

神経成長因子とそのファミリーの構造と機能

—基礎研究から医学的応用へ—

古川昭栄^{a)}

岐薬紀要 (1992) 41 : 11-22

要約：神経成長因子は118個のアミノ酸からなる塩基性タンパク質である。その作用は特定の神経細胞膜上にある特異的受容体との結合を介して細胞内に伝達されその結果、神経細胞の分化、生存を促す。神経成長因子およびそのファミリーは末梢神経系ばかりでなく中枢神経系でも合成され機能していることが近年明らかにされ、アルツハイマー型痴呆症をはじめとする神経変性疾患の治療薬として期待が高まっている。

索引用語：神経成長因子, NGF, ニューロトロフィン, 遺伝子発現, 神経細胞, アストロサイト, アルツハイマー型痴呆症, パーキンソン病, 神経細胞死 (文 70)

Nerve Growth Factor and Related Molecules :

Structure, Physiological Functions and Therapeutic Applications

SHOEI FURUKAWA^{a)}*Ann. Proc. Gifu Pharm. Univ.* (1992) 41 : 11-22

Abstract : Nerve growth factor (NGF) is a protein that stimulates differentiation and maintains survival of sympathetic, some sensory neurons in the peripheral nervous system and magnocellular cholinergic neurons in the central nervous system. In this article, recent advances in NGF research field are presented as follows :

1) NGF-related molecules (NGF family proteins), 2) *trk* oncogene family coding high affinity NGF receptor, 3) NGF and NGF family protein potentials for application to degenerative neurological disorder treatment.

Keyphrases : nerve growth factor, NGF, neurotrophin, neuron, astrocyte, Alzheimer's disease, Perkinson's disease, neuronal death, gene expression

ヒトの脳には150億もの神経細胞がありその活動が日常生活を支えている。そのなかでも思考、記憶、学習行動は脳神経細胞の働きの最たるものでありヒトを人間たらしめる由縁である。分化した神経細胞には分裂能がなく、ほかの細胞でよくみられるような自己増殖して失われた細胞を補うというような芸当はできない。従って個体の老化とともに徐々に神経細胞の数は減少してゆく。単純老化による損失の範囲を越えて神経細胞が失われると分担していた機能

a) 岐阜薬科大学分子生物学教室

岐阜市三田洞東5丁目6-1

a) Laboratory of Molecular Biology,

Gifu Pharmaceutical University,

6-1, Mitahora-higashi 5 chome, Gifu 502

Received February 28, 1992

The Annual Proceedings of Gifu

Pharmaceutical University,

ISSN 0434-0094, CODEN : GYDYA 9

に重大な破綻をきたす。アルツハイマー病などの痴呆症の場合は記憶や学習機能を担う神経細胞が、パーキンソン病や筋萎縮性側索硬化症では運動機能に関わる神経細胞がそれぞれ障害や死におちいることが病態の主因になっている。

個体発生過程において未熟な神経細胞が神経機能を発揮するようになるにはいくつもの過程がある。たとえば神経突起の伸展、分化、シナプス形成などである。このすべての段階で神経栄養因子と総称される物質が重要な働きをしていると考えられている。また、分化し、機能し始めた神経細胞は個体と同じ寿命を生き抜かねばならない特別な細胞であり、死なないように特別の保護機構が講じられていてよいはずである。神経栄養因子はこの機構にも組み込まれた分子群であると考えられる。前脳基底核コリン作動性神経細胞はアルツハイマー病で障害され問題になっているが、この細胞は分化する過程で神経成長因子 (nerve growth factor : NGF) の作用が必要である。分化し、機能し始めてからも機能の維持や生存のために NGF を必要とする。NGF は代表的な神経栄養因子であり、充分量が与えられていれば神経細胞は長期生存し、機能できることになる。

本稿では最近の報告を中心に NGF とそのファミリーの物質特性、神経栄養因子としての生理・生物活性、疾患との関連について述べ、最後に疾患の予防や治療へ向けた応用の可能性に言及したい。

1. NGF ファミリーの構造と機能

1-1. 物質としての NGF

マウス NGF は118個のアミノ酸から成る分子量13,259の単量体が2個、非共有結合した二量体を形成している^{1,2)}。等電点9.3の比較的安定なタンパク質分子である。マウス顎下腺、ヘビ毒、モルモット前立腺、ウシ精液、ジャコウネズミ顎下腺に多量に含まれている(これらの組織に含まれる NGF は神経系には作用せず、生理的な存在理由は不明である)。分子量、等電点は相互に類似する¹⁾。さらに遺伝子の構造からこれら以外の動物の NGF についてもアミノ酸配列が推定できたことから³⁻⁹⁾、NGF 分子の全体的特性が見えてきた (Fig. 1)。1) アミノ酸残基の相同性は哺乳類相互では88%以上、哺乳類とヘビでは66-70%、2) 分子内の6個のシステイン、75、84位のヒスチジン、21、76、99位のトリプトファンは不変領域を形成し生物活性発現に必須、3) 種間で置換がある残基はアミノ末端、カルボキシ末端、66-65位および92-94位の親水性アミノ酸残基からなる領域に局限、4) 33位前後の親水性アミノ酸残基から

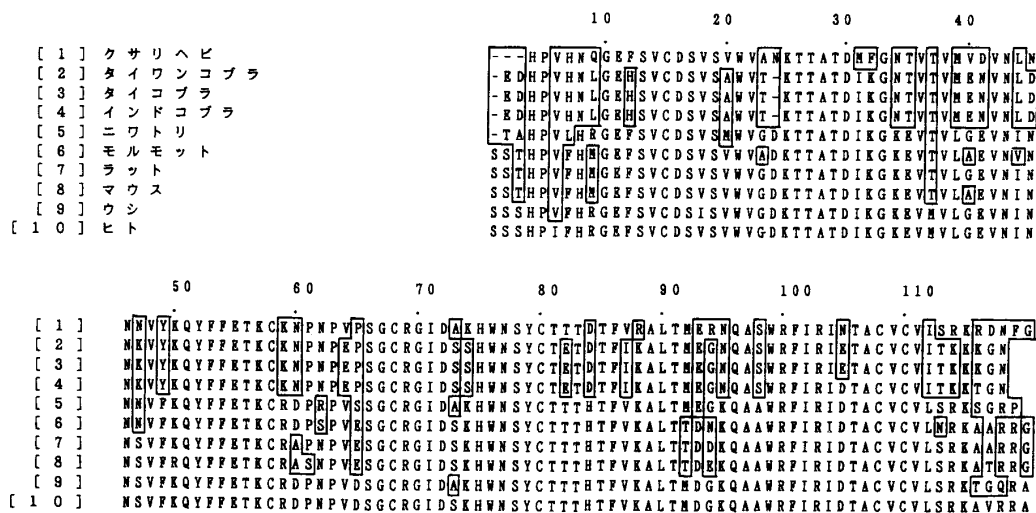


Fig. 1 Amino acid sequences of NGFs derived from various species. Residues which are displaced by different aminoacids from those of human NGF are enclosed into boxes.

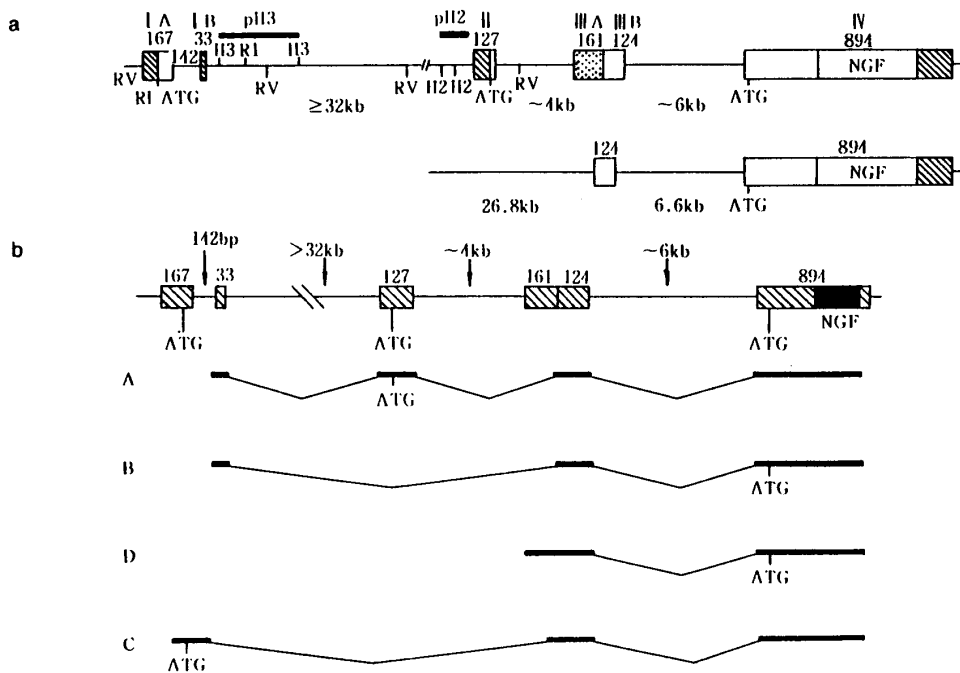


Fig. 2 Diagrammatic representation of the predicted NGF transcripts in relation to the gene¹¹⁾. The genes are shown with exons as boxes and introns as lines. The size of exons and introns is shown above boxes and lines, respectively. Mature NGF is striped. a) Structure of mouse (upper) and human (lower) NGF genes. b) Structure of mouse NGF gene and its mRNAs. Thick lines represent sequences formed in the mature RNA, and the thin lines represent regions that are removed by splicing of a primary transcript. The presumed sites for initiation of translation are indicated (ATG).

なる領域は比較的置換が少なく NGF 受容体との結合部位らしい、5) ヘビ NGF の生物活性は哺乳類 NGF に比べて弱いことが知られていたが、34-35位の Lys-Glu がヘビ NGF では Asn-Thr に、His 84 が Asp に置換されているため⁹⁾、6) Val 22 が活性発現に必須¹⁰⁾、7) 糖鎖は生物活性に関与していないなどの特性が明らかにされた。

NGF 遺伝子はいくつかのエクソンからなり 2つのプロモーターの転写開始と alternative splicing によって 4種の mRNA が作られる (Fig. 2)¹¹⁾。しかしどの転写産物からも最終的な翻訳産物として同じ活性型 NGF 分子が産生される。転写産物 A, B, C, D の存在比率は臓器によって異なっており、発現調節に関する遺伝子プロモーター領域の詳細な解析が待たれる。

1-2. NGF ファミリーの構造と分子進化

ブタ、ラット、マウスの脳より NGF と構造類似性の高い brain-derived neurotrophic factor (BDNF) が見いだされた (Fig. 3)^{12,13)}。BDNF は 119個のアミノ酸残基からなり 3種間のアミノ酸配列はまったく同じであった。BDNF は精製が完了してから遺伝子のクローニングまで 7年を要したが、第 3番目の NGF ファミリー因子、neurotrophin-3 (NT-3) の遺伝子は BDNF のクローニングからたったの数カ月でクローニングされてしまった。アミノ酸配列は NGF や BDNF に類似し、BDNF 同様動物種間で高い相同性をもつ (Fig. 3)¹³⁻¹⁵⁾。この成功は NGF と BDNF 遺伝子の共通配列をプライマーとする PCR (polymerase chain reaction) 法の威力をまざまざと見せつけた。同様の手法でアフリカツメガエル、クサリヘビに見いだされた (哺乳類には見いだされていない) 第 4番目のファミリー因子

h N G F	1	M S M L F Y T L I T A P L I G Q A E P H S E S N V P A G H --- T I P Q V H W T K L Q H S D T
h B D N F	1	M T I L F L T N V I S Y F G C K K A A P N K E A N I R G Q G -- G L A Y P G V R T H G T L E S Y N G
h N T - 3	1	M S I L F Y V I F L A Y L R G I Q G N N D Q R S L P E D S L N S L I K L I Q A D I L K N K L S K
x N T - 4	1	M L L R L Y A N V I S Y C C A L Q A A P F Q S R T T D L D Y G P D K T S E A S D R Q S V P N F S H
h N T - 5	1	M - L P L ----- P S C S L P I L ----- L L F - L L P S V P I E S Q P P P S T L P P
h N G F	47	A L R R R A R ----- S A P A A A I A A R V A G Q T R N ----- I T V D P R L F K - K R R L R
h B D N F	49	P K A G S R ----- G L T S L A D T F E H M I E E L D E -- D Q K V R P N E E N N K - D A D L Y
h N T - 3	51	Q H V D V K E N Y Q S T L P K A E A P R E P E R G G P A K S A F Q P V I A M D T E L L R Q R R Y N
x N T - 4	51	V L Q N G F ----- F P D L S S T Y S S M A G K ----- D W N L Y
h N T - 5	34	F L ----- A P ----- E W D L L
h N G F	84	S P R V L F S T Q P P R E A A D T Q D I D F E V G G A A P F N R T H R S K R - - S S S H P I F H R
h B D N F	91	T S R V M L S S Q V P L E P L L F L L E Y K N Y L D A A N N S M R V R R - - H S D P A - - R
h N T - 3	101	S P R V L L S D S T P L E P P L Y L M E D Y V G S P V V A N R T S R R R R - - Y A E H K S - H R
x N T - 4	76	S P R V T L S S E E P S G P P L L F L S E T V V I I P E A N R T S R I L K R A S G S D S V S L S R R
h N T - 5	43	S P R V V L S R G A P A G P P L L F L L E A G A F R E S A G A P A N P S R R - G V S E T A P A S R R
h N G F	131	G E L S V C D S V S V W V - - G D K T T A T D I R K G K E V M V L G E V N I N N S - V F K Q Y F F E T
h B D N F	136	G E L S V C D S T S E W V T A A D K K T A Y D M S G G T V T V L E K V T V S K G - Q L K Q Y F F E T
h N T - 3	147	G E L S V C D S E S L W V - - T D K S S A I D I R G H Q V T V L G E I K T G M S - P L K Q Y F F E T
x N T - 4	126	G E L S V C D S V N V W V - - T D K R T A V D D R G K I V T V M S E L Q T L T G - P L K Q Y F F E T
h N T - 5	92	G E L A V C D A V S G W V - - T D R R T A V D L R G R E V E V L G E V P A A G G S P L R Q Y F F E T
h N G F	178	K C R D ----- P N P V D S G C R G I D S K I I W N S Y C I T T H T F V K A L T M D - G K Q A A
h B D N F	185	K C N P ----- M Q Y T K E G C R G I D K R I I W N S Q C R I T T Q S Y V R A L T M D S K K R I G
h N T - 3	194	R C K E ----- A R P V K N G C R G I D D R I I W N S Q C K T S Q T Y V R A L T S E N N K L V G
x N T - 4	173	K C N P ----- S G S T R G C R G V D K K Q W I S E C K A K Q S Y V R A L T I D A N K L V G
h N T - 5	140	R C K A D N A E E G G P G A G G G G C R G V D R R I I W V S R C K A K Q S Y V R A L T A A Q G R V G
h N G F	220	W R F I R I D T A C V C V I L S R K A V R R A
h B D N F	228	W R E I R I D T S C V C T I T I R R G R - -
h N T - 3	237	W R W I R I D T S C V C A L S R R I G R T -
x N T - 4	216	W R W I R I D T A C V C T L L S R T G R T -
h N T - 5	190	W R W I R I D T A C V C T L L S R T G R A -

Fig. 3 Amino acid sequences of precursors of NGF family proteins¹⁷⁾. Human sequences are shown except for xenopus NT-4. Sequences are arranged to obtain the highest homology. Identical residues among over 3 species are enclosed into boxes. An arrow indicates the amino terminal of mature proteins.

は NT-4 と命名された¹⁶⁾。123個のアミノ酸からなり、ツメガエル NT-4 とマウスの NGF, BDNF, NT-3 相互のアミノ酸配列の相同性は50-60%である。さらに最近 NT-5 が発見された¹⁷⁾。NT-5 の前駆体は他のファミリー因子よりアミノ酸が50残基短い。活性型は123個のアミノ酸からなり、他の因子同様、6個のシステインは完全に保持されている。

McDonald ら¹⁸⁾ は X 線解析によってマウス NGF の立体構造を明らかにした。それによると、1) NGF 分子を構成するそれぞれのプロトマーは偏平な3本の非平行型 β 鎖構造である、2) NGF, BDNF, NT-3 の間でアミノ酸置換の多い29-35, 43-48, 92-98, 59-66位の4カ所は β -hairpin loop や reverse turn 構造を形成し、異なるそれぞれの受容体(後述)への結合部位と考えられている。

魚類からヒトに至る NGF, BDNF, NT-3, NT-4 のアミノ酸配列をもとに Hallbook ら¹⁶⁾ は分子進化系統樹を発表している。NGF は他の3種より進化の速度が速い、NGF は NT-3 と最も遺伝的に近縁である、NT-3 は NGF と BDNF に同定度近縁、NT-4 は BDNF と近縁、などが示されている。

1-3. NGF ファミリーの生物活性

末梢神経系では交感神経と神経冠由来知覚神経(脊髄後根神経節にある)が NGF に応答する。NGF は交感神経の発達過程で分化促進、生存維持作用を、神経細胞の成熟後は生存・機能維持作用を示す^{1,2)}。知覚神経は胎性期に NGF

に応答性が高い¹⁾。中枢神経系では前脳基底核の大細胞性コリン作動性神経と線条体コリン作動性神経がNGFに
 応答する^{19,20)}。末梢同様、これらの脳神経細胞が未分化
 な段階では主に分化誘導を、成熟後は生存・機能維持作
 用を示す。このほか小脳のプルキンエ細胞に対する作用
 が報告されている。培養下のプルキンエ細胞はK⁺ (脱
 分極をおこす)や興奮性神経伝達物質とともにNGFを添
 加すると生存が維持され、形態形成が促進される²¹⁾。

NGFファミリーは構造的には類似するが結合する受容
 体が異なるため(後述)、作用する神経細胞も多少違って
 いる(Table)。BDNFは神経冠知覚神経^{22,23)}、前脳基底
 核コリン作動性神経^{24,25)}のほか前脳基底核GABA作動
 性神経²⁵⁾、中脳ドーパミン作動性神経^{25,26)}に生存維持活
 性を示すのが特徴である。神経冠由来知覚神経は発生初
 期にBDNFに、やや遅れてNGFに応答性を示す²⁷⁾。同じ
 傾向は前脳基底核コリン作動性神経にもみられる²⁵⁾。NT-3
 の中枢神経への作用は報告されていないが、末梢神経細
 胞に対してはNGFやBDNFとオーバラップしている。しかし、NGFの作用しない神経板由来の知覚神経に強い作
 用を示す^{28,29)}のが特徴である。NT-4は神経冠、神経板由来いずれの知覚神経にも作用するが交感神経には作用しな
 い¹⁶⁾。NT-5は神経冠由来知覚神経に強い、神経板由来知覚神経に弱い生存維持活性を示す¹⁷⁾。

NGFは神経系以外の細胞にも作用することが知られている。肥満細胞のヒスタミン分泌を促進³⁰⁾、多型核白血球
 を走化³¹⁾、コロニー形成を促進³²⁾、T細胞、B細胞の増殖促進³³⁾など免疫系細胞への作用、精子など生殖細胞の減数
 分裂を調節する作用¹⁶⁾、が報告されている。

2. NGFファミリーの受容体

NGF受容体には低親和性受容体(low affinity NGF receptor [LNGFR], fast receptor; Kd=10⁻⁹ - 10⁻⁸ M)
 と高親和性受容体(high affinity NGF receptor [HNGFR], slow NGF receptor; Kd=10⁻¹¹ - 10⁻¹⁰ M)の2種
 の受容体がある^{1,2)}。LNGFRのcDNAの塩基配列の解析³⁴⁻³⁶⁾からアミノ酸配列やN-およびO-型糖鎖結合位置が
 推定され、分子量約8万の複合糖タンパク質であることが明らかにされている。HNGFRはNGFの生物活性を細胞
 内に伝達すると考えられてきたが、その分子実体は混沌としていた。NGFの作用機序を解明する鍵はHNGFRを分
 子レベルで解明し、2種の受容体間の相互の関連を明確にすることにかかっていた。ごく最近になってこの問題は意
 外なところから糸口が見えてきた。

プロトオンコジーン(tyrosine receptor kinase: *trk*)のmRNAの分布がNGF受容体のそれと一致することを契
 機として検討された結果、*trk*遺伝子産物がNGF受容体そのものであることが判明した^{37,38)}。ヒト*trk*遺伝子産物
 (gp140^{prototr}, gp140^{trk}, gp140^{trkA})はアミノ酸790個から成る分子量約14万の糖タンパク質であり³⁹⁾、1カ所の膜貫
 通領域、32個のアミノ酸からなるシグナルペプチド、13個の糖鎖結合部位、細胞内にチロシンキナーゼ領域、をもつ。
 一方、*trk*の類似遺伝子である*trkB*、*trkC*が見いだされ、これらがBDNFやNT-3の受容体であることがわかつ

Table. Biological activities of NGF family proteins

		NGF	BDNF	NT-3	NT-4
peripheral nervous system	neural crest-derived sensory neurons	○	○	○	○
	placode-derived sensory neurons	×	○	○	○
	sympathetic neurons	○	×	○×	×
	Ciliary neurons	×	-	○×	-
central nervous system	motor neurons	×	×	×	×
	basal forebrain cholinergic neurons	○	○	×	-
	basal forebrain GABAergic neurons	×	○	×	-
	mid-brain dopaminergic neurons	×	○	×	-

- : not done, × : inactive, ○ : active

a) not active in paravertebral neurons.

b) reported as active or inactive depending on reports.

た⁴⁰⁻⁴³)。これらの結果をふまえて NGF ファミリーとその受容体の相互作用を統一的に説明しようとするモデルが提出されている⁴⁰⁻⁴²)。ひとつの説は LNGFR と *trk* 遺伝子産物の相互作用を重視したもので、この場合 LNGFR は NGF ファミリー共通の低親和性受容体である。これに *trk*, *trk B*, *trk C* 遺伝子産物が結合し個々のファミリー因子に特異的な高親和性受容体としての機能を発揮するとするものである (Fig. 4)。このほか *trk* 遺伝子ファミリー産物は単独で NGF, BDNF, NT-3 の活性を媒介するとする考えもある。すなわち活性を伝達する受容体の機能は *trk* 遺伝子ファミリーの翻訳産物だけで十分とする説とこれに LNGFR の関与が必要とする2つの説があり決着していない。重要なのは、NGF の gp140^{trk} への結合により細胞内領域のチロシンキナーゼが活性化され、その刺激が細胞内に伝達されることがはっきりしたことである。

3. アルツハイマー病と NGF

脳での NGF の作用は記憶や学習能に重要とされる前脳基底核コリン作動性神経細胞に向けられていると考えられるに至り^{19,20})、アルツハイマー型痴呆症との関連が注目を集めた (Fig. 5)。アルツハイマー型痴呆症の患者脳はこの神経路に顕著な変性・脱落を呈しており、このことが痴呆病態と深く結びついていると考えられている⁴⁴)からである。患者脳の NGF mRNA⁴⁵)とそのレセプター mRNA レベル⁴⁶)はこれまで異常が報告されていないことから、直接病因に関与するかどうかは結論が出ていない。しかしこの問題とは別に、NGF の神経細胞死抑制作用、機能修復作用をアルツハイマー型痴呆症の治療に生かそうとする検討が始まっている。NGF の有効性はラットを使った2つのモデルで検討されている。ひとつは海馬一中隔間の切断によって死滅する前脳基底核コリン作動性神経細胞を NGF の脳室内投与により救うことができること⁴⁷)、もうひとつは老化に伴う前脳基底核コリン作動性神経細胞の萎縮、機能的低下を NGF が抑制する⁴⁸)ことである。最初のモデルについてはサルでも効果が確認されている⁴⁹)。アメリカでは社会倫理の問題、必要量のヒト NGF の確保の問題を克服すべく臨床試験のための準

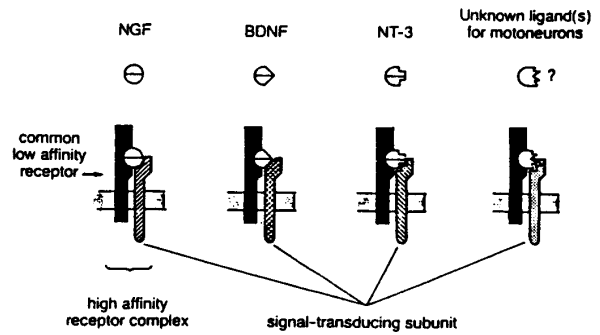


Fig. 4 Hypothetical structure of the high affinity receptors of the neurotrophins and of a receptor for an as yet unidentified ligand of motoneurons³⁸).

NGF, BDNF and NT-3 share a common low affinity unit. The high affinity receptors are probably formed from different subunits that do not exhibit a binding affinity for the ligands. However, together with the low affinity receptors, they mediate the high affinity binding of the corresponding ligands. Motoneurons express the common low affinity subunit during embryonic development and after axonal lesion.

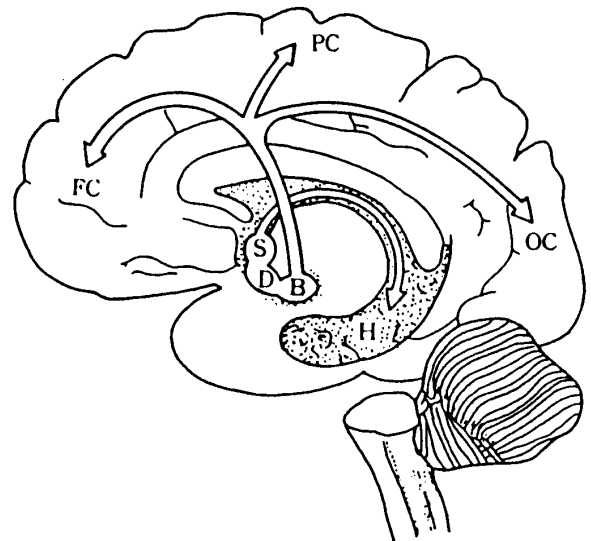


Fig. 5 Schematic representation of cholinergic projection from basal forebrain in human. FC, frontal cortex ; PC, parietal cortex ; OC, occipital cortex ; H, hippocampus ; B, nucleus basalis of Meynert ; D, diagonal band of Broca ; S, septal nucleus.

備が進められている⁵⁰⁾。すでにスウェーデンで一例のアルツハイマー病患者脳にマウス由来の NGF 6 mg が3カ月にわたり投与され脳血流、物質代謝、痴呆病態の改善がみられている⁵¹⁾。

一方、NGF ファミリータンパクである BDNF も同様の観点から重要と考えられる。BDNF は前脳基底核コリン作動性神経細胞に対し、*in vitro*, *in vivo* いずれにおいても NGF 類似の作用を持つ^{23,24)} こと、ラット成熟脳では NGF mRNA の50倍もの BDNF mRNA が発現している¹²⁾ ことなどから、前脳基底核コリン作動性神経細胞の栄養因子としての生理的役割が NGF より重い可能性もある。BDNF は前脳基底核コリン作動性神経細胞ばかりでなく黒質ドーパミン作動性神経細胞に対しても培養下で神経栄養因子作用を示す^{25,26)}。しかも BDNF の添加によって MPP⁺ による選択的細胞毒性に抵抗性となることも報告²⁶⁾ されている。すなわち BDNF はこの神経路の障害によって起こるパーキンソン病の治療薬としても期待されている。神経疾患への応用をめざすにあたっては個々の疾患について NGF ファミリーおよびその高親和性レセプターである *trk* 遺伝子ファミリーの発現を含めた総合的知見が必要であり、今後の検討課題であろう。

4. NGF の合成誘導

このように NGF の治療薬としての応用の可能性は高まる方向にあると思われる。しかし問題点もある。その一つは NGF が巨大分子、タンパク質であるため、脳・血液関門を通過できないことである。NGF を脳で作用させるには直接脳内に注入しなければならない。ヒトへの応用を考えると大きなリスクになると思われる。もし脳・血液関門通過性の物質を末梢投与し、その物質の脳への移行によって脳の NGF 合成を高めることができれば、そして誘導された NGF に神経機能修復作用が期待できれば、そのような物質はアルツハイマー病の予防や治療にある程度有効かも知れない。そのような物質は存在するのであろうか？ このアプローチの成否はこの物質の発見にかかっているといえる。以後この点を詳しく述べる。

4-1. NGF 合成細胞

NGF 合成の場合は NGF に応答する神経細胞が軸索を投射している組織とほぼ一致する。末梢では上皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞、シュワン細胞など多種の細胞が NGF を合成する^{52,53)}。一方、中枢神経系では *in situ* ハイブリダイゼーション法で成熟ラット、マウスの脳が調べられ、海馬の顆粒細胞、錐体細胞、さらに一部の報告は皮質の錐体細胞で NGF mRNA を確認している^{54,55)}。しかし共通してアストロサイトには検出されていない。最近 Zafra ら⁵⁶⁾ はラット海馬神経細胞の NGF mRNA レベルは興奮性アミノ酸によって高まり、GABA によってこの作用が抑制されることを見いだしている。神経回路網の刺激伝達によって神経細胞の NGF 合成が調節されるらしい。

一方、アストロサイトはもう一つの主な脳神経系構成細胞であり、脳や脊髄の神経細胞や血管周囲に広く分布して神経細胞の機能維持や栄養補給などの重要な役割を担っている。著者らは培養下でアストロサイトが NGF を合成・分泌することを示し、さらに NGF 合成はアストロサイトの増殖期で高く、増殖が停止すると低くなることを示した⁵⁷⁾。成熟脳内のアストロサイトの多くは増殖を停止しているのほとんど NGF を合成していないと考えられる。しかし、Lu ら⁵⁸⁾ は解剖学的に神経細胞が存在しない視神経において、アストロサイトが増殖する生後の一時期や、損傷後に NGF 遺伝子が発現していることを示した。脳の発達段階、状態によって NGF 合成にシめる神経細胞とアストロサイトの役割が変わると推定される。

さてそれでは、NGF 合成を調節する低分子化合物の検索にはアストロサイトと神経細胞のいずれを用いればよいであろうか。この結論はアストロサイトということになるであろう。神経細胞による NGF 合成は興奮性神経ネット

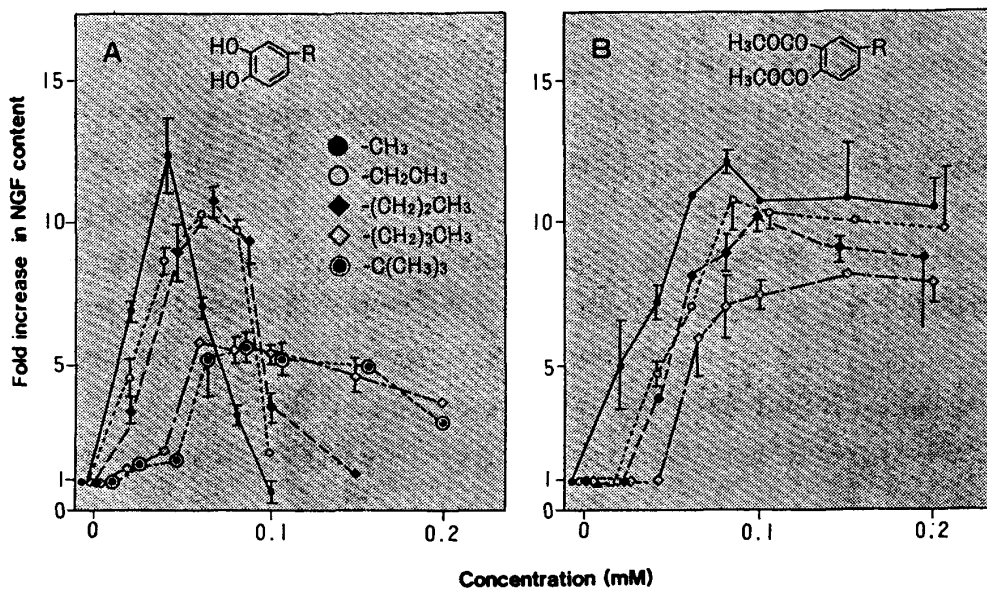


Fig. 6 Effects of 4-alkylcatechols (A) and 1,2-diacetoxy-4-alkylbenzene (B) on NGF synthesis in mouse L-M cells⁶³⁾.

ワークの活動の結果ということであるならば、神経細胞の NGF 合成を高める薬物は神経細胞を興奮させる薬理作用をとらなう。その結果としてなんらかの不利益な精神活動を個体に引き起こす可能性が否定できないからである。

4-2. 培養細胞の NGF 合成を促進する物質

血清を含む培養液で飽和密度に達したアストロサイトを 0.5% 牛血清アルブミンを含む培養液に取り替え 1-2 週間維持する。この間にアストロサイトは静止期に入り NGF 産生も低下する⁵⁷⁾。静止期に導入するのはアストロサイトを成熟脳内の状態に近づけるためと同時に NGF 遺伝子発現が抑制されて外部からの合成刺激が観察しやすくなるためである。次に試料を含む培養液で 24 時間培養し、培養液中の NGF 濃度を酵素免疫測定法 (enzyme immunoassay: EIA) で定量する。この方法でカテコールアミン (エピネフリン, ノルエピネフリン, ドーパミン) は NGF 合成を顕著に促進する⁵⁹⁾。類似の活性はアストロサイト以外の細胞に対しても認められる⁶⁰⁾。構造-活性相関の研究からカテコールアミンの活性はカテコール環構造によること、側鎖は活性の強さを調節すること、この作用はアドレナジックレセプターを介していないこと、が見いだされた⁶⁰⁻⁶²⁾。つまりカテコール化合物にはアドレナジックレセプターを介して伝達されるホルモン様作用、神経伝達物質類似作用がないことを意味し、将来医薬品を目指す際の不利益な副作用を除外できる特に重要なポイントである。以上の情報をもとに側鎖の 4 位にアルキル基をもつカテコール化合物に強い活性を見いだした (Fig. 6)^{63,64)}。以上の一連の実験結果から NGF 合成促進活性はカテコール化合物に特異的と思われた。しかしその後構造的には全く異なるプロペントフィン⁶⁵⁾ や 1,4-ベンゾキノン類⁶⁶⁾ にも同様な活性が見いだされた。これら低分子化合物が NGF 合成を促進する作用機序は明らかではないが、特異性がそれほど厳密でなく、他にも未発見の化合物群があると推定される。

4-3. 生体内の NGF 合成誘導

さて培養細胞でスクリーニングされた NGF 合成刺激物質は生体でも NGF 合成を促進するであろうか。この点を脳・血液関門の問題のない末梢神経系で検討した。強い NGF 合成促進作用を有する 4-メチルカテコールをわずか 2

μg ($10 \mu\text{g}/\text{kg}$), ラット腹腔内に単回投与すると、まず神経支配組織で NGF レベルの上昇がみられその上昇は順次、坐骨神経（逆行性輸送ルートのひとつ）、神経節（神経細胞体が存在する）へと経時的に移行した。すなわち 4-メチルカテコールで合成誘導された NGF は軸索内を神経節まで生理的なプロセスに乗って運ばれることが判明した (Fig.7)^{67,68}。

薬物誘導によって作り出された NGF に生理活性はあるだろうか？ カテコール化合物を幼若ラットに毎日 1 回、1 ないし 2 週間連続的に投与すると、知覚神経細胞の神経伝達物質であるサブスタンス P レベル、交感神経細胞の伝達物質ノルエピネフリンをつくる律速酵素のチロシン水酸化酵素活性が有意に上昇した。すなわち誘導 NGF が生理活性を発現し、末梢神経系での NGF 応答神経細胞の分化を促進することが示された⁶⁸。

5. 疾患モデル動物における NGF 合成誘導

つぎに疾患モデル動物へのアプローチの一環として、ラットの坐骨神経再生に及ぼす NGF 誘導の効果を検討した⁶⁹。ラットの坐骨神経を外科的に切断、生理食塩水を満たしたシリコンチューブ内に断端を挿入してから生体にもどす。4-メチルカテコールまたは生理食塩水を 1 日 1 回、2 週間にわたり投与、投与終了後の 3 週間後に観察すると対照に比べカテコール化合物投与群では、発芽する有髄線維の数がほぼ 2 倍に増加 (Fig. 7)、しかも径の大きい線維の比率が高まった。一方、軸索の伸展速度には変化がなかった。また無髄線維の数も著明に増加した。これらの結果は 4-メチルカテコール投与によって NGF 合成が高まりその結果ラットの末梢神経再生が促進されたことを示している⁷⁰。

NGF 合成誘導の臨床的意義を探るためもうひとつ別のモデル系を用いた。ストレプトゾトシン (STZ) でランゲルハンス島 B 細胞を破壊した糖尿病ラットは末梢神経炎をおこし、その結果、運動神経の刺激伝達速度が低下する。花岡ら⁷⁰は STZ 投与と同時に 4-メチルカテコールをラットに投与すると STZ のみを投与した群に比べて血糖値には全く変化がみられないのに、運動神経刺激伝達速度は有意に高く維持されることを見いだしている (Fig. 8)。以上のように NGF 合成誘導は末梢神経系疾患モデルの臨床的側面からは注目に値する。さらに他の疾患モデル系での検討を計画中である。

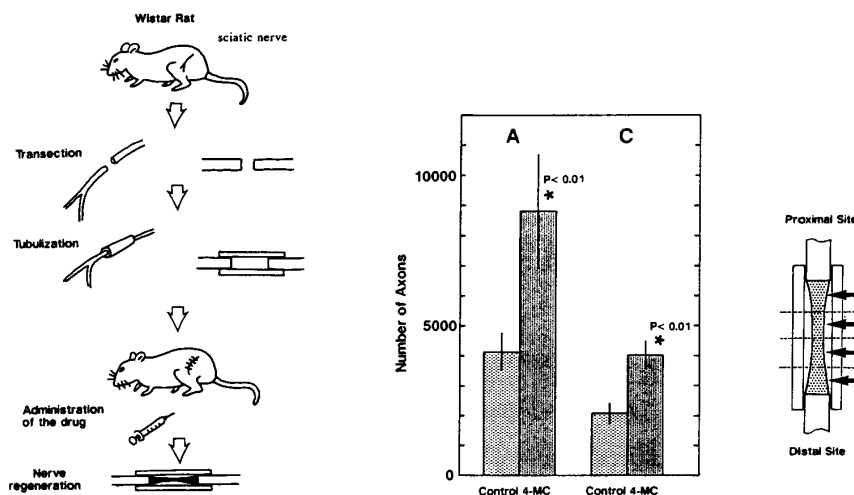


Fig. 7 Stimulation of sciatic nerve regeneration by repetitive administration of 4-methylcatechol⁶⁹.

Left : Schematic drawing of experimental procedures. The sciatic nerves of adult rats were transected, and both distal and proximal stumps were inserted into a silicon tube filled with PBS. Rats were intraperitoneally injected with $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ of 4-methylcatechol in PBS or PBS alone once a day for 2 weeks. Right : Numbers of myelinated axons sprouted from proximal stump at two different sites. The sciatic nerve regenerated in the tubes were analysed morphologically.

さて末梢神経系の NGF の合成誘導が成功すると次のターゲットは当然、脳である。化合物の安定性、脳・血液関門通過性などの問題がある。既知化合物の修飾、新しい化合物の創製の両面からの検討が必要であろう。

6. おわりに

神経栄養因子の生理活性を利用して神経疾患を治療しようという試みは緒についたばかりである。因子の大量生産の困難さ、脳室投与のリスクなどを考えると、低分子化合物の末梢投与によって神経栄養因子を合成誘導する方法は神経細胞死を伴う神経疾患の治療法、予防法として最も現実に即応しているといえる。ここしばらくは神経栄養因子そのものの投与によって治療効果を確認することが世界的な研究の趨勢であろうが、その後は合成誘導物質の開発に研究主体が移ってゆくと思われる。アルツハイマー型痴呆症をはじめ、これらの疾患の多くは原因不明の難病である。このアプローチが少なからぬ成果をおさめ、病気に苦しむ多くの人々に福音となることを期待したい。

引用文献

- 1) 林 恭三, 古川昭栄, 日本組織培養学会編「細胞成長因子」朝倉書店, pp. 8-20 (1984).
- 2) 林 恭三, 古川美子, 古川昭栄, 日本組織培養学会編「細胞成長因子 part II」朝倉書店, pp. 5-10 (1987).
- 3) J. Scott, M. Selby, M. Urdea, M. Quiroga, G.I. Bell and W.J. Rutter, *Nature*, **302**, 538-540 (1983).
- 4) A. Ullrich, A. Gray, C. Berman and T.J. Dull, *Nature*, **303**, 821-825 (1983).
- 5) R. Meier, M. Becker-Andre, R. Gotz, R. Neunamt, A. Shaw and H. Thoenen, *EMBO J.*, **5**, 1489-1493 (1986).
- 6) D. Wion, C. Perret, N. Frechin, A. Keller, G. Behar and P. Brachet, *FEBS Lett.*, **14**, 82-86 (1986).
- 7) T. Ebendal, D. Larhammar and H. Persson, *EMBO J.*, **5**, 1483-1487 (1986).
- 8) M.J. Selby, R.H. Edwards and W.J. Rutter, *J. Neurosci. Res.*, **18**, 293-298 (1987).
- 9) T. Oda, M. Ohta, S. Inoue, K. Ikeda, S. Furukawa and K. Hayashi, *Biochem. Inter.*, **19**, 909-919 (1989).
- 10) C.F. Ibanez, F. Hallbook, T. Ebendal and H. Persson, *EMBO J.*, **9**, 1477-1483 (1990).
- 11) M.J. Selby, R. Edwards, F. Sharp and W.J. Rutter, *Mol. Cellul. Biol.*, **7**, 3057-3064 (1987).
- 12) J. Leibrock, F. Lottspeich, A. Hohn, M. Hofer, B. Hengerer, P. Masiakowski, H. Thoenen and Y.-A. Barde, *Nature*, **341**, 149-152 (1989).
- 13) P.C. Maisonpierre, L. Belluscio, S. Squinto, N.Y. Ip, M.E. Furth, R.M. Lindsay and G.D. Yancopoulos, *Science*, **247**, 1446-1451 (1990).
- 14) A. Hohn, J. Leibrock, K. Bailey, and Y.-A. Barde, *Nature*, **344**, 339-341 (1990).

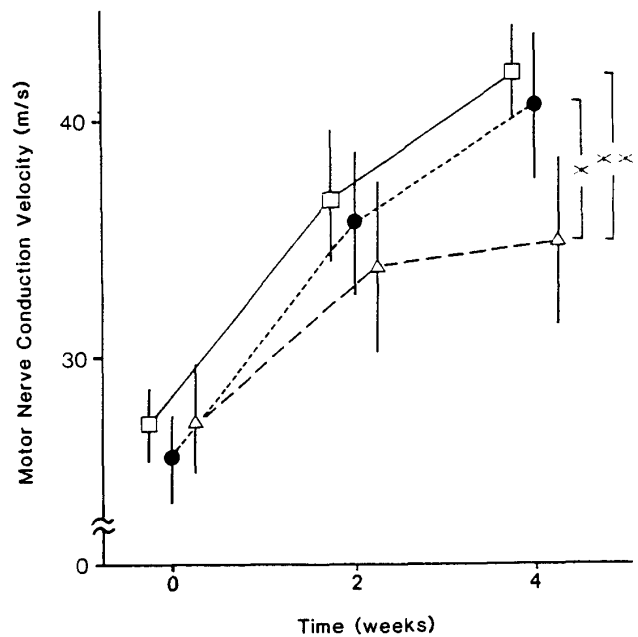


Fig. 8 Effect of 4-methylcatechol of motor nerve conduction velocity in the sciatic nerve⁷⁰. Symbols: ●, 4-methylcatechol-administered diabetic rats (n=11); △, untreated diabetic rats (n=9); □, control rats (n=7). Significance: *, P<0.01; **, P<0.05.

- 15) Y. Kaisho, K. Yoshimura and K. Nakahama, *FEBS Lett*, **266**, 187-191 (1990).
- 16) F. Hallbook, C.F. Ibanez and H. Persson, *Neuron*, **6**, 845-858 (1991).
- 17) L.R. Berkemeier, J.W. Winslow, D.R. Kaplan, K. Nicholies, D.V. Goeddel and A. Rosenthal, *Neuron*, **7**, 857-866 (1991).
- 18) N.Q. McDonald, R. Lapatto, J. Murray-Rust, J. Gunning, A. Wlodawer and T.L. Blundell, *Nature*, **354**, 411-414 (1991).
- 19) S. Korsching, G. Auburger, J. Scott and H. Thoenen, *EMBO J.*, **4**, 1389-1393 (1985).
- 20) H. Thoenen, C. Bandtlow and R. Heumann, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **109**, 46-177 (1987).
- 21) S. Cohen-Cory, C.F. Dreyfus and I.B. Black, *J. Neurosci.*, **112**, 462-471 (1991).
- 22) C. Kalcheim, Y.-A. Barde, H. Thoenen and N.M. Le Douarin, *EMBO J.*, **6**, 2871-2873 (1987).
- 23) M.M. Hoffer and Y.-A. Barde, *Nature*, **331**, 261-262 (1988).
- 24) R.F. Alderson, A.L. Alterman, Y.-A. Barde and R.M. Lindsay, *Neuron*, **5**, 297-306 (1990).
- 25) B. Kunsel, J.W. Winslow, A. Rosenthal, L. Burton, D.P. Seid, K. Nikolics and F. Hefti, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 961-965 (1991).
- 26) C. Hyman, M. Hofer, Y.-A. Barde, M. Juhasz, G.D. Yancopoulos, S.P. Squinto and R.M. Lindsay, *Nature*, **350**, 230-232 (1991).
- 27) R.M. Lindsay, H. Thoenen and Y.-A. Barde, *Dev. Biol.*, **112**, 319-328 (1985).
- 28) P. Ernfors, C.F. Ibanez, T. Ebendal, L. Olson and H. Persson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 5454-5458 (1990).
- 29) A. Rosenthal, D.V. Goeddel, T. Nguyen, M. Lewis, A. Shin, G.R. Laramée, K. Nikolics, J.W. Winslow, *Neuron*, **4**, 767-773 (1990).
- 30) G.V. Abramchik, V.N. Yermakova and R.M. Kaliunov, *J. Neurosci. Res.*, **19**, 349-356 (1988).
- 31) M.D. Boyle, M.J.P. Lawman and A.P. Gee, *J. Immunol.*, **134**, 564-568 (1985).
- 32) H. Matsuda, M.D. Coughlin and J. Bienemstoch, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 6508-6512 (1988).
- 33) L.W. Thorpe and J.R. Perez-Polo, *J. Neurosci. Res.*, **18**, 134-139 (1987).
- 34) M.J. Radeke, T.P. Misko, C. Hsu, L.A. Herzenberg and E.M. Shooter, *Nature*, **325**, 593-597 (1987).
- 35) T.H. Large, G. Weskamp, J.C. Helder, M.J. Radeke, T.P. Misko, and E.M. Shooter, *Neuron*, **2**, 1123-1134 (1989).
- 36) D. Johnson, A. Lanahan, C.R. Buck, A. Sehgal, C. Morgan, E. Mercer, M. Bothwell and M. Chao, *Cell*, **47**, 545-554 (1986).
- 37) C. Ragsdale and J. Woodgett, *Nature*, **350**, 660-661 (1991).
- 38) H. Thoenen, *TINS*, **14**, 165-170 (1991).
- 39) D. Martin-Zanca, O.R. Mitta, G. Copeland and T. Barbacid, *Mol. Cell Biol.*, **9**, 24-33 (1989).
- 40) D. Soppet, E. Escandon, J. Maragos, D.S. Middlemas, S.W. Reid, J. Blair, L.E. Burton, B.R. Stanton, D.R. Kaplan, T. Hunter, K. Nikolies, L.F. Parada, *Cell*, **65**, 895-903 (1991).
- 41) R. Klein, V. Nanduri, S. Jing, F. Lamballe, P. Tapley, S. Bryant, C. Cardon-Cardo, K.R. Jones, L.F. Reichardt and M. Barbacid, *Cell*, **66**, 395-403 (1991).

- 42) F. Lamballe, R. Klein and M. Barbacid, *Cell*, **66**, 967-979 (1991).
- 43) S.P. Squinto, T.N. Stitt, T.H. Aldrich, S. Davis, S.M. Bianco, C. Radziejewski, D.M. Glass, P. Masiakowski, M.E. Furth, D.M. Valenezuela, P.S. Distefano and G.D. Yancopoulos, *Cell*, **65**, 885-893 (1991).
- 44) P.J. Whitehouse, D.L. Proce, R.G. Struble, A.W. Clark, J.T. Coyle and M.R. De Long, *Science*, **215**, 1237-1239 (1982).
- 45) M. Goedert, A. Fine, S.P. Hunt and U. Ulleich, *Mol. Brain Res.*, **1**, 85-92 (1986).
- 46) M. Goedert, D. Fine, D., D. Dawbarn, G.K. Wilcock and M.V. Chao, *Mol. Brain Res.*, **5**, 1-7 (1989).
- 47) F. Hefti and B. Knusel, *Neurobiol. Aging*, **9**, 689-690 (1988).
- 48) W. Fisher, K. Wictorin, A. Bjotklund, L.R. Williams, S. Varon, F.H. Gage, *Nature*, **329**, 65-68 (1987).
- 49) M.H. Tuszynski, H.S.U., D.G. Amaral and F.H. Gage, *J. Neurosci.*, **10**, 3604-361 (1990).
- 50) C.H. Phelps, F.H. Gage, J.H. Growdon, F. Hefti, R. Harbauch, M.V. Johnston, Z.S. Khachaturian, W.C. Mobley, D.L. Price, M. Raskind, J. Simpkins, L.J. Thal, J. Woodcock, *Neurobiol. Aging*, **10**, 205-207(1989).
- 51) L. Olson, Second international conference on nerve growth factor and related molecules. *Oral presentation* (1991).
- 52) C. Bandtlow, R. Heumann, M.E. Schwab and H. Thoenen, *EMBO J.*, **6**, 891-899 (1987).
- 53) Y. Furukawa, S. Furukawa, E. Satoyoshi and K. Hayashi, *J. Biol. Chem.*, **259**, 1259-1264 (1984).
- 54) C. Ayer-LeLievre, L. Olson, T. Ebendal, A. Seiger and H. Persson, *Science*, **240**, 1339-1341 (1988).
- 55) C.M. Gall and P.J. Isackson, *Science*, **245**, 758-761 (1989).
- 56) F. Zafra, B. Hengerer, J. Leibrock, H. Thoenen and D. Lindholm, *EMBO J.*, **9**, 3545-3550 (1990).
- 57) S. Furukawa, Y. Furukawa, E. Satoyoshi and K. Hayashi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **142**, 395-402 (1987).
- 58) B. Lu, M. Yokoyama, C.F. Dreyfus and I.B. Black, *J. Neurosci.*, **11**, 318-326 (1991).
- 59) S. Furukawa, Y. Furukawa, E. Satoyoshi and K. Hayashi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **147**, 1048-1054 (1987).
- 60) Y. Furukawa, S. Furukawa, E. Satoyoshi and K. Hayashi, *J. Biol. Chem.*, **261**, 6039-6047 (1986).
- 61) Y. Furukawa, S. Furukawa, E. Satoyoshi and K. Hayashi, *FEBS lett.*, **208**, 258-262 (1986).
- 62) Y. Furukawa, S. Furukawa, E. Satoyoshi and K. Hayashi, *FEBS Lett.*, **247**, 463-467 (1989).
- 63) Y. Furukawa, N. Fukazawa, Y. Miyama, K. Hayashi and S. Furukawa, *Biochem. Pharmacol.*, **40**, 2337-2342 (1990).
- 64) R. Ikegami, Y. Furukawa, K. Kaechi, K. Hayashi and S. Furukawa, *Biomed. Res.*, **11**, 61-65 (1990).
- 65) I. Shinoda, Y. Furukawa and S. Furukawa, *Biochem. Pharmacol.*, **39**, 1813-1816 (1990).
- 66) R. Takeuchi, K. Murase, Y. Furukawa, S. Furukawa and K. Hayashi, *FEBS Lett.*, **261**, 63-66 (1990).
- 67) 古川昭栄, 化学と工業, **42**, 1362-1364 (1989).
- 68) S. Furukawa and Y. Furukawa, *Cerebrovasc. Brain Metabol. Rev.*, **2**, 328-344 (1990).
- 69) 古川昭栄, 替地恭介, 池上亮介, 古川美子, 厚生省精神・神経疾患委託研究, 宮武班, 平成2年度報告書.
- 70) Y. Hanaoka, T. Ohi, S. Furukawa, Y. Furukawa, K. Hayashi and S. Matsukura, *Exp. Neurol.*, **115**, 292-296 (1992).