

## GDNF は特異的な運動ニューロンに選択的に影響を与える

平成 20 年 6 月 5 日

神経系の発生や分化、生存、機能には神経栄養因子をはじめとするさまざまな分子が関与している。神経栄養因子の一つである GDNF (Glial cell-line derived neurotrophic factor)は、神経細胞の生存や、遺伝子発現制御、発生過程のシナプス除去などに非常に重要な役割を担っており、特に脊髄の運動ニューロンの発生と分化、生存に深く関与している。脊髄の運動神経は脳からの指令を骨格筋へと伝える遠心性の情報伝達路である。運動神経の情報を受け取る骨格筋は、収縮・伸展により骨などの運動器を実際に動かす錐外筋と、筋の長さを感じ調整する筋紡錘を構成する錐内筋の二種の筋繊維から構成されている。GDNF ノックアウトマウスでは運動ニューロンが特に欠損、減少していることが報告されているが、このノックアウトマウスは生後すぐに死亡するため、GDNF がある特異的な運動ニューロンに選択的に影響を与えるのか、未だ分かっていなかった。

今回神経分化再生チーム(榎本秀樹チームリーダー)の Thomas Gould 研究員は、GDNF あるいは GDNF 受容体の機能は、錐内筋に軸策を伸ばすガンマ運動ニューロンの生存に必須であることを明らかにした。Gould 研究員はさらに、運動ニューロン生存の GDNF 依存性が生後数日までに限定されることを明らかにした。この論文は、*The Journal of Neuroscience* 誌の 2 月号に掲載された。

研究を進めるにあたりまず壁にぶつかった。GDNF シグナルのホモノックアウトマウスは腎臓や消化管の機能不全のため生後すぐに死亡してしまう。これでは脊髄の運動神経細胞に対して GDNF シグナルがどのような役割をしているのか詳細な解析は難しい。「マウスを用いた実験系では多くの研究室で似たような問題を抱えている」と Gould 研究員は語る。そこで Gould 研究員はマウス体内で条件特異的に遺伝子をノックアウトすることができるコンディショナルノックアウトマウスを使用した。「われわれの研究室のコンディショナルノックアウトマウスでは、たとえば運動ニューロンなどある一部の細胞においてのみ GDNF シグナルを欠損させることができるので、生後すぐに死ぬことがない。」

しかしさらに第二の壁が続く。運動ニューロンを可視化し正確に定量する方法だ。この問題は運動ニューロンに発現する遺伝子をラベルし細胞を数えることによって解決した。

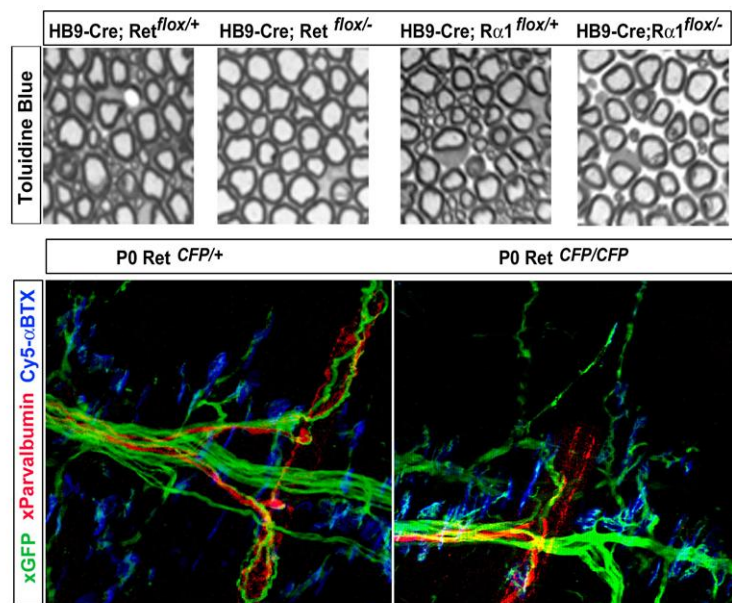
生後すぐの GDNF ノックアウトマウスで腰部運動ニューロン数を数え、運動ニューロンの下肢筋群への投射パターンと比較した。投射パターンからは腓骨筋、大殿筋、腸腰筋の三つの筋においてのみ異常が認められた。過去に GDNF は腓骨筋を支配する運動ニューロンの軸策誘導に関与するという報告もあり、その結果と今回の結果は一致している。ところが、GDNF やその受容体のノックアウトマウスには腓骨筋の神経に異常のない個体がしばしば認められるが、そのような個体でも、かなりの運動ニューロン数の減少があった。そして、その減少は、大殿筋と腸腰筋に分布するニューロンの異常だけでは説明できなかった。この発見から、GDNF シグナルの運

動ニューロンに対する影響は、支配筋だけでなく支配する筋繊維の種類（錘内筋・錘外筋）によっても異なるのではないかと Gould 研究員は考え研究を進めた。

調べてみると、Ret ノックアウトマウスでは錘内筋への投射がほぼすべて欠損していたのに対し、錘外筋への投射はほとんど変化は見られなかった。この錘内筋への運動ニューロン投射の選択的な欠損は GDNF ノックアウトマウス、GFR $\alpha$ 1 ノックアウトマウス双方において同様であった。

運動ニューロン特異的に Ret と GFR $\alpha$ 1 をノックアウトしたマウスでも、やはり錘内筋への投射が欠損していた。いつ、このような異常がおこるのであろうか。GDNF シグナルを欠くマウス胎児を調べたところ、筋紡錘に運動神経線維が投射する時期と一致して運動ニューロンに異常なアポトーシスが認められた。GDNF は発生中の錘内筋繊維に高く発現されることもわかった。この結果は、GDNF が標的由来生存因子としてガンマ運動ニューロン発生に関わっていることを示唆していた。

更に、Ret、GFR $\alpha$ 1 のコンディショナルノックアウトマウスを、タモキシフェン誘導性 Cre 遺伝子を発現するマウスと掛け合わせたマウスを作製した。このマウスではタモキシフェンにより Ret、GFR $\alpha$ 1 の機能喪失を誘導できる。このマウスを用いて生後数日たってから GDNF シグナルを欠損させたところ、発生時に GDNF シグナルを欠いた場合とは対照的に、錘内筋への投射に異常は認められなかった。つまり、ガンマ運動ニューロンの生存は発生の後期に限定して GDNF に依存することが示唆された。



上：L4 脊髄背側とるトルイジンブルー染色

下：筋紡錘内の筋と神経線維。左が W.T、右が Ret K/O (赤：感覚神経の神経末端、緑：運動ニューロン、青：筋繊維)

Gould 研究員は「運動ニューロンの変性疾患である筋萎縮性側索硬化症（ALS）では、アルファ運動ニューロンの細胞死と GDNF の機能不全との関連が示唆されてきた。しかし我々のこの

研究により、生理的条件下では GDNF はアルファ運動ニューロンよりガンマ運動ニューロンに深く関わっていることが分かった。したがって、GDNF シグナル不全と ALS 発病や症状との関連はより慎重に考察する必要がある。」と語る。