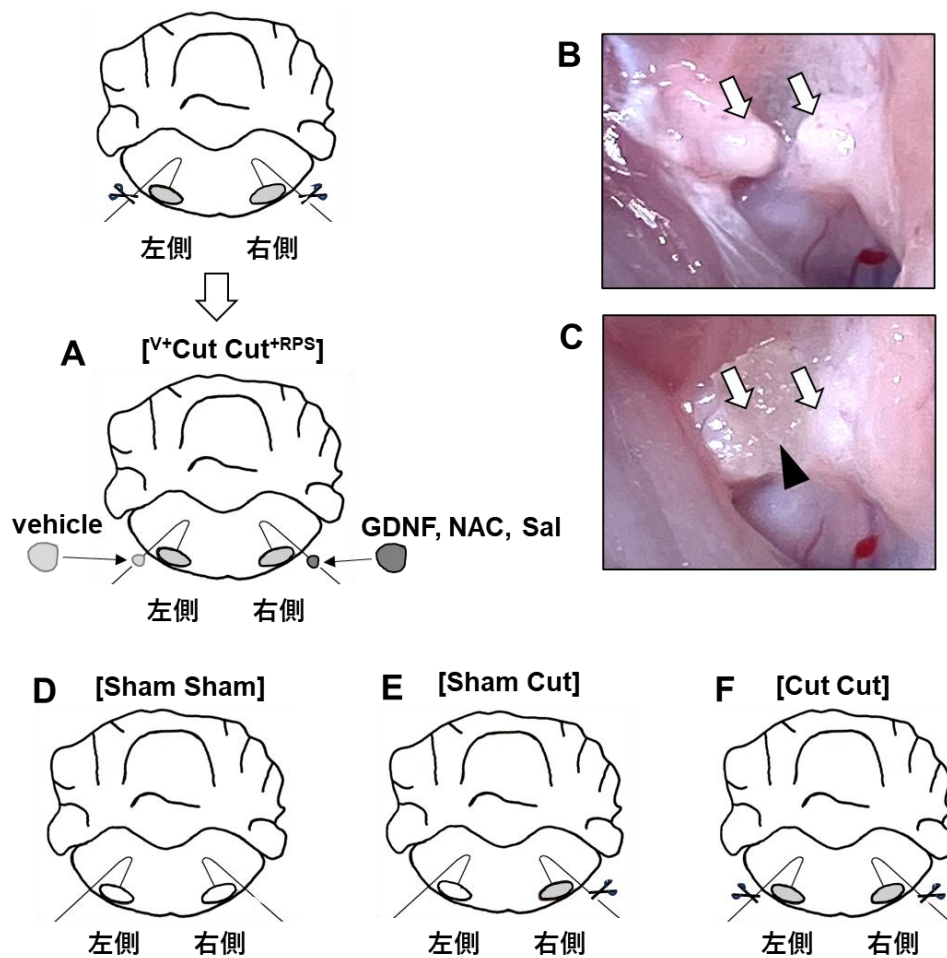
B



**Fig.1** ラットの顔面神経と顔面神経核

A. ラットの右側顔面神経と茎乳突孔の位置を示した。

B. 脳幹の環状切片で、左右の顔面神経核を示した。



**Fig. 2** ラットの顔面神経傷害・投薬システム

A. [ $V^+$ Cut Cut $^{+RPS}$ ]系。左側の切断部には、溶媒 (PBS または DMSO) を含む Gelfoam を、右側の切断部には RPS (GDNF、NAC または Sal) を含む Gelfoam を処理した。この場合、左側の顔面神経核は[cut+vehicle]、右側の顔面神経核は[cut+RPS]と表す。

B. 右側顔面神経の切断部。白矢印は軸索末端部を示している。

C. RPS の投与。軸索切断部に薬液を含ませた Gelfoam を置いた。白矢印は軸索末端部を、また、黒矢頭は Gelfoam を示している。

D. [Sham Sham]系。両側の軸索に対し疑似手術を行った。

E. [Sham Cut]系。左の軸索には疑似手術、右の軸索は切断した。

F. [Cut Cut]系。両側の軸索を切断した。

### 2.3. イムノブロットイング

凍結したラット脳から、左右の顔面神経核を凍結脳幹から注意深く切り取り、非還元 SDS サンプル緩衝液 [62.5 mM Tris HCl (pH 6.8)、2.3% SDS、10%グリセロール、2 mM ピロリン酸、2 mM NaF、2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>]を加え、100,000 g で 30 分間遠心分離を行った。上清を採取し、Lowry 法 (Lowry et al., 1951) によりタンパク質含有量を定量した。これらの組織抽出液を、4%の 2-メルカプトエタノールを含むように調製し、90°Cに加熱した。

試料 (組織抽出液) を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、ゲル内のタンパク質を PVDF 膜にトランスブロットした。その後、ウシ血清アルブミンやスキムミルクを含むブロッキング液で 1 時間ブロッキングを行い、メンブレンは一次抗体とともに 4°Cで一晩 (16 時間) 反応させた。翌日、HRP 標識二次抗体を加え、室温で 6 時間反応し、目的のバンドを ECL 法により検出した。

一次抗体は次のような希釈で使用した : c-Jun (1:1000)、 $\beta$ -Actin (1:2000)、c-Fos (1:500)、p-CREB (1:1000) 、CREB (1:1000)、ATF2 (1:1000)、p-ERK1/2 (1:1000)、ERK1/2 (1:1000)、p-JNK (1:1000)、JNK (1:1000) 、p-p38 (1:1000)、p38 (1:1000)、p-MSK1 (1:1000)、MSK1 (1:1000)、p-ATF2 (1:1000)、GDNF (1:1000)、ChAT (1:500)、GABA<sub>A</sub>R $\alpha$ 1 (1:1000)、Iba1 (1:1000)、cFms (1:1000)、PCNA (1:500)。

### 2.4. 免疫組織化学

ラットの顔面神経を切断後、5 日目に脳の灌流固定を行った。麻酔下で開胸し、200 mL の PBS、続いて 200 mL の 4%パラホルムアルデヒド (PFA) を用いて経心的に脳を灌流した。灌流固定した全脳を取り出し、4% PFA で一晩後固定した。その後、脳は 10%、20%および 30% のスクロース溶液に順番に浸漬し、-80°Cに保存した。脳幹をクライオスタット (Leica CM1860) によって、厚さ 10-20  $\mu$ m の切片に切断し、免疫組織化学染色に使用した。

ABC 染色を行う場合は、Vectastain® ABC kit を使用した。脳幹切片をブロッキング溶液中で一次抗体とともに 4°Cで 16 時間反応し、その後 10 mM PBS で洗浄した (5 分 $\times$ 2)。次に、切片をビオチン化二次抗体とともに 2 時間反応させた。10 mM PBS で洗浄後、アビジン-ビオチン複合体溶液を室温で 2 時間反応させた。切片は DAB/10 mM PBS で着色させた。

着色切片は、エタノールシリーズ・イソプロパノール・キシレンで脱水し、VectaMount™で封入した。

蛍光染色の場合、切片をブロッキング溶液中の一次抗体とともに 4°C で 16 時間反応し、次に蛍光標識二次抗体を加え 4°C で 16 時間反応させた。洗浄後、切片を Aqua-Poly/Mount で密封した。蛍光二重染色の場合、切片は、最初の一次抗体で 4°C、16 時間反応させた。洗浄後、切片を適切な二次抗体とともに 4°C、16 時間反応させた。その後、切片を、2 番目の一次抗体で 4°C、16 時間反応させた。次に適切な二次抗体で 4°C、16 時間反応させた。これらの切片を十分に洗浄し Aqua-Poly/Mount で封入した。

## 2.5. 新生仔ラット初代脳培養の調製

ラット新生仔の全脳 (小脳と脳幹を除去) をカミソリによって細断した。次にそれを、0.25%トリプシンと 0.01% DNase 1 で消化した。その後、細胞を 10% (v/v) ウシ血清 (HyClone™) を添加した DMEM に懸濁し、poly-L-lysine でコーティングされた 60 mm ディッシュに、 $2.5 \sim 3.0 \times 10^6$  cells/dish の密度で播種した。培養開始 1 週間後、これらの初代細胞は、RPS (NAC および Sal) の刺激実験に使用した。

RPS の刺激実験には、上記の初代細胞/ディッシュを、無血清 DMEM で 3 回洗浄し、同じ培地で 16 時間維持し、NAC (20 mM) または Sal (50  $\mu$ M) で刺激した。刺激後、一定時間で (0、5 分、10 分、30 分など)、細胞をスクレーパーで収集した。回収した細胞は凍結乾燥し、イムノブロット用の試料とした。

## 2.6. ミクログリアの調製

ミクログリアは、常法 (Oshiro et al., 2008) により、ラット新生仔脳の初代培養系から調製した。十分生育した初代培養細胞のボトルを穏やかに振盪することによってミクログリアを浮遊させ、60 mm ディッシュ (Nunclon) に  $1.5 \times 10^6$  cells/dish の密度で播種した。

M-CSF による刺激実験を行う場合は、ディッシュを無血清 DMEM で 3 回洗浄し、同じ培地で一晚 (16 時間) 維持した。各ディッシュのミクログリアは、M-CSF (20 ng/mL) で刺激し、0、5、10、15 および 30 分後に、ホスファターゼ阻害溶液 [20 mM Tris-HCl (pH 7.4)、

10 mM ピロリン酸、10 mM NaF、10 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>] を用いて回収した。回収したミクログリアは凍結乾燥し、-80°Cに保存した。必要に応じ、非還元 SDS 溶解液で可溶化し、細胞抽出液とした。これらの細胞抽出液は、p-CREB/CREB、p-ATF2/ATF2、p-MSK1/MSK1 および p-p38/p38 の分析に使用した。

## 2.7. 統計処理

ウェスタンブロットにおける運動ニューロンの機能分子、ミクログリア関連タンパク質およびシグナル伝達分子の量は、3 ~ 6 回の独立した実験の平均値 ± SD として表した。左の神経核と右の神経核間の差異、または[Cut+vehicle]核と[Cut+RPS]核間の差異は、Student t 検定によって評価した。0.05 未満の P 値を有意とみなした (ns; not significant、\*P<0.05、\*\*P<0.01)。

免疫組織化学によって染色された運動ニューロン、または、ミクログリアの細胞数および蛍光強度は、[対物レンズ (×2) と接眼レンズ (×10)]、または、[対物レンズ (×40) と接眼レンズ (×10)]の視野で測定した。3 匹のラットの顔面神経核から切り出した切片 3 枚ずつを染色し、1 切片あたり 5 視野 (ランダムに選択) を計測した。データは、平均値 ± SD で示した。左の神経核と右の神経核間の差異、または[Cut+vehicle]核と[Cut+RPS]核間の差異は、Student t 検定によって評価した。0.05 未満の P 値を有意とみなした (\*P<0.05、\*\*P<0.01)。

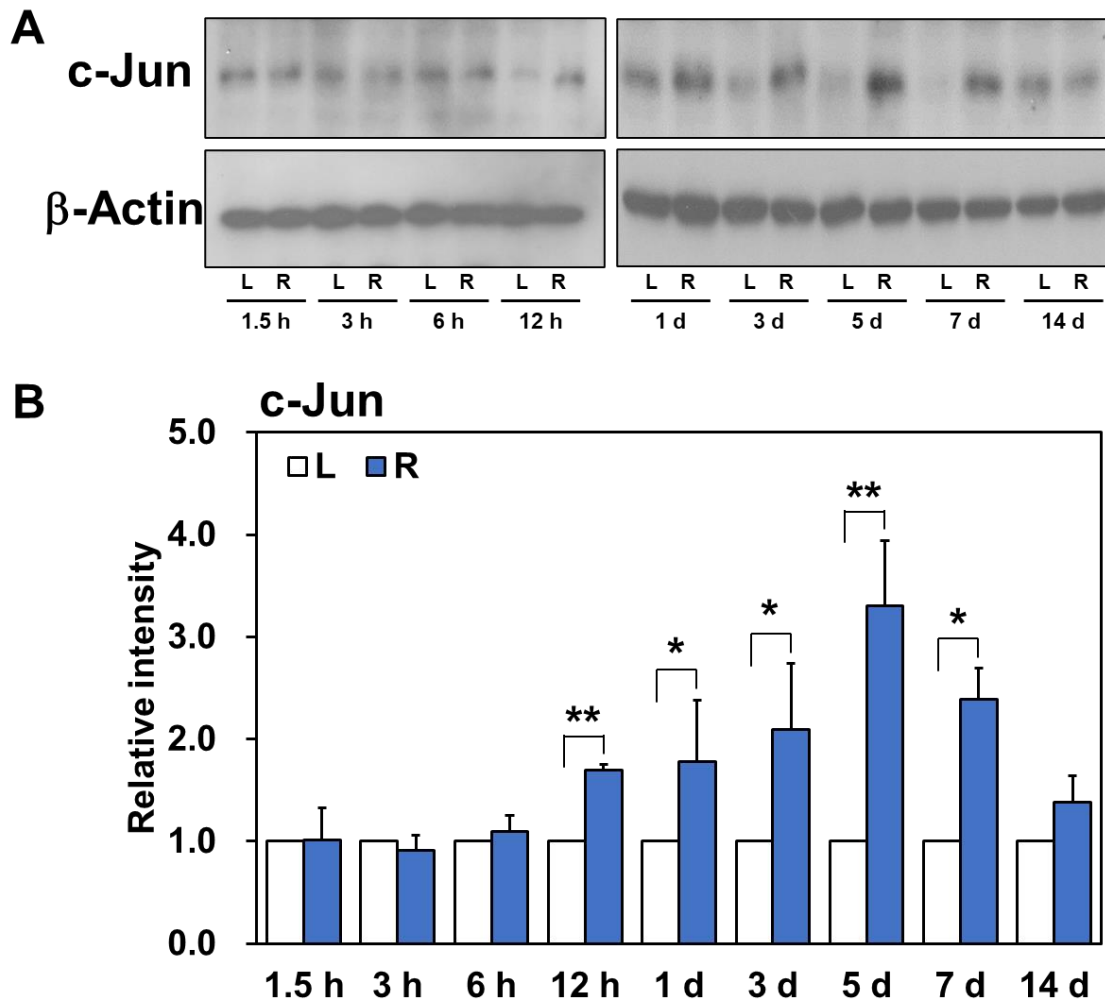
### 3. 結果及び考察

#### 3.1. IEGs (c-Jun, c-Fos) の変動と局在

一般的に、c-Jun と c-Fos は AP-1 として二量体を形成し、初期応答性の転写調節因子として機能する (Rauscher et al., 1988; Karin et al., 1997)。これらの c-Jun や c-Fos が、顔面神経が傷害を受けた直後に変動するのではないかと予想し、傷害後、1.5 時間から経時的変化を解析した。

非傷害側の神経核 (contFN) と傷害側の神経核 (axotFN) における c-Jun のレベルをイムノブロットで調べた (Fig. 3A)。β-Actin はローディングコントロールとして使用した。非傷害側の神経核 (L) では、c-Jun のバンドは薄かったが、傷害側 (R) では、濃いバンドとして検出された。軸索切断後の c-Jun の定量レベルは、傷害後 1.5、3、6、12 時間および 1、3、5、7、14 日で、それぞれ  $1.01 \pm 0.32$ 、 $0.91 \pm 0.15$ 、 $1.10 \pm 0.15$ 、 $1.70 \pm 0.06$ 、 $1.78 \pm 0.59$ 、 $2.10 \pm 0.64$ 、 $3.31 \pm 0.64$ 、 $2.39 \pm 0.30$ 、 $1.38 \pm 0.26$  を示した (Fig. 3B)。これらの結果から、c-Jun は傷害後 12 時間から 7 日まで、有意に増加していることがわかった。

次に、c-Jun の増加がどの細胞種で起こっているのかを明らかにするために、傷害後 5 日の脳幹切片を免疫組織化学的に染色した。その結果、contFN に比べて axotFN では、c-Jun を発現している核の数とその染色強度が増していることが分かった (Fig. 4)。運動ニューロンのマーカーとなる ChAT と c-Jun 抗体で蛍光二重染色を行ったところ、ChAT 陽性の運動ニューロンの核に c-Jun が存在することが明らかとなった (Fig. 5)。これらの結果から、c-Jun は傷害運動ニューロンの核で誘導されると考えられた。

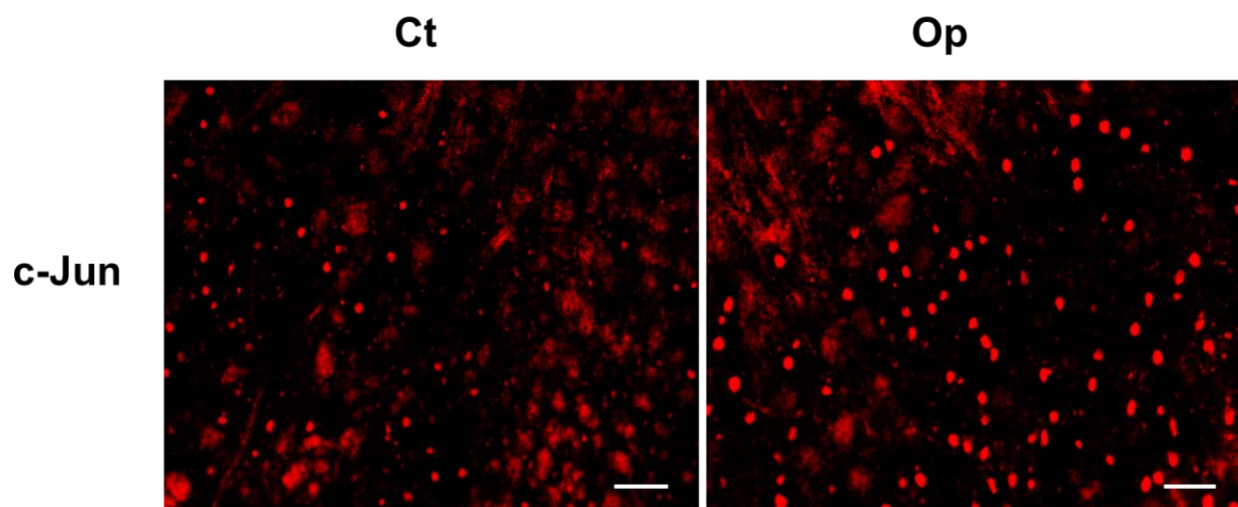


**Fig. 3 c-Jun の変動**

A: c-Jun のイムノブロット。神経損傷後 1.5、3、6、12 時間および 1、3、5、7、14 日に回収されたコントロール核 (L) および傷害核 (R) から組織抽出液を調製し、c-Jun のイムノブロットを行った。 $\beta$ -Actin はローディングコントロールとして使用した。

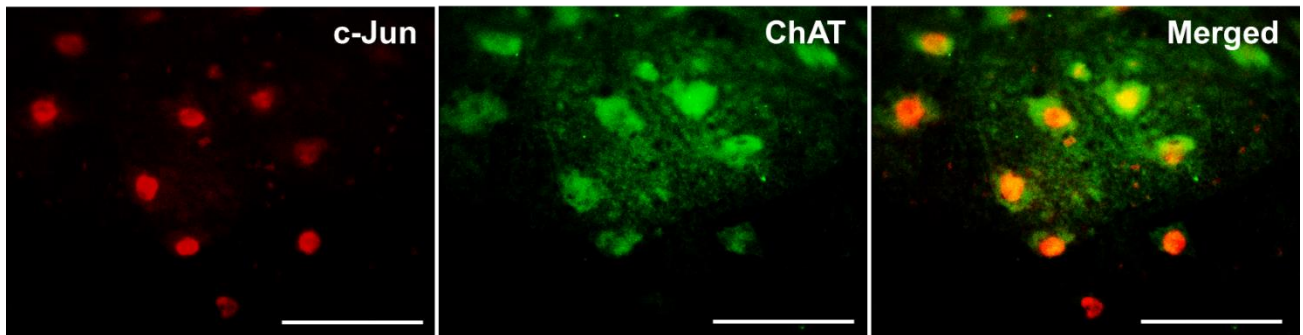
B: c-Jun の定量分析。傷害核 (R) の c-Jun のバンド強度は、コントロール核 (L) の強度 (1.00 として定義) に対する相対値として表した。示したデータは、3 ~ 5 回の独立した実験からの平均値  $\pm$  SD で表した。コントロール核 (L) と傷害核 (R) の間の差異は、t 検定によって評価した (\*  $P < 0.05$ 、\*\*  $P < 0.01$ )。





**Fig. 4** c-Jun の免疫組織化学染色

神経損傷後 5 日目に回収した脳幹の環状切片を、抗 c-Jun 抗体で染色し、コントロール (Ct) 核と傷害核 (Op) を比較した。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。

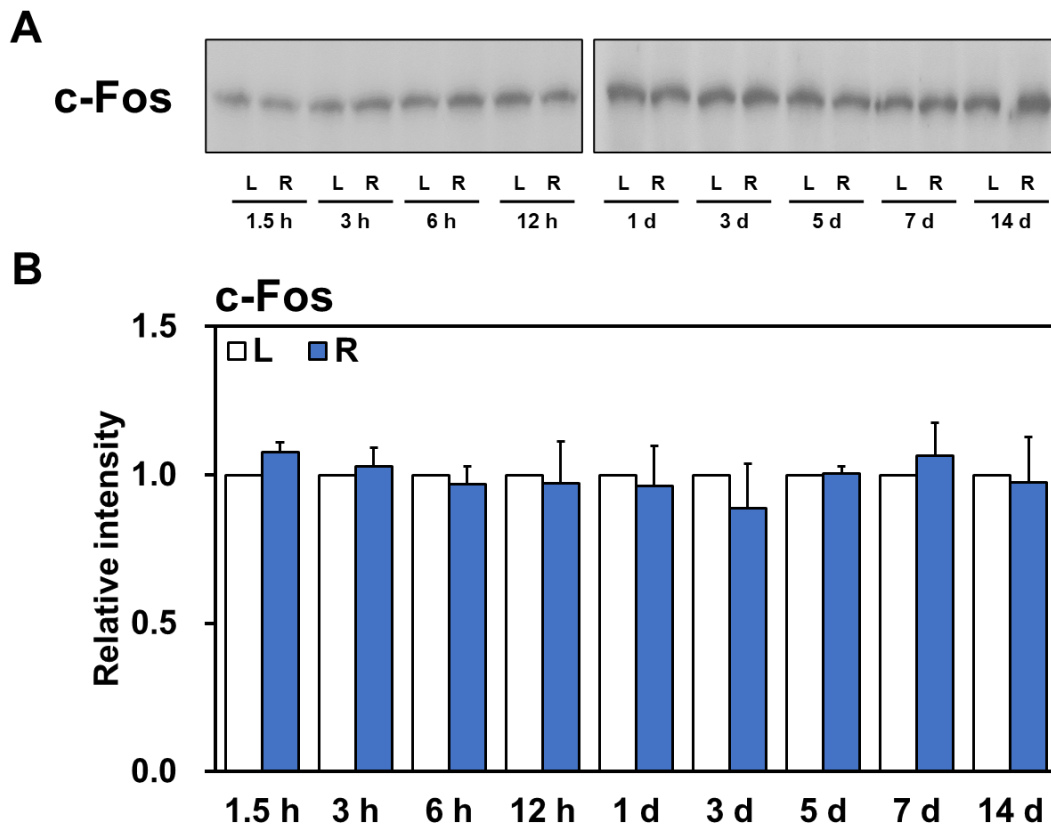


**Fig. 5** 抗 c-Jun 抗体と抗 ChAT 抗体による二重染色

脳幹切片を調製し、抗 c-Jun 抗体と抗 ChAT 抗体を用いて、二重染色を行った。c-Jun 発現細胞および ChAT 発現細胞は、それぞれ Alexa Fluor-568 (赤色) と Alexa Fluor-488 (緑色) によって視覚化した。両者を重ねた画像は、右側に表示した (Merged)。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。

一方で、c-Fos は顔面神経核で恒常的に発現しているものの、傷害後 1.5 時間から 14 日までの間、傷害に対する応答は見られなかった (Fig. 6A)。傷害側の定量値は、傷害後 1.5、3、6、12 時間および 1、3、5、7、14 日で、それぞれ  $1.08 \pm 0.03$ 、 $1.03 \pm 0.06$ 、 $0.97 \pm 0.14$ 、 $0.97 \pm 0.14$ 、 $0.96 \pm 0.14$ 、 $0.89 \pm 0.15$ 、 $1.00 \pm 0.02$ 、 $1.06 \pm 0.11$ 、 $0.97 \pm 0.15$  であった (Fig. 6B)。

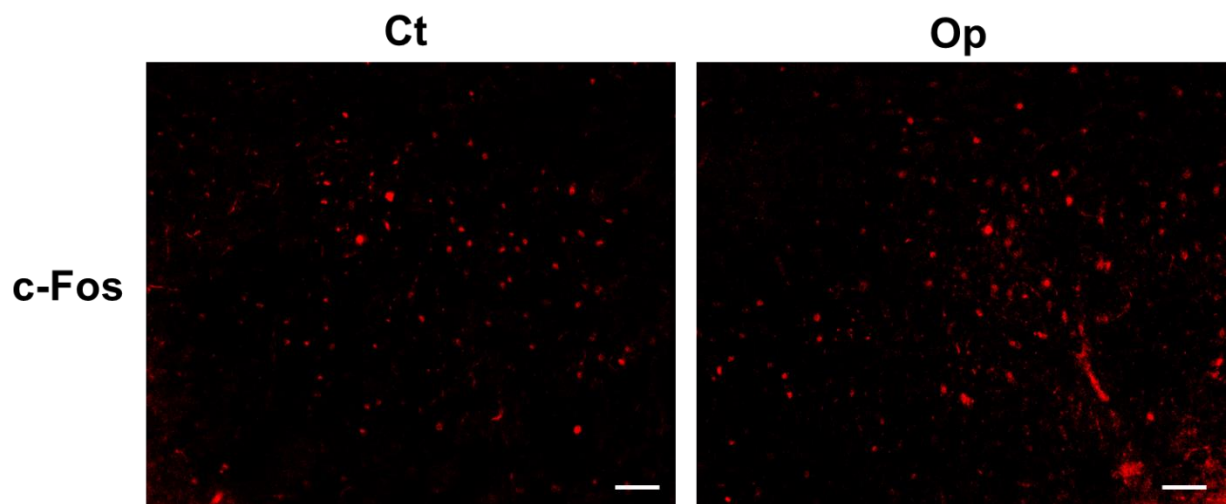
免疫組織化学染色の結果、c-Fos は両顔面神経核で同程度に発現しており、有意な差はみられなかった (Fig. 7)。蛍光二重染色により、c-Fos は主に ChAT 陽性の運動ニューロン核に局在していることが示された (Fig. 8)。これらの結果から、c-Fos は運動ニューロンにおいて恒常的に発現しているが、軸索傷害によって、そのレベルは影響を受けないことがわかった。



**Fig. 6 c-Fos の変動**

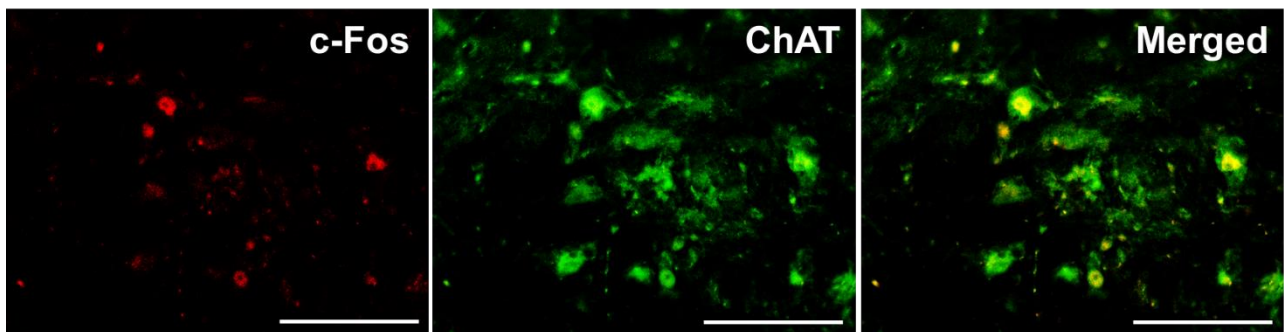
A. c-Fos の免疫ブロット。神経傷害後 1.5、3、6、12 時間および 1、3、5、7、14 日に回収されたコントロール核 (L) および傷害核 (R) から組織抽出液を調製し、c-Fos の免疫ブロットを行った。

B. c-Fos の定量分析。傷害側 (R) の c-Fos のバンド強度はコントロール核 (L) の強度 (1.00 として定義) に対する相対値として表した。示したデータは、3 回の独立した実験からの平均値  $\pm$  SD で表した。コントロール核 (L) と傷害核 (R) の間の差異は、t 検定によって評価した (\*  $P < 0.05$ 、\*\*  $P < 0.01$ )。



**Fig. 7 c-Fos の免疫染色**

神経損傷後 5 日目に回収した脳幹の環状切片を、抗 c-Fos 抗体で染色し、コントロール (Ct) 核と傷害核 (Op) を比較した。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。



**Fig. 8** 抗 c-Fos 抗体と抗 ChAT 抗体による二重染色

脳幹切片を調製し、抗 c-Fos 抗体と抗 ChAT 抗体を用いて、二重染色を行った。c-Fos 発現細胞および ChAT 発現細胞はそれぞれ、Alexa Fluor-568 (赤色) と Alexa Fluor-488 (緑色) によって視覚化した。両者を重ねた画像は、右側に表示した (Merged)。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。

c-Jun のレベルは神経傷害後 12 時間から運動ニューロンで増加した。一方で c-Fos のレベルは傷害による影響を受けなかった。c-Jun と c-Fos が AP-1 を形成し、その AP-1 が転写調節因子として機能することを考えると、傷害顔面神経核における AP-1 形成は、一定量の c-Fos の存在下 c-Jun の上昇によって増加する可能性が高い。また、この c-Jun が主導する AP-1 の役割は、おそらく神経細胞の修復遺伝子の転写促進にあると考えられる。実際に、Herdegen らは、ラットの坐骨神経傷害モデルで、c-Jun が損傷した後根神経節や運動ニューロンあるいは後角に誘導されることを示しており (Herdegen et al., 1992)、c-Jun の神経保護および修復・再生への働きを推測している (Herdegen et al., 1997)。さらに、c-Jun は、マウスの顔面神経傷害モデルにおいて、軸索の再生反応に必須であることが報告されている (Raivich et al., 2004)。以上の報告から、c-Jun が神経の修復・再生過程に関与することが示唆された。

c-Fos は、タンパク質レベルではほとんど研究されておらず、傷害を受けたニューロンにおける変動性や、機能については全く解明されていない。Haas らは、c-Fos の mRNA は、axotFN では検出されなかったと述べている (Haas et al., 1993)。彼らの結果とは異なり、私はラットの顔面神経核で c-Fos タンパク質が運動ニューロンに一定量存在し、そのレベルは顔面神経傷害によってほとんど変動しないことを示した。解析前は、c-Fos も c-Jun と同様、神経傷害後に増加し、AP-1 の増加に寄与すると考えていたが、以上のように、傷害を受けた顔面運動ニューロンにおける AP-1 の形成は、c-Fos ではなく c-Jun の発現量により調節されるという結果を得た。

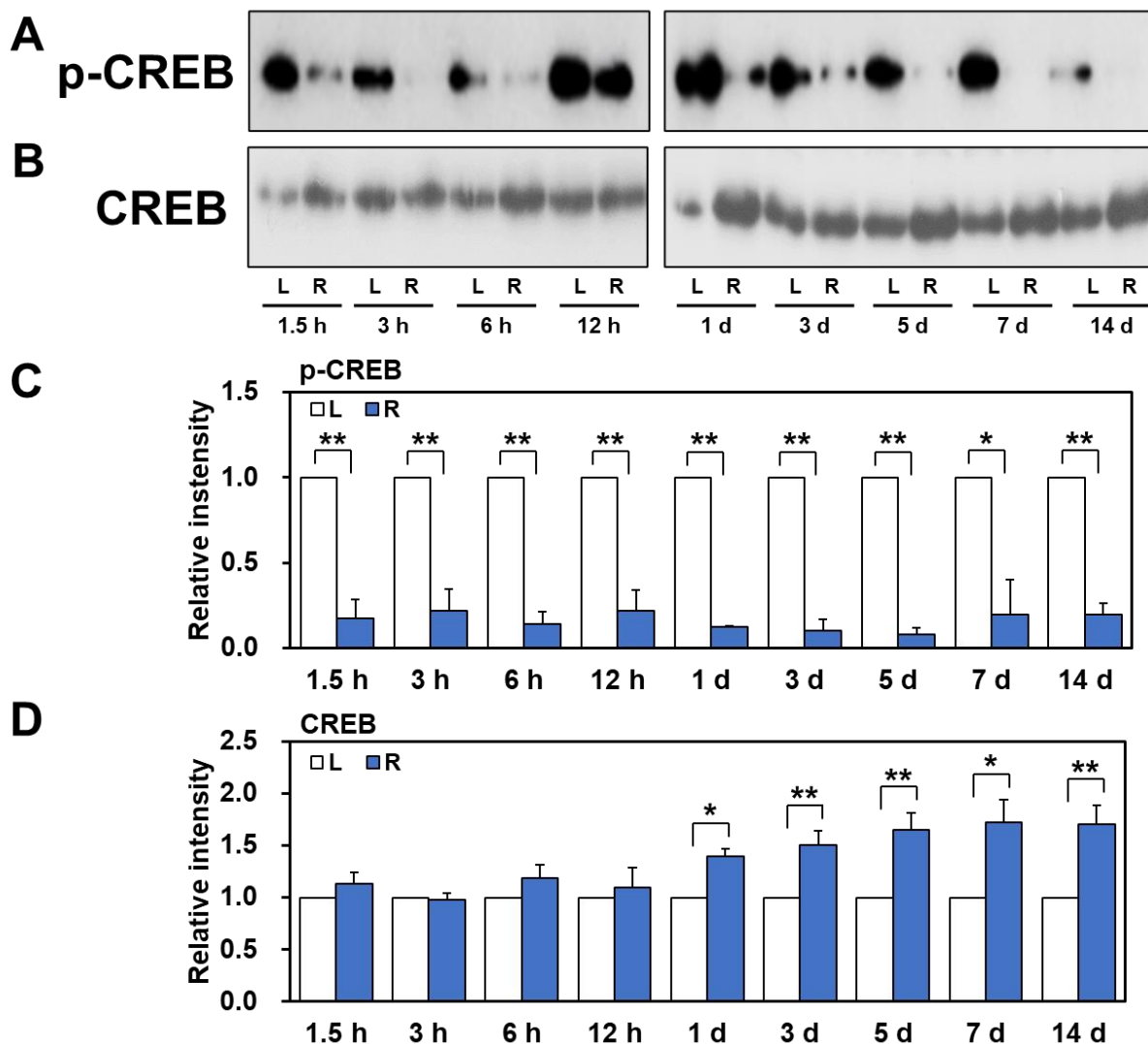
### 3.2. CREB/ATF ファミリーの変動と局在

CREB/ATF ファミリーの転写調節因子は、ニューロンの活動依存的な転写、可塑性、記憶、生存など神経機能において多様な役割を果たすことが知られている (Cox et al., 2008)。傷害および非傷害顔面神経核をイムノブロットで調べた結果、p-CREB は傷害後 1.5 時間から顕著に減少し、14 日までの間、低値を示した (Fig. 9A)。一方、CREB は傷害後 1-14 日の間で、contFN に対し axotFN で増加していた (Fig. 9B)。p-CREB の定量結果は、傷害後 1.5、3、6、12 時間、および 1、3、5、7、14 日で、それぞれ  $0.18 \pm 0.11$ 、 $0.22 \pm 0.13$ 、 $0.14 \pm 0.07$ 、 $0.22 \pm 0.12$ 、 $0.12 \pm 0.01$ 、 $0.10 \pm 0.07$ 、 $0.08 \pm 0.04$ 、 $0.20 \pm 0.20$ 、 $0.20 \pm 0.06$  であった (Fig. 9C)。一方、CREB の定量結果は、傷害後 1.5、3、6、12 時間、および 1、3、5、7、14 日で、それぞれ  $1.13 \pm 0.11$ 、 $0.98 \pm 0.06$ 、 $1.18 \pm 0.13$ 、 $1.10 \pm 0.19$ 、 $1.39 \pm 0.07$ 、 $1.50 \pm 0.13$ 、 $1.65 \pm 0.17$ 、 $1.72 \pm 0.21$ 、 $1.70 \pm 0.19$  であった (Fig. 9D)。これらの結果から、活性型 CREB (p-CREB) は、傷害後 1.5 時間から 14 日までの間、有意に減少するが、CREB は、傷害後 1-14 日の間、有意に増加することが分かった。

次に、免疫組織化学的に、p-CREB と CREB の局在を調べた。ABC 染色の結果、contFN では、p-CREB が大型の細胞と小型の細胞の核に染色されていたが、axotFN では、大きな細胞の核での染色性が減少し、小さい細胞の核の数が増加していた (Fig. 10A)。CREB は、contFN で大小の細胞の核に染まっていたが、axotFN では小さい細胞の核の数が増えていた (Fig. 10B)。

蛍光二重染色により、CREB 抗体陽性の大きな核は、ChAT 抗体に陽性の運動ニューロンの核と一致した (Fig. 11A)。一方で、CREB 抗体に陽性の小さい核は、CD11b 陽性ミクログリアの核と一致し (Fig. 11B)、glial fibrillary acidic protein (GFAP) 陽性アストロサイトとは一致しなかった (Fig. 11C)。以上の結果から、無傷の運動ニューロンでは CREB は活性化されて機能しているが、軸索切断傷害を受けると著しく不活性化されることが分かった。一方、この時、axotFN のミクログリアでは、CREB が活性化されていた (後述)。

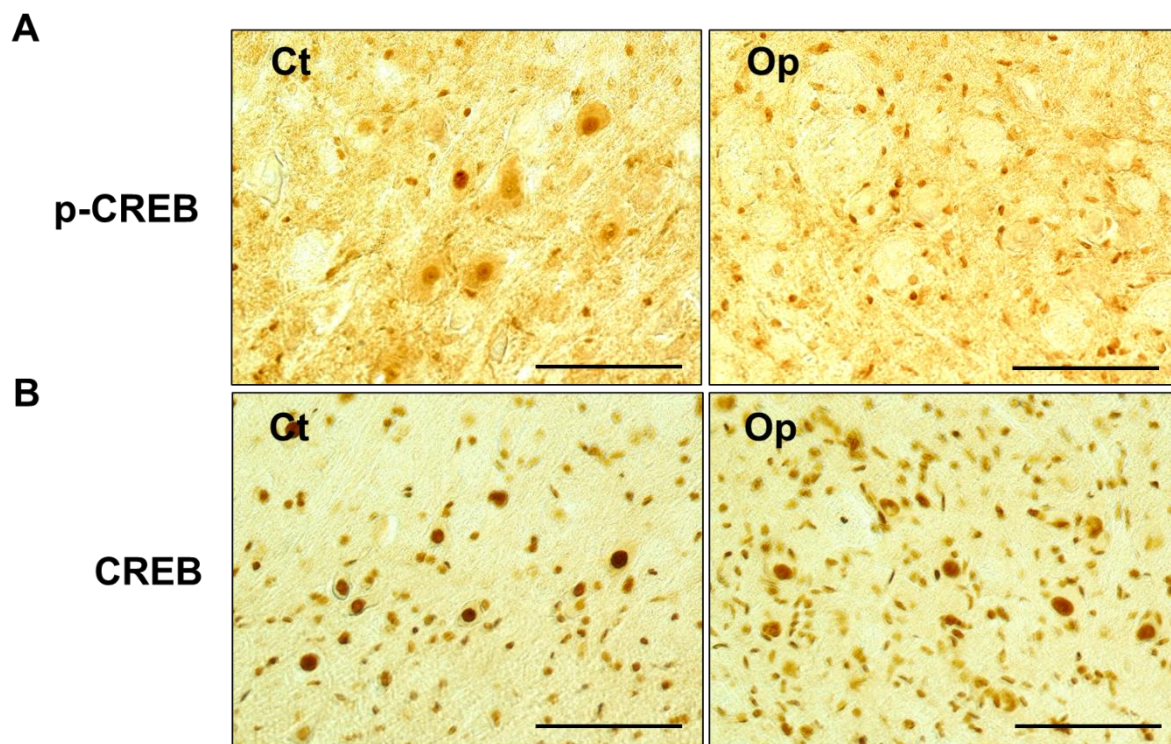




**Fig. 9 p-CREB/CREB の変動**

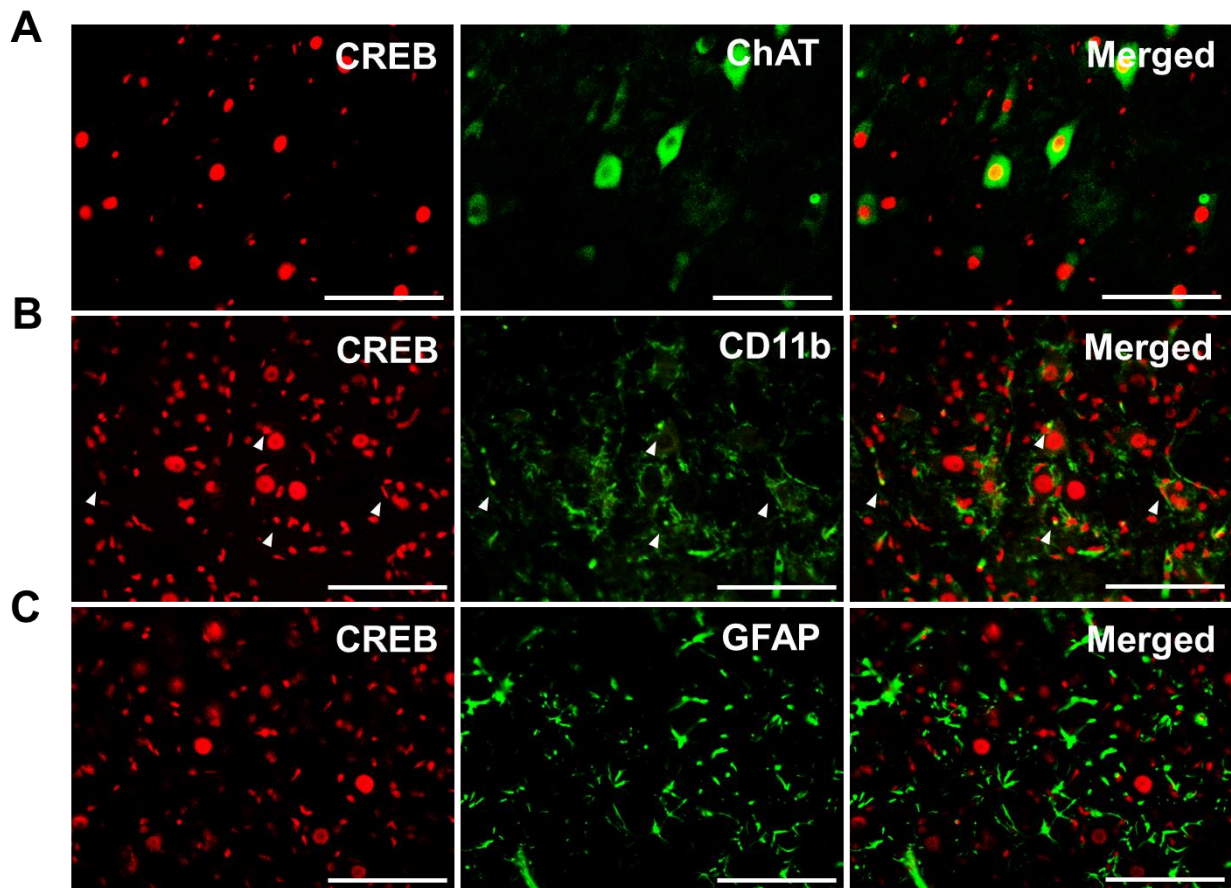
A, B. p-CREB および CREB のイムノブロット。神経傷害後、1.5、3、6、12 時間、および 1、3、5、7、14 日に回収されたコントロール核 (L) および傷害核 (R) から組織抽出液を調製し、p-CREB (A) および CREB (B) のイムノブロットを行った。

C, D. p-CREB および CREB の定量分析。傷害核 (R) の p-CREB (C) または CREB (D) のバンド強度は、コントロール核 (L) の強度 (1.00 として定義) に対する相対値として表した。示したデータは、3 ~ 4 回の独立した実験からの平均値  $\pm$  SD で表した。コントロール核 (L) と傷害核 (R) 間の差異は、t 検定によって評価した (\*  $P < 0.05$ 、\*\*  $P < 0.01$ )。



**Fig. 10 p-CREB/CREB の免疫染色 (ABC 法)**

神経損傷後 5 日目に回収した脳幹切片を、抗 p-CREB 抗体 (A) および抗 CREB 抗体 (B) で染色した。p-CREB および CREB の発現レベルを、コントロール核 (Ct) と傷害核 (Op) の間で比較した。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。



**Fig. 11** 抗 CREB 抗体と運動ニューロン/グリアマーカーによる二重染色

脳幹切片は、抗 CREB 抗体/抗 ChAT 抗体 (A)、抗 CREB 抗体/抗 CD11b 抗体 (B)、または抗 CREB 抗体/抗 GFAP 抗体 (C) の組み合わせで二重染色を行った。CREB は Alexa Fluor-568 (赤色) で可視化し、ChAT、CD11b および GFAP は Alexa Fluor-488 (緑色) で可視化した。両者を重ねた画像は、右側に表示した (Merged)。中段の画像 (B) 中の白い矢頭は CREB 抗体陽性の核を示している。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。

これらの結果は、傷害運動ニューロンにおいて CREB を介した転写活性が低下し、CREB によって調節されている機能分子の発現が減少したことを示している。関連する研究として、Hu らは、ラットの初代新皮質培養系を使用した実験で、GABA<sub>A</sub>R $\alpha$ 1 の発現が、CREB 活性によって調節されることを報告している (Hu et al., 2008)。また、p-CREB の低下したラットの axotFN では、GABA<sub>A</sub>R $\alpha$ 1 のレベルが有意に減少することが示されている (Kikuchi et al., 2018)。以上の結果から、運動ニューロンの CREB 活性は、機能分子の発現量を調節する重要な役割を果たしていると考えられた。CREB は、主に 3 つの経路、すなわち、cAMP 依存性プロテインキナーゼ A (PKA) 経路、プロテインキナーゼ C (PKC) 関連経路または MAPK 経路を通じて活性化される (Deisseroth et al., 2002; Koga et al., 2019)。従って、axotFN の傷害運動ニューロンでは、これらの経路のいずれか、あるいは、全ての経路において、CREB が不活性化され、そのために機能分子が低下している可能性がある。

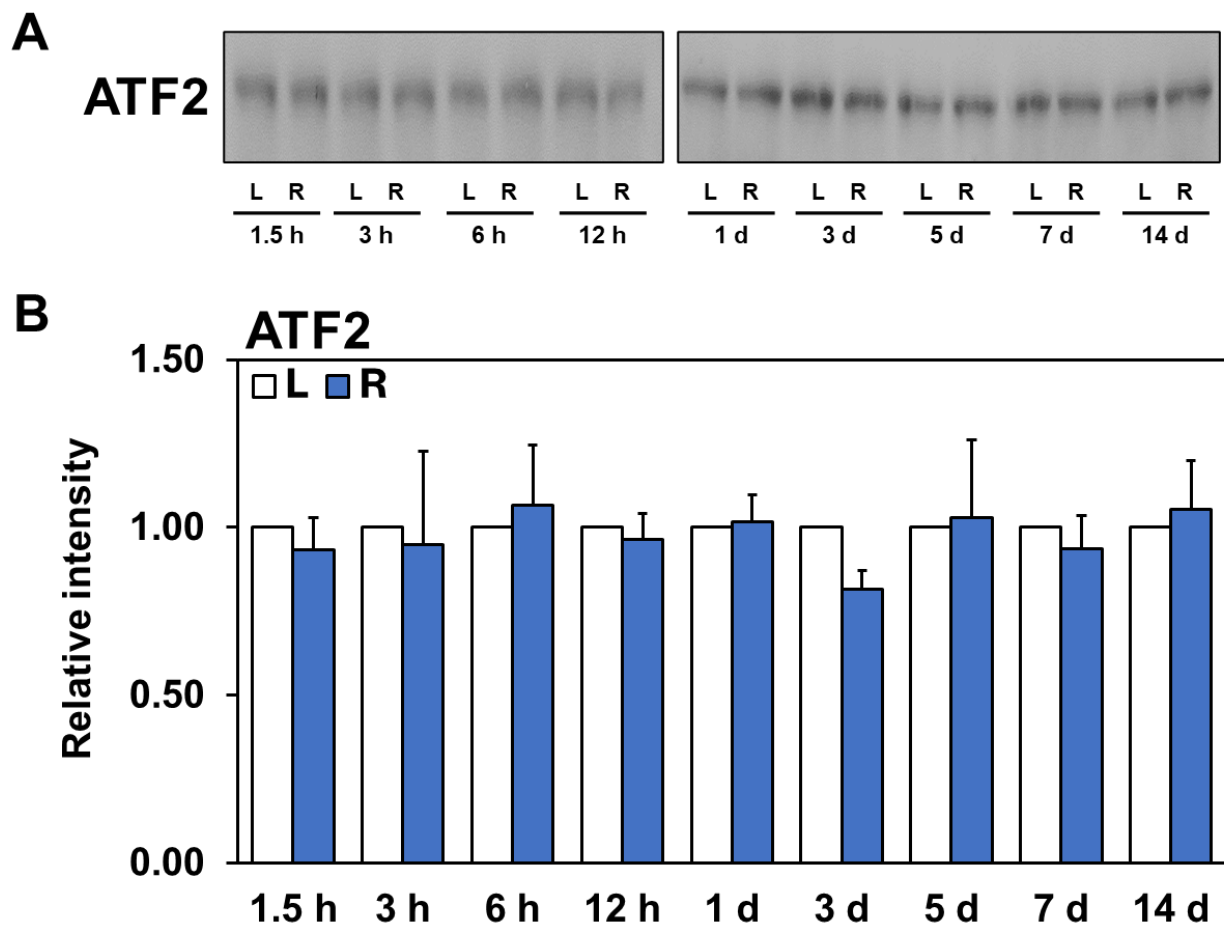
興味深いことに、免疫組織化学的染色によると、axotFN では、p-CREB/CREB を発現するミクログリアが増加することがわかった。傷害後 3-5 日の時点で増加するミクログリアの p-CREB は、増殖反応と密接な関連があると考えられる (後述)。

ATF2 は、抗アポトーシス、細胞増殖、DNA 損傷など、様々な細胞応答に働く転写調節因子である。イムノブロットの結果、axotFN の ATF2 レベルは、contFN と比較し、大きな変化は見られなかった (Fig. 12A)。定量結果は、1.5、3、6、12 時間、および 1、3、5、7、14 日で、それぞれ、 $0.93 \pm 0.09$ 、 $0.95 \pm 0.28$ 、 $1.07 \pm 0.18$ 、 $0.96 \pm 0.08$ 、 $1.02 \pm 0.08$ 、 $0.82 \pm 0.05$ 、 $1.03 \pm 0.23$ 、 $0.94 \pm 0.10$ 、 $1.05 \pm 0.14$  であった (Fig. 12B)。

ABC 染色の結果では、p-ATF2 は contFN で大きな細胞の核に染まっていたが、axotFN では、その染色性が低下していた (Fig. 13A)。一方で、contFN では染まっていなかった小さな細胞の核が、axotFN では増加していた (Fig. 13A)。ATF2 は、contFN では、主に大型の細胞核に存在していたが、axotFN では、それと共に、多数の小型細胞核に認められた (Fig. 13B)。

ATF2 陽性の大きな細胞の核は、抗 ChAT、CD11b、GFAP 抗体との二重染色から、運動ニューロンのものであり、小さな ATF2 陽性の細胞核はミクログリアのものであることが示された (Fig. 14A,B,C)。これらの結果から、運動ニューロンにおける ATF2 の活性は、軸索

切断によって減少することが分かった。一方で、ミクログリアは神経損傷に応答して ATF2 を活性化させた。Li らは、*in vivo* および *in vitro* の系を使用し、lipopolysaccharide (LPS) でミクログリアを刺激すると ATF2 の活性化が促進されることを報告している (Li et al., 2019)。この ATF2 の活性化は、ミクログリアの機能亢進 (活性化反応) に関与することを示唆している。

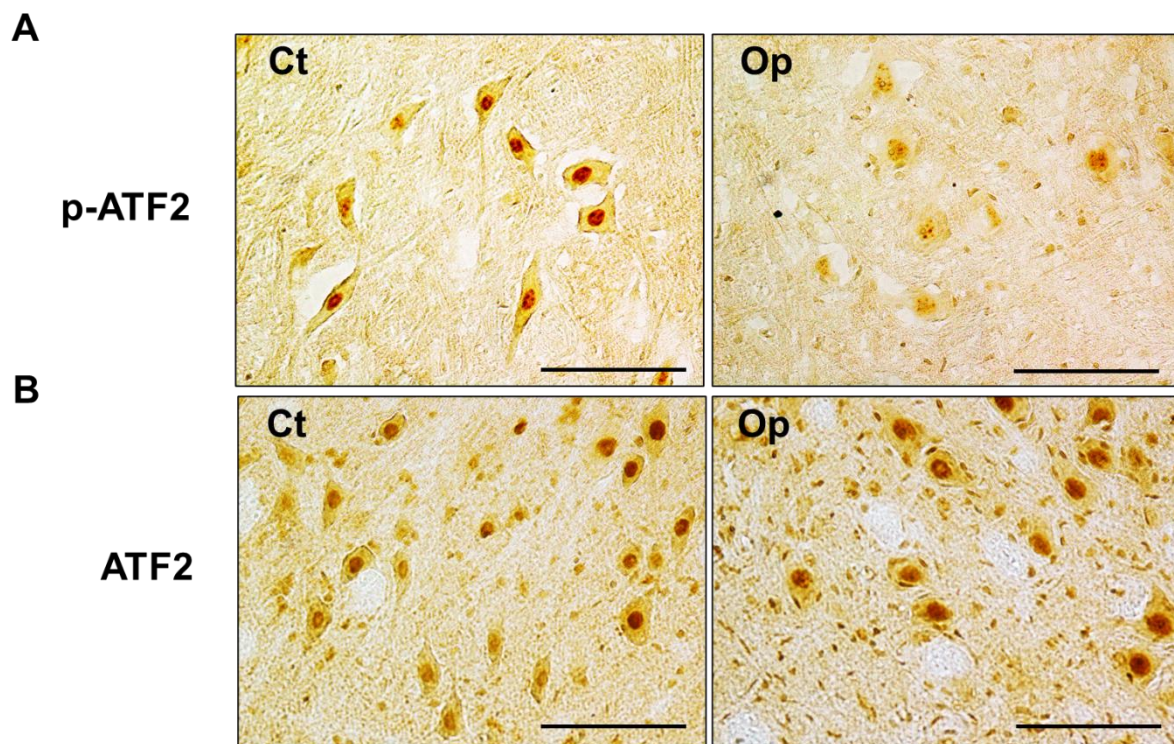


**Fig. 12 ATF2 の変動**

A. ATF2 のイムノブロット。神経傷害後、1.5、3、6、12 時間および 1、3、5、7、14 日に回収されたコントロール核 (L) および傷害核 (R) の組織抽出液を、イムノブロットによって分析した。

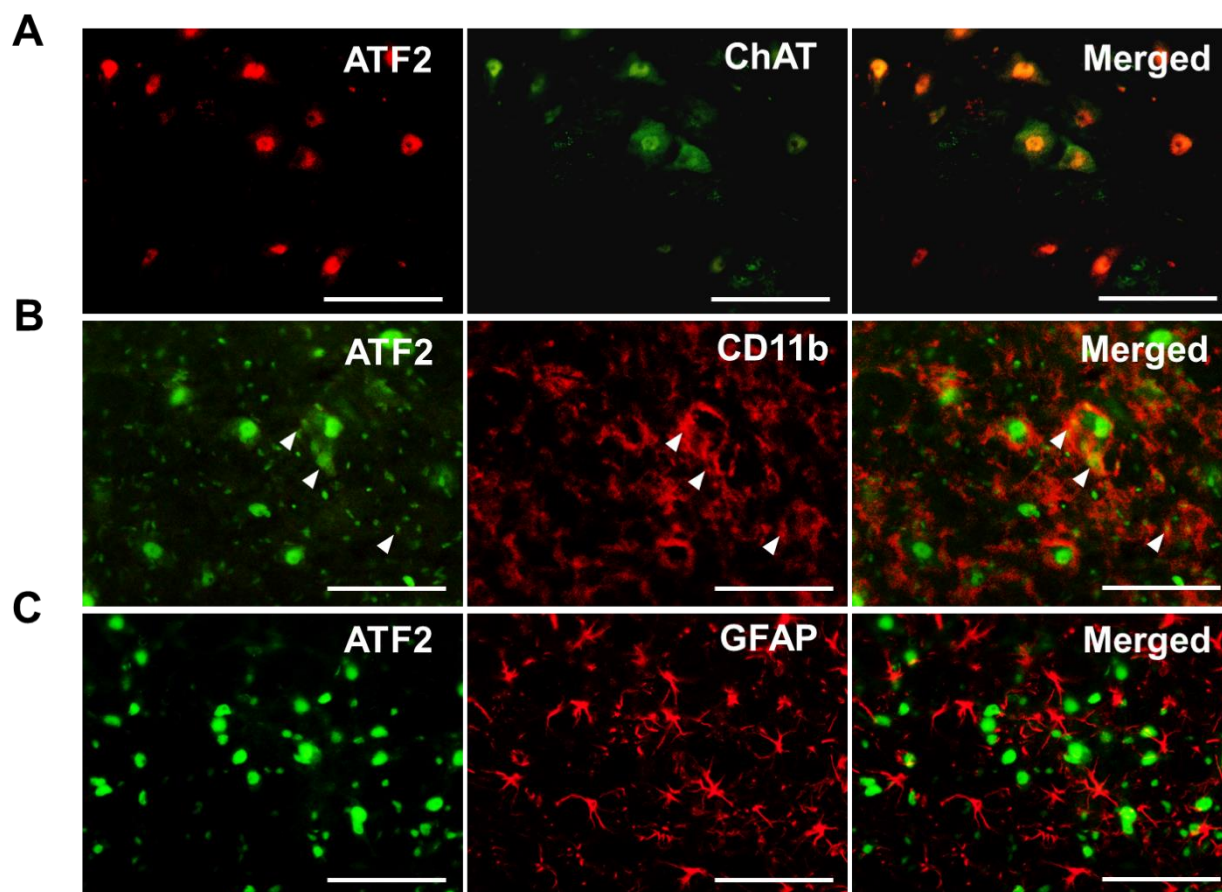
B: ATF2 の定量分析。傷害核 (R) の ATF2 のバンド強度は、コントロール核 (L) の強度 (1.00 として定義) に対する相対値として表した。示したデータは、3 回の独立した実験からの平均値  $\pm$  SD で表した。コントロール核 (L) と傷害核 (R) の間の差異は、t 検定によって評価した (\*  $P < 0.05$ 、\*\*  $P < 0.01$ )。





**Fig. 13 p-ATF2/ATF2 の免疫組織化学染色 (ABC 法)**

神経損傷後 5 日目に回収した脳幹の環状切片を、抗 p-ATF2 抗体および抗 ATF2 抗体で染色した。p-ATF2 (A) および ATF2 (B) の発現レベルを、コントロール核 (Ct) と傷害核 (Op) で比較した。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。



**Fig. 14** 抗 ATF2 抗体と運動ニューロン/グリアマーカーによる二重染色

脳幹切片は、抗 ATF2 抗体/抗 ChAT 抗体 (A)、抗 ATF2 抗体/抗 CD11b 抗体 (B)、または抗 ATF2 抗体/抗 GFAP 抗体 (C) の組み合わせで二重染色を行った。ATF2 は Alexa Fluor-568 (赤色) または Alexa Fluor-488 (緑色) によって、また、ChAT 陽性細胞は Alexa Fluor-488 (緑色) によって、CD11b および GFAP 陽性細胞は Alexa Fluor-594 (赤色) によって可視化した。両者を重ねた画像は、右側に表示した (Merged)。中段の画像 (B) の白い矢頭は抗 ATF2 抗体陽性の核を示している。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。



### 3.3. MAPKs の変動と局在

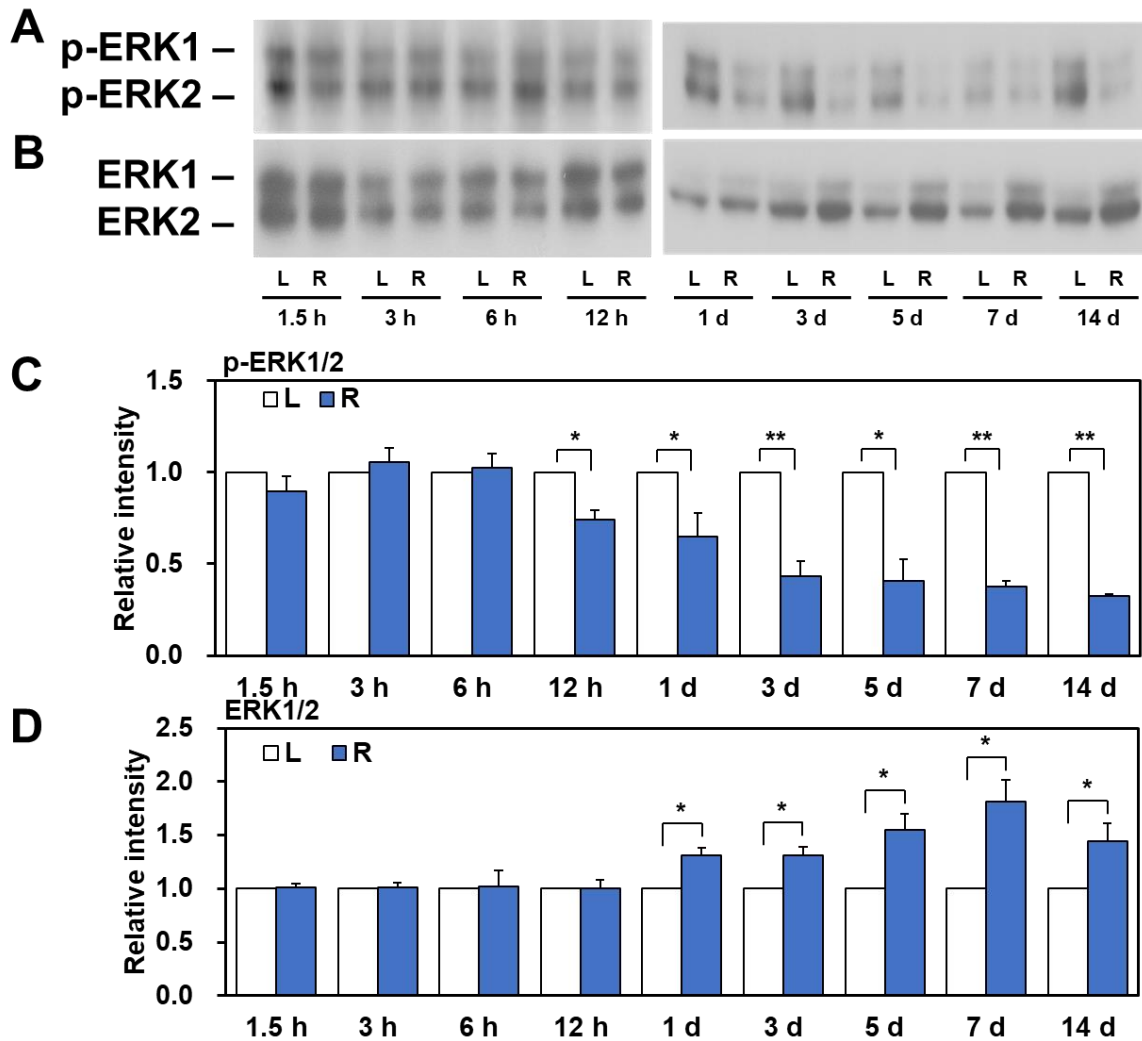
MAPK は Ser/Thr キナーゼファミリーであり、多くの受容体の下流に位置している。上流からの刺激で活性化されると、下流で基質タンパク質をリン酸化する。細胞の代謝、細胞成長、分化、増殖など生命現象に広く関与している。

#### 3.3.1. ERK1/2

p-ERK1/2 は、顔面神経傷害後 12 時間から 14 日の間で減少した (Fig. 15A)。一方で、ERK1/2 は 1-14 日で増加した (Fig. 15B)。axotFN における p-ERK1/2 の定量結果は、神経傷害後 1.5、3、6、12 時間および 1、3、5、7、14 日で、それぞれ  $0.89 \pm 0.08$ 、 $1.06 \pm 0.07$ 、 $1.02 \pm 0.08$ 、 $0.74 \pm 0.05$ 、 $0.65 \pm 0.13$ 、 $0.43 \pm 0.08$ 、 $0.41 \pm 0.12$ 、 $0.38 \pm 0.03$ 、 $0.33 \pm 0.01$  であった (Fig. 15C)。一方、ERK1/2 の定量結果は、傷害後 1.5、3、6、12 時間、および 1、3、5、7、14 日で、それぞれ  $1.01 \pm 0.04$ 、 $1.02 \pm 0.04$ 、 $1.02 \pm 0.15$ 、 $1.01 \pm 0.08$ 、 $1.31 \pm 0.06$ 、 $1.31 \pm 0.08$ 、 $1.55 \pm 0.15$ 、 $1.82 \pm 0.20$ 、 $1.44 \pm 0.16$  であった (Fig. 15D)。

免疫組織化学染色の結果、p-ERK1/2 陽性細胞は、contFN では多かったのに対し、axotFN では減少していた (Fig. 16A)。一方、axotFN における ERK1/2 陽性細胞の数は、contFN よりも多かった (Fig. 16B)。蛍光二重染色の結果、ERK1/2 発現細胞は、ChAT 発現細胞と一致したことから、運動ニューロンということができる (Fig. 17)。

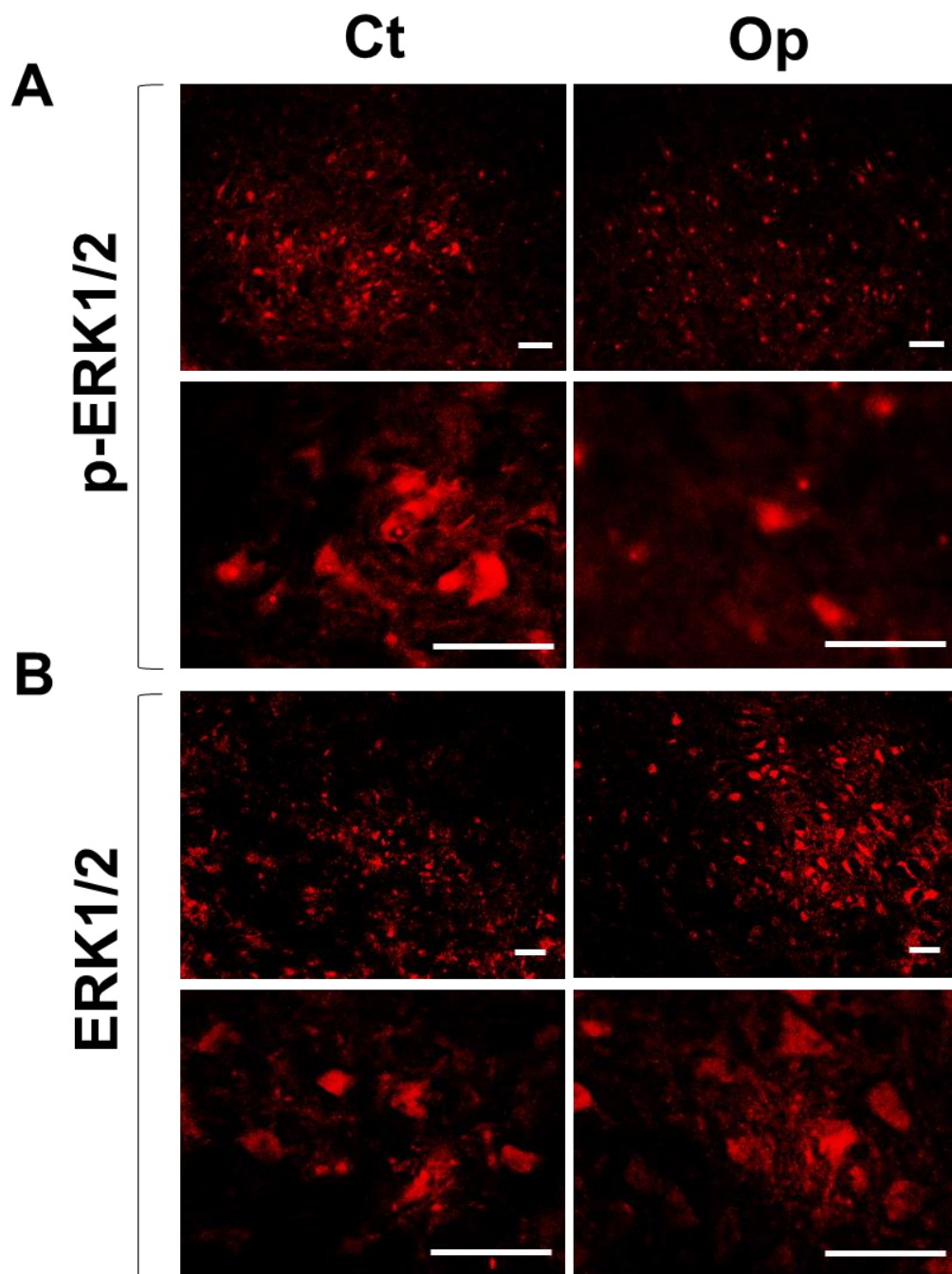
ERK1/2 は、様々な因子によって活性化され、下流では多くの転写調節因子にシグナルを伝達することが報告されている (Agthong et al., 2006)。本研究では、傷害運動ニューロンにおいて p-ERK1/2 が減少したが、この結果から、p-ERK1/2 は顔面神経の損傷刺激/損傷ストレスによって不活性化され、下流の CREB など転写調節因子の活性を抑制していると考えられた。



**Fig. 15 p-ERK1/2/ERK1/2 の変動**

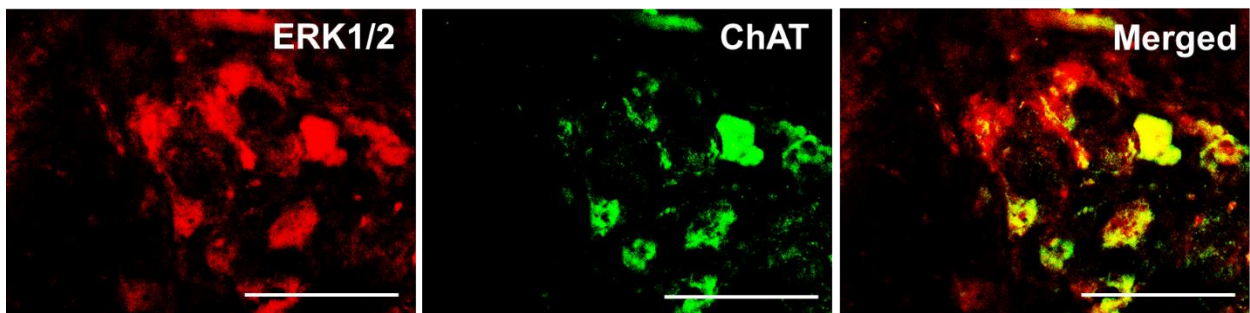
A, B. p-ERK1/2 および ERK1/2 のイムノブロット。神経傷害後、1.5、3、6、12 時間および 1、3、5、7、14 日目に回収されたコントロール核 (L) および傷害核 (R) から組織抽出液を調製し、p-ERK1/2 (A) および ERK1/2 (B) のイムノブロットを行った。

C, D. p-ERK1/2 および ERK1/2 の定量分析。傷害核の p-ERK1/2 または ERK1/2 のバンド強度は、コントロール核の強度 (1.00 として定義) に対する相対値として表した。示したデータは、3 ~ 4 回の独立した実験からの平均値  $\pm$  SD で表した。コントロール核 (L) と傷害核 (R) 間の差異は、t 検定によって評価した (\*  $P < 0.05$ 、\*\*  $P < 0.01$ )。



**Fig. 16 p-ERK1/2 と ERK1/2 の免疫組織化学染色**

神経損傷後 5 日目に回収した脳幹の環状切片を、抗 p-ERK1/2 抗体 (A) または抗 ERK1/2 抗体 (B) で染色し、コントロール核 (Ct) と傷害核 (Op) を比較した。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。



**Fig. 17** 抗 ERK1/2 抗体と抗 ChAT 抗体による二重染色

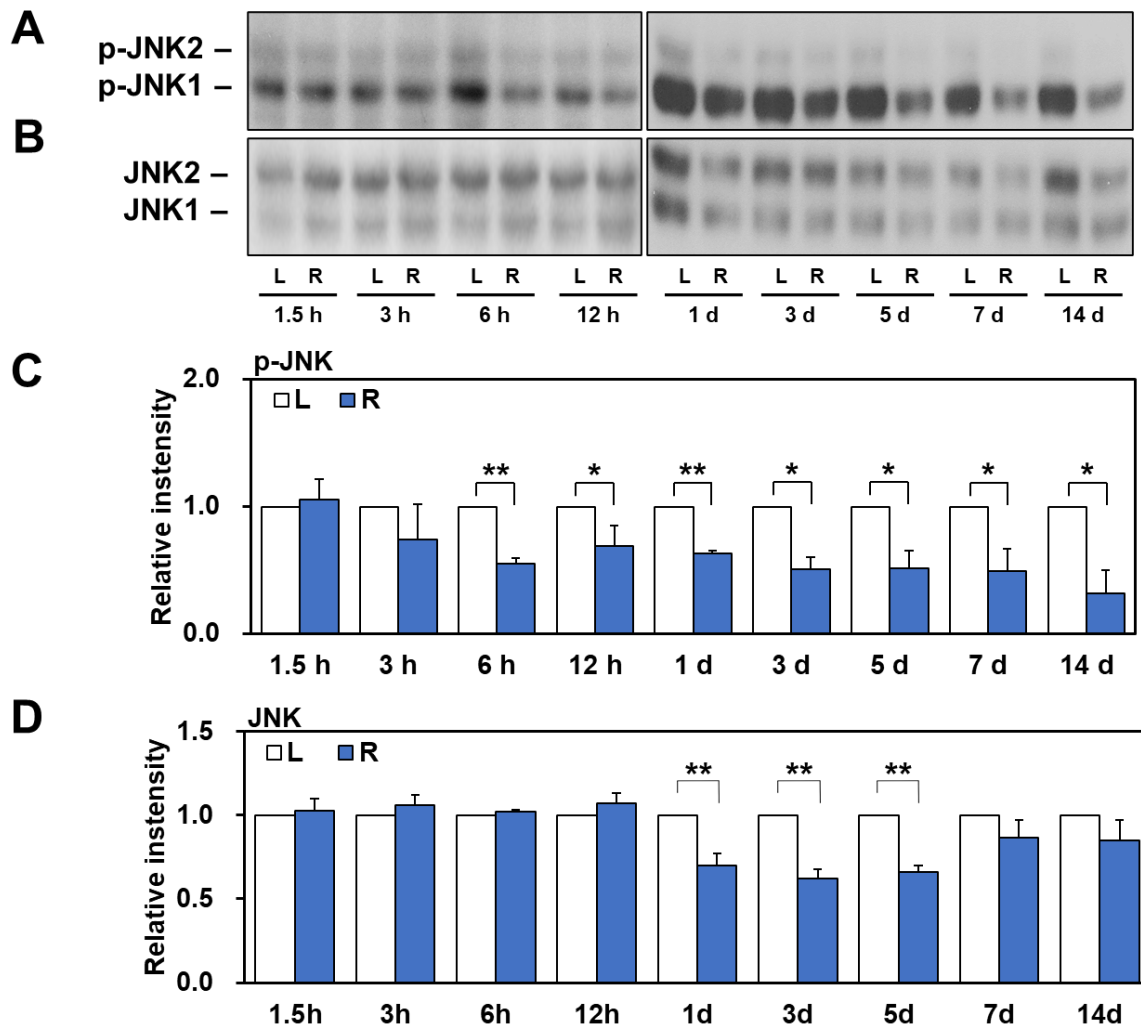
脳幹切片を作成し、ERK1/2 抗体および ChAT 抗体を使用した二重染色を行った。抗 ERK1/2 抗体陽性かつ抗 ChAT 抗体陽性の細胞は、それぞれ、Alexa Fluor-568 (赤色) と Alexa Fluor-488 (緑色) によって視覚化した。両者を重ねた画像は、右側に表示した (Merged)。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。

### 3.3.2. JNK

イムノブロッティングの結果、axotFNにおける p-JNK は、contFN に比べて、傷害後 6 時間から減少していた (Fig. 18A)。一方、JNK は、傷害後 1-5 日に、わずかではあるが減少していた (Fig. 18B)。p-JNK の定量結果では、傷害後 1.5、3、6、12 時間および 1、3、5、7、14 日目で、それぞれ、 $1.06 \pm 0.16$ 、 $0.74 \pm 0.28$ 、 $0.55 \pm 0.04$ 、 $0.69 \pm 0.16$ 、 $0.63 \pm 0.02$ 、 $0.51 \pm 0.09$ 、 $0.52 \pm 0.13$ 、 $0.50 \pm 0.17$ 、 $0.32 \pm 0.18$  であった (Fig. 18C)。JNK の定量結果は、傷害後 1.5、3、6、12 時間および 1、3、5、7、14 日目で、それぞれ、 $1.03 \pm 0.08$ 、 $1.06 \pm 0.07$ 、 $1.02 \pm 0.01$ 、 $1.07 \pm 0.06$ 、 $0.70 \pm 0.07$ 、 $0.66 \pm 0.08$ 、 $0.70 \pm 0.05$ 、 $0.87 \pm 0.10$ 、 $0.85 \pm 0.12$  であった (Fig. 18D)。

免疫組織化学染色の結果、contFN では、p-JNK 陽性の細胞核が多く染まっていたのに対し、axotFN ではその数が減少していた (Fig. 19)。蛍光二重染色の結果、p-JNK 陽性の細胞核は、ChAT 陽性の運動ニューロンのものであった (Fig. 20)。これらの結果から、無傷の運動ニューロンには、JNK1/2 が比較的多く発現していて、活性型は主に JNK1 であったが、軸索切断後 6 時間以降、この p-JNK1 量は減少することが明らかとなった。

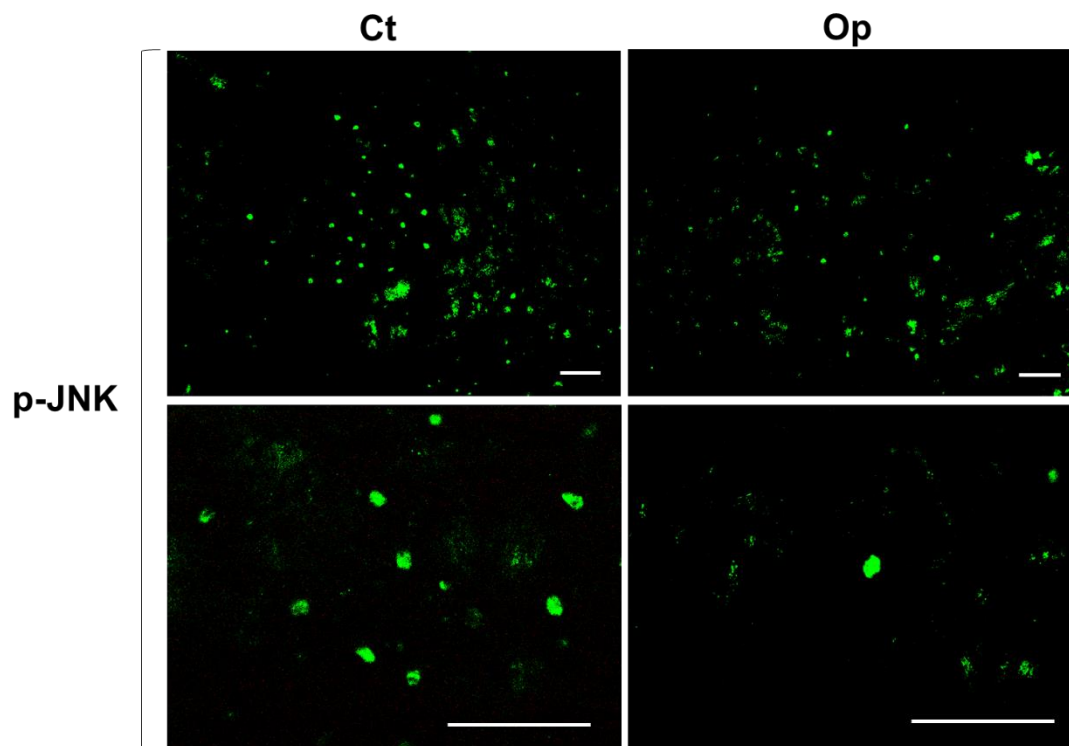
JNK はストレス応答性 MAPK として知られているが、神経系では、軸索の再生や、神経細胞の成長・成熟に関与すると報告されている (Kawasaki et al., 2018; Schellino et al., 2019)。この知見から、本傷害モデルでも JNK の活性化が促進するものと予測したが、その予測とは異なり、axotFN 中の p-JNK レベルは、時間の経過と共に徐々に減少した。この減少レベルは統計学的には有意ではあるが、著しい低下ではないことから、p-JNK は神経損傷後もかなりの程度活性型として機能している可能性が高い。一般に p-JNK は炎症で機能することが知られているため、傷害運動ニューロンの残存 p-JNK 活性が炎症反応に関わるとの推測もされたが、その可能性は低いと思われる。というのは、先行研究で、傷害運動ニューロンでは炎症反応が起こっていない (Yamamoto et al., 2010) ことが明らかになっている。従って、傷害運動ニューロンで p-JNK がある程度減少するが、残存の p-JNK は、c-Jun の活性化を介した修復反応などに関わっていると考えられる。



**Fig. 18 p-JNK/JNK の変動**

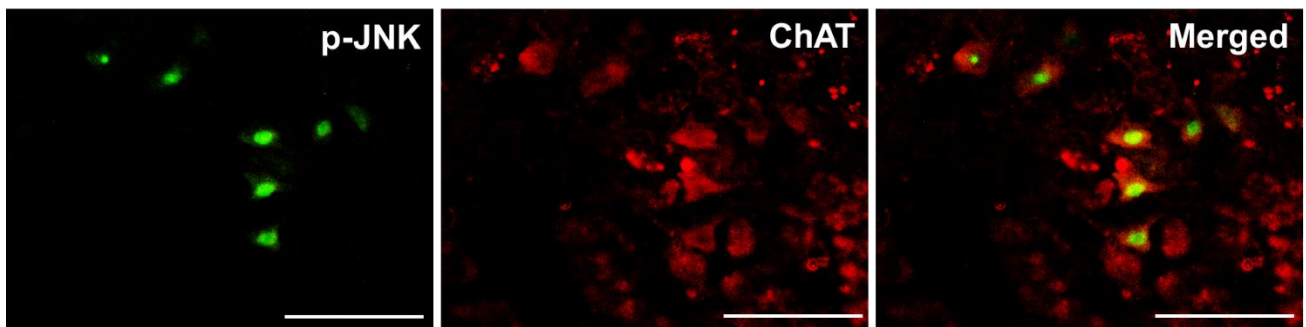
A, B. p-JNK および JNK のイムノブロット。神経傷害後、1.5、3、6、12 時間および 1、3、5、7、14 日目に回収されたコントロール核 (L) および傷害核 (R) から組織抽出液を調製し、p-JNK (A) および JNK (B) のイムノブロットを行った。

C, D. p-JNK および JNK の定量分析。傷害核 (R) の p-JNK (C) または JNK (D) のバンド強度は、コントロール核(L)の強度 (1.00 として定義) に対する相対値として表した。示したデータは、3 ~ 4 回の独立した実験からの平均値  $\pm$ SD で表した。コントロール核 (L) と傷害核 (R) の間の差異は、t 検定によって評価した (\*  $P < 0.05$ 、\*\*  $P < 0.01$ )。



**Fig. 19** p-JNK の免疫組織化学染色

神経損傷後 5 日目に回収した脳幹の環状切片を、抗 p-JNK 抗体で染色し、コントロール核 (Ct) と傷害核 (Op) を比較した。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。



**Fig. 20** 抗 p-JNK 抗体と抗 ChAT 抗体による二重染色

脳幹切片を調製し、p-JNK と ChAT について二重染色を行った。抗 p-JNK 抗体陽性かつ抗 ChAT 抗体陽性の細胞はそれぞれ、Alexa Fluor-488 (緑色) と Alexa Fluor-568 (赤色) によって視覚化した。両者を重ねた画像は、右側に表示した (Merged)。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。

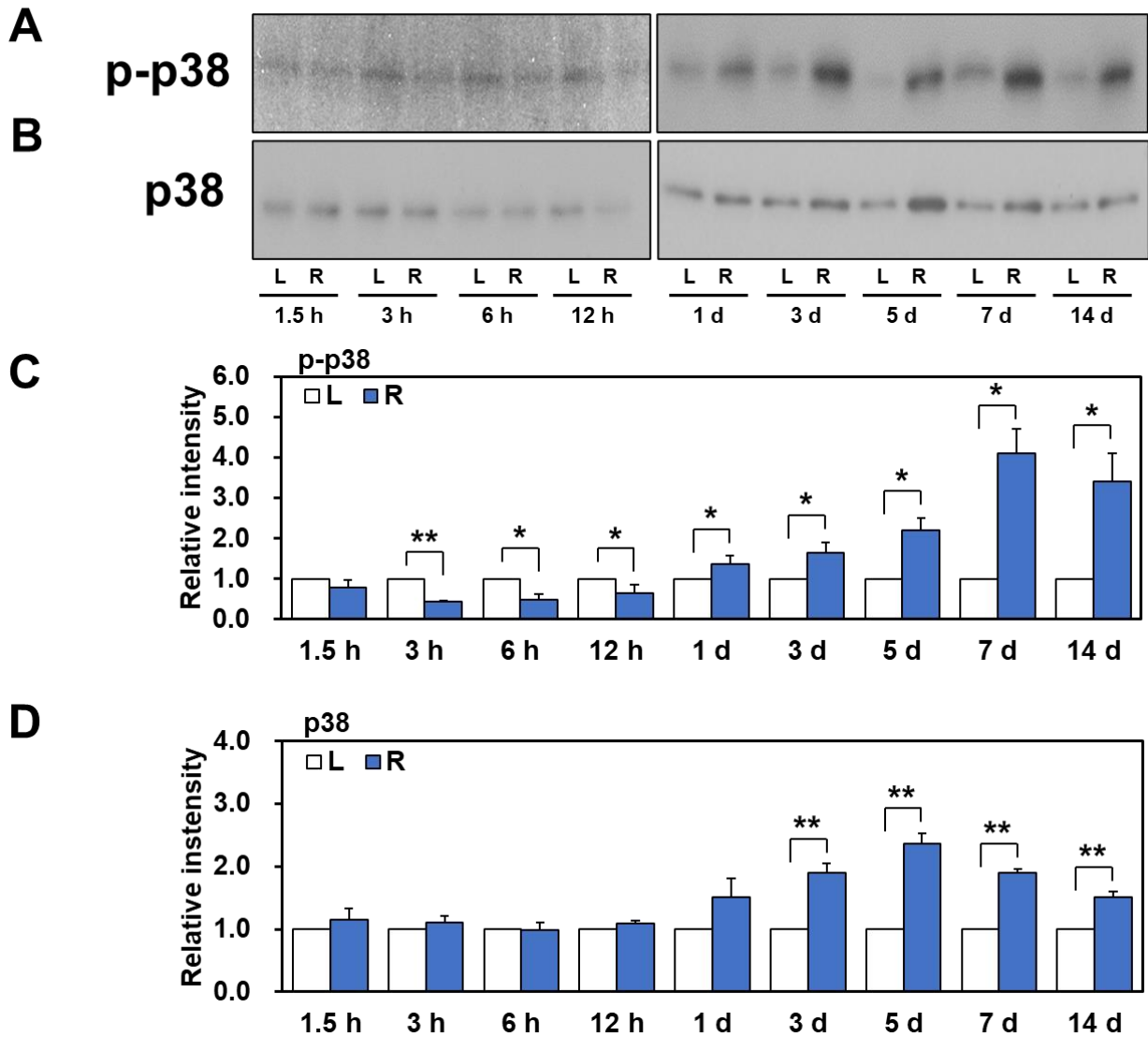


### 3.3.3. p38

活性化 p38 (p-p38) は、神経傷害後 3 時間から 12 時間にかけて有意に減少し、その後 1-14 日では有意に増加するという二相性の反応を示した (Fig. 21A)。一方、p38 は傷害後 1-14 日で有意に増加した (Fig. 21B)。p-p38 の定量結果は、傷害後 1.5、3、6、12 時間および 1、3、5、7、14 日目で、それぞれ、 $0.79 \pm 0.18$ 、 $0.43 \pm 0.04$ 、 $0.49 \pm 0.13$ 、 $0.64 \pm 0.21$ 、 $1.36 \pm 0.21$ 、 $1.65 \pm 0.25$ 、 $2.21 \pm 0.30$ 、 $4.11 \pm 0.60$ 、 $3.40 \pm 0.71$  であった (Fig. 21C)。p38 の定量結果は、傷害後 1.5、3、6、12 時間および 1、3、5、7、14 日目で、それぞれ  $1.15 \pm 0.18$ 、 $1.10 \pm 0.11$ 、 $0.99 \pm 0.12$ 、 $1.08 \pm 0.06$ 、 $1.51 \pm 0.30$ 、 $1.90 \pm 0.15$ 、 $2.36 \pm 0.17$ 、 $1.90 \pm 0.07$ 、 $1.51 \pm 0.08$  であった (Fig. 21D)。

免疫組織化学染色の結果、抗 p-p38 抗体は、運動ニューロンではない、小さな細胞を染色したが、この小型の細胞は axotFN で増加していることが示された (Fig. 22A)。一方、抗 p38 抗体は、contFN では大型の細胞と小型の細胞の両方を染色したが、axotFN では、より多くの小型細胞が染色されていた (Fig. 22B)。

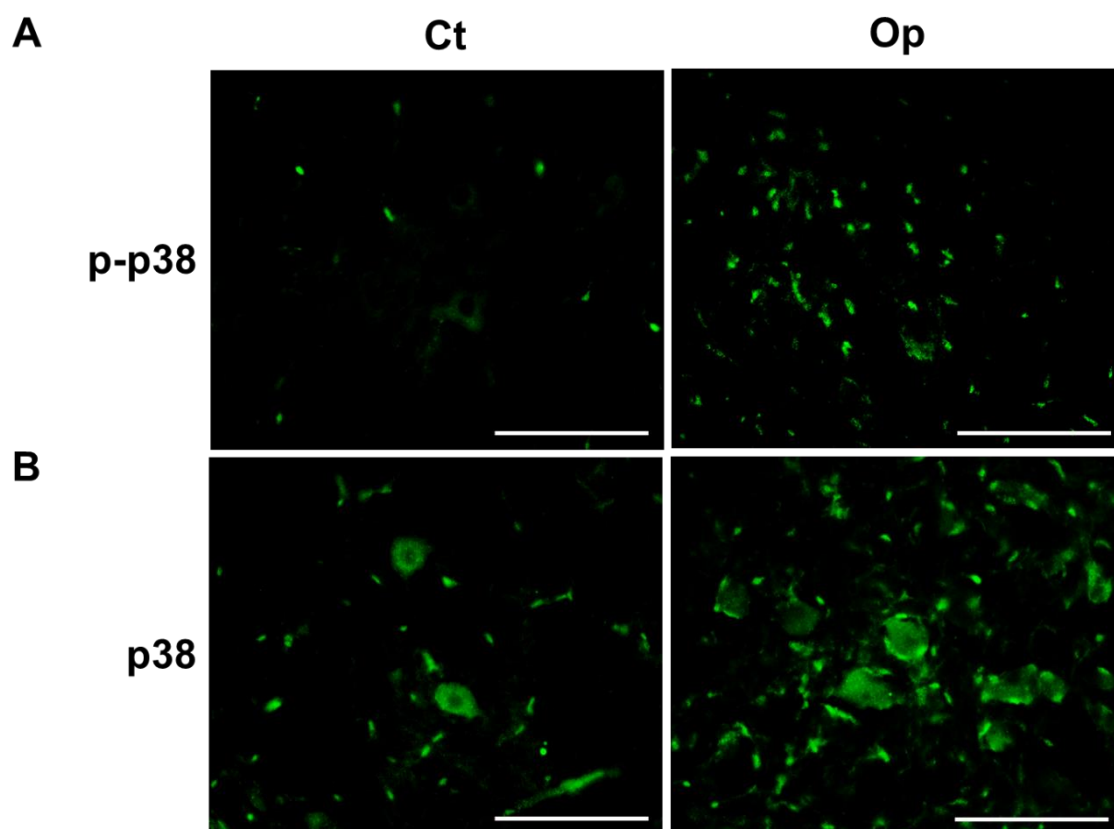
蛍光二重染色によって、p-p38 発現細胞および p38 発現細胞の同定を行った。p-p38 発現細胞は、ミクログリアマーカーの CD11b と局在が一致したが (Fig. 23A)、アストロサイトマーカーの GFAP とは一致しなかった (Fig. 23B)。次に p38 発現細胞を調べたが、p38 発現細胞には大型と小型の 2 種類存在していた。大型の細胞は運動ニューロンマーカーの ChAT と局在が一致したことから、その細胞は運動ニューロンと同定された (Fig. 24A)。一方、大型細胞周辺の小型の細胞は、CD11b と局在が一致したが (Fig. 24B)、GFAP とは一致しなかった (Fig. 24C)。これらの結果から、p38 を発現している小型の細胞は、ミクログリアであることが明らかとなった。



**Fig. 21** p-p38/p38 の変動

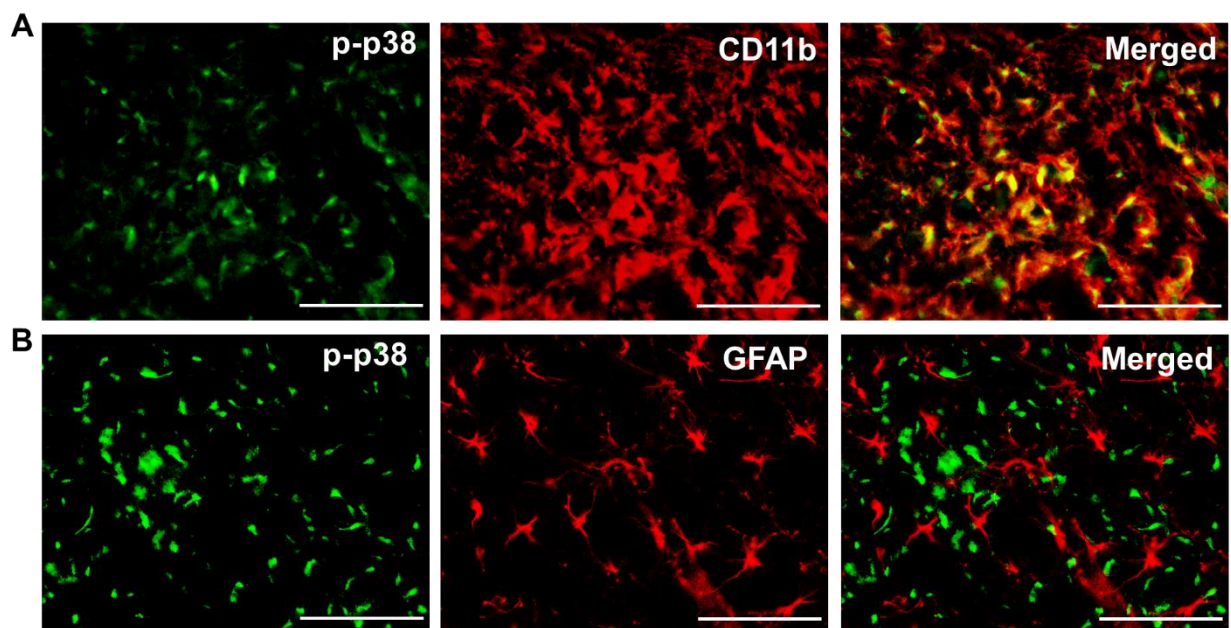
A, B. p-p38 および p38 のイムノブロット。神経傷害後、1.5、3、6、12 時間および 1、3、5、7、14 日目に回収されたコントロール核 (L) および傷害核 (R) から組織抽出液を調製し、p-p38 (A) または p38 (B) のイムノブロットを行った。

C, D. p-p38 および p38 の定量分析。傷害核 (R) の p-p38 (C) または p38 (D) のバンド強度は、コントロール核 (L) の強度 (1.00 として定義) に対する相対値として表した。示したデータは、3 ~ 5 回の独立した実験からの平均値  $\pm$ SD で表した。コントロール核 (L) と傷害核 (R) の間の差異は、t 検定によって評価した (\*  $P < 0.05$ 、\*\*  $P < 0.01$ )。



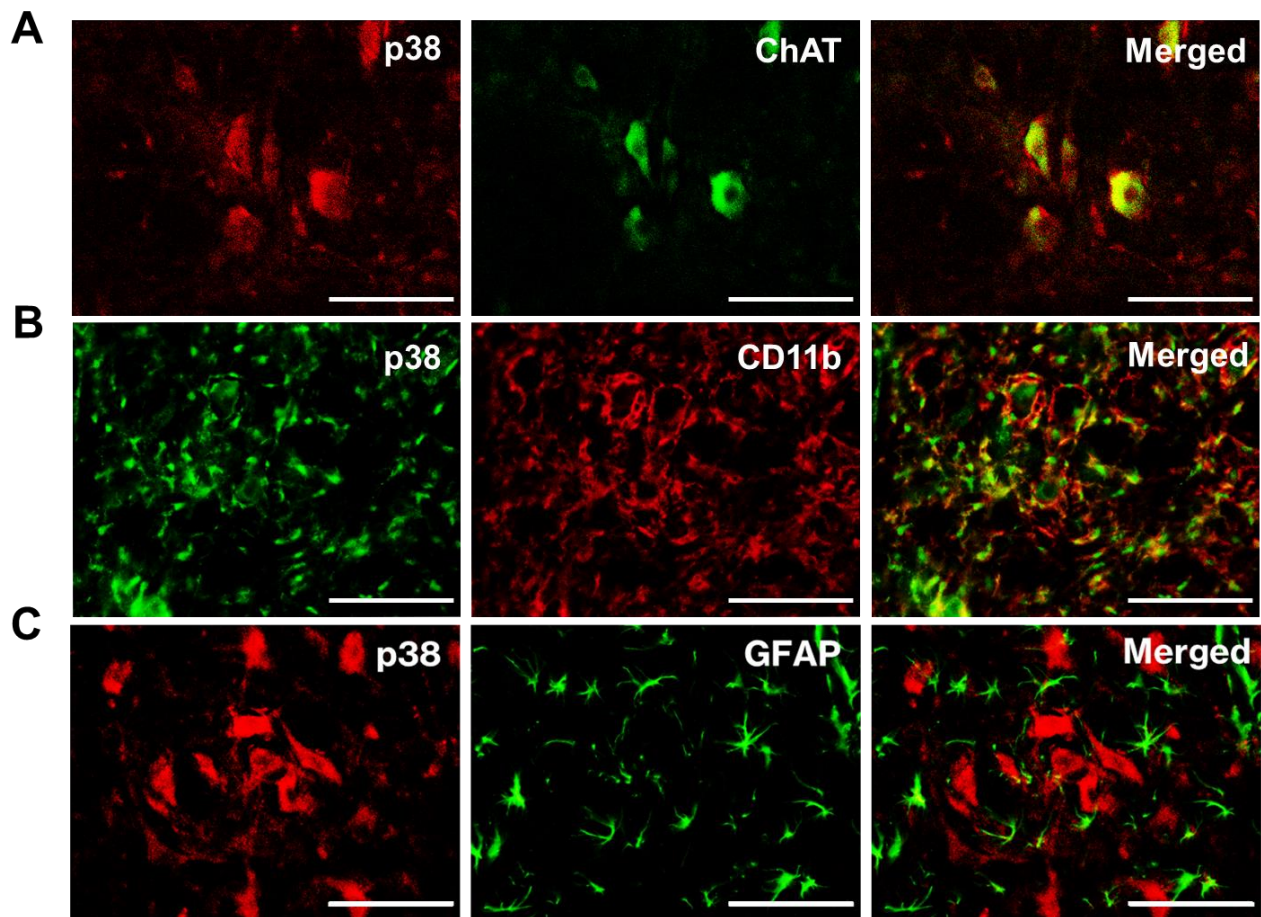
**Fig. 22 p-p38/p38 の免疫組織化学染色**

神経損傷後 5 日目に回収した脳幹の環状切片を、抗 p-p38 抗体 (A) または抗 p38 抗体 (B) で染色し、コントロール核 (Ct) と傷害核 (Op) を比較した。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。



**Fig. 23** 抗 p-p38 抗体とグリアマーカーによる二重染色

脳幹切片を調製し、抗 p-p38 抗体/抗 CD11b 抗体 (A)、または抗 p-p38 抗体/抗 GFAP 抗体 (B) の組み合わせで二重染色を行った。p-p38 は Alexa Fluor-488 (緑色) で、CD11b および GFAP は Alexa Fluor-594 (赤色) によって可視化した。両者を重ね合わせた画像は、右側に表示した (Merged)。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。



**Fig. 24** 抗 p38 抗体と運動ニューロン/グリアマーカーによる二重染色

脳幹切片を調製し、抗 p38 抗体/抗 ChAT 抗体 (A)、抗 p38 抗体/抗 CD11b 抗体 (B)および抗 p38 抗体/抗 GFAP 抗体 (C) の組み合わせで二重染色を行った。p38 は Alexa Fluor-568 (赤色) または Alexa Fluor-488 (緑色) で可視化し、ChAT は Alexa Fluor-488 (緑色) で、CD11b は Alexa Fluor-594 (赤色) で、GFAP は Alexa Fluor-488 (緑色) で可視化した。両者を重ね合わせた画像は、右側に表示した (Merged)。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。

p38 は、一般的に、炎症性サイトカイン、LPS、成長因子、細胞ストレスによって活性化される Ser/Thr プロテインキナーゼとして知られているが、神経系では修復・再生過程に関与するという報告もある。Nix らは、線虫の GABA ニューロンの軸索再生には p38 と JNK の両方が必要であると報告している (Nix et al., 2011)。本研究では、傷害後 1-14 日の axotFN において p-p38 と p38 の両方のレベルが上昇することを示した。p-p38 の上昇はミクログリアで、一方 p38 の上昇は運動ニューロンとミクログリアの両方で起こることも示した。先行研究により、ミクログリアが増殖因子である macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) の刺激を受けると、p38 が活性化されることが明らかになっているため (Yamamoto et al., 2010, 2012)、ミクログリアにおける p-p38 の上昇は、増殖に関連していると考えられた。

以上、ラットの顔面神経傷害に伴う転写調節因子およびシグナル分子の変動と局在性を述べた。本研究を通して得られた結果をまとめ、表 1 に示した。

表 1 ラット顔面神経傷害後のシグナル分子の変動と局在

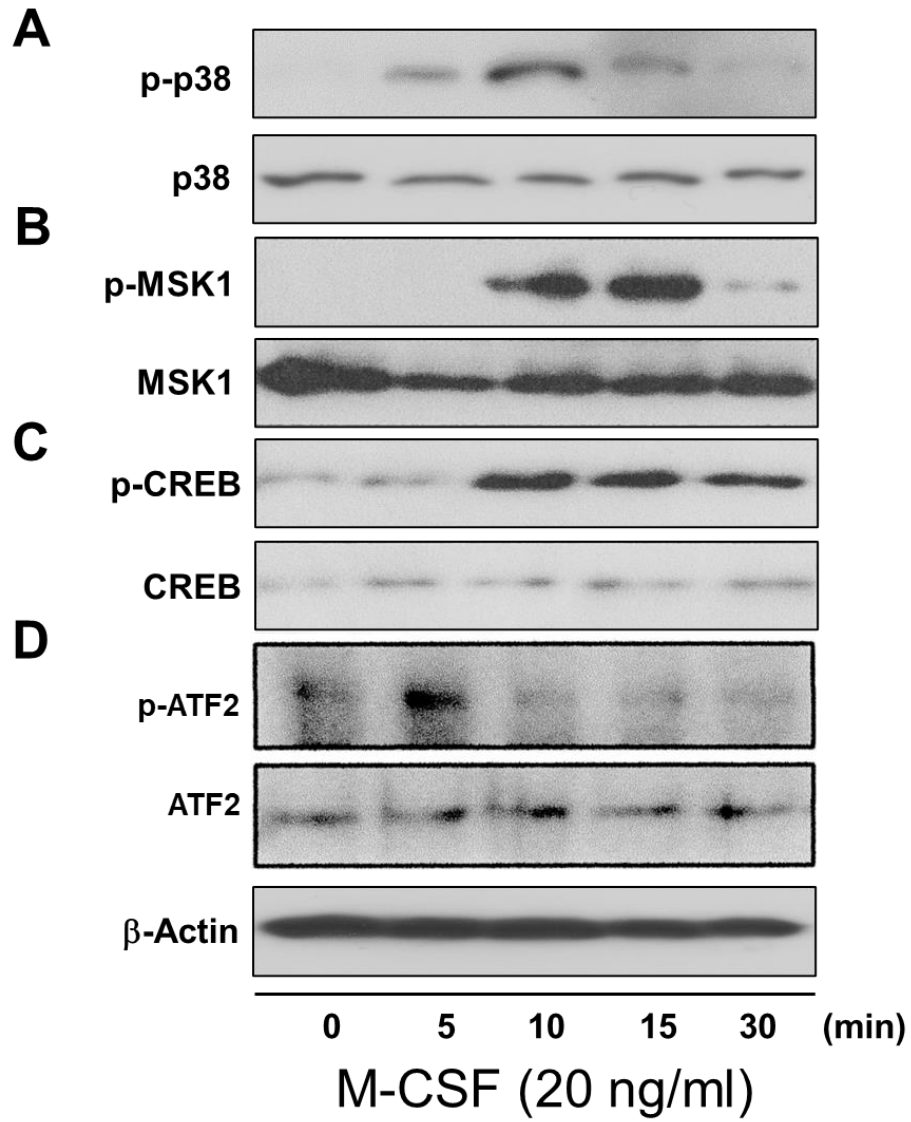
Molecular name	Motoneuron	Microglia
c-Jun	↗	
c-Fos	→	
p-CREB	↘	↗
CREB	↗	↗
p-ATF2	↘	↗
ATF2	→	↗
p-ERK1/2	↘	
ERK1/2	↗	
p-JNK	↘	
JNK	↘ ↗	
p-p38		↗
p38	↗	↗

### 3.4. M-CSF によるミクログリアの p38、CREB、ATF2 の活性化

上述のように、axotFN では、ミクログリアが、p-p38、p-CREB、p-ATF2 を高発現したので、これらの因子がミクログリアの増殖中、活性化されると推測された。そこで、ミクログリアの主要な増殖因子である M-CSF を使って、ミクログリアが増殖する時、これらの因子 (p38、CREB、ATF2) が実際に活性化されるかどうか *in vitro* の系で調べた。

ミクログリアを単離・培養し、ミクログリアの増殖因子である M-CSF で刺激したところ、刺激後 5 分から p38 がリン酸化 (活性化) された (Fig. 25A)。この結果から、axotFN で増加する p-p38 はミクログリアの増殖と関連していることが強く示唆された。ところで、p38 は、下流でどのような分子を活性化するのであろうか。一つの候補は、mitogen and stress-activated kinase 1 (MSK1) である。MSK1 は CREB のリン酸化を進めるプロテインキナーゼである (Reyskens and Arthur, 2016)。それ故、M-CSF で刺激されたミクログリアでは、MSK1 と CREB が活性化されると予想し、その解析を行った。その結果、M-CSF の刺激後 10 分から、MSK1 および CREB がリン酸化されることがわかった (Fig. 25B,C)。以上から、ミクログリアの増殖は、M-CSF-cFms の下流に、p38-MSK1-CREB というシグナル経路が関与することが示唆された。加えて、CREB 同様、axotFN のミクログリアで活性化が見られた ATF2 についても解析を行った。その結果、ATF2 は、M-CSF の刺激後 5 分からリン酸化されることが明らかとなった (Fig. 25D)。ATF2 は p38 の基質になることが知られているため、p38-ATF2 という経路もミクログリアの増殖に関与すると考えられる。





**Fig. 25 M-CSF によるミクログリアの刺激**

培養ミクログリアを M-CSF (20 ng/mL) で刺激し、一定時間後に回収し、イムノブロットにより p-p38/p38 (A)、p-MSK1/MSK1 (B)、p-CREB/CREB (C)、p-ATF2/ATF2 (D) および β-Actin を分析した。

### 3.5. 修復促進物質 (RPS) の探索

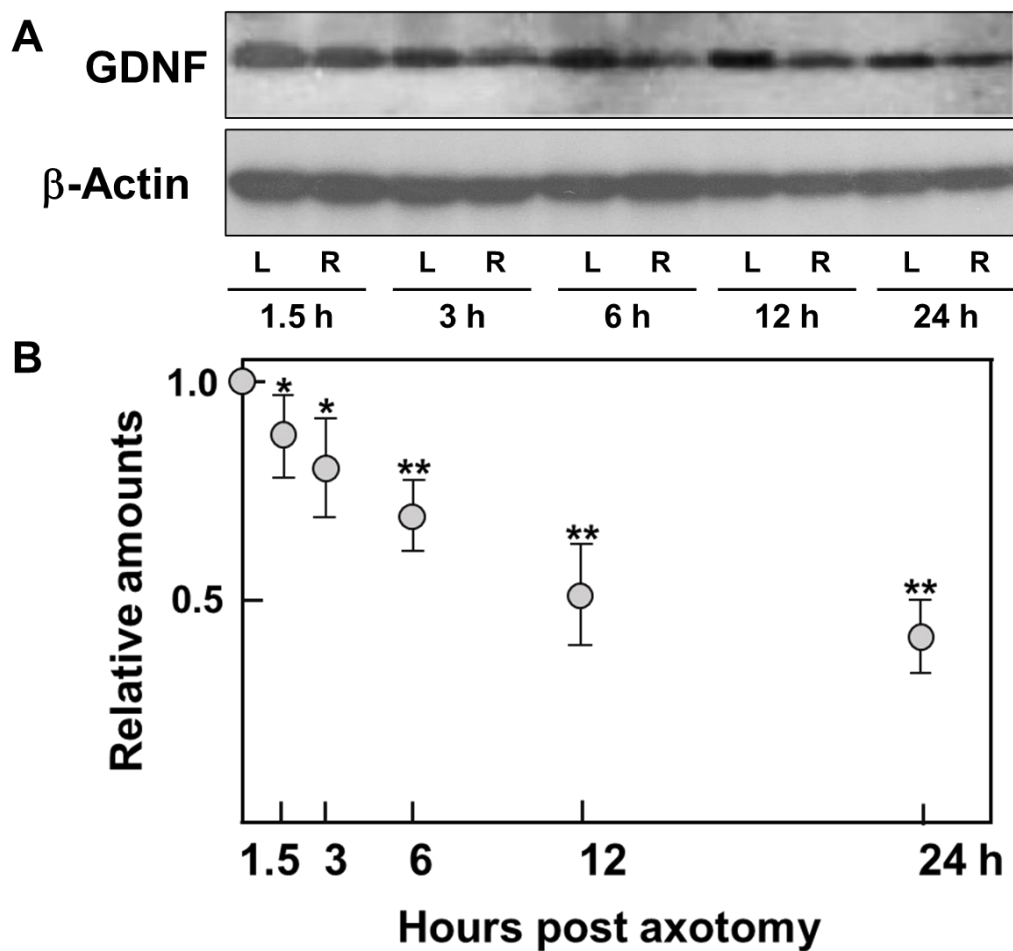
次に、傷害運動ニューロンで大きな変動を見せたシグナル分子に注目し、それらの変動を軽減させた時に、ミクログリアの増殖の程度が抑えられるかどうかを調べた。具体的には、傷害運動ニューロンでは、c-Jun が上昇し、p-CREB が低下したが、この変動を緩和すると、ミクログリアの増殖が抑制されるのかどうかを調べる実験を行った。これは神経傷害の程度がミクログリアの増殖性に関連するかどうかという、長年にわたり取り残されてきた課題でもある。そのためにまず、傷害ニューロンで、シグナル分子の変動を緩和し、機能修復を促進する薬剤・物質 (修復促進物質 : RPS) を探索することにした。様々な因子や薬剤・試薬など候補に挙げ、予備実験を行いながら、有効なものを探してきた。本研究では、その中から、神経栄養因子である GDNF、抗酸化剤である NAC そして抗小胞体ストレス物質である Sal の 3 つを選択し使用した。

GDNF は、運動ニューロンの生存維持や修復に働く因子として知られており、恒常的に標的組織より細胞体に逆行性に輸送されている。そのため、軸索切断により供給が絶たれると、細胞死や機能不全に陥る。従って、GDNF は神経損傷の治療薬となり得る因子としても注目され、研究されてきた (Trupp et al., 1995; Flachsbarth et al., 2018; Eggers et al., 2020)。実際、GDNF は軸索損傷後の新生仔ラットの運動ニューロンの細胞死を抑える働きがある (Matheson et al., 1997)。また、in vitro でも神経細胞死を抑制する効果を示した (Henderson et al., 1994; Yan et al., 1995)。脊髄の前根剥離傷害モデルでは、GDNF を投与すると運動機能の回復が促進されることが報告されている (Bergerot et al., 2004)。ラットの顔面神経傷害モデルにおいて、傷害神経核中の GDNF 量を測定したところ、軸索切断後、数時間で低下することが認められた (Fig. 26)。この GDNF 量の低下が運動ニューロンのシグナル分子や機能分子の発現に強く影響を与えている可能性が推測されたため、本研究では、シグナル分子の活性変動を軽減できる有効な RPS として使用することにした。

神経細胞が損傷を受けた時、同時に酸化ストレスを受けると言われている。例えば、ラットの脊髄損傷モデルでは、運動ニューロンが傷害後に酸化ストレスを受けることが知られている (Wu, 1993; Azbill et al., 1997)。また、ラットの坐骨神経剥離モデルでは、運動ニューロンが酸化障害によりアポトーシスを起こすことが示されている (Martin et al., 1999)。従

って、酸化ストレスを解消できる薬剤・物質も RPS の候補に挙げて、探索を行った。その結果、効果的なものとして、NAC が浮上した。NAC は、活性酸素種 (ROS) (Zafarullah et al., 2003) および一酸化窒素 (NO) (Bergamini et al., 2001) を除去することができるため、抗酸化ストレス剤として有効と考えられた。本研究では、NAC が *in vitro* で初代培養細胞を刺激し、ERK1/2 および CREB のリン酸化を促進することを明らかにした (Fig. 27A,B)。これらの結果は、NAC が損傷した運動ニューロンの RPS として有効に作用することを示唆している。

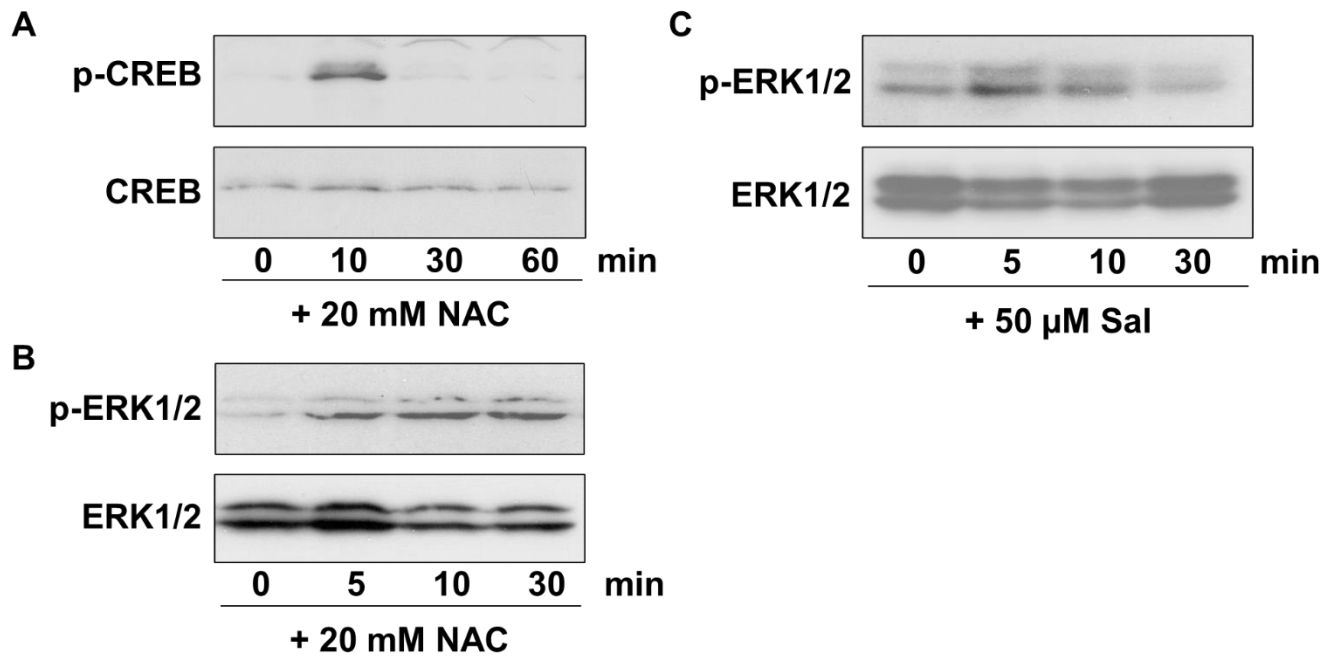
Sal は、リン酸化 eukaryotic initiation factor 2 alpha (p-eIF2 $\alpha$ : eIF2 $\alpha$  の不活化状態) の脱リン酸化を選択的に抑制する阻害剤であるが、この反応を介し、細胞内の ER ストレスを軽減する働きを示す。最近の研究により、ER ストレスが軸索損傷を含む幅広い神経変性に関与していることが明らかになりつつある (Hu, 2016; Valenzuela et al., 2016; Yamaguchi et al., 2018; Salvany et al., 2019)。このような点から、Sal はニューロンの変性を促進する ER ストレスの除去薬として研究されてきた。実際、マウスの外傷性脳損傷モデルでは、Sal は運動ニューロンのアポトーシスを抑制し、運動能力の回復を促進した (Wang et al., 2019)。同様に、マウス脊髄損傷モデルでは、Sal は運動ニューロンの運動機能を回復させた (Ohri et al., 2013)。さらに、Sal は、NAC と同様、*in vitro* で ERK1/2 をリン酸化する活性を示した (Fig. 27C)。故に、Sal が損傷した運動ニューロンの RPS として機能することが期待された。



**Fig. 26 傷害顔面神経核の GDNF**

A. GDNF のウェスタンブロット。ラットの右側顔面神経を損傷後、1.5、3、6、12、24 時間で、脳を回収し、コントロール核 (L) および傷害核 (R) の組織抽出液を調製し、GDNF のイムノブロットを行った。 $\beta$ -Actin はローディングコントロールとして使用した。

B. GDNF の定量測定。傷害核 (R) のバンド強度は、コントロール核 (L) の値を 1.00 と定義した時の相対強度として示した。データは、4 回の独立した実験からの平均値  $\pm$  SD で表した。コントロール核 (L) と傷害核 (R) の間の差異は、t 検定によって評価した (\*  $P < 0.05$ 、\*\*  $P < 0.01$ )。



**Fig. 27** NAC および Sal による初代脳培養細胞の刺激

A,B. NAC 刺激。脳の初代培養細胞を NAC (20 mM) で刺激し、0、10、30、60 分 (A) または 0、5、10、30 分 (B) で回収した。細胞抽出液を調製し、イムノブロットにより p-CREB/CREB (A) および p-ERK1/2 と ERK1/2 (B) を分析した。

C. Sal 刺激。脳の初代培養細胞を Sal (50 μM) で刺激し、0、5、10、30 分 (C) で回収した。細胞抽出液を調製し、イムノブロットにより p-ERK1/2 と ERK1/2 (C) を分析した。

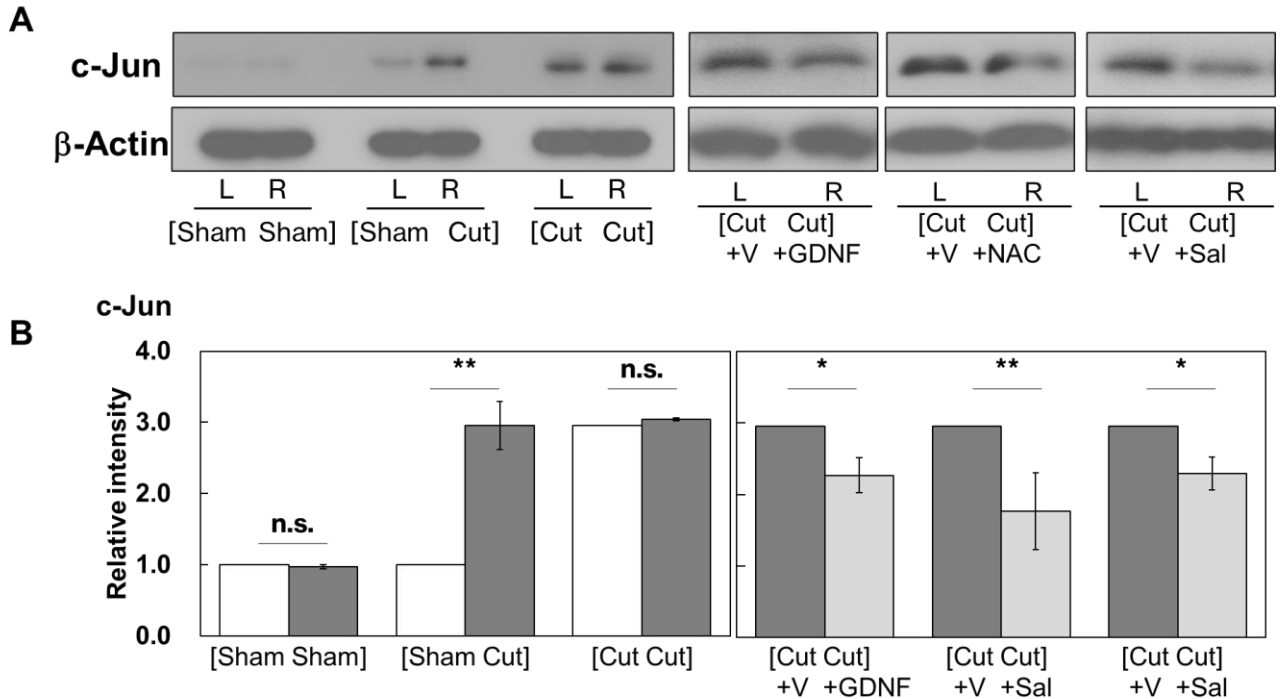
### 3.6. 損傷運動ニューロンに対する RPS 投与の効果

選択された RPS の効果は、まず、運動ニューロンのシグナル分子に対して調べられた。すなわち、 $[V^+Cut\ Cut^{+RPS}]$ 系で、両側切断し、 $[Cut+RPS]$ 側には RPSs (GDNF、NAC、Sal) を投与し、 $[Cut+vehicle]$  側には溶媒を投与し、両神経核における c-Jun、p-CREB および CREB のレベルを比較することにより、RPS の評価を行った。

シグナル分子の最初として c-Jun について解析した (Fig. 28)。 $[Sham\ Sham]$ 系の c-Jun レベルは両側で低かったが ( $1.00\ vs\ 0.97 \pm 0.03$ )、 $[Sham\ Cut]$ 系では axotFN のレベルが大幅に増加した ( $1.00\ vs\ 2.96 \pm 0.34$ )。 $[Cut\ Cut]$ 系では、両側のレベルが同等に増加した ( $2.96\ vs\ 3.04 \pm 0.02$ )。 $[V^+Cut\ Cut^{+RPS}]$ 系では、GDNF、NAC、Sal は、軸索切断に伴って増加した c-Jun のレベルを有意に減少させ、値はそれぞれ  $2.27 \pm 0.25$ 、 $1.77 \pm 0.54$  および  $2.29 \pm 0.23$  であった ( $[Cut+vehicle]$ 核の値として、 $[Sham\ Cut]$ の Cut 側の値である 2.96 を使用した)。

次に p-CREB を解析した。c-Jun とは対照的に、 $[Sham\ Sham]$ 系では、両側の p-CREB レベルが同等に高かったが ( $1.00\ vs\ 0.98 \pm 0.07$ )、 $[Sham\ Cut]$ 系では axotFN のレベルが有意に減少した ( $1.00\ vs\ 0.11 \pm 0.03$ ) (Fig. 29A)。 $[Cut\ Cut]$ 系では、両側のレベルが均等に減少した ( $0.11\ vs\ 0.11 \pm 0.01$ ) (Fig. 29A)。 $[V^+Cut\ Cut^{+RPS}]$ 系では、GDNF、NAC、および Sal は、軸索切断に依存して減少した p-CREB のレベルを有意に回復させ、値は、それぞれ  $0.25 \pm 0.06$ 、 $0.19 \pm 0.02$ 、および  $0.19 \pm 0.06$  であった。 ( $[Cut+vehicle]$ 核の値として、 $[Sham\ Cut]$ の Cut 側の値である 0.11 を使用した) (Fig. 29C)。

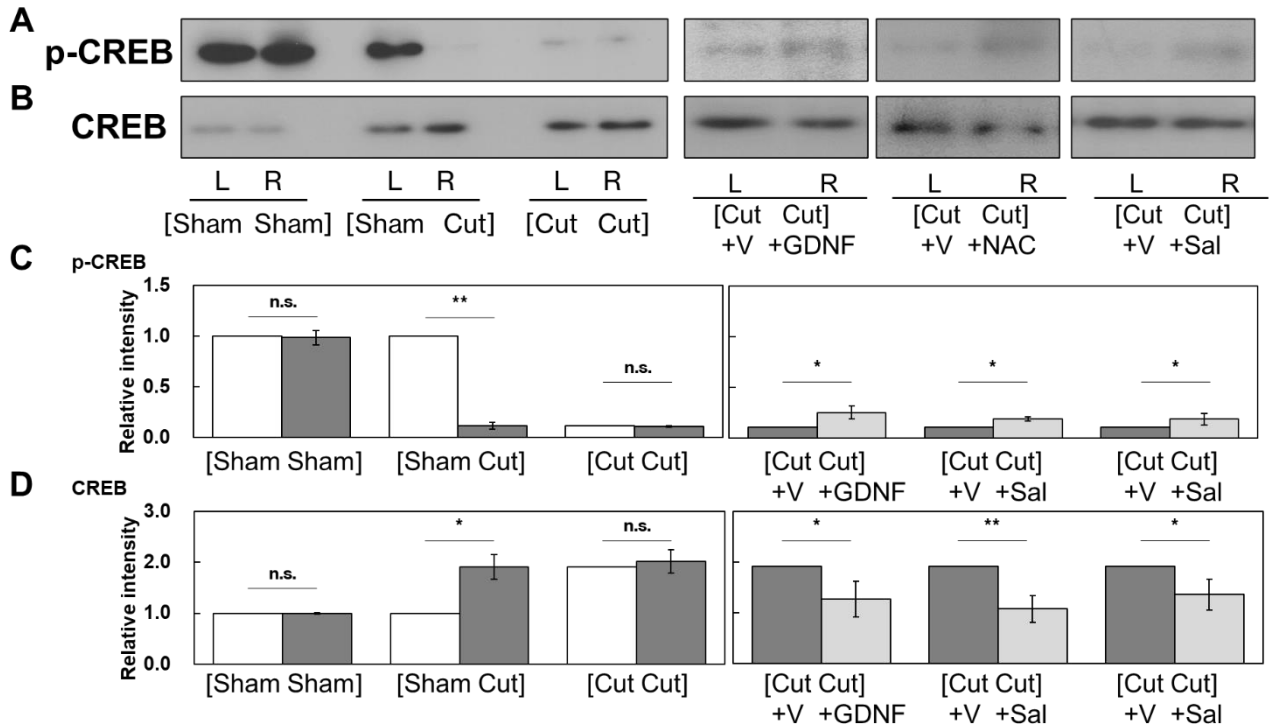
CREB のレベルは、 $[Sham\ Sham]$ 系では、両側で低かったが ( $1.00\ vs\ 1.00 \pm 0.01$ )、 $[Sham\ Cut]$ 系では axotFN でのレベルが大幅に増加した ( $1.00\ vs\ 1.91 \pm 0.25$ ) (Fig. 29B)。 $[Cut\ Cut]$ 系では、両側のレベルが均等に増加した ( $1.91\ vs\ 2.02 \pm 0.23$ ) (Fig. 29B)。 $[V^+Cut\ Cut^{+RPS}]$ 系では、GDNF、NAC、および Sal は、軸索傷害に依存して増加した CREB のレベルを有意に減少させ、その値は、それぞれ  $1.27 \pm 0.35$ 、 $1.07 \pm 0.26$ 、および  $1.36 \pm 0.31$  であった ( $[Cut+vehicle]$ 核の値として、 $[Sham\ Cut]$ の Cut 側の値である 1.91 を使用した) (Fig. 29D)。



**Fig. 28 c-Jun に対する RPSs 投与の影響**

A. c-Jun の[Sham Sham]、[Sham Cut]、[Cut Cut]、 $[^{V+}Cut\ Cut^{+RPS}]$ による解析。[Sham Sham]、[Sham Cut]、[Cut Cut]および $[^{V+}Cut\ Cut^{+RPS}]$ 系の左右顔面神経核を回収し、組織抽出液を調製した後、c-Jun のウェスタンブロットを行った。β-Actin はローディングコントロールとして使用した。

B. c-Jun の定量解析。[Sham Sham]系および[Sham Cut]系では、左側 Sham のバンド強度を 1.00 として表示した。[Cut Cut]系の左側 Cut の値および $[^{V+}Cut\ Cut^{+RPS}]$ 系の左側  $^{V+}Cut$  の値としては、[Sham Cut]系の Cut の値を使用した。示されたデータは、3 ~ 5 回の独立した実験からの平均値 ±SD である。左側の顔面神経核と右側の顔面神経核の差異は、t 検定によって評価した (\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$ )。



**Fig. 29 p-CREB/CREB に対する RPSs 投与の影響**

A,B. p-CREB/CREB の[Sham Sham]、[Sham Cut]、[Cut Cut]、 $[^{V+}Cut\ Cut^{+RPS}]$ による解析。[Sham Sham]、[Sham Cut]、[Cut Cut]および $[^{V+}Cut\ Cut^{+RPS}]$ 系の左右顔面神経核を回収し、組織抽出液を調製した後、p-CREB と CREB のウェスタンブロットを行った。

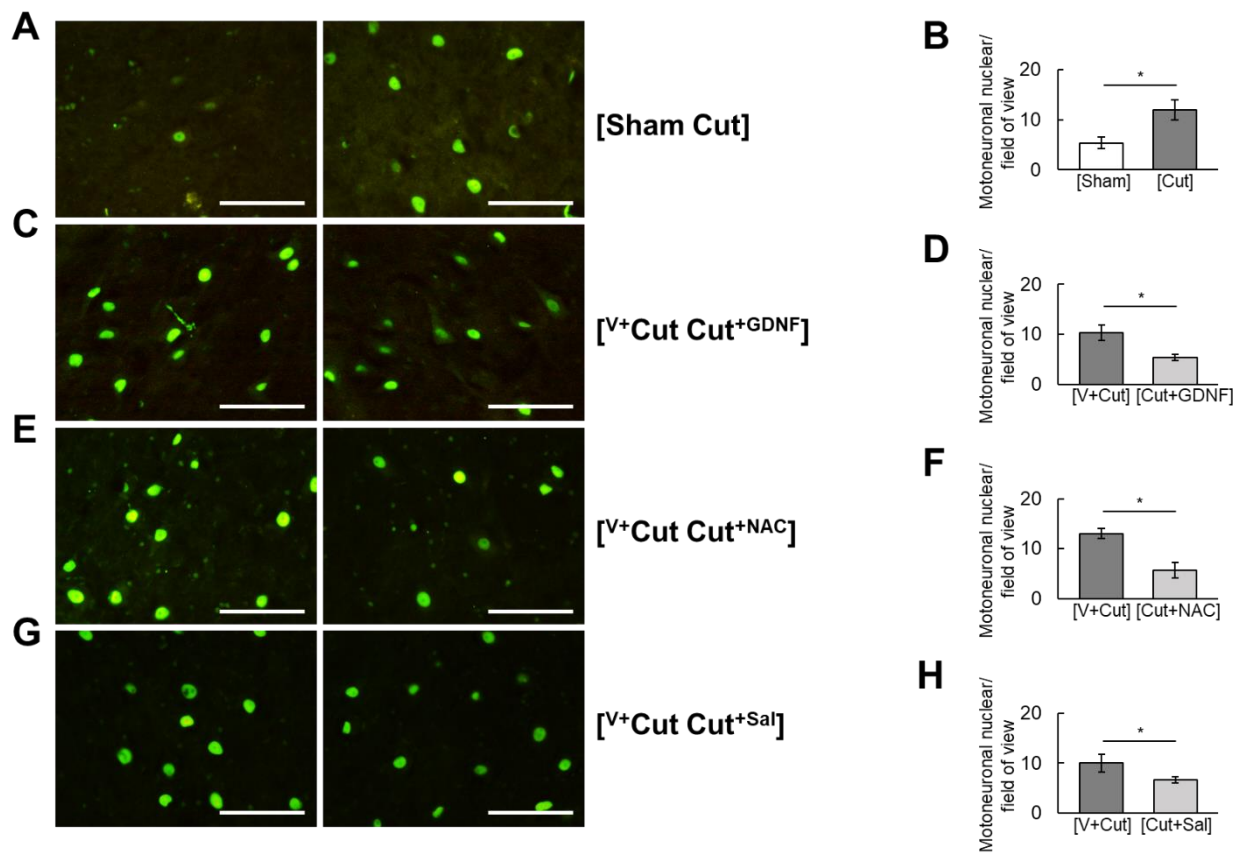
C,D. p-CREB/CREB の定量解析。[Sham Sham]系および[Sham Cut]系では、左側 Sham のバンド強度を 1.00 として表示した。[Cut Cut]系の左側 Cut の値および $[^{V+}Cut\ Cut^{+RPS}]$ 系の左側  $^{V+}Cut$  の値としては、[Sham Cut]系の Cut の値を使用した。示されたデータは、3 ~ 5 回の独立した実験からの平均値  $\pm$ SD である。左側の顔面神経核と右側の顔面核の差異は、t 検定によって評価した (\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$ )。



傷害運動ニューロンのシグナル分子に対する RPS の効果を、上記イムノブロッティングに加えて、免疫組織化学によっても調べた。c-Jun を調べた結果、[Sham Cut]切片の[Sham]核では、少数の運動ニューロン核が抗 c-Jun 抗体で染色されたのに対し、[Cut]核では多くの運動ニューロン核が染色された ( $5 \pm 1$  vs  $12 \pm 2$ ) (Fig. 30A,B)。しかし、 $[V^+Cut\ Cut^{+RPS}]$ 切片の GDNF、NAC、または Sal を投与した[Cut+RPS]核では、[Cut+vehicle]核と比較して、c-Jun を発現している細胞核の数が減少していた (GDNF では  $10 \pm 2$  vs  $5 \pm 1$ 、NAC では  $13 \pm 1$  vs  $6 \pm 2$ 、Sal では  $10 \pm 2$  vs  $7 \pm 1$ ) (Fig. 30C-H)。

p-CREB の発現性を調べると、[Sham Cut]切片の[Sham]核では多くの運動ニューロンが p-CREB を発現していたが、[cut]核ではその数が著しく減少していた ( $6 \pm 1$  vs  $1 \pm 1$ ) (Fig. 31A,B)。しかし、 $[V^+Cut\ Cut^{+RPS}]$ 切片の GDNF、NAC、または Sal を投与した核すなわち[Cut+RPS]核では、[Cut+vehicle]核と比較して、p-CREB 発現核の減少が抑制されていることがわかった (GDNF では  $1 \pm 1$  vs  $4 \pm 2$ 、NAC では  $1 \pm 1$  vs  $4 \pm 1$ 、Sal では  $1 \pm 1$  vs  $3 \pm 1$ ) (Fig. 31C-H)。この図で p-CREB 陽性の運動ニューロン核の染色性が回復している様子を見ることが出来る (白の矢頭)。

CREB を観察すると、[Sham Cut]切片の[Sham]核ではいくつかの CREB 発現運動ニューロンが見られたが、[Cut]核ではそれが増加していた ( $6 \pm 2$  vs  $14 \pm 4$ ) (Fig. 32A,B)。 $[V^+Cut\ Cut^{+RPS}]$ 切片の GDNF、NAC、または Sal を投与した[Cut+RPS]核では、[Cut+vehicle]核と比較して、CREB を発現している細胞核の増加が有意に抑制されることがわかった (GDNF では  $14 \pm 3$  vs  $5 \pm 2$ 、NAC では  $11 \pm 1$  vs  $5 \pm 3$ 、Sal では  $9 \pm 1$  vs  $6 \pm 1$ ) (Fig. 32C-H)。

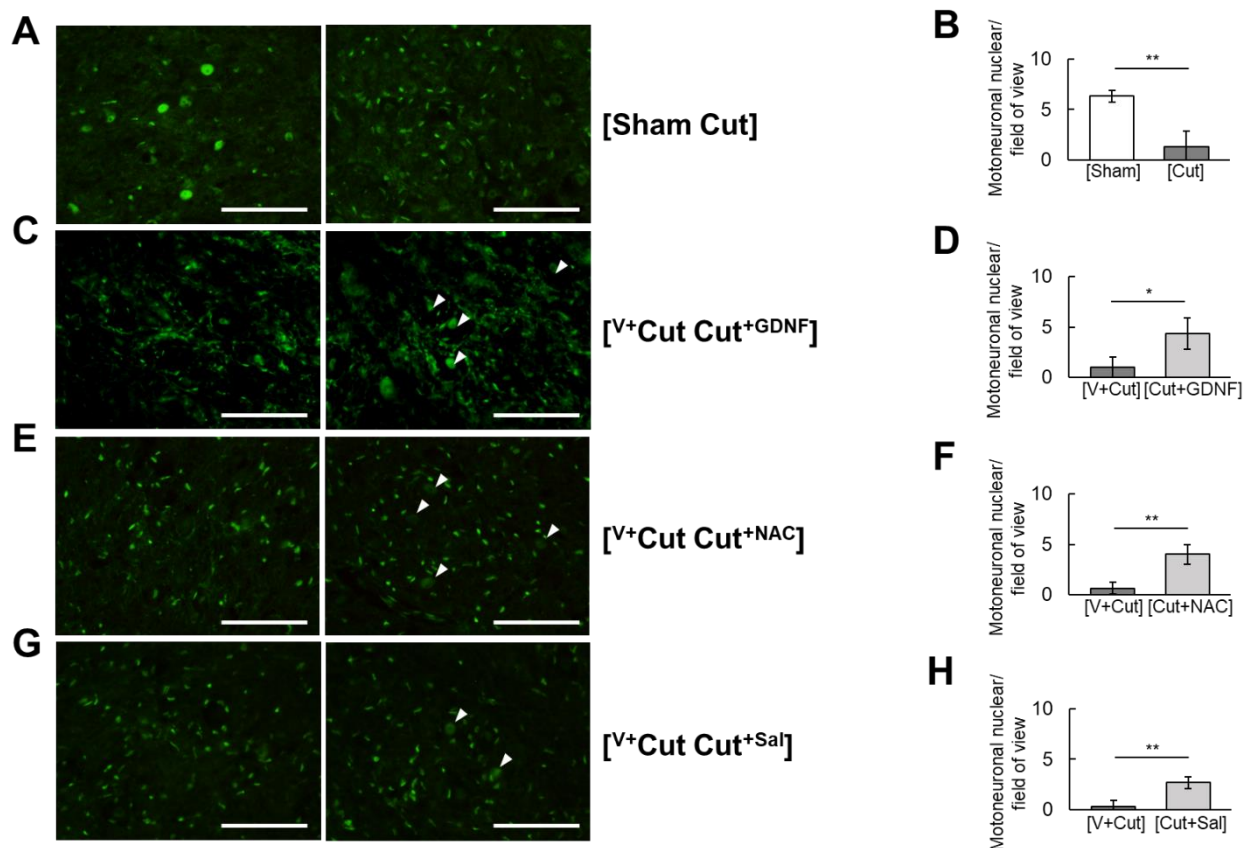


**Fig. 30 c-Jun の免疫組織化学染色**

A. [Sham Cut]系。片側顔面神経を切断し、5 日後に回収した脳幹の切片を抗 c-Jun 抗体で染色した。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。

C,E,G. [ $V^+$ Cut Cut $^{RPS}$ ]系。RPS として、GDNF (C)、NAC (E) および Sal (G) を使用し、5 日に回収した脳幹の切片を、抗 c-Jun 抗体で染色した。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。

B,D,F,H. c-Jun 陽性運動ニューロン核の定量。[Sham Cut]系 (B)、[ $V^+$ Cut Cut $^{GDNF}$ ]系 (D)、[ $V^+$ Cut Cut $^{NAC}$ ]系 (F) および [ $V^+$ Cut Cut $^{Sal}$ ]系 (H) の両核における染色核を定量した。データは、平均値  $\pm$  SD で示した。左右間の差異は、t 検定によって評価した (\*  $P < 0.05$ 、\*\*  $P < 0.01$ )。

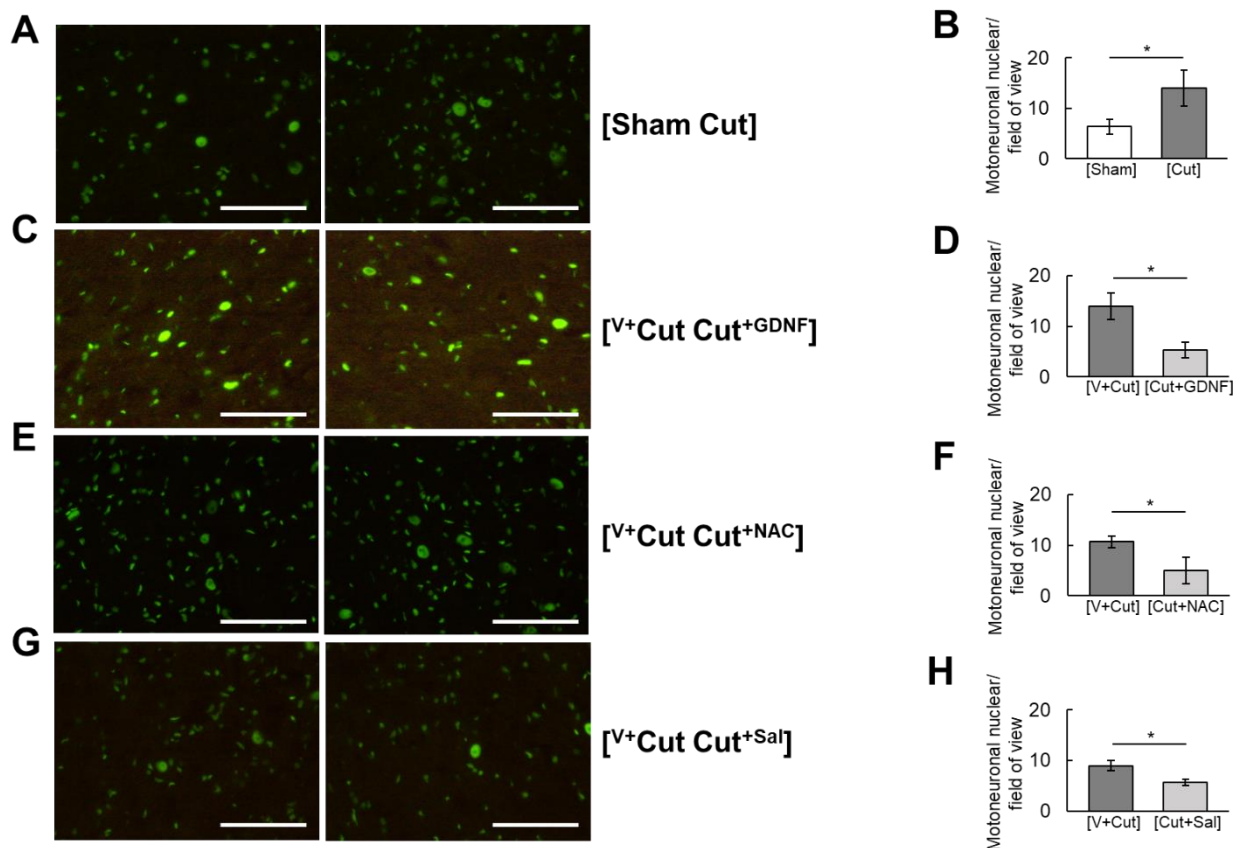


**Fig. 31 p-CREB の免疫組織化学染色**

A. [Sham Cut]系。片側顔面神経を切断し、5 日後に回収した脳幹の切片を抗 p-CREB 抗体で染色した。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。

C,E,G. [ $V^+$ Cut Cut $^{RPS}$ ]系。RPS として、GDNF (C)、NAC (E) および Sal (G) を使用し、5 日目に回収した脳幹の切片を、抗 p-CREB 抗体で染色した。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。

B,D,F,H. p-CREB 陽性運動ニューロン核の定量。[Sham Cut]系 (B)、[ $V^+$ Cut Cut $^{GDNF}$ ]系 (D)、[ $V^+$ Cut Cut $^{NAC}$ ]系 (F) および [ $V^+$ Cut Cut $^{Sal}$ ]系 (H) の両核における染色核を定量した。データは、平均値  $\pm$  SD で示した。左右間の差異は、t 検定によって評価した (\*  $P < 0.05$ 、\*\*  $P < 0.01$ )。



**Fig. 32** CREB の免疫組織化学染色

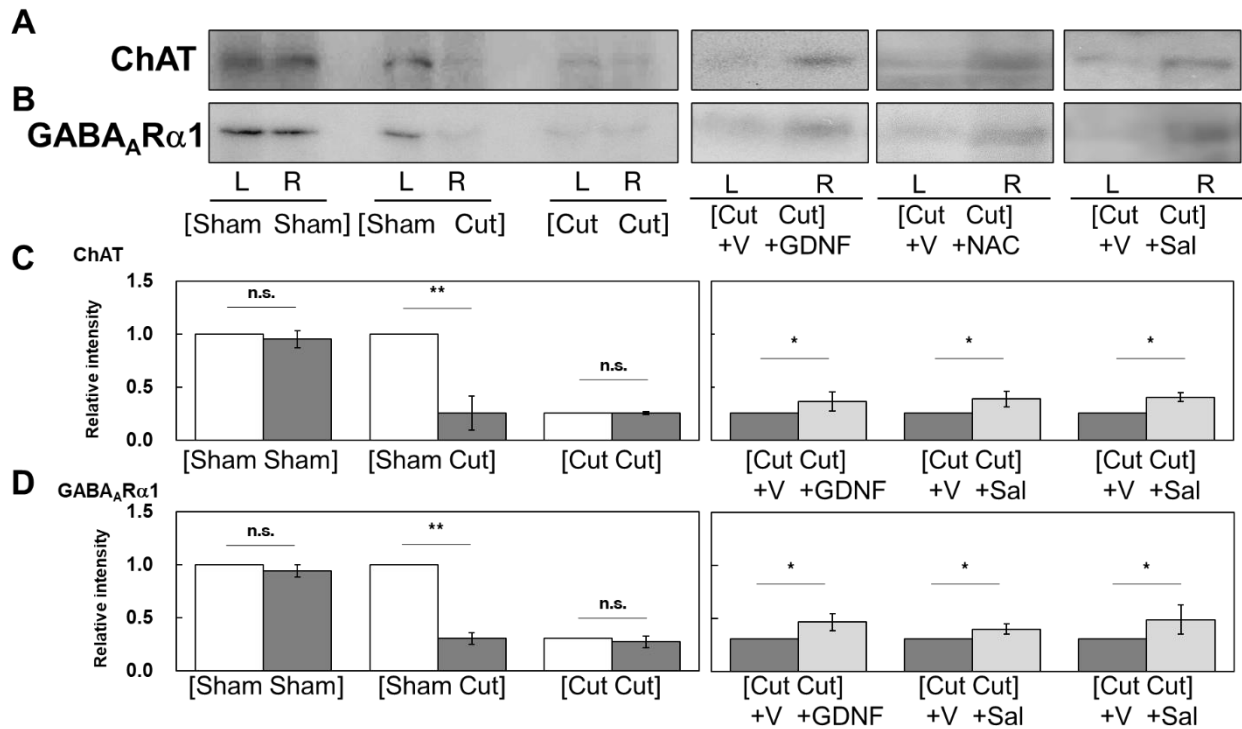
A. [Sham Cut]系。片側顔面神経を切断し、5 日後に回収した脳幹の切片を抗 CREB 抗体で染色した。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。

C,E,G. [V<sup>+</sup>Cut Cut<sup>+RPS</sup>]系。RPS として、GDNF (C)、NAC (E) および Sal (G) を使用し、5 日目に回収した脳幹切片を、抗 CREB 抗体で染色した。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。

B,D,F,H. CREB 陽性運動ニューロン核の定量。[Sham Cut]系 (B)、[V<sup>+</sup>Cut Cut<sup>+GDNF</sup>]系 (D)、[V<sup>+</sup>Cut Cut<sup>+NAC</sup>]系 (F) および [V<sup>+</sup>Cut Cut<sup>+Sal</sup>]系 (H) の両核における染色核を定量した。データは、平均値  $\pm$  SD で示した。左右間の差異は、t 検定によって評価した (\* P < 0.05、\*\* P < 0.01)。

続いて、運動ニューロンの機能分子に対する RPS の影響を解析した。[Sham Sham]系では、ChAT および GABA<sub>A</sub>R $\alpha$ 1 は、両側でほぼ同レベルで高発現していたが (ChAT は  $1.00$  vs  $0.95 \pm 0.08$ 、GABA<sub>A</sub>R $\alpha$ 1 は  $1.00$  vs  $0.95 \pm 0.06$ ) (Fig. 33A,C; Fig. 33B,D)、[Sham Cut]系では axotFN でのレベルが大幅に減少した (ChAT は  $1.00$  vs  $0.26 \pm 0.16$ 、GABA<sub>A</sub>R $\alpha$ 1 は  $1.00$  vs  $0.31 \pm 0.06$ ) (Fig. 33A,C; Fig. 33B,D)。[Cut Cut]系では、両側のレベルは均等に減少していた (ChAT は  $0.26$  vs  $0.26 \pm 0.01$ 、GABA<sub>A</sub>R $\alpha$ 1 は  $0.31$  vs  $0.28 \pm 0.05$ ) (Fig. 33A,C; Fig. 33B,D)。[<sup>V+</sup>Cut Cut<sup>+RPS</sup>]系では、GDNF、NAC、Sal の投与側すなわち[Cut+RPS]核の ChAT/GABA<sub>A</sub>R $\alpha$ 1 のレベルは[Cut+vehicle]核と比較して有意に改善されることがわかった。GDNF 投与では、ChAT の値は  $0.37 \pm 0.09$ 、GABA<sub>A</sub>R $\alpha$ 1 の値は  $0.46 \pm 0.08$  であった (Fig. 33A,C; Fig. 33B,D) ([Cut+vehicle]核の値として、[Sham Cut]の Cut 側の値である  $0.26$  を使用した)。NAC 投与では、ChAT は  $0.39 \pm 0.08$ 、GABA<sub>A</sub>R $\alpha$ 1 は  $0.40 \pm 0.05$  であった (Fig. 33A,C; Fig. 33B,D)。Sal 投与では、ChAT は  $0.41 \pm 0.04$ 、GABA<sub>A</sub>R $\alpha$ 1 は  $0.49 \pm 0.14$  であった (Fig. 33A,C; Fig. 33B,D)。

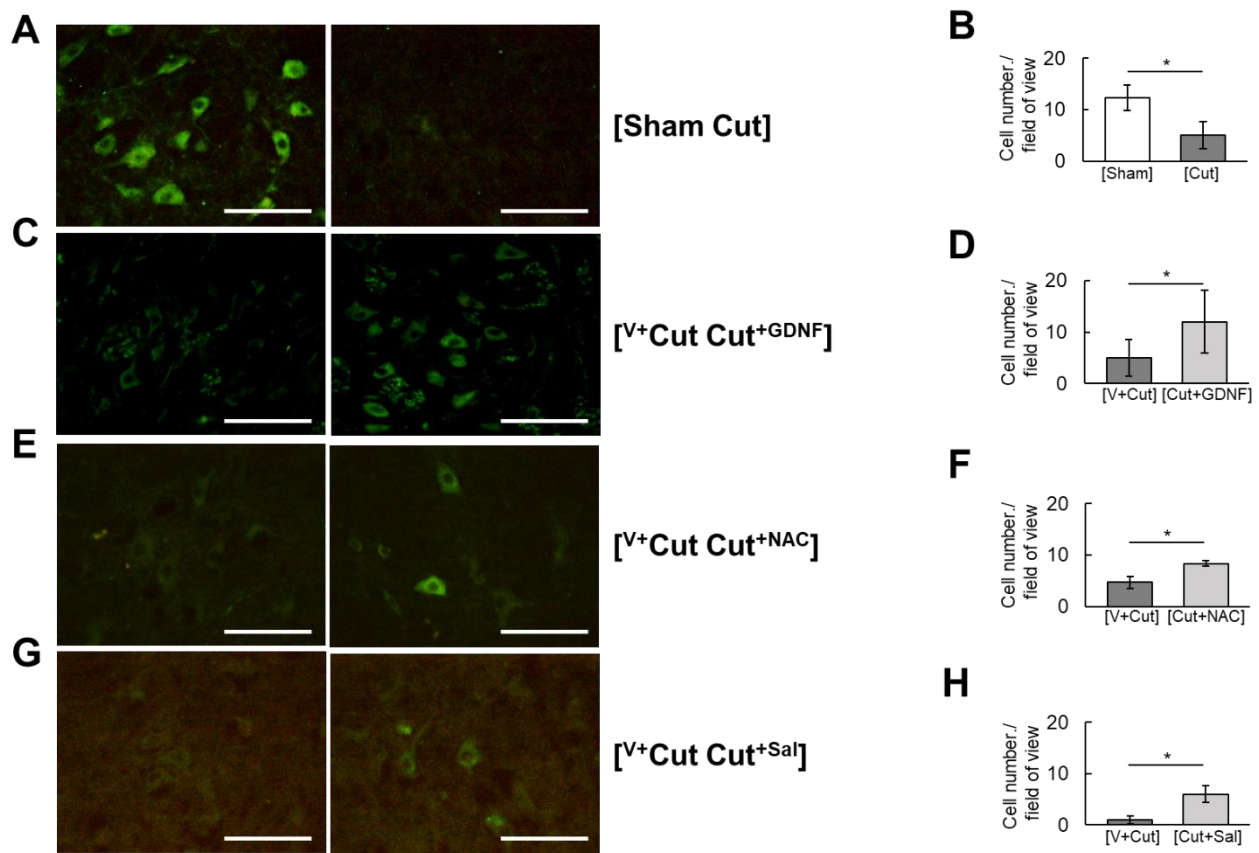
RPS 効果は免疫組織化学的染色によっても確認した。[Sham Cut] 切片の[Sham] 核では多くの運動ニューロンが ChAT、GABA<sub>A</sub>R $\alpha$ 1 および VAchT 抗体で染色されていたが、[Cut] 核では、それらの陽性細胞が著しく減少していた (Fig. 34A,B; 35A,B; 36A,B)。[<sup>V+</sup>Cut Cut<sup>+RPS</sup>] 切片の GDNF、NAC、または Sal を投与した[Cut+RPS]核では、[Cut+vehicle]核と比較して、ChAT/GABA<sub>A</sub>R $\alpha$ 1/VAch 発現ニューロンの減少が改善されていた (Fig. 34C-H, 35C-H, 36C-H)。免疫組織化学染色の定量結果は、以下にまとめて示す。ChAT は、[Sham Cut]では  $12 \pm 2$  vs  $5 \pm 3$  であったが (Fig. 34B)、[<sup>V+</sup>Cut Cut<sup>+RPS</sup>]系の GDNF 投与では  $5 \pm 4$  vs  $12 \pm 6$ 、NAC 投与では  $5 \pm 1$  vs  $8 \pm 1$ 、Sal 投与では  $1 \pm 1$  vs  $6 \pm 2$  であった (Fig. 34D,F,H)。GABA<sub>A</sub>R $\alpha$ 1 は、[Sham Cut]では  $10 \pm 2$  vs  $2 \pm 1$  であったが (Fig. 35B)、[<sup>V+</sup>Cut Cut<sup>+RPS</sup>]系の GDNF 投与では  $1 \pm 1$  vs  $4 \pm 1$ 、NAC 投与では  $1 \pm 1$  vs  $5 \pm 2$ 、Sal 投与では  $2 \pm 1$  vs  $5 \pm 1$  であった (Fig. 35D,F,H)。VAchT は、[Sham Cut]では  $145798 \pm 48092$  vs  $59612 \pm 33274$  であったが (Fig. 36B)、[<sup>V+</sup>Cut Cut<sup>+RPS</sup>]系の GDNF 投与では  $11716 \pm 1157$  vs  $23216 \pm 6161$ 、NAC 投与では  $20158 \pm 3510$  vs  $42806 \pm 12062$ 、Sal 投与では  $15566 \pm 4134$  vs  $32977 \pm 5473$  であった (Fig. 36D,F,H)。



**Fig. 33 運動ニューロン機能分子に対する RPSs の影響**

A,B. ChAT および GABA<sub>A</sub>Rα1 の[Sham Sham]、[Sham Cut]、[Cut Cut]、[<sup>V+</sup>Cut Cut<sup>+RPS</sup>]による解析。[Sham Sham]、[Sham Cut]、[Cut Cut]および[<sup>V+</sup>Cut Cut<sup>+RPS</sup>]系の左右顔面神経核を回収し、組織抽出液を調製した後、ChAT と GABA<sub>A</sub>Rα1 のウェスタンブロットを行った。

C,D. ChAT および GABA<sub>A</sub>Rα1 の定量解析。[Sham Sham]系および[Sham Cut]系では、左側 Sham のバンド強度を 1.00 として表示した。[Cut Cut]系の左側 Cut の値および[<sup>V+</sup>Cut Cut<sup>+RPS</sup>]系の左側 <sup>V+</sup>Cut の値としては、[Sham Cut]系の Cut の値を使用した。示されたデータは、3 ~ 6 回の独立した実験からの平均値 ± SD である。左側の顔面神経核と右側の顔面神経核の差異は t 検定によって評価した (\*P < 0.05, \*\*P < 0.01)。



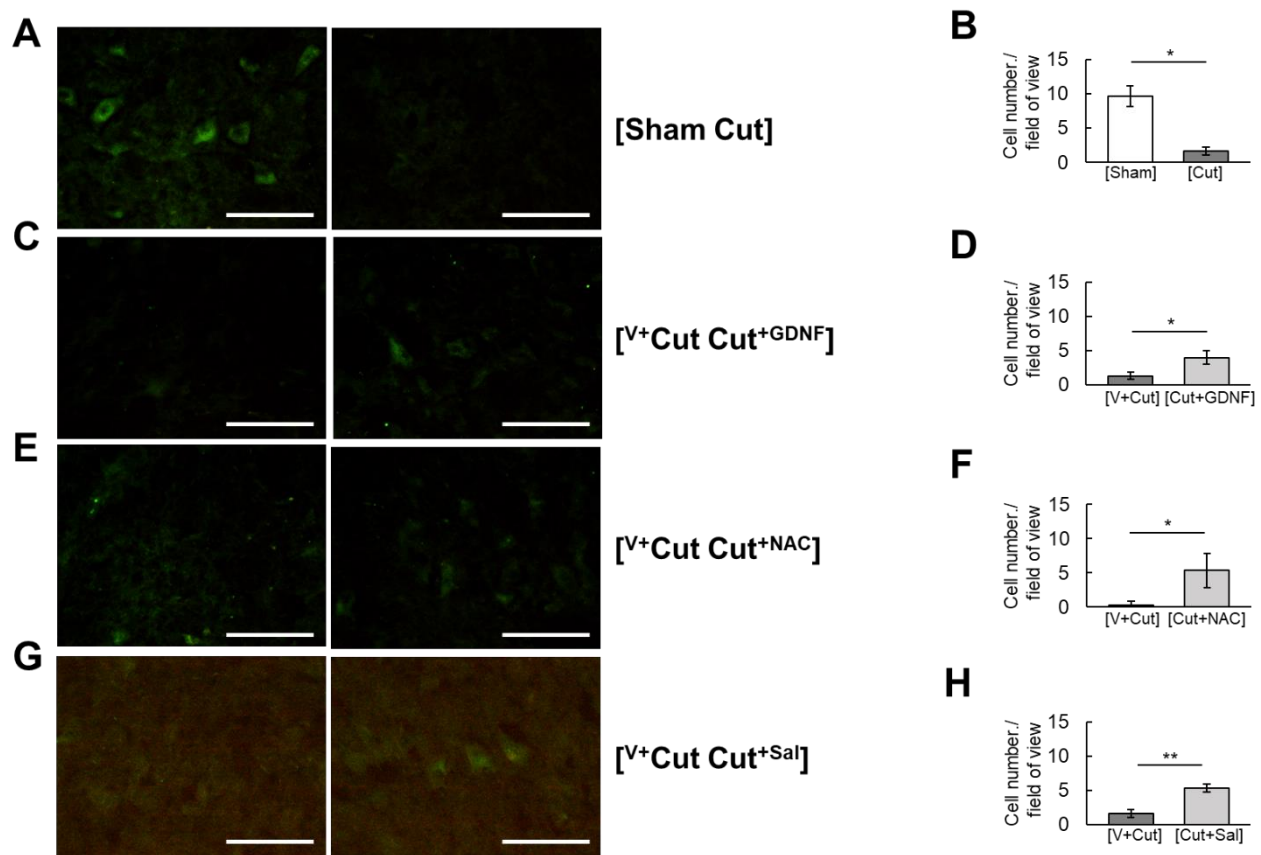
**Fig. 34 ChAT の免疫組織化学染色**

A. [Sham Cut]系。片側顔面神経を切断し、5 日後に回収した脳幹の切片を抗 ChAT 抗体で染色した。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。

C,E,G. [ $V^+$ Cut Cut<sup>+RPS</sup>]系。RPS として、GDNF (C)、NAC (E) および Sal (G) を使用し、5 日目に回収した脳幹の切片を、抗 ChAT 抗体で染色した。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。

B,D,F,H. ChAT 陽性細胞数の定量。[Sham Cut]系 (B)、[ $V^+$ Cut Cut<sup>+GDNF</sup>]系 (D)、[ $V^+$ Cut Cut<sup>+NAC</sup>]系 (F) および [ $V^+$ Cut Cut<sup>+Sal</sup>]系 (H) の両核における染色細胞数を定量した。データは、平均値  $\pm$  SD で示した。左右間の差異は、t 検定によって評価した (\*  $P < 0.05$ 、\*\*  $P < 0.01$ )。





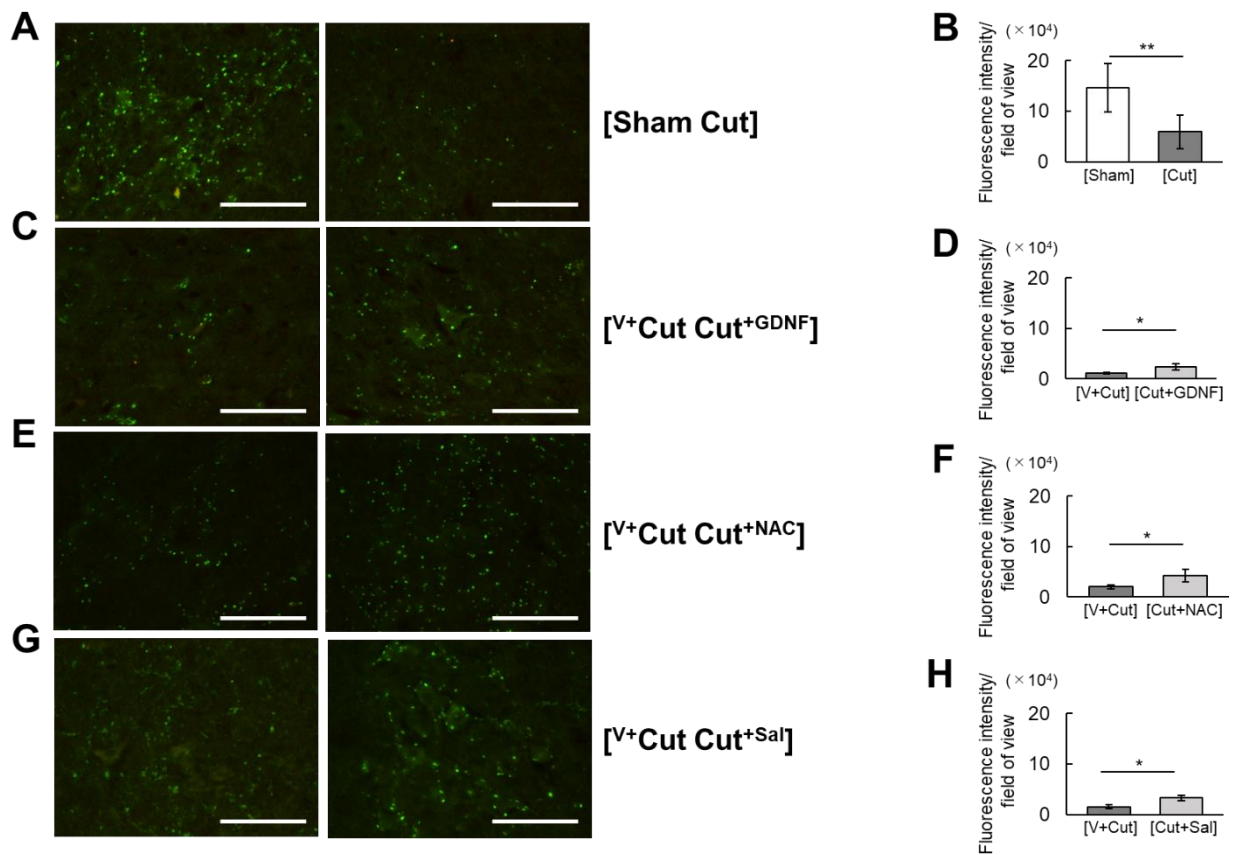
**Fig. 35 GABA<sub>A</sub>Rα1 の免疫組織化学染色**

A. [Sham Cut]系。片側顔面神経を切断し、5日後に回収した脳幹の切片を抗 GABA<sub>A</sub>Rα1 抗体で染色した。スケールバーは 100 μm。

C,E,G. [V<sup>+</sup>Cut Cut<sup>+RPS</sup>]系。RPS として、GDNF (C)、NAC (E) および Sal (G) を使用し、5日目に回収した脳幹の切片を、抗 GABA<sub>A</sub>Rα1 抗体で染色した。スケールバーは 100 μm。

B,D,F,H. GABA<sub>A</sub>Rα1 陽性細胞数の定量。[Sham Cut]系 (B)、[V<sup>+</sup>Cut Cut<sup>+GDNF</sup>]系 (D)、[V<sup>+</sup>Cut Cut<sup>+NAC</sup>]系 (F) および [V<sup>+</sup>Cut Cut<sup>+Sal</sup>]系 (H) の両核における染色細胞数を定量した。データは、平均値 ± SD で示した。左右間の差異は、t 検定によって評価した (\* P < 0.05、\*\* P < 0.01)。





**Fig. 36 VAcHT の免疫組織化学染色**

A. [Sham Cut]系。片側顔面神経を切断し、5日後に回収した脳幹の切片を抗 VAcHT 抗体で染色した。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。

C,E,G. [<sup>V+</sup>Cut Cut<sup>RPS</sup>]系。RPS として、GDNF (C)、NAC (E) および Sal (G) を使用し、5日目に回収した脳幹の切片を、抗 VAcHT 抗体で染色した。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。

B,D,F,H. VAcHT 蛍光強度の定量。[Sham Cut]系 (B)、[<sup>V+</sup>Cut Cut<sup>GDNF</sup>]系 (D)、[<sup>V+</sup>Cut Cut<sup>NAC</sup>]系 (F) および [<sup>V+</sup>Cut Cut<sup>Sal</sup>]系 (H) の両核における VAcHT 蛍光強度を定量した。データは、平均値  $\pm$  SD で示した。左右間の差異は、t 検定によって評価した (\* P<0.05、\*\* P<0.01)。

以上の $[V^+Cut\ Cut^{+RPS}]$ 系を用いた解析から、RPS (GDNF、NAC、Sal) が c-Jun の上昇を抑制、p-CREB の減少を軽減し、ChAT、GABA<sub>A</sub>R $\alpha$ 1、VAchT などの運動ニューロン機能分子の減少を有意に抑えることが証明された。

ラットの顔面神経傷害系において axotFN では ChAT が低下するが、Yan らはこの時、傷害側に GDNF を投与すると ChAT 発現細胞の減少が軽減されることを免疫組織化学的に示した (Yan et al., 1995)。本研究の結果は、彼らの結果と一致したことを示すと共に、傷害軸索への RPS 投与が効果的に行われたことも示している。また Yan らは、ラット新生仔の脊髄運動ニューロンでは、GDNF が受容体媒介様式で逆行的に輸送されることも述べている (Yan et al., 1995)。したがって、本研究において、顔面神経の切断部位に投与された GDNF は、軸索を通過して運動ニューロン細胞体に逆行的に輸送され、そこで修復プロセスを進めるように機能したと考えられる。本研究では、GDNF の効果として、ChAT のみならず GABA<sub>A</sub>R $\alpha$ 1 および VAchT の傷害依存的低下を軽減できることを新たに示すことができ、GDNF による損傷運動ニューロンの機能回復が ChAT に限定されないことがわかった。さらに NAC と Sal も GDNF 同様に、ChAT、GABA<sub>A</sub>R $\alpha$ 1、VAchT の傷害依存的減少を軽減する効果を持つことが判明した。従来、傷害運動ニューロンの回復は、主に運動機能を測定することによって行われてきたが、本研究から示唆されたように、神経機能分子の発現性も運動ニューロン回復の指標になりうると考えられた。

### 3.7. ミクログリアの増殖に対する RPS 投与の効果

GDNF、NAC または Sal を、切断した顔面神経軸索に投与した後、顔面神経核内におけるミクログリアの増殖を分析した。評価は、 $[V^+Cut\ Cut^{+RPS}]$ 系を使用して、ミクログリアマーカータンパク質である ionized calcium binding adapter molecule 1 (Iba1)、cFms、proliferating cell nuclear antigen (PCNA) および p-p38/p38 のレベルを比較した。

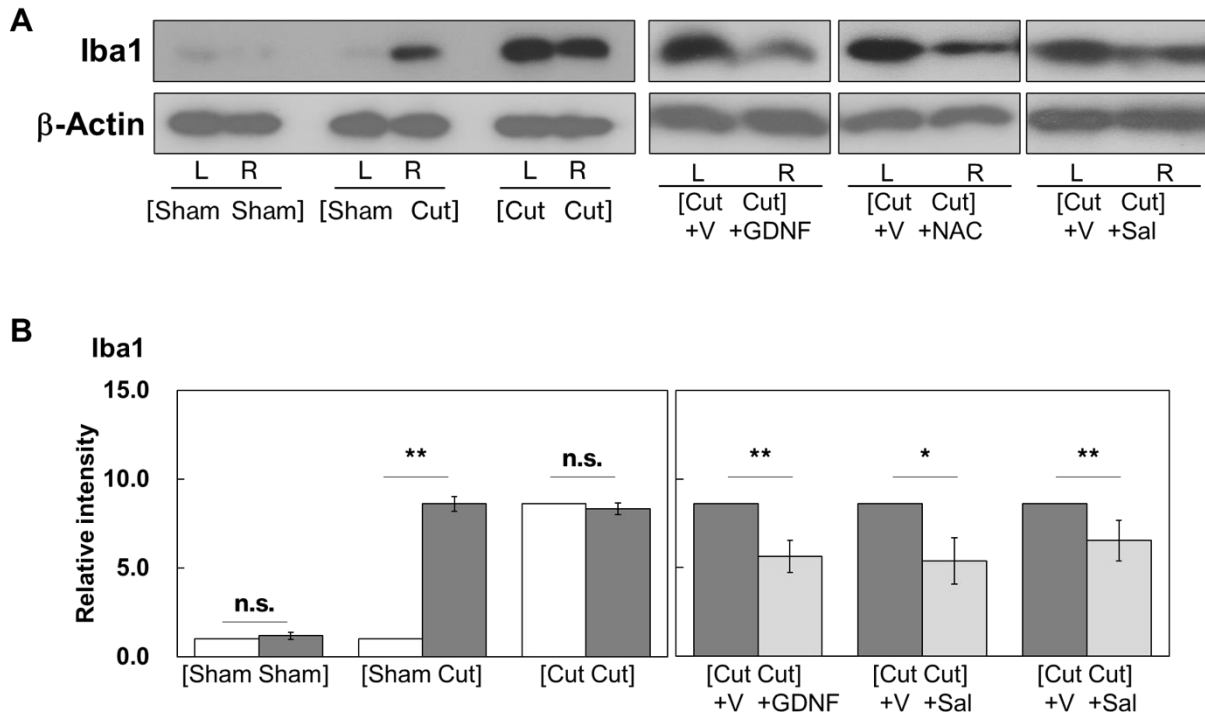
Iba1 のレベルは、[Sham Sham]系では、両側とも非常に低かったが (1.00 vs  $1.18 \pm 0.21$ )、[Sham Cut]系では、axotFN のレベルが劇的に増加した (1.00 vs  $8.60 \pm 0.41$ ) (Fig. 37A,B)。[Cut Cut]系では、両側のレベルが同等に増加した ( $8.60$  vs  $8.33 \pm 0.32$ ) (Fig. 37A,B)。 $[V^+Cut\ Cut^{+RPS}]$  の GDNF、NAC または Sal を投与した[Cut+RPS]核における Iba1 のレベルは、それぞれ  $5.65 \pm 0.91$ 、 $5.38 \pm 1.30$  および  $6.54 \pm 1.14$  の値を示し、[Cut+vehicle]核より低下した (Fig. 37A,B) ([Cut+vehicle]核の値として、[Sham Cut]の Cut 側の値である 8.60 を用いた)。

cFms の挙動は Iba1 とよく似て、[Sham Sham]系では、両側で低値を示したが (1.00 vs  $1.07 \pm 0.03$ )、[Sham Cut]系の axotFN では大幅に増加した (1.00 vs  $9.70 \pm 0.30$ ) (Fig. 38A,B)。[Cut Cut]系では、両側のレベルが同等に増加した ( $9.70$  vs  $9.61 \pm 0.56$ ) (Fig. 38A,B)。 $[V^+Cut\ Cut^{+RPS}]$  系では、[Cut+vehicle]核に比べ、GDNF、NAC または Sal を投与した[Cut+RPS]核では有意に減少し、値はそれぞれ  $5.94 \pm 1.35$ 、 $6.55 \pm 1.50$  および  $6.46 \pm 0.68$  であった (Fig. 38A,B) ([Cut+vehicle]核の値として、[Sham Cut]の Cut 側の値である 9.70 を使用した)。

PCNA は、[Sham Sham]系では、両側でほとんど発現していなかったが (1.00 vs  $1.01 \pm 0.01$ )、[Sham Cut]系では、axotFN におけるレベルが増加した (1.00 vs  $4.54 \pm 0.47$ ) (Fig. 39A,B)。[Cut Cut]系では、両側のレベルがほぼ同等に増加した ( $4.54$  vs  $4.58 \pm 0.39$ ) (Fig. 39A,B)。 $[V^+Cut\ Cut^{+RPS}]$ 系の GDNF、NAC または Sal を投与した[Cut+RPS]核では、PCNA レベルは [Cut+Vehicle]核に比べ有意に低下し、その値はそれぞれ、 $2.99 \pm 0.67$ 、 $3.00 \pm 0.74$ 、および  $2.09 \pm 1.15$  であった (Fig. 39A,B) ([Cut+vehicle]核の値として、[Sham Cut]の Cut 側の値である 4.54 を用いた)。

次に、p-p38 および p38 を調べた。[Sham Sham]系では、p-p38 および p38 のレベルは両側で非常に低かったが (p-p38 では 1.00 vs  $1.06 \pm 0.07$ 、p38 では 1.00 vs  $1.01 \pm 0.05$ ) (Fig. 40A,C; Fig. 40B,D)、[Sham Cut]系の axotFN では顕著な増加が認められた (p-p38 は 1.00 vs  $2.81 \pm$

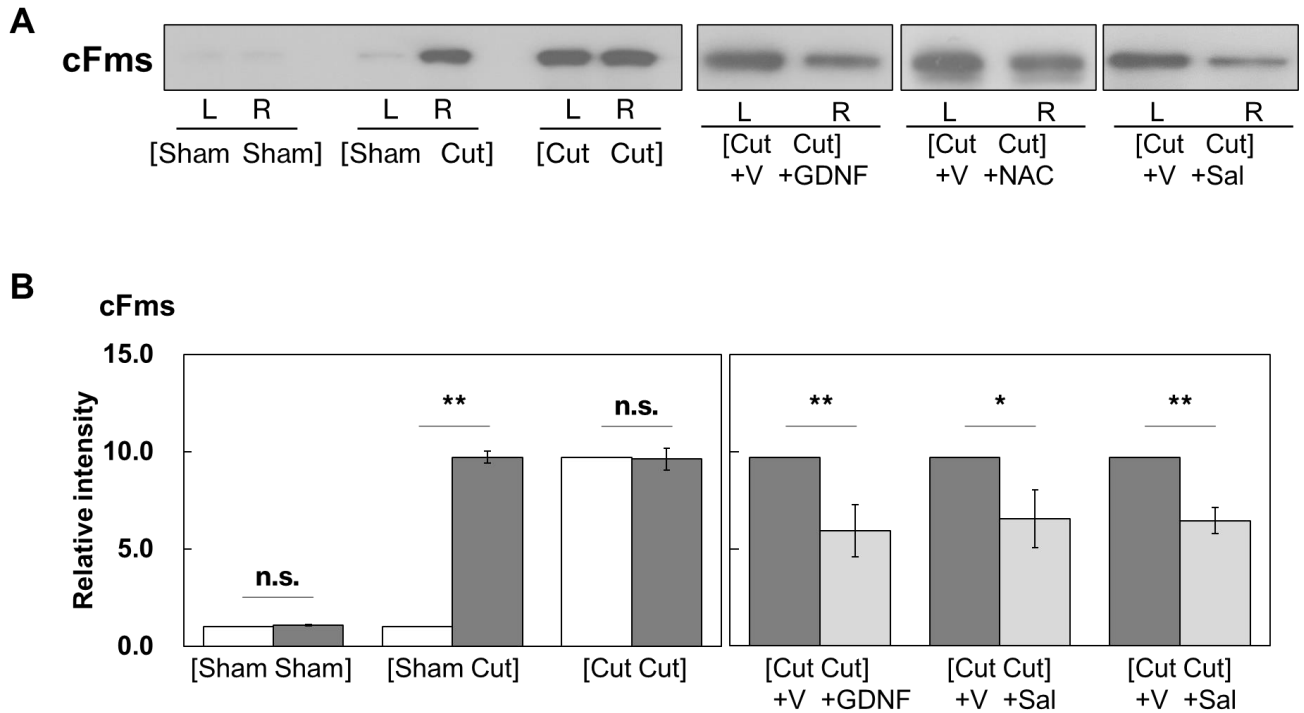
0.25、p38 は  $1.00$  vs  $2.74 \pm 0.59$ ) (Fig. 40A,C; Fig. 40B,D)。[Cut Cut]系では、両側のレベルが同程度に増加した (p-p38 は  $2.81$  vs  $2.94 \pm 0.21$ 、p38 は  $2.74$  vs  $2.78 \pm 0.14$ ) (Fig. 40A,C; Fig. 40B,D)。[ $^{V+}$ Cut Cut $^{RPS}$ ]系の GDNF、NAC または Sal を投与した[Cut+RPS]核内の p-p38 および p38 量は、[Cut+Vehicle]核と比較して有意に減少した。GDNF 投与では、p-p38 は  $1.75 \pm 0.51$ 、p38 は  $1.94 \pm 0.54$  であった (Fig. 40A,C; Fig. 40B,D) ([Cut+vehicle]核の値として、[Sham Cut]の Cut 側の値、すなわち、p-p38 は  $2.81$ 、p38 は  $2.74$  を使用した)。NAC 投与では、p-p38 は  $2.01 \pm 0.25$ 、p38 は  $2.12 \pm 0.41$  であった (Fig. 40A,C; Fig. 40B,D)。Sal 投与では、p-p38 は  $2.06 \pm 0.26$ 、p38 は  $1.97 \pm 0.60$  であった (Fig. 40A,C; Fig. 40B,D)。



**Fig. 37 Iba1 に対する RPSs 投与の影響**

A. Iba1 の[Sham Sham]、[Sham Cut]、[Cut Cut]、[<sup>V+</sup>Cut Cut<sup>+RPS</sup>]による解析。[Sham Sham]、[Sham Cut]、[Cut Cut]および[<sup>V+</sup>CutCut<sup>+RPS</sup>]系の左右顔面神経核を回収し、組織抽出液を調製した後、Iba1 のウェスタンブロットを行った。 $\beta$ -Actin はローディングコントロールとした。

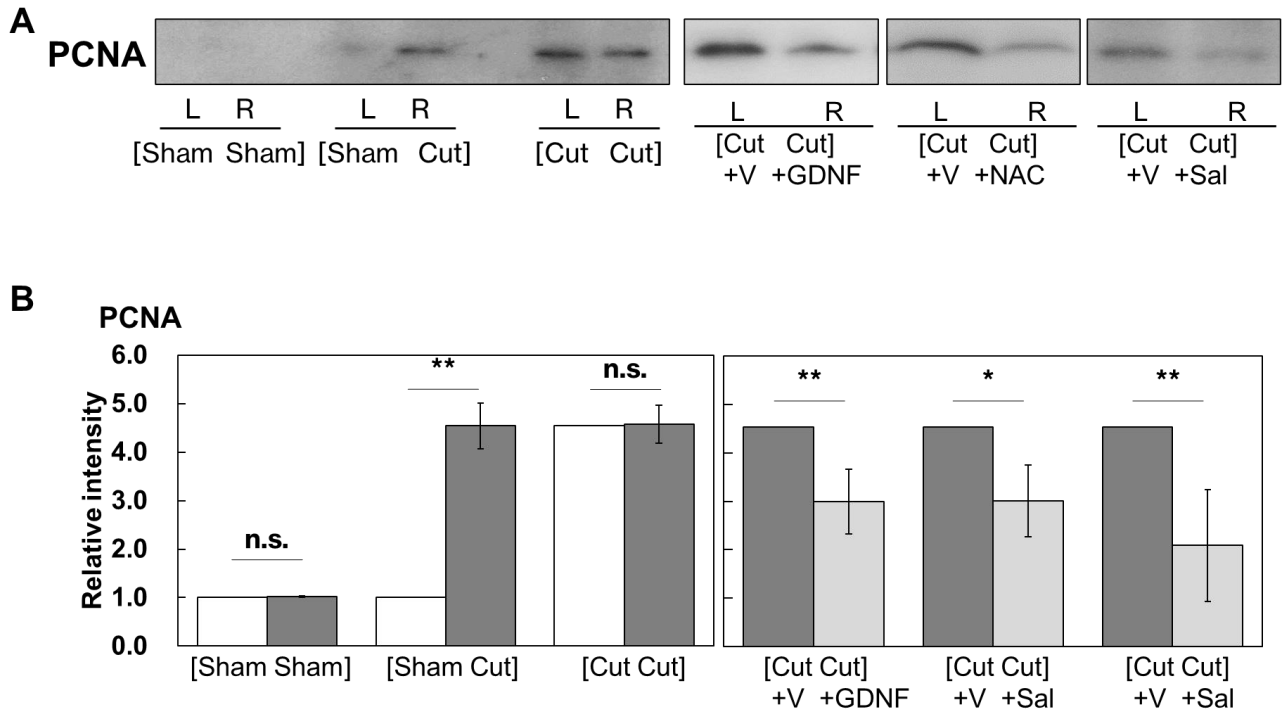
B. Iba1 の定量解析。[Sham Sham]系および[Sham Cut]系では、左側 Sham のバンド強度を 1.00 として表示した。[Cut Cut]系の左側 Cut の値および[<sup>V+</sup>Cut Cut<sup>+RPS</sup>]系の左側 <sup>V+</sup>Cut の値としては、[Sham Cut]系の Cut の値を使用した。示されたデータは、3 ~ 6 回の独立した実験からの平均値  $\pm$  SD である。左側の顔面核と右側の顔面核の差異は、検定によって評価した (\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$ )。



**Fig. 38 cFms に対する RPSs 投与の影響**

A. cFms の[Sham Sham]、[Sham Cut]、[Cut Cut]、 $[^{V+}Cut\ Cut^{+RPS}]$ による解析。[Sham Sham]、[Sham Cut]、[Cut Cut]および $[^{V+}Cut\ Cut^{+RPS}]$ 系の左右顔面神経核を回収し、組織抽出液を調製した後、cFms のウェスタンブロットを行った。

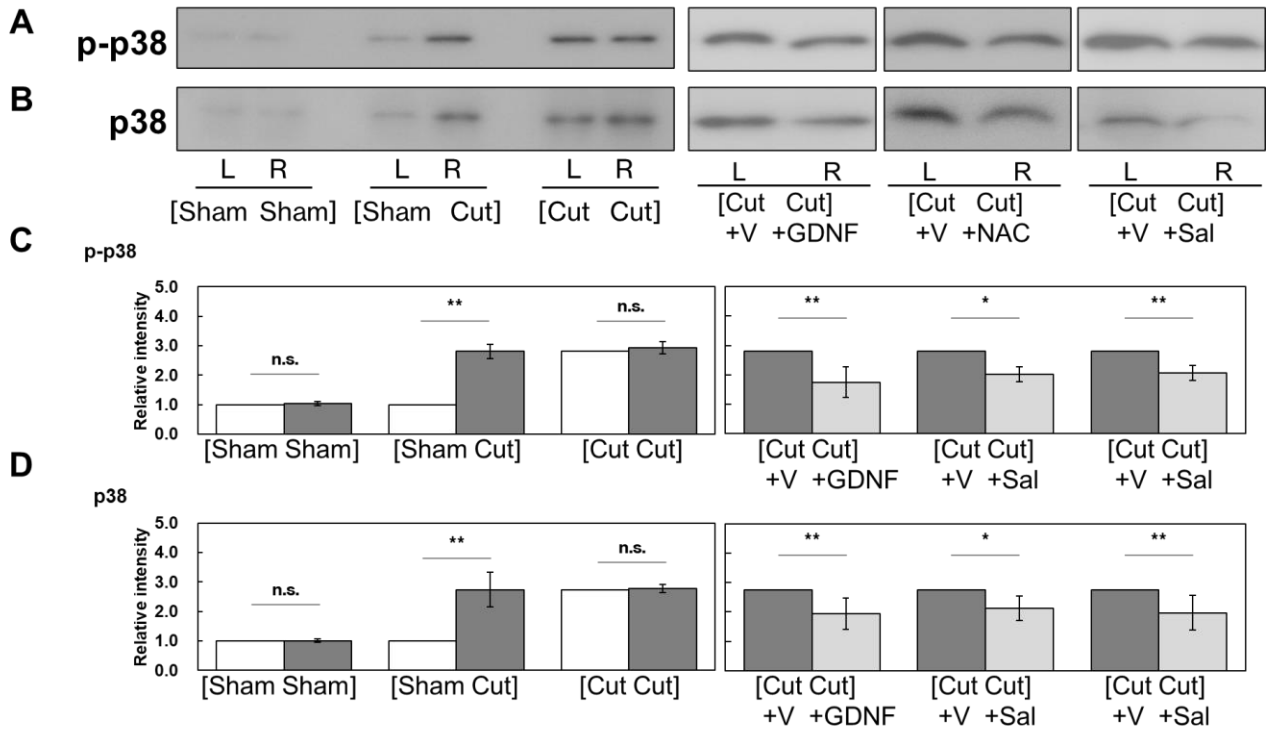
B. cFms の定量解析。[Sham Sham]系および[Sham Cut]系では、左側 Sham のバンド強度を 1.00 として表示した。[Cut Cut]系の左側 Cut の値および $[^{V+}Cut\ Cut^{+RPS}]$ 系の左側  $^{V+}Cut$  の値としては、[Sham Cut]系の Cut の値を使用した。示されたデータは、3 ~ 4 回の独立した実験からの平均値  $\pm$ SD である。左側の顔面核と右側の顔面核の差異は、t 検定によって評価した (\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$ )。



**Fig. 39 PCNA に対する RPSs 投与の影響**

A. PCNA の[Sham Sham]、[Sham Cut]、[Cut Cut]、 $[^{V+}Cut\ Cut^{+RPS}]$ による解析。[Sham Sham]、[Sham Cut]、[Cut Cut]および $[^{V+}Cut\ Cut^{+RPS}]$ 系の左右顔面神経核を回収し、組織抽出液を調製した後、PCNA のウェスタンブロットを行った。

B. PCNA の定量解析。[Sham Sham]系および[Sham Cut]系では、左側 Sham のバンド強度を 1.00 として表示した。[Cut Cut]系の左側 Cut の値および $[^{V+}Cut\ Cut^{+RPS}]$ 系の左側  $^{V+}Cut$  の値としては、[Sham Cut]系の Cut の値を使用した。示されたデータは、3 ~ 6 回の独立した実験からの平均値  $\pm$ SD である。左側の顔面核と右側の顔面核の差異は、t 検定によって評価した (\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$ )。



**Fig. 40** p-p38/p38 に対する RPSs 投与の影響

A,B. p-p38/p38 の[Sham Sham]、[Sham Cut]、[Cut Cut]、[<sup>V+</sup>Cut Cut<sup>+RPS</sup>]による解析。[Sham Sham]、[Sham Cut]、[Cut Cut]および[<sup>V+</sup>Cut Cut<sup>+RPS</sup>]系の左右顔面神経核を回収し、組織抽出液を調製した後、p-p38 (A) および p38 (B) のウェスタンブロットを行った。

C,D. p-p38/p38 の定量解析。A,B に示したウェスタンブロットの結果を定量化し、p-p38 (C) および p38 (D) とした。[Sham Sham]系および[Sham Cut]系では、左側 Sham のバンド強度を 1.00 として表示した。[Cut Cut]系の左側 Cut の値および[<sup>V+</sup>Cut Cut<sup>+RPS</sup>]系の左側 <sup>V+</sup>Cut の値としては、[Sham Cut]系の Cut の値を使用した。示されたデータは、3 ~ 5 回の独立した実験からの平均値 ±SD である。左側の顔面核と右側の顔面核の差異は、t 検定によって評価した (\*P < 0.05、\*\*P < 0.01)。



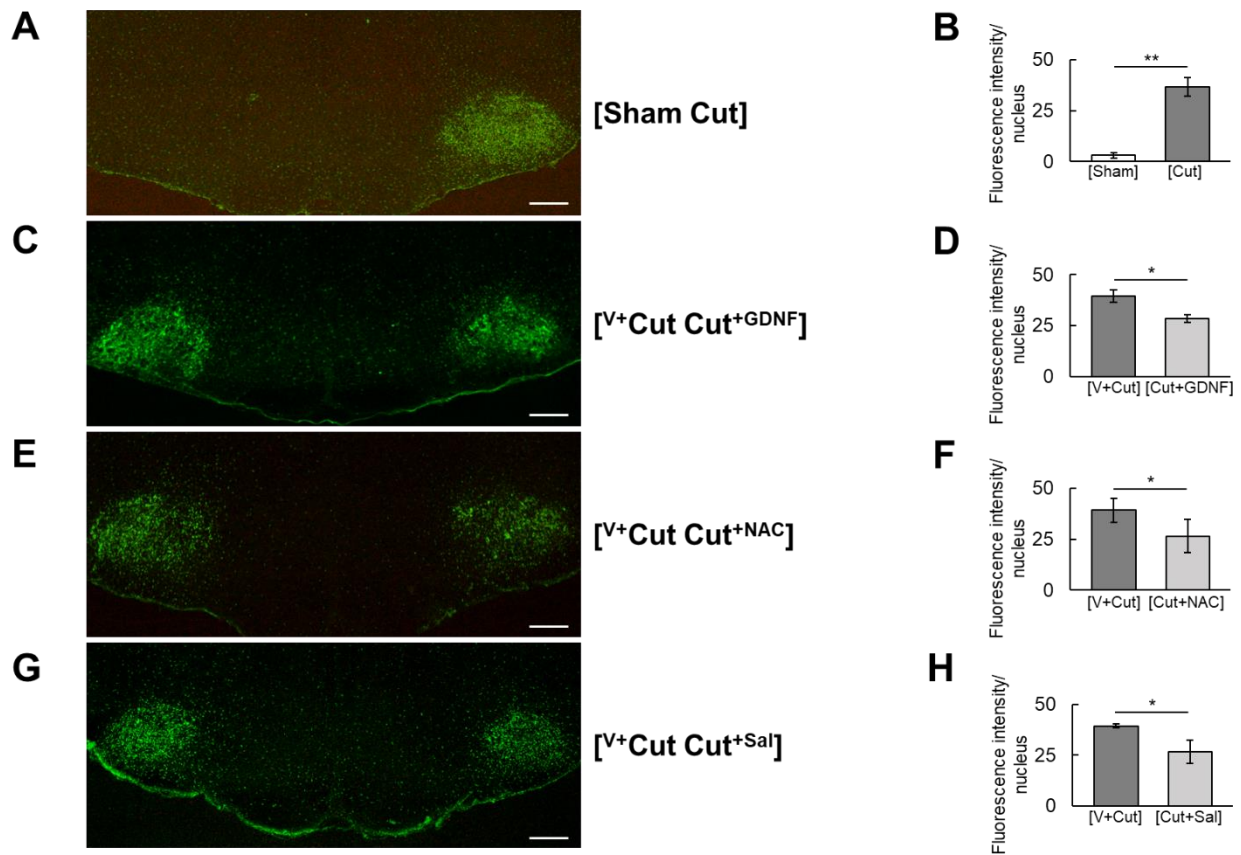
ミクログリア関連分子に対する RPS 投与の効果、免疫組織化学的に調べた。ミクログリアのマーカータンパク質である Iba1 の染色性は、[Sham Cut]切片の[Sham]核ではほとんど見られなかったが、[Cut]核内では多くのミクログリアが染色されており、染色性も増強された ( $3.05 \pm 1.48$  vs  $36.78 \pm 4.48$ ) (Fig. 41A,B)。[ $V^+$ Cut Cut $^{+RPS}$ ]切片では、GDNF、NAC または Sal を投与した[Cut+RPS]核では、[Cut+Vehicle]と比較して、Iba1 の染色性が低下していた (GDNF では  $39.38 \pm 2.98$  vs  $28.32 \pm 1.87$ 、NAC では  $39.18 \pm 6.04$  vs  $26.49 \pm 8.25$ 、Sal では  $39.25 \pm 0.99$  vs  $26.54 \pm 5.66$ ) (Fig. 41C-H)。

ミクログリアの主要な増殖因子は M-CSF であるが、その受容体は cFms であり、神経系ではミクログリアにのみ発現する。その cFms は、[Sham Cut]切片の[Sham]核では、ほとんど発現していないのに対し、[Cut]核では多くのミクログリアに検出された ( $4.04 \pm 0.77$  vs  $38.17 \pm 1.54$ ) (Fig. 42A,B)。[ $V^+$ Cut Cut $^{+RPS}$ ]切片の GDNF、NAC または Sal を投与した[Cut+RPS]核における cFms の染色性は、[Cut+Vehicle]と比較して低下していた (GDNF では  $40.38 \pm 7.3$  vs  $27.69 \pm 3.51$ 、NAC では  $42.02 \pm 6.18$  vs  $30.28 \pm 8.66$ 、Sal では  $35.07 \pm 3.68$  vs  $23.81 \pm 6.18$ ) (Fig. 42C-H)。このように、cFms の反応性は Iba1 とよく似ていた。

細胞周期の S 期のマーカーである PCNA は、[Sham Cut]切片の[Sham]核では、ほとんど検出されなかったが、[Cut]核では多くのミクログリアの核に検出された ( $1 \pm 1$  vs  $124 \pm 42$ ) (Fig. 43A,B)。[ $V^+$ Cut Cut $^{+RPS}$ ]切片の GDNF、NAC または Sal を投与した[Cut+RPS]核における PCNA レベルは、[Cut+Vehicle]に比べて減少していた (GDNF では  $132 \pm 26$  vs  $62 \pm 4$ 、NAC では  $92 \pm 12$  vs  $56 \pm 15$ 、Sal では  $110 \pm 15$  vs  $66 \pm 6$ ) (Fig. 43C-H)。

MAPK の一つである p-p38/p38 は、どちらも、[Sham Cut]切片の[Sham]核では少数の細胞だけに検出されたが、[Cut]核では多くのミクログリアに出現した (p-p38 では  $6 \pm 4$  vs  $106 \pm 27$ 、p38 では  $10 \pm 2$  vs  $121 \pm 29$ ) (Fig. 44A,B, 45A,B)。[ $V^+$ Cut Cut $^{+RPS}$ ]切片の GDNF、NAC または Sal を投与した[Cut+RPS]核における p-p38/p38 の発現性は、[Cut+Vehicle]と比較すると低下していることがわかった (GDNF 投与の p-p38 は  $117 \pm 18$  vs  $81 \pm 18$  であり、p38 は  $93 \pm 10$  vs  $73 \pm 17$ 。NAC 投与の p-p38 は  $88 \pm 13$  vs  $44 \pm 14$  であり、p38 は  $103 \pm 14$  vs  $70 \pm 16$ 。Sal 投与の p-p38 は  $104 \pm 20$  vs  $76 \pm 14$  であり、p38 は  $93 \pm 18$  vs  $58 \pm 14$ ) (Fig. 44C-H, 45C-H)。

以上のイムノブロットおよび免疫組織化学染色の結果から、RPS (GDNF、NAC および Sal) が Iba1、PCNA、cFms および p-p38/p38 の傷害依存性増加に対して抑制効果を発揮することが明らかになった。おそらく、運動ニューロンの傷害度が GDNF、NAC または Sal によって改善され、それがミクログリアの細胞分裂活性を低下させたものと推測された。従って、ミクログリアの増殖度は運動ニューロンの損傷レベルによって調節を受けると考えられた。

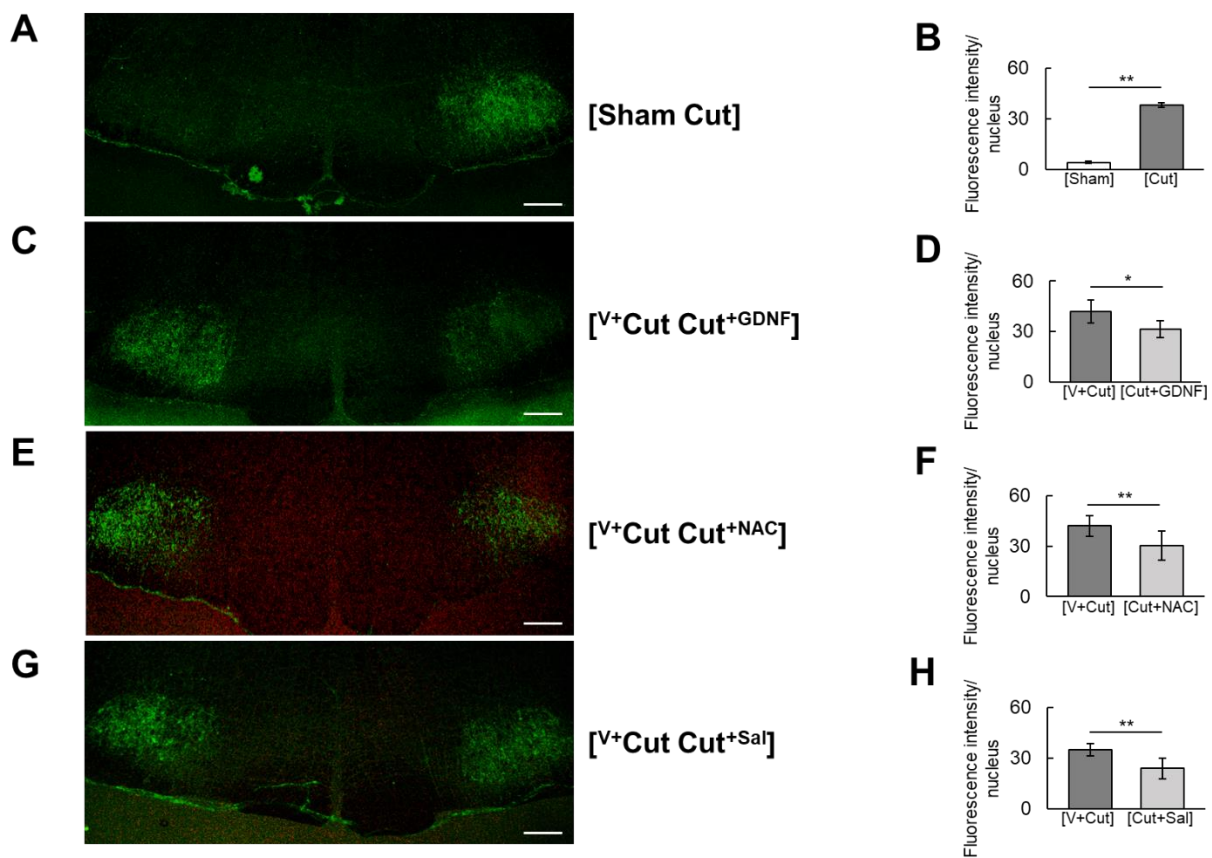


**Fig. 41 Iba1 の免疫組織化学染色**

A. [Sham Cut]系。片側顔面神経を切断し、5 日後に回収した脳幹の切片を抗 Iba1 抗体で染色した。スケールバーは 500  $\mu\text{m}$ 。

C,E,G. [ $\text{V}^+\text{Cut Cut}^{\text{RPS}}$ ]系。RPS として、GDNF (C)、NAC (E) および Sal (G) を使用し、5 日目に回収した脳幹の切片を、抗 Iba1 抗体で染色した。スケールバーは 500  $\mu\text{m}$ 。

B,D,F,H. Iba1 蛍光強度の定量。Iba1 の蛍光強度を、[Sham Cut]系 (B)、[ $\text{V}^+\text{Cut Cut}^{\text{GDNF}}$ ]系 (D)、[ $\text{V}^+\text{Cut Cut}^{\text{NAC}}$ ]系 (F) および [ $\text{V}^+\text{Cut Cut}^{\text{Sal}}$ ]系 (H) の両核における Iba1 蛍光強度を定量した。データは、平均値  $\pm$  SD で示した。左右間の差異は、t 検定によって評価した (\*  $P < 0.05$ 、\*\*  $P < 0.01$ )。

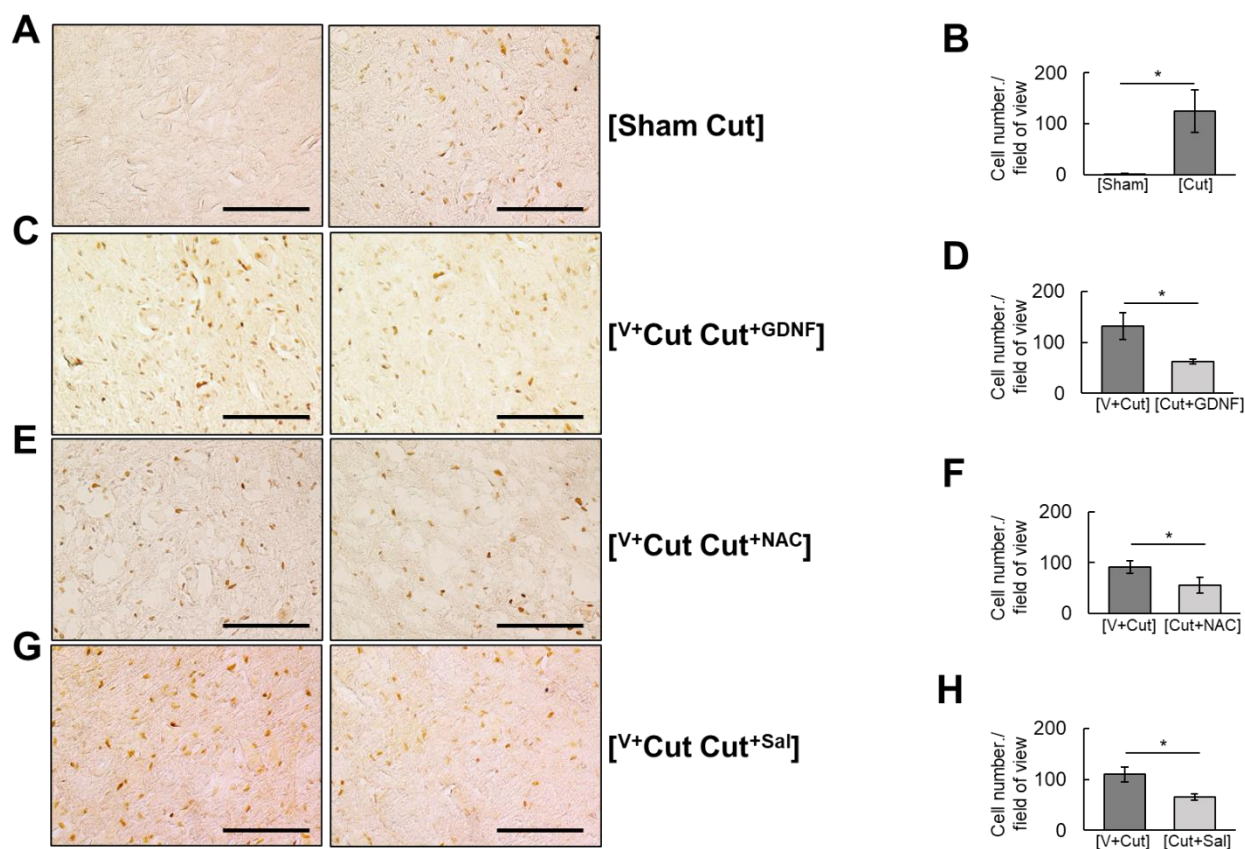


**Fig. 42** cFms の免疫組織化学染色

A. [Sham Cut]系。片側顔面神経を切断し、5 日後に回収した脳幹の切片を抗 cFms 抗体で染色した。スケールバーは 500  $\mu\text{m}$ 。

C,E,G. [<sup>V+</sup>Cut Cut<sup>+RPS</sup>]系。RPS として、GDNF (C)、NAC (E) および Sal (G) を使用し、5 日に回収した脳幹の切片を、抗 cFms 抗体で染色した。スケールバーは 500  $\mu\text{m}$ 。

B,D,F,H. cFms 蛍光強度の定量。[Sham Cut]系 (B)、[<sup>V+</sup>Cut Cut<sup>+GDNF</sup>]系 (D)、[<sup>V+</sup>Cut Cut<sup>+NAC</sup>]系 (F) および [<sup>V+</sup>Cut Cut<sup>+Sal</sup>]系 (H) の両核において cFm の蛍光強度を定量した。データは、平均値  $\pm$  SD で示した。左右間の差異は、t 検定によって評価した (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ )。

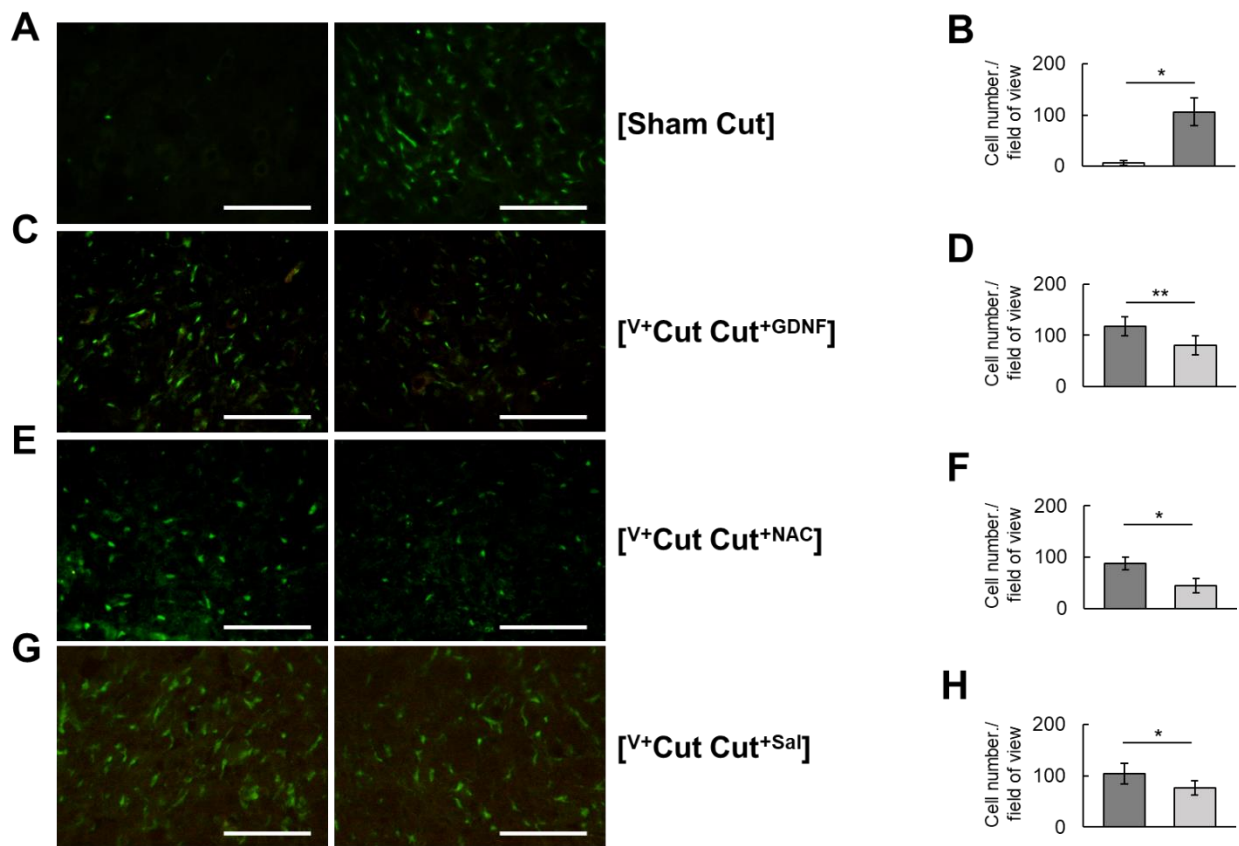


**Fig. 43 PCNA の免疫組織化学染色**

A. [Sham Cut]系。片側顔面神経を切断し、5 日後に回収した脳幹の切片を抗 PCNA 抗体で染色した。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。

C,E,G. [V+Cut Cut<sup>+RPS</sup>]系。RPS として、GDNF (C)、NAC (E) および Sal (G) を使用し、5 日に回収した脳幹の切片を、抗 PCNA 抗体で染色した。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。

B,D,F,H. PCNA 陽性核数の定量。[Sham Cut]系 (B)、[V+Cut Cut<sup>+GDNF</sup>]系 (D)、[V+Cut Cut<sup>+NAC</sup>]系 (F) および [V+Cut Cut<sup>+Sal</sup>]系 (H) の両核における PCNA 陽性核数を定量した。データは、平均値  $\pm$  SD で示した。左右間の差異は、t 検定によって評価した (\*  $P < 0.05$ 、\*\*  $P < 0.01$ )。



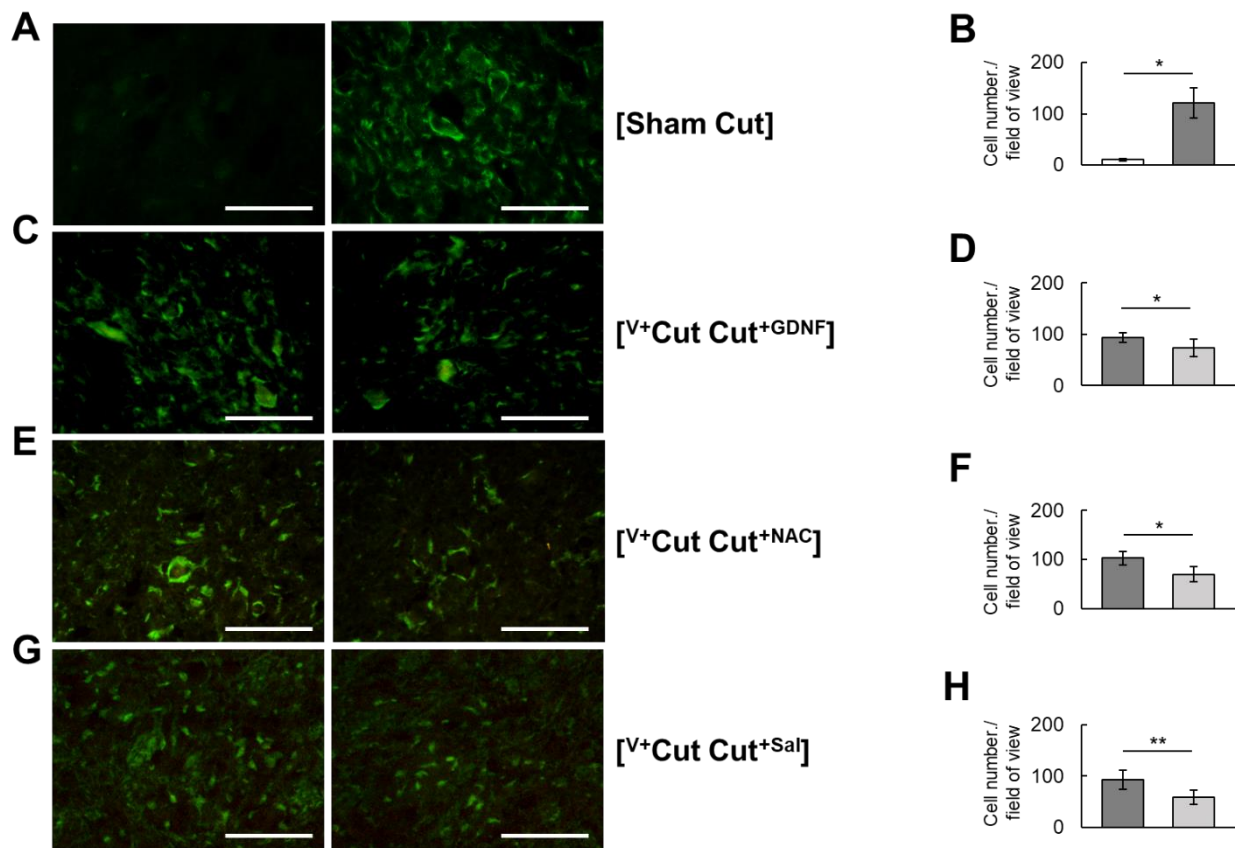
**Fig. 44 p-p38 の免疫組織化学染色**

A. [Sham Cut]系。片側顔面神経を切断し、5 日後に回収した脳幹の切片を抗 p-p38 抗体で染色した。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。

C,E,G. [ $V^+$ Cut Cut<sup>+RPS</sup>]系。RPS として、GDNF (C)、NAC (E) および Sal (G) を使用し、5 日目に回収した脳幹の切片を、抗 p-p38 抗体で染色した。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。

B,D,F,H. p-p38 陽性細胞数の定量。[Sham Cut]系 (B)、[ $V^+$ Cut Cut<sup>+GDNF</sup>]系 (D)、[ $V^+$ Cut Cut<sup>+NAC</sup>]系 (F) および [ $V^+$ Cut Cut<sup>+Sal</sup>]系 (H) の両核における p-p38 陽性細胞数を定量した。データは、平均値  $\pm$  SD で示した。左右間の差異は、t 検定によって評価した (\*  $P < 0.05$ 、\*\*  $P < 0.01$ )。





**Fig. 45 p38 の免疫組織化学染色**

A. [Sham Cut]系。片側顔面神経を切断し、5 日後に回収した脳幹の切片を抗 p38 抗体で染色した。スケールバーは 100  $\mu$ m。

C,E,G. [V<sup>+</sup>Cut Cut<sup>+RPS</sup>]系。RPS として、GDNF (C)、NAC (E) および Sal (G) を使用し、5 日目に回収した脳幹の切片を、抗 p38 抗体で染色した。スケールバーは 100  $\mu$ m。

B,D,F,H. p38 陽性細胞数の定量。[Sham Cut]系 (B)、[V<sup>+</sup>Cut Cut<sup>+GDNF</sup>]系 (D)、[V<sup>+</sup>Cut Cut<sup>+NAC</sup>]系 (F) および [V<sup>+</sup>Cut Cut<sup>+Sal</sup>]系 (H) の両核における p38 陽性細胞数を定量した。データは、平均値  $\pm$ SD で示した。左右間の差異は、t 検定によって評価した (\* P < 0.05、\*\* P < 0.01)。

## 4. 総合考察

### 4.1. 神経傷害・修復・再生とミクログリア増殖に働く遺伝子

本研究では、ラットの顔面神経傷害時に動くシグナル分子を解析したが (表 1)、運動ニューロンで顕著に上昇した転写調節因子は **c-Jun** であり、低下したものは **p-CREB** および **p-ATF2** であった。一方、グリア細胞では、ミクログリアで **p-CREB/CREB**、**p-ATF2/ATF2** が増加した。運動ニューロンの **c-Jun** の上昇は生存維持のための反応に、**p-CREB**、**p-ATF2** の低下は運動ニューロンの機能分子の低下に、またミクログリアの **p-CREB/CREB**、**p-ATF2/ATF2** 増加は、増殖に関与する可能性が示唆されたが、これら転写調節因子の標的遺伝子は何かという点に興味を持たれた。転写調節因子とその標的遺伝子の関連性は、神経損傷-修復-再生過程の分子メカニズムを理解するうえで重要である。そこで、**axotFN** で応答性がみられた **c-Jun**、**CREB** および **ATF2** の標的遺伝子を **ChIP-Atlas** のデータから検索し、神経の生存・修復およびミクログリアに関連したものをリストアップした (表 2、3)。**c-Jun** は『軸索再生』に関連する 18 個の遺伝子発現に関与することが示されており、顔面神経の修復過程にも共通する可能性もあり、その働きは興味深い。**CREB** および **ATF2** の『ミクログリア』への関連性では、活性化や免疫反応または遊走性に働く遺伝子が 12 個記載されており、これらの中には増殖に関連するものも含まれている可能性がある。**c-Jun**、**CREB** および **ATF2** によるこれら標的遺伝子が、実際に、ラットの顔面神経傷害モデルで発現されるのか、また、これらの遺伝子発現が、実際に、軸索再生やミクログリアの増殖に関与しているのかについては、個別に解析する必要がある。また、これらの転写調節因子 (**c-Jun**、**CREB**、**ATF2**) の発現に関わる遺伝子については、**ChIP-Atlas** 上に登録されているデータが極めて限定的であるため、直接役立つ情報は得られなかった。今後、細胞種の制限を設けることなく一般的に検索するとか、あるいは、実際に **ChIP-Seq** を行い、クロマチンと転写調節因子との相互作用を探ることで、有益な情報が得られる可能性が残されている。



表 2 “axon regeneration”に関連した c-Jun の標的遺伝子候補

転写因子	動物種	Gene ontology (GO)	標的遺伝子
c-Jun (Jun)	ラット	regulation of axon regeneration [GO:0048679]	Map2k2、Map2k1、Adam17、 Stk3、Ptprf、Pten
		axon regeneration [GO:0031103]	Jun、Jak2、Enpp1、Dhfr、 Mapk8ip3
		positive regulation of axon regeneration [GO:0048680]	Ndel1、Mif、Stk3、Grn
		peripheral nervous system axon regeneration [GO:0014012]	Apoe、Calu、Apoa1
		negative regulation of axon regeneration [GO:0048681]	Ptprs、Pten

表 3 “microglia”に関連した転写調節因子の標的遺伝子候補

転写因子	動物種	Gene ontology (GO)	標的遺伝子
CREB (Creb1)	ラット	microglial cell activation [GO:0001774]	C1qa、Jak2、Jun、Nampt
		negative regulation of microglial cell activation [GO:1903979]	Grn、Ldlr、Nr1d1、Syt11
		microglial cell activation involved in immune response [GO:0002282]	Grn
		positive regulation of microglial cell migration [GO:1904141]	P2rx4
ATF2 (Atf2)	マウス	negative regulation of microglial cell activation [GO:1903979]	Pparg、Grn、Ldlr、Cx3cl1、Nr1d1
		microglial cell activation [GO:0001774]	Jun、Cx3cl1、Trem2
		microglial cell activation involved in immune response [GO:0002282]	Grn、Trem2
		microglial cell proliferation [GO:0061518] & positive regulation of microglial cell migration [GO:1904141]	Cx3cl1、Trem2
		positive regulation of microglial cell activation [GO:1903980]	Trem2

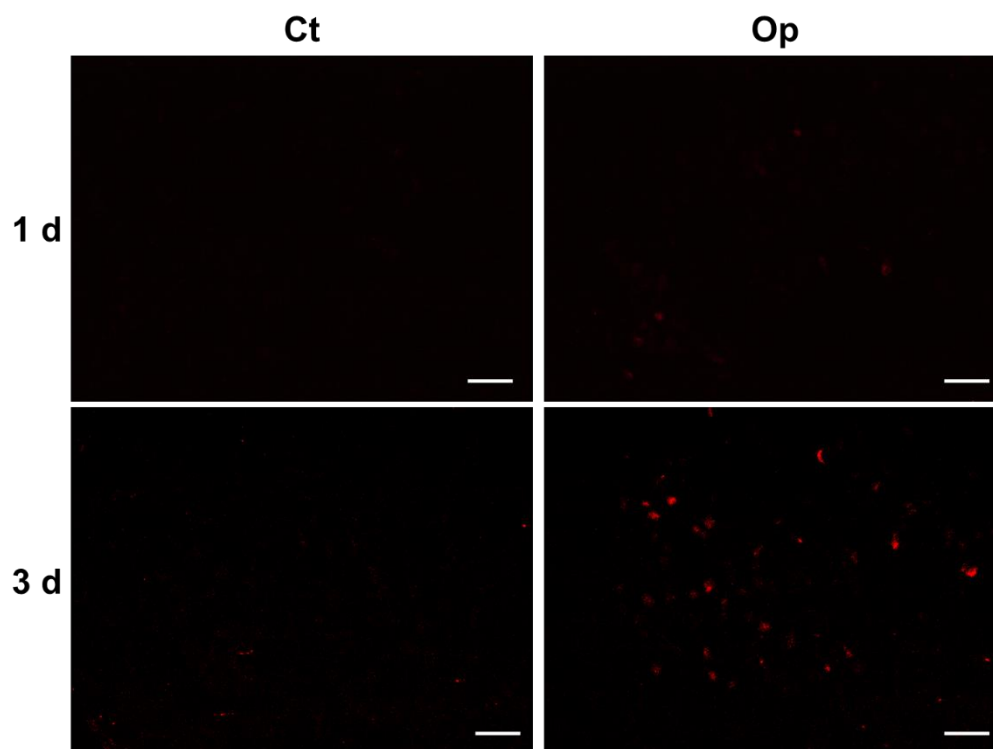
## 4.2. 傷害運動ニューロンとミクログリアの細胞間相互作用

ラット顔面神経の軸索切断部位に投与した3種類のRPSには、運動ニューロンの修復作用がみられたが、その作用機序としては、Gelfoamに染み込んでいたRPSが軸索切断部に取り込まれ、その後、逆行性に運動ニューロン細胞体に輸送され修復作用を示す、と推測された。私は、軸索切断した部位に投与したRPSが、実際に、運動ニューロン細胞体まで逆行輸送されるかどうかを調べてみた。ラットの右側顔面神経を切断し、その軸索切断部位に対して、1 mM propidium iodide (PI) をトレーサーとして投与し、PIが運動ニューロン細胞体に輸送されるかどうかを経時的に観察した (Fig. 46)。その結果、投与後1日の時点では少数の運動ニューロンだけにPIが検出されたが、投与後3日目では、より多くの運動ニューロンにPIが検出された。このことから、RPSもPI同様に、切断された軸索から細胞体へ逆行的に輸送されると考えられた。私が得たこの結果を支持するように、Yanら (Yan et al., 1995) はGDNFが、Kirschら (Kirsch et al., 2003) は ciliary neurotrophic factor (CNTF) が、それぞれ、ラット顔面神経切断部位から軸索に取り込まれ、神経保護・修復効果を与えることを報告している。

本研究によって、傷害運動ニューロンへRPSを投与すると、シグナル系の変動が軽減され、機能分子が回復した上に、ミクログリアの増殖が抑制されるといった重要な結果が得られた。すなわち、 $[V^+Cut\ Cut^{+RPS}]$ 系において、RPSとしてGDNF, NACおよびSalを使用すると、ミクログリア局在性のIba1, cFms, PCNAおよびp-p38/p38のレベルが全て減少し、ミクログリアの増殖性が抑制されるといった新規の結果が得られたのである。これは、ミクログリアの増殖性が運動ニューロンの傷害レベルによって調節されることを示す最初の実験的証拠である。

傷ついた運動ニューロンとミクログリアの間を取り持つメディエーターにはどのようなものがあるかについても触れておく必要がある。一般的に、軸索切断部位で生じた何らかの傷害信号が運動ニューロンの細胞体に逆行的に伝達され (Rishal and Fainzilber, 2010, 2014)、運動ニューロン細胞体から緊急事態を知らせる緊急因子が分泌され、その情報を受けたミクログリアが活性化し細胞分裂を開始すると考えられている。緊急因子としては、運動ニューロンの損傷電位やイオンのバランス変化のほか、低分子物質、神経伝達物質、

生理活性分子が推測されている。ニューロン内で産生される生物活性分子としては、M-CSF (Guan et al., 2016; Gushchina et al., 2018)、monocyte chemoattractant protein (MCP-1) (Flügel et al., 2001)、fractalkine (Luo et al., 2019)、calcitonin gene-related peptide (Streit et al., 1989) および ATP (Volonté et al., 2003; Fields and Burnstock, 2006) などが候補に挙げられている。傷害運動ニューロンから放出されたこれらの緊急因子がミクログリアを刺激して増殖させるという考え方は、もっともらしく受け入れられやすいが、これまでのところ、実験的証拠は提出されていない。緊急因子の介在に関しては、今後の課題としたい。



**Fig. 46 Propidium iodide の軸索逆行輸送**

右側顔面神経を切断した後、1 mM propidium iodide (PI) を軸索切断部に投与した。傷害後1日 (1d) および3日 (3d) の時点で脳を回収し、顔面神経核の切片を調製した。非傷害側 (Ct) と傷害側 (Op) を蛍光顕微鏡で観察した。スケールバーは100  $\mu\text{m}$ 。

## 5. 結論

本研究では、ラットの顔面神経傷害時に変動する転写調節因子やシグナル分子を解析し、それらの経時的変化と局在を明らかにした (表 1)。傷害運動ニューロンで上昇した **c-Jun** は生存維持に、低下した **p-CREB** および **p-ATF2** は機能分子の低下に関連すると考えられた。一方、ミクログリアで上昇した **p-CREB/CREB**、**p-ATF2/ATF2** および **p-p38/p38** は、**M-CSF-cFms** を介した増殖経路に関連したものであった。

傷害運動ニューロンではシグナル分子の変動 (上昇/低下) が起こるが、この変動を軽減する修復促進物質 (**RPS**) を軸索損傷部に投与すると、運動ニューロンの機能分子の低下が抑えられ、同時にミクログリアの増殖性が抑制された。この結果から、ミクログリアの増殖レベルは、一律・一定ではなく、運動ニューロンの損傷程度によって調節されることが明らかになった。

## 6. 謝辞

本研究の遂行にあたり、長期間にわたって実験手技の指導、論文作成、研究に関する御助言、激励などを通し、あらゆる面で研究者としての素養を終始真剣に鍛えて頂いた担当指導教員である創価大学大学院理工学研究科生命理学専攻の中嶋一行教授に対し、ここに深謝いたします。また、本論文の作成にあたり副査をご担当頂いた同研究科の西原祥子教授、ならびに同研究科の川井秀樹教授に対し、感謝いたします。また、創価大学牧口記念教育基金会様には、経済的な支援として、2021年度大学院生奨学金を授与して頂いたことに対し、感謝いたします。

## 7. 参考文献

- Agthong, S., Kaewsema, A., Tanomsridejchai, N., Chentanez, V., 2006. Activation of MAPK ERK in peripheral nerve after injury. *BMC Neurosci.* 7, 1–8.
- Amidfar, M., de Oliveira, J., Kucharska, E., Budni, J., Kim, Y.-K.K., 2020. The role of CREB and BDNF in neurobiology and treatment of Alzheimer's disease. *Life Sci.* 257, 118020.
- Azbill, R.D., Mu, X., Bruce-Keller, A.J., Mattson, M.P., Springer, J.E., 1997. Impaired mitochondrial function, oxidative stress and altered antioxidant enzyme activities following traumatic spinal cord injury. *Brain Res.* 765, 283–290.
- Bergamini, S., Rota, C., Canali, R., Staffieri, M., Daneri, F., Bini, A., Giovannini, F., Tomasi, A., Iannone, A., 2001. N-Acetylcysteine Inhibits in Vivo Nitric Oxide Production by Inducible Nitric Oxide Synthase. *Nitric Oxide* 5, 349–360.
- Bergerot, A., Shortland, P.J., Anand, P., Hunt, S.P., Carlstedt, T., 2004. Co-treatment with riluzole and GDNF is necessary for functional recovery after ventral root avulsion injury. *Exp. Neurol.* 187, 359–366.
- Carlezon, W.A., Duman, R.S., Nestler, E.J., 2005. The many faces of CREB. *Trends Neurosci.* 28, 436–445.
- Cox, L.J., Hengst, U., Gurskaya, N.G., Lukyanov, K.A., Jaffrey, S.R., 2008. Intra-axonal translation and retrograde trafficking of CREB promotes neuronal survival. *Nat. Cell Biol.* 10, 149–159.
- Deisseroth, K., Tsien, R.W., Creb-mediated, S., 2002. Dynamic multiphosphorylation passwords for activity-dependent gene expression. *Neuron* 34, 179–182.
- Eggers, R., de Winter, F., Tannemaat, M.R., Malessy, M.J.A., Verhaagen, J., 2020. GDNF Gene Therapy to Repair the Injured Peripheral Nerve. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8, 583184.
- Elkabes, S., DiCicco-Bloom, E.M., Black, I.B., 1996. Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *J. Neurosci.* 16, 2508–2521.
- Fields, R.D., Burnstock, G., 2006. Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 423–436.
- Flachsbarth, K., Jankowiak, W., Kruszewski, K., Helbing, S., Bartsch, S., Bartsch, U., 2018.



- Pronounced synergistic neuroprotective effect of GDNF and CNTF on axotomized retinal ganglion cells in the adult mouse. *Exp. Eye Res.* 176, 258–265.
- Flügel, A., Hager, G., Horvat, A., Spitzer, C., Singer, G.M., Graeber, M.B., Kreutzberg, G.W., Schwaiger, F.W., 2001. Neuronal MCP-1 expression in response to remote nerve injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 21, 69–76.
- Gehrmann, J., Yao, D.L., Bonetti, B., Bondy, C.A., Brenner, M., Zhou, J., Kreutzberg, G.W., Webster, H.D., 1994. Expression of insulin-like growth factor-I and related peptides during motoneuron regeneration. *Exp. Neurol.* 128, 202–210.
- Graeber, M.B., Kreutzberg, G.W., 1988. Delayed astrocyte reaction following facial nerve axotomy. *J. Neurocytol.* 17, 209–220.
- Graeber, M.B., Tetzlaff, W., Streit, W.J., Kreutzberg, G.W., 1988. Microglial cells but not astrocytes undergo mitosis following rat facial nerve axotomy. *Neurosci. Lett.* 85, 317–321.
- Guan, Z., Kuhn, J.A., Wang, X., Colquitt, B., Solorzano, C., Vaman, S., Guan, A.K., Evans-Reinsch, Z., Braz, J., Devor, M., Abboud-Werner, S.L., Lanier, L.L., Lomvardas, S., Basbaum, A.I., 2016. Injured sensory neuron-derived CSF1 induces microglial proliferation and DAP12-dependent pain. *Nat. Neurosci.* 19, 94–101.
- Gushchina, S., Pryce, G., Yip, P.K., Wu, D., Pallier, P., Giovannoni, G., Baker, D., Bo, X., 2018. Increased expression of colony-stimulating factor-1 in mouse spinal cord with experimental autoimmune encephalomyelitis correlates with microglial activation and neuronal loss. *Glia* 66, 2108–2125.
- Haas, C.A., Donath, C., Kreutzberg, G.W., 1993. Differential expression of immediate early genes after transection of the facial nerve. *Neuroscience* 53, 91–99.
- Henderson, C.E., Phillips, H.S., Pollock, R.A., Davies, A.M., Lemeulle, C., Armanini, M., Simmons, L., Moffet, B., Vandlen, R.A., Simpson LC corrected to Simmons, L., Koliatsos, V.E., Rosenthal, A., 1994. GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. *Science* 266, 1062–1064.
- Herdegen, T., Fiallos-Estrada, C.E., Schmid, W., Bravo, R., Zimmermann, M., 1992. The transcription factors c-JUN, JUN D and CREB, but not FOS and KROX-24, are differentially

- regulated in axotomized neurons following transection of rat sciatic nerve. *Mol. Brain Res.* 14, 155–165.
- Herdegen, T., Skene, P., Bähr, M., 1997. The c-Jun transcription factor - bipotential mediator of neuronal death, survival and regeneration. *Trends Neurosci.* 20, 227–231.
- Hu, Y., 2016. Axon injury induced endoplasmic reticulum stress and neurodegeneration. *Neural Regen. Res.* 11, 1557–1559.
- Hu, Y., Lund, I. V., Gravielle, M.C., Farb, D.H., Brooks-Kayal, A.R., Russek, S.J., 2008. Surface expression of GABAA receptors is transcriptionally controlled by the interplay of camp-response element-binding protein and its binding partner inducible camp early repressor. *J. Biol. Chem.* 283, 9328–9340.
- Ichimiya, T., Yamamoto, S., Honda, Y., Kikuchi, R., Kohsaka, S., Nakajima, K., 2013. Functional down-regulation of axotomized rat facial motoneurons. *Brain Res.* 1507, 35–44.
- Ishijima, T., Nakajima, K., 2023. Mechanisms of Microglia Proliferation in a Rat Model of Facial Nerve Anatomy. *Biology (Basel)*. 12.
- Karin, M., Liu, Z.G., Zandi, E., 1997. AP-1 function and regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 240–246.
- Kawasaki, A., Okada, M., Tamada, A., Okuda, S., Nozumi, M., Ito, Y., Kobayashi, D., Yamasaki, T., Yokoyama, R., Shibata, T., Nishina, H., Yoshida, Y., Fujii, Y., Takeuchi, K., Igarashi, M., 2018. Growth cone Phosphoproteomics reveals that GAP-43 phosphorylated by JNK is a marker of axon growth and regeneration. *iScience* 4, 190–203.
- Kikuchi, R., Hamanoue, M., Koshimoto, M., Kohsaka, S., Nakajima, K., 2018. Response of the GABAergic System to Axotomy of the Rat Facial Nerve. *Neurochem. Res.* 43, 324–339.
- Kirsch, M., Terheggen, U., Hofmann, H.D., 2003. Ciliary neurotrophic factor is an early lesion-induced retrograde signal for axotomized facial motoneurons. *Mol Cell Neurosci.* 24, 130-138.
- Koga, Y., Tsurumaki, H., Aoki-Saito, H., Sato, M., Yatomi, M., Takehara, K., Hisada, T., 2019. Roles of cyclic AMP response element binding activation in the ERK1/2 and p38 MAPK signalling pathway in central nervous system, cardiovascular system, osteoclast differentiation and mucin and cytokine production. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 1–23.

- Landeira, B.S., Santana, T.T.D.S., Araújo, J.A.D.M., Tabet, E.I., Tannous, B.A., Schroeder, T., Costa, M.R., 2018. Activity-independent effects of CREB on neuronal survival and differentiation during mouse cerebral cortex development. *Cereb. Cortex* 28, 538–548.
- Li, M., Zhang, D., Ge, X., Zhu, X., Zhou, Y., Zhang, Y., Peng, X., Shen, A., 2019. TRAF6-p38/JNK-ATF2 axis promotes microglial inflammatory activation. *Exp. Cell Res.* 376, 133–148.
- Liu, M.G., Wang, R.R., Chen, X.F., Zhang, F.K., Cui, X.Y., Chen, J., 2011. Differential roles of ERK, JNK and p38 MAPK in pain-related spatial and temporal enhancement of synaptic responses in the hippocampal formation of rats: Multi-electrode array recordings. *Brain Res.* 1382, 57–69.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Luo, P., Chu, S.-F., Zhang, Z., Xia, C.-Y., Chen, N.-H., 2019. Fractalkine/CX3CR1 is involved in the cross-talk between neuron and glia in neurological diseases. *Brain Res. Bull.* 146, 12–21.
- Martin, L.J., Kaiser, A., Price, A.C., 1999. Motor neuron degeneration after sciatic nerve avulsion in adult rat evolves with oxidative stress and is apoptosis. *J. Neurobiol.* 40, 185–201.
- Matheson, C.R., Wang, J., Collins, F.D., Yan, Q., 1997. Long-term survival effects of GDNF on neonatal rat facial motoneurons after axotomy. *Neuroreport* 8, 1739–1742.
- Matsushita, Y., Nakajima, K., Tohyama, Y., Kurihara, T., Kohsaka, S., 2008. Activation of microglia by endotoxin suppresses the secretion of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) through the action of protein kinase C alpha (PKCalpha) and mitogen-activated protein kinases (MAPKS). *J Neurosci Res.*, 86, 1959–1971.
- Moran, L.B., Graeber, M.B., 2004. The facial nerve axotomy model. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 44, 154–178.
- Nakajima, K., Honda, S., Tohyama, Y., Imai, Y., Kohsaka, S., Kurihara, T. 2001. Neurotrophin secretion from cultured microglia. *J Neurosci Res.* 65, 322–331.
- Nakajima, K., Ishijima, T., 2022. Events Occurring in the Axotomized Facial Nucleus. *Cells* 11, 2068.

- Nix, P., Hisamoto, N., Matsumoto, K., Bastiani, M., 2011. Axon regeneration requires coordinate activation of p38 and JNK MAPK pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 10738–10743.
- Ohri, S.S., Hetman, M., Whittemore, S.R., 2013. Restoring endoplasmic reticulum homeostasis improves functional recovery after spinal cord injury. *Neurobiol. Dis.* 58, 29–37.
- Oshiro, S., Kawamura, K., Zhang, C., Sone, T., Morioka, M. S., Kobayashi, S., Nakajima, K., 2008. Microglia and astroglia prevent oxidative stress-induced neuronal cell death: implications for aceruloplasminemia. *Biochim Biophys Acta* 1782, 109–117.
- Raivich, G., Bohatschek, M., Da Costa, C., Iwata, O., Galiano, M., Hristova, M., Nateri, A.S., Makwana, M., Riera-Sans, L., Wolfer, D.P., Lipp, H.P., Aguzzi, A., Wagner, E.F., Behrens, A., 2004. The AP-1 transcription factor c-Jun is required for efficient axonal regeneration. *Neuron* 43, 57–67.
- Rauscher, F.J., Voulalas, P.J., Franza, B.R., Curran, T., 1988. Fos and Jun bind cooperatively to the AP-1 site: reconstitution in vitro. *Genes Dev.* 2, 1687–1699.
- Reyskens, K.M.S.E.S.E., Arthur, J.S.C., 2016. Emerging Roles of the Mitogen and Stress Activated Kinases MSK1 and MSK2. *Front. Cell Dev. Biol.* 4, 56.
- Rishal, I., Fainzilber, M., 2010. Retrograde signaling in axonal regeneration. *Exp. Neurol.* 223, 5–10.
- Rishal, I., Fainzilber, M., 2014. Axon–soma communication in neuronal injury. *Nat. Rev. Neurosci.* 15, 32–42.
- Salvany, S., Casanovas, A., Tarabal, O., Piedrafita, L., Hernández, S., Santafé, M., Soto-Bernardini, M.C., Calderó, J., Schwab, M.H., Esquerda, J.E., 2019. Localization and dynamic changes of neuregulin-1 at C-type synaptic boutons in association with motor neuron injury and repair. *FASEB J.* 33, 7833–7851.
- Schellino, R., Boido, M., Vercelli, A., 2019. JNK signaling pathway involvement in spinal cord neuron development and death. *Cells.*
- Sng, J.C.G., Taniura, H., Yoneda, Y., 2004. A tale of early response genes. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 606–612.

- Streit, W.J., Dumoulin, F.L., Raivich, G., Kreutzberg, G.W., 1989. Calcitonin gene-related peptide increases in rat facial motoneurons after peripheral nerve transection. *Neurosci. Lett.* 101, 143–148.
- Takezawa Y., Kohsaka S., Nakajima K., 2014. Transient down-regulation and restoration of glycogen synthase levels in axotomized rat facial motoneurons. *Brain Res.* 1586:34-45.
- Takezawa Y., Baba O., Kohsaka S., Nakajima K., 2015. Accumulation of glycogen in axotomized adult rat facial motoneurons. *J Neurosci Res.* 93(6):913-921
- Thomas, G.M., Huganir, R.L., 2004. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 173–183.
- Trupp, M., Rydén, M., Jörnvall, H., Funakoshi, H., Timmusk, T., Arenas, E., Ibáñez, C.F., 1995. Peripheral expression and biological activities of GDNF, a new neurotrophic factor for avian and mammalian peripheral neurons. *J. Cell Biol.* 130, 137–148.
- Valenzuela, V., Oñate, M., Hetz, C., Court, F.A., 2016. Injury to the nervous system: A look into the ER. *Brain Res.*
- Volonté, C., Amadio, S., Cavaliere, F., D'Ambrosi, N., Vacca, F., Bernardi, G., 2003. Extracellular ATP and neurodegeneration. *Curr. Drug Targets. CNS Neurol. Disord.* 2, 403–412.
- Wang, Z.-F., Gao, C., Chen, W., Gao, Y., Wang, H.-C., Meng, Y., Luo, C.-L., Zhang, M.-Y., Chen, G., Chen, X.-P., Wang, T., Tao, L.-Y., 2019. Salubrinal offers neuroprotection through suppressing endoplasmic reticulum stress, autophagy and apoptosis in a mouse traumatic brain injury model. *Neurobiol. Learn. Mem.* 161, 12–25.
- Wu, W., 1993. Expression of Nitric-Oxide Synthase (NOS) in Injured CNS Neurons as Shown by NADPH Diaphorase Histochemistry. *Exp. Neurol.* 120, 153–159.
- Yamaguchi, Y., Oh-hashii, K., Matsuoka, Y., Takemura, H., Yamakita, S., Matsuda, M., Sawa, T., Amaya, F., 2018. Endoplasmic Reticulum Stress in the Dorsal Root Ganglion Contributes to the Development of Pain Hypersensitivity after Nerve Injury. *Neuroscience* 394, 288–299.
- Yamamoto, S., Kohsaka, S., Nakajima, K., 2012. Role of cell cycle-associated proteins in microglial proliferation in the axotomized rat facial nucleus. *Glia* 60, 570–581.
- Yamamoto, S., Nakajima, K., Kohsaka, S., 2010. Macrophage-colony stimulating factor as an

inducer of microglial proliferation in axotomized rat facial nucleus. *J. Neurochem.* 115, 1057–1067.

Yan, Q., Matheson, C., Lopez, O.T., 1995. In vivo neurotrophic effects of GDNF on neonatal and adult facial motor neurons. *Nature* 373, 341–344.

Yuan, Z., Gong, S., Luo, J., Zheng, Z., Song, B., Ma, S., Guo, J., Hu, C.C.-D., Thiel, G., Vinson, C., Hu, C.C.-D., Wang, Y., Li, M., 2009. Opposing roles for ATF2 and c-Fos in c-Jun-mediated neuronal apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 29, 2431–2442.

Zafarullah, M., Li, W.Q., Sylvester, J., Ahmad, M., 2003. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell. Mol. Life Sci. C.* 60, 6–20.