

ラット顔面神経損傷時に働くシグナル分子の解析

Analyses of signaling molecules in the axotomized rat facial nucleus

学籍番号 21D5903 氏名 石嶋 貴志 指導教員名 中嶋 一行

SYNOPSIS

Axotomy of the rat facial nerve causes downregulation of motoneuron-specific molecules, including choline acetyltransferase, the vesicular acetylcholine transporter and GABA_AR α 1, in surviving motoneurons. Subsequently, resident microglia are activated and proliferate. However, it is still unclear which signaling molecules are involved in these responses. In this study, I investigated the changes and localizations of immediate early genes (IEGs), transcription factors (CREB/ATF family) and mitogen-activated protein kinases (MAPKs). Immunoblotting and immunohistochemical analyses revealed the following. Among the IEGs, c-Jun was increased in injured motoneurons, but c-Fos did not. Among the CREB/ATF family members, p-CREB was significantly decreased in injured motoneurons. The levels of p-CREB/CREB and p-ATF2/ATF2 were immunohistochemically increased in microglia. Among MAPKs, p-ERK1/2 and p-JNK1 were decreased in injured motoneurons. p-p38 and p38 were markedly increased in microglia. In vitro experiments revealed that p38, CREB, and ATF2 were activated in proliferating microglia. These results strongly suggested that c-Jun is involved in the survival and repair of motoneurons, but p-CREB/CREB, p-ERK/ERK and p-JNK/JNK are associated with the downregulation of motoneuron-specific molecules. On the other hand, p-p38/p38, p-CREB/CREB, and p-ATF2/ATF2 were suggested to be closely involved in the activation/proliferation of microglia. Furthermore, I investigated whether the level of microglial proliferation is dependent on the degree of motoneuronal insult. By administrating glial cell line-derived neurotrophic factor, N-acetyl cysteine or salubrinol at the transection site, I found that these reagents ameliorated the increase in c-Jun and the reductions in levels of p-CREB and functional molecules in the injured motoneurons. In tandem with these changes, the levels of a microglial marker. i.e., Iba1, and the levels of cFms, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), and p-p38/p38 were significantly downregulated in microglia. These results demonstrated that the recovery of motoneuron resulted in the reduction of microglial proliferation. I thus conclude that the degree of neuronal injury regulates the levels of microglial proliferation in adult rat facial nucleus.

Keywords: rat, facial nerve, axotomy, microglial proliferation, c-Jun, CREB, ATF2, MAPK, GDNF, NAC, salubrinol

1. 序論

ラットの顔面神経を傷害すると、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、choline acetyltransferase (ChAT) (図 1), vesicular acetylcholine transporter (VAChT) (図 1), GABA receptor subunit (GABA_AR α 1) といった、機能分子を減少させることが知られている^{1,2}。また、運動ニューロンの軸索傷害は、運動ニューロン細胞体周辺のミクログリアの増殖^{3,4} (図 1)、およびアストロサイトの活性化⁵を引き起こす (図 1)。これらの顔面神経傷害に伴う細胞応答は、運動ニューロンの軸索損傷-修復-再生という一連の過程の中で起こるものであり、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と考えられている⁶。

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、良く分かっていなかった。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、軸索損傷に伴うシグナル分子の変動 (増強または抑制) と、それらの局在を解析した。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、神経機能の働きに関与している cAMP response element binding protein (CREB)、CREB と同じファミリーに属し、DNA 損傷やアポトーシスなどに関連している activating transcription factor 2 (ATF2)、

細胞の様々な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)、p38 を選択した。

また、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。傷害された運動ニューロンでは、シグナル分子の低下が起こるが、その低下を防ぐ修復促進物質 (RPS) を探索し、RPS を顔面神経の損傷部に投与した時、運動ニューロンの修復とミクログリアの増殖性に関連性があるかどうかを解析した。

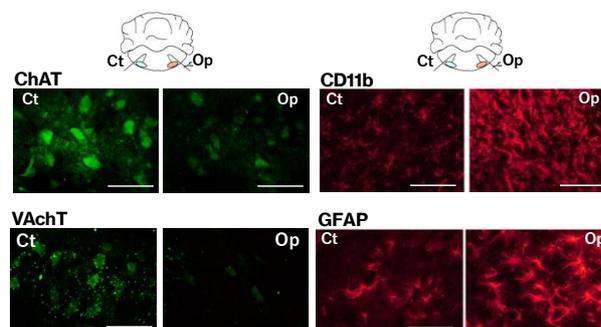


図 1 顔面神経傷害後の細胞応答

顔面神経の軸索切断後、5 日目の脳幹切片を、ChAT 抗体 (運動ニューロン機能分子 : 左上)、VAChT 抗体 (運動ニューロン機能分子 : 左下)、CD11b 抗体 (ミク

ログリアマーカー：右上)、GFAP 抗体 (アストロサイトマーカー：右下) を用いて蛍光染色を行った。スケールバーは 100 μm 。

2. 実験方法

2.1. ラットの顔面神経傷害

生後 8 週のウィスターラット (同腹オス) を使用した。イソフルラン麻酔下で、ラットの片側または両側顔面神経軸索を、茎乳突孔の位置で切断した (図 2)。神経軸索切断後、1.5、3、6、12 時間後、および、1、3、5、7、14 日後に麻酔下で断頭し、全脳を摘出し -80°C で保存した。

運動ニューロン修復促進物質 (RPS) の効果を調べる時は、ラットの両側顔面神経を茎乳突孔で切断し、右側の軸索損傷部には、RPS (Gelfoam に浸透) を投与し [cut+RPS]、左側にはそれらの溶媒 (Gelfoam に浸透) を投与した [cut+vehicle]。このように、両側を傷害し片側に RPS 投与したモデルを [V+Cut Cut^{RPS}] と表わす (図 2)。この [V+Cut Cut^{RPS}] モデル作成時、両顔面神経を傷害しないラット [Sham Sham]、片側 (右) のみ傷害したラット [Sham Cut]、両側傷害したラット [Cut Cut] も用意した (図 2)。傷害後 5 日の時点で全脳を摘出し、 -80°C で保存し、必要に応じて、各ラットの左右顔面神経核を切り出した。

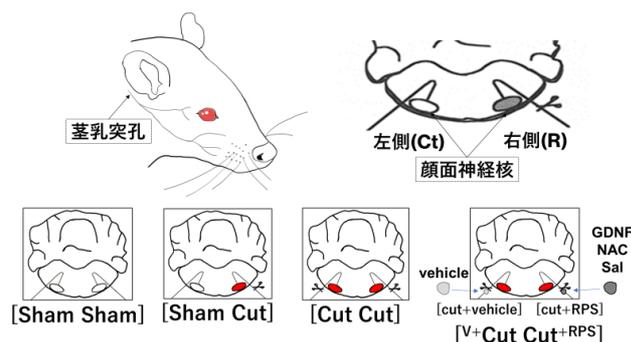


図 2 顔面神経傷害モデル

上段にはラットの茎乳突孔および顔面神経核の位置を示した。下段には、三種類の傷害モデルと、RPS/vehicle 投与モデルを示した。

2.2. ウェスタンブロット

回収した脳の脳幹から、左右顔面神経核を切り出し、それぞれの組織抽出液を調製し、試料とした。12%ポリアクリルアミドゲルを用いて、SDS-PAGE を行い、タンパク質を PVDF メンブレンにトランスブロットした。PVDF メンブレンを牛血清アルブミン (BSA) やスキムミルクを含むブロッキング液でブロッキングを行った。その後、一次抗体を 4°C で一晩反応させ、2 次抗体を室温で 6 時間反応させた。抗原・抗体反応物の検出は、化学発光試薬 (ECL) を用いて行った。

2.3. 免疫組織化学染色

ラットの顔面神経傷害後、5 日の時点で、麻酔下に 4%パラホルムアルデヒドを用いて、経心的に灌流固定を行い、全脳を回収した。その後、4%パラホルムアルデヒドで後固定処理をし、さらに 10%、20%お

よび 30%スクロース液に浸漬した。この脳は、使用時まで -80°C で保存した。

脳幹の冠状切片 (厚さ 10 μm) は、クリオスタットを用いて作製した。免疫組織化学染色の前処理としては、切片を室温で風乾し、0.3%TritonX 100/10 mM PBS を用いて、5 分間、3 回の洗浄を行なった。

蛍光染色では、切片を洗浄後、BSA を含むブロッキング液で 1 時間ブロッキングをし、一次抗体を 4°C で一晩反応させ、その後蛍光標識された二次抗体を 4°C で一晩反応させた。蛍光二重染色では、一つ目の一次抗体と蛍光標識第二抗体を反応させた後、二つ目の一次抗体と蛍光標識二次抗体を反応させた。

アビジン・ビオチン複合法 (ABC 法) では、Vectastain[®] ABC kit を使用した。切片には、ブロッキング後、一次抗体を添加し 4°C で一晩反応させた。洗浄後、ビオチン標識二次抗体を室温で 2 時間反応させた。さらにアビジン・ビオチン複合体を 2 時間反応させ、発色には、DAB (3,3'-ジアミノベンジジン) を使用した。その後、脱水処理を行い、封入した。

2.4. ラット新生仔脳の初代培養系

ラット新生仔の脳から、常法により初代培養細胞を調製した。細胞は、 2×10^6 cells/60 mm dish の密度で播種し、1 週間培養をした。RPS の効果を調べる実験では、無血清培地で 3 回洗い、血清成分を取り除き、一晩培養した。その後、NAC (終濃度 20 mM) および Sal (終濃度 50 μM) で刺激し、0、5、10、30、60 分後に細胞を回収した。細胞は、凍結乾燥しウェスタンブロット用の試料とした。

2.5. ミクログリアの分離・培養

ラット新生仔脳の初代培養系 (上述) から、振とう分離法によりミクログリアを回収し、 1.5×10^6 cells/60 mm dish の密度で播種した。Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) の刺激実験では、培養ミクログリアを無血清培地下で培養し、M-CSF (終濃度 20 ng/mL) を添加した。0、5、10、15、30 分後に細胞を回収し、それぞれの細胞をホモジナイズし、細胞抽出液を調製した。

3. 結果および考察

ラットの顔面神経傷害後、傷害神経核 (axotomized facial nucleus; axotFN) 中のシグナル分子を非傷害側 (contralateral facial nucleus; contFN) と比較した。

3.1. Immediate early genes

c-Jun は、axotFN で、傷害後 12 時間から 7 日間、有意に増加した。蛍光二重染色の結果、この c-Jun の増加は、主に運動ニューロンの核で起こっていることがわかった。c-Jun が傷害ニューロンで増加する現象は、ラットの坐骨神経傷害モデル⁷、マウスの顔面神経傷害モデル⁸で報告されている。私の結果およびこれらの報告から、運動ニューロンが傷害されると c-Jun が増加し、その結果、AP-1 (c-Jun/c-Fos) の形成が上昇し、神経細胞の修復・再生関連遺伝子の転写が促進されると推測された。しかし、ラット顔面神経傷害系では、c-Fos は運動ニューロンで恒常的

に発現はされていたものの、傷害後に有意な変動はみられなかった。従って、AP-1の量は、c-Jun量の増減によって決定されると考えられた。

3.2. CREB/ATF family

リン酸化 CREB (p-CREB) は、傷害後 1.5 時間から有意に減少し、14 日間、低値が継続した。一方で、CREB は傷害後 1 日から 14 日間増加を続けた。免疫組織化学染色の結果、p-CREB は非傷害側の多くの運動ニューロンの核に認められたが、傷害運動ニューロンの核ではかなり減少していた。CREB/ATF ファミリーは、様々な神経機能に役割を果たしていることが知られている。特に運動ニューロン関連では、CREB が GABA_AR α 1 の発現を調節していることが報告され、注目された⁹。実際、GABA_AR α 1 は axotFN の運動ニューロンで減少することが明らかになっており²、運動ニューロンにおける p-CREB の減少は、機能分子の低下と関連していると考えられた。

一方、免疫組織化学染色の結果から、p-CREB/CREB は、運動ニューロン周辺の小型の細胞、すなわちミクログリアで増加していることが分かった。ミクログリアにおける高発現は増殖と関連のあることが明らかになった (後述)。

ATF2 は、DNA 損傷やアポトーシスなどに関連する転写調節因子なので、神経が傷害を受けると変動する可能性が考えられたが、ラットの顔面神経傷害系の運動ニューロン核では反応が見られなかった。

しかし、免疫組織化学による染色像を詳細に観察すると、周辺のミクログリアで増加していることが明らかになった。Li らは、*in vivo* および *in vitro* の実験系で、ミクログリアが lipopolysaccharide (LPS) 刺激によって活性化される時、ATF2 が誘導されることを報告している¹⁰。この結果は、ATF2 がミクログリアの活性化に関与していることを示唆している。実際、ミクログリアの増殖時、ATF2 の活性化が観察された (後述)。

3.3. MAPKs

MAPK は Ser/Thr キナーゼファミリーであり、広範な生命現象に関与している重要なシグナル分子である。本研究では、p-ERK/ERK、p-JNK/JNK および p-p38/p38 の変動および局在を調べた。

p-ERK1/2 は、傷害後 12 時間から 14 日にかけて減少したが、ERK1/2 は、反対に 1 日から 14 日にかけて増加した。免疫組織化学染色の結果、これらの変動は主に運動ニューロンで起こっていることが分かった。p-ERK1/2 は様々な転写調節因子を活性化し、細胞機能調節に関連するが、神経傷害系では、軸索の再生や生存を進める作用が注目されてきた。本研究では、傷害された運動ニューロンで p-ERK1/2 が減少したが、この結果は、p-ERK1/2 による転写活性が抑制されることを示唆している。

リン酸化 JNK (p-JNK) は、傷害後 6 時間から 14 日にかけて減少する傾向がみられた。免疫組織化学染色の結果、p-JNK は損傷した運動ニューロンで減少していた。JNK は、ストレス応答性 MAPK として知られているが、神経軸索の再生や神経細胞の成長・

発達にも関連することが知られている。当初、ラットの axotFN では上昇すると推測されたが、p-JNK は傷害運動ニューロンで減少していた。減少は有意なものであったが、減少幅は半分程度であることから、傷害運動ニューロンでは、かなりの程度機能している可能性がある。

リン酸化 p38 (p-p38) は、傷害後、一時的に (3-12 時間) 減少したが、1 日から 14 日では有意に増加していた。p38 も傷害後 3 日から有意に増加していた。免疫組織化学染色の結果、p-p38/p38 の増加は、主にミクログリアで起こっていた。p38 は、様々な刺激やストレスによって活性化される MAPK である。Nix らは、線虫の GABA ニューロンの軸索再生に、p38 と JNK が必須であることを報告している¹¹。本研究では、ミクログリアの p-p38 は傷害後 1 日から増加することを示したが、この p-p38 の増加は、増殖反応に密接に関連することが明らかになった (後述)。

3.4. p38 および CREB 活性化とミクログリアの増殖

axotFN のミクログリアでは、p38 と CREB がリン酸化されたが、この反応は増殖と強く関連すると考えられた。そこで、ミクログリアの増殖時、これらのシグナル分子が活性化されるかを培養系で調べた。培養ミクログリアを M-CSF で刺激すると、約 10 分で p38 および CREB がリン酸化された。従って、M-CSF によるミクログリアの増殖には、p38-CREB 経路が関与すると考えられた。ところで、M-CSF の刺激によって、p38 と CREB 以外、MSK1 もリン酸化されることが示された。MSK1 は p38 で活性化され、CREB を活性化するキナーゼなので、M-CSF によるミクログリアの増殖には、p38-MSK1-CREB という経路が動くと考えられた。また、M-CSF 刺激を受けたミクログリアでは、ATF2 がリン酸化されたが、これは axotFN でも見られた現象である。この結果から、ミクログリアの増殖シグナル系には p38-ATF2 経路も含まれると考えられる。

ラット顔面神経の傷害時、axotFN に起こったシグナル分子の変動および局在性を表 1 にまとめた¹²。

表 1 顔面神経傷害後のシグナル分子の変動と局在

	Motoneuron	Microglia	Astrocyte
c-Jun	↑		
c-Fos	→		
p-CREB	↓	↑	
CREB	↑	↑	
p-ATF2	↓	↑	
ATF2	→	↑	
p-ERK1/2	↓		
ERK1/2	↓		
p-JNK	↓		
JNK	↓↑		
p-p38		↑	
P38	↑	↑	

3.5. 傷害運動ニューロンの修復促進因子の探索

上述のように、顔面神経を傷害すると、運動ニューロンのシグナル分子の活性および量に変化し、機

能分子が低下した。そしてそれに呼応するようにミクログリアの増殖が起こった。ミクログリアが増殖する現象は、損傷した運動ニューロンを介したものと推測されてきたが、ミクログリアの増殖の程度が、いつも一定なのか、運動ニューロンの損傷レベルに影響されるかどうかは、不明であった。

そこで、傷害運動ニューロンで低下するシグナル分子の活性および量を回復させた時、ミクログリアの増殖性は変動するかどうかを調べることにした。そのために、運動ニューロンのシグナル分子の活性化および量を回復させる修復促進物質 (RPS) をインビトロで探索した。その結果、運動ニューロンに対する生存作用、抗酸化ストレス効果、および抗小胞体(ER) ストレス効果の観点から、glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF)、N-acetyl-L-cysteine (NAC)、salubrinal (Sal) が RPS として選択された。

3.6. 修復促進因子の傷害運動ニューロンへの効果

In vitro の実験から選択された運動ニューロンの修復促進物質 (RPS) の効果をラット顔面神経傷害系で、ウェスタンブロットを使用して定量的に解析した。

[V⁺Cut Cut^{+RPS}]系で、[cut+RPS]核では、GDNF、NAC、Sal のいずれも[cut+vehicle]核と比較して、c-Jun レベルが低下、p-CREB レベルが上昇した。これは RPS が運動ニューロンの傷害性を回復させたことを示す結果である。また、運動ニューロンの ChAT、VAChT および GABA_AR α 1 の量も[cut+RPS]核では[cut+vehicle]核より有意に高いことが明らかになった。

免疫組織化学染色の結果では、c-Jun は[cut+vehicle]核に比べ[cut+RPS]核の運動ニューロン核での染色性が低下していた。p-CREB は、[cut+vehicle]核に比べ[cut+RPS]核の運動ニューロン核での染色性が増加していた。ChAT、VAChT および GABA_AR α 1 の染色性は、[cut+vehicle]核に比べ、[cut+RPS]核の運動ニューロン核の染色性が増加していた。

これらの結果から、GDNF、NAC、Sal の投与が、顔面運動ニューロンの損傷レベルを回復させたと考えられた。GDNF は運動ニューロンの生存因子であること、NAC は酸化ストレスを引き起こす活性酸素種 (ROS) の除去剤であること、Sal は ER ストレスを解消する作用を持つことが傷害ニューロンの修復促進に繋がったと考えられた。

3.7. 修復促進因子のミクログリアへの効果

次に、ミクログリア関連分子への影響について、ウェスタンブロットで定量的解析を行った。

[V⁺Cut Cut^{+RPS}]系で、Iba1、cFms、PCNA のレベルを調べると、[cut+vehicle]核に比べると[cut+RPS]核では増加が抑えられていた。図3に Iba1 の結果を示す。MAPK である p-p38/p38 の応答性を見ると、[cut+vehicle]核では高値を示したが、[cut+RPS]核では、それより有意に低い値を示した。

免疫組織化学染色の結果では、Iba1、cFms、PCNA および p-p38/p38 のいずれも、[cut+vehicle]核に比べると[cut+RPS]核での発現性が有意に抑えられていた。例として、Iba1 の結果を図4に示した。これらの結果は、RPS 投与によって、ミクログリアの増殖

性が抑制されたことを示唆している。

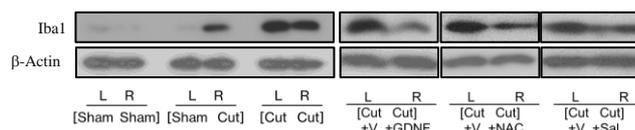


図3 RPS のミクログリアへの効果 (Western blot) 顔面神経傷害後5日目に、LとRを比較した。

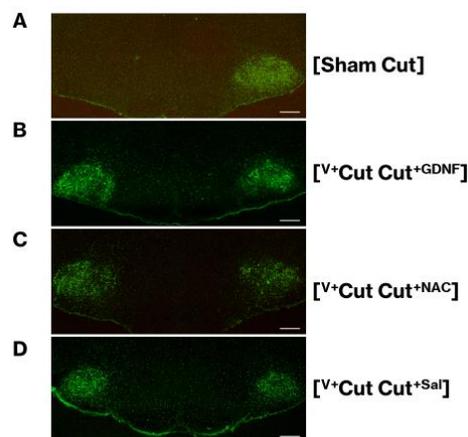


図4 RPS のミクログリアへの効果 (IHC)

顔面神経傷害後5日の脳幹冠状切片に対し、抗 Iba1 抗体を用いて蛍光染色を行った。A: 右側顔面神経のみ傷害した場合。B: RPS として GDNF を投与した場合。C: RPS として NAC を投与した場合。D: RPS として Sal を投与した場合。スケールバーは、500 μ m。

4. 結論

ラット顔面神経を傷害すると、傷害運動ニューロンでは、c-Jun レベルが上昇し、p-CREB、p-ERK/ERK および p-JNK/JNK レベルは低下した。c-Jun は運動ニューロンの生存・修復に、p-CREB、p-ERK/ERK および p-JNK/JNK は機能分子の低下に関連すると考えられた。ミクログリアでは、p-p38/p38、p-CREB/CREB および p-ATF2/ATF2 レベルが増加した。これらの増加は、増殖反応に関わるものと推測された。また、傷害運動ニューロンで上昇あるいは低下するシグナル分子のレベルを RPS 投与によって軽減させると、運動ニューロンの機能分子の低下が抑制され、ミクログリアの増殖が低下した。従って、ミクログリアの増殖性は、運動ニューロンの傷害レベルによって調節されることが示唆された。

参考文献

1. Ichimiya, T. *et al. Brain Res.* **1507**, 35–44 (2013).
2. Kikuchi, R. *et al. Neurochem. Res.* **43**, 324–339 (2018).
3. Graeber, M. B. *et al. Neurosci. Lett.* **85**, 317–321 (1988).
4. Ishijima, T. & Nakajima, K. *Biology (Basel)*. **12**, (2023).
5. Graeber, M. B. & Kreutzberg, G. W. *J. Neurocytol.* **17**, 209–220 (1988).
6. Nakajima, K. & Ishijima, T. *Cells* **11**, 2068 (2022).
7. Herdegen, T. *et al. Trends Neurosci.* **20**, 227–231 (1997).
8. Raivich, G. *et al. Neuron* **43**, 57–67 (2004).
9. Hu, Y. *et al. J. Biol. Chem.* **283**, 9328–9340 (2008).
10. Li, M. *et al. Exp. Cell Res.* **376**, 133–148 (2019).
11. Nix, P. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 10738–10743 (2011).
12. Ishijima, T. & Nakajima, K. *J. Chem. Neuroanat.* **126**, 102179 (2022).