

## 運動ニューロンの細胞死に関する研究

### Studies on cell death of motoneurons

代表研究者	京都大学医学部教授 Prof. Fac. of Medicine, Kyoto Univ. Motoy KUNO	久野 宗
協同研究者	京都大学医学部講師 Lecturer, Fac. of Medicine, Kyoto Univ. Tomoyuki TAKAHASHI	高橋 智幸

In patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS), motoneurons innervating skeletal muscle show a massive cell death. However, motoneurons in Onuf's nucleus are exceptionally spared in these patients. Motoneurons in Onuf's nucleus are sexually dimorphic and innervate perineal muscles. The spinal nucleus of the bulbocavernosus (SNB) in the rat is considered to correspond to Onuf's nucleus in man. The rat SNB motoneurons also innervate perineal muscles. The rat SNB neurons are responsive to testosterone, and in female rats the majority of SNB neurons die at early postnatal stages, showing sexual dimorphism. We have examined the difference in electrophysiological properties between male and female rats during the cell death period in neonatal stages. We also tested whether SNB motoneurons in male rats respond directly to testosterone or whether its effects are mediated by their target muscles.

The membrane currents were recorded from SNB motoneurons in male and female neonatal rats by the whole-cell configuration of patch-clamp techniques in thin slices of the spinal cord. Among several parameters measured, calcium currents in SNB motoneurons were distinctly different between male and female rats. The mean magnitude of calcium currents was significantly larger in female SNB neurons than in male SNB neurons. This suggests that the cell death in female SNB neurons at early postnatal stages may be induced by excessive calcium influx associated with neuronal activity.

The size of SNB neurons in adult rats is reduced by castration, and this effect is reversed by treatment with testosterone. Androgen receptors are known to be present in the perineal muscles as well as in SNB motoneurons. Therefore, it is not clear whether the neuron size is regulated by direct action of the hormone on SNB neurons or whether this regulation is mediated by the target muscles. To address this question, the SNB motor nerve was united to a grafted skeletal muscle which lacks androgen sensitivity. Under this condition the size of the SNB neurons remained unchanged in response to testosterone manipulation. It is concluded that hormonal regulation of SNB neurons is mediated by their target muscles.

Cell death in patients with ALS has been suggested to result from diminished availability of a neurotrophic factor normally supplied from the target muscle. If this were the case, Onuf's nucleus may be preserved because of continual stimulation of the synthesis of the trophic factor by the effect of testosterone on the target muscle.

#### 研究目的

運動ニューロンは胎生期の特定の時期に多数が自然に消滅し、約半数のみが分化を達成する。この細胞死の発現は運動ニューロンがその支配筋と

機能的結合を形成する時期に一致する (Hamburger, 1975)。あらかじめ、標的となる支配筋を切除しておくと運動ニューロンの死滅は亢進し、究極的にはすべての運動ニューロンが死滅する

(Hamburger, 1958)。したがって、少なくとも胎生期の運動ニューロンの生存はその支配筋に依存すると仮定される (Kuno, 1990)。同様な現象は新生ラットにおいても観察される。生後4日に筋神経を切断すると、切断神経は筋を再支配しその運動ニューロンに死滅は見られないが、切断した筋神経による筋の再支配を阻止すると運動ニューロンは2~3週間以内に死滅する (Kashihara *et al.*, 1987)。この結果は単に胎生期のみでなく、幼弱ラットにおいても運動ニューロンの生存は支配筋に依存することを示唆する。成熟とともに運動ニューロンの筋依存性は低下し、成熟ネコでは、下肢を切断して18か月後でも下肢を支配する腰髄運動ニューロンには死滅が見られない (Carlson *et al.*, 1979)。しかし、下肢切断手術後5~9年に実施されたヒト (成人) の剖検例では腰髄に約50%の運動ニューロンの死滅が観察された (Kawamura & Dyck, 1981)。運動ニューロンの筋依存性は、筋から由来する神経栄養因子が運動ニューロンの軸索を介して逆行性に輸送されその生存を維持すると仮定されている (Purves & Lichtman, 1985)。ヒトの筋萎縮性側索効果症 (amyotrophic lateral sclerosis; ALS) では多数の運動ニューロンが死滅し、その病因は不明であるが、一つの可能性として筋由来の神経栄養因子の欠如が示唆されている (Appel, 1981)。

ヒトのALS疾患では骨格筋を支配する運動ニューロンは死滅するが直腸及び膀胱の括約筋を支配するOnuf核と呼ばれる運動ニューロンは死滅から免れる (Mannen *et al.*, 1977, 1982)。この特異性の要因は不明である。ヒトのOnuf核に相当する運動ニューロンはラットにも存在し、その一部は球海綿体 (bulbocavernosus) を支配するので、SNB (spinal nucleus of the bulbocavernosus) ニューロンと呼ばれる (Breedlove & Arnold, 1980)。ラットのSNBニューロンはテストステロンに対する感受性を持ち、雌では生後約10日の間にこのニューロンは死滅し、ヒトのOnuf核と同様な性差を示す。ヒトのALS患者に見られるOnuf核の特異性を理解する目的で、我々はラットのSNBニューロンの細胞死とテス

トステロン依存性の栄養因子効果を検討した。

#### 研究経過

出生時にはSNBニューロンは雌雄いずれのラットにも存在するが、雌ラットのSNBニューロンは生後10日までに死滅し、この雌の新生ラットのSNBニューロンの死滅はテストステロン投与により阻止される (Nordeen *et al.*, 1985; Sengelaub & Arnold, 1986)。我々は、この新生雌ラットに発生するSNBニューロンの自然死の経過を電気生理学的に解析することを企画した。この目的のために、雌雄新生ラットの脊椎のスライス標本作製し、そのスライスに存在するSNBニューロンの細胞膜に微小電極の先端を密着させ、電極下の細胞膜を破裂して細胞膜のイオン電流を記録する (全細胞パッチクランプ法; Hamill *et al.*, 1981) ことを試みた。中枢神経のスライス標本のニューロンにパッチクランプを適用する手法は、協同研究者、高橋智幸、が開発したもので、この手法による脊椎運動ニューロンの膜電流の解析は既に報告した (Takahashi, 1990)。本研究の電気生理学的解析はこの実験法に準じたものである。

成熟雄ラットのSNBニューロンの大きさと樹状突起の長さは去勢により縮小し、この効果はテストステロンの投与により阻止される (Breedlove & Arnold, 1981; Kurz *et al.*, 1986)。このホルモンに対する受容体はSNBニューロンにも (Breedlove & Arnold, 1983)、その支配筋である会陰部筋にも (Dube *et al.*, 1979) 存在する。したがって、テストステロンによるSNBニューロンの大きさの調節はそのホルモンのSNBニューロンに対する直接作用によるのか、あるいは、その支配筋を介して発現するのかわ不明である (Breedlove, 1986)。これらの可能性を検討するために、我々はテストステロンに感受性を持たない骨格筋を移植してSNBニューロンによって支配させ、この条件下で去勢あるいはテストステロン投与によるSNBニューロンの大きさの変化の有無を検討した。この目的のために、同一のラットの下肢のヒラメ筋 (soleus muscle) を摘出して会陰部に移植した。この手法は1974年に Hanzlik-

ova & Gutmann が開発し、予備実験において、代表研究者（久野）がこの手法は技術的に比較的容易であることを確認した。

## 研究成果

### SNB 細胞死に関する電気生理学的研究

生後 1~4 日の雌雄ラットの外陰神経 (pudendal nerve) を露出し、その中枢側切断端に蛍光色素 (tetramethylrhodamine-dextran-lysine) を約 30 分間適用し、48 時間後に実験を行った。第 5 及び第 6 腰椎から 120  $\mu\text{m}$  の厚さのスライス標本を作製すると、先の報告に一致して (Breedlove & Arnold, 1980), 前角の内側に蛍光を含んだ SNB ニューロンが確認された。これらのニューロンの細胞膜の表面を生理的溶液のジェット流により露出し、パッチクランプ電極を密着させ、電極下の膜を破り全細胞記録 (whole-cell recording) を灌流液下に実施した。最初に細胞内電位を記録し、次いで、電圧固定下で膜電流を記録した。

細胞に脱分極を与え、活動電位とそれに続く後過分極電位を記録した。雌雄のラットの SNB ニューロンにおいて活動電位には差が見られなかったが、後過分極電位の期間は雌の方が (304  $\pm$  72 msec) 雄より (258  $\pm$  67 msec) 有意に延長していた。また、ニューロンの大きさを反映する細胞の膜容量の測定においては、雌 (48  $\pm$  14 pF) のほうが雄 (59  $\pm$  10 pF) より低く、雌 SNB ニューロンの大きさが小さいことが示唆された。

電圧を種々のレベルに固定して、電圧依存性 K 電流、電圧依存性 Ca 電流を記録した。雌雄のラットの SNB ニューロンの K 電流には差が認められなかった。Ca 電流に関しては、脱分極により一過性と持続性の 2 成分が記録された。一過性 Ca 電流には差がなかったが、持続性 Ca 電流は雌のほうが (1141  $\pm$  193 pA at 0 mV) 雄より (786  $\pm$  193 pA at 0 mV) 有意に大きかった。

神経細胞は過剰の Ca の流入により細胞死が誘発されることが観察されている (Choi, 1988; Siesjo, 1988)。この事実を考慮すると、本研究の結果から、雌 SNB ニューロンの新生期の細胞死はその高密度の Ca チャネルの存在に起因することが示唆される。雌ラットの SNB ニューロンの

Ca 電流は雄より約 1.5 倍大きく、細胞の大きさは雌は雄の約 80% であるから、同一のニューロンの活動による細胞内 Ca 濃度は雌 SNB ニューロンのほうが約 3 倍高いと推定される。

また、ALS 疾患において細胞死から免れること及び特異的なペプチドの分布から、ヒトの Onuf 核 (Gibson *et al.*, 1988) もラットの SNB ニューロン (Katagiri *et al.*, 1986) も骨格筋を支配する運動ニューロンとは性質が異なり、むしろ、自律神経系の節前ニューロンに類似していると仮定されている。この可能性を検討するために、同様なスライス標本によって下肢筋を支配する腰髄運動ニューロンからも記録を実施したが、SNB ニューロンが骨格筋支配の運動ニューロンと質的に異なる結果も、自律神経節前ニューロンと類似している証明も得られなかった。したがって、SNB ニューロンはその性質においては骨格筋支配の運動ニューロンと同じクラスに分類され、その細胞死の特異性は他の要因によると結論された。

### SNB ニューロンの大きさのホルモン依存性機構

成熟雄ラットの SNB ニューロンは第 5、第 6 腰椎の前角の内側に限局した位置に密集しているため、ニッスル染色により容易に識別され、その大きさを計測することが可能である (Breedlove & Arnold, 1980)。一側の外陰神経を切断し、その位置にヒラメ筋を移植して SNB ニューロンにより支配させ、反対側の外陰神経は一度切断して直ちに再縫合して、元来の会陰部筋を再支配させて、10 週間後に観察した。この条件下で、去勢を行うと、再支配された会陰部筋は正常動物と同様に萎縮し、この効果はテストステロンの投与により阻止された。また、あらかじめ除神経を実施した後に去勢を行うと会陰部筋の萎縮はさらに著明になり、除神経会陰部筋はテストステロン投与により重量が増加した。したがって、会陰部筋のホルモン感受性は筋自身に存在することは明らかである。これに対して、SNB ニューロンによって支配されたヒラメ筋の重量は去勢によっても、テストステロンの投与によっても変化しなかった。こ

の結果から、ヒラメ筋にはテストステロン感受性が存在しないと結論される。SNB ニューロン自身もテストステロンの投与によりその大きさが増大し (Breedlove & Arnold, 1980), このホルモンに対する結合部位の存在が報告されている (Breedlove & Arnold, 1983)。それでは、ヒラメ筋を支配した SNB ニューロンの大きさは正常と同様にテストステロン投与により増大するのであろうか？

腰髄の連続切片を作製し、両側の SNB ニューロンの計測を行った。末梢の外陰神経を切断してその神経による筋の再支配を 10 週間阻止すると、SNB ニューロンの大きさは正常の約 63% に有意に減少した。切断した外陰神経をヒラメ筋と縫合してこの異種筋を支配させておくと、SNB ニューロンの大きさは正常の 91% であり、有意差がなく、SNB ニューロンは異種筋によっても維持されると結論された。

外陰神経を一度切断して、元来の会陰部筋を再支配させると、正常動物と同様に、去勢によりニューロンの大きさは有意に減少し (平均, 正常の 74%), 去勢後テストステロンを投与すると有意に増大した (平均, 正常の 101%)。これに対し、ヒラメ筋を再支配した SNB ニューロンの大きさは去勢によっても (2% の減少) テストステロンの投与によっても (1% の増大) 有意の変化を示さなかった。したがって、SNB ニューロンの大きさが去勢あるいはテストステロンの投与によって変化するかどうかは、その SNB ニューロンが支配する筋のホルモン感受性の有無に依存すると結論される。

これらの実験結果は筋由来の神経栄養因子効果に関して三つの示唆を与える。第一に、SNB ニューロンのテストステロン投与による大きさの変化はその支配筋のタイプに依存するから、ホルモンによるこのニューロンの大きさの調節は明らかに筋由来の神経栄養因子効果に起因する。第二にニューロンの大きさは元来の支配会陰部筋のみではなく、異種の骨格筋 (ヒラメ筋) の支配によっても維持されるから、会陰部筋と骨格筋から由来する逆行性神経栄養因子の性質は同一か極め

て類似したものと考えられる。第三に、支配筋にホルモン感受性が無ければ、テストステロンによる SNB ニューロンの大きさの増大は見られないから、テストステロンは筋に作用して、その筋由来の栄養因子の合成を促進すると仮定できる。

ヒトの Onuf 核運動ニューロンは ALS 疾患において死滅しない (Mannen *et al.*, 1977, 1982)。もし、ALS 疾患における運動ニューロンの死滅が筋由来の逆行性神経栄養因子の欠乏によるのであれば (Appel, 1981), Onuf 核が支配する筋では血中のテストステロンによってその栄養因子の合成が亢進され得るから、このニューロンは死滅から免れる可能性が考えられる。

#### 今後の課題と発展

本研究の結果に基づいて、現在二つの課題を検討中である。第一の問題点は神経の細胞死と Ca の関連である。細胞死の時期の雌ラットの SNB ニューロンでは有意に大きい Ca 電流が記録され、Ca の過剰な流入により細胞死が誘発される可能性が示唆された。しかし、この結果は単に雌雄差を反映したもので、細胞死とは因果関係がない可能性も存在する。同様な大きな Ca 電流の発現が事実細胞死の過程で観察できるかを新生ラットの顔面運動神経細胞で検討中である。ラットの顔面運動神経を生後 1 日に時期に切断すると、その運動ニューロンは 1 週間以内にほとんどすべてが死滅し、この細胞死は栄養因子、ciliary neurotrophic factor (CNTF) の投与によって阻止される (Sendtner *et al.*, 1990)。新生ラットを用い、脳幹部のスライス標本において軸索切断を行った顔面運動ニューロンと正常ニューロンからパッチクランプ法により Ca 電流を記録し、死滅の過程にあるニューロンに異常に大きな Ca 電流の発現が見られるかを検討し、そのような結果が得られたら、CNTF を投与して、細胞死と Ca 電流の発現が平行して阻止されるかを検討する。

第二の問題点は筋由来の運動ニューロン生存維持因子 (栄養因子) の同定である。この仮定された生存維持因子の筋における含有量は極めて微量であり、その同定が困難である。本研究では、骨格筋と会陰部筋から由来する栄養因子は同一であ

り、会陰部筋ではその合成がテストステロンにより促進されることが示唆された。この結果に基づき、雄ラットに連日テストステロンを2週間投与し、その会陰部筋から mRNA を抽出する。この mRNA をアフリカツメガエルの卵母細胞に注入して、新たに合成された蛋白の運動ニューロンの細胞死に対する効果を検討する。この蛋白効果の検討には胎生期のチックの腰髄運動ニューロンの自然細胞死をアッセイ系として用いる。正常の筋に存在する栄養因子が余りに微量であるため、これを蛋白とし同定するのは困難であり、mRNA として探索するのが主眼である。現在、やや好結

果が得られたので、会陰部筋から抽出した mRNA の分画を実施中である。

#### 発表論文

- 1) Kuno, M.: Target dependence of motoneuronal survival: The current status, *Neurosci. Res.*, **9**, 155~172 (1990).
- 2) Manabe, T., Araki, I., Takahashi, T. and Kuno, M.: Membrane currents recorded from sexually dimorphic motoneurons of the bulbocavernosus muscle in neonatal rats, *J. Physiol. (Lond.)*, **440**, 257~270 (1991).
- 3) Araki, I., Harada, Y. and Kuno, M.: Target-dependent hormonal control of neuron size in the rat spinal nucleus of the bulbocavernosus, *J. Neurosci.*, **11**, 3025~3033 (1991).