

## 脊髄運動ニューロンの発生と細胞死：その標的との関連

佐藤 昇・柴田 昌弘・安戸 方邦・伊藤健二郎

新潟大学大学院医歯学総合研究科

肉眼解剖学分野

### Development and Programmed Cell Death of Spinal Motoneurons: What the Target Tells Us ?

Noboru SATO, Masahiro SHIBATA, Masakuni YASUDO and Kenjiro ITO

*Division of Gross Anatomy and Morphogenesis, Niigata University*

*Graduate School of Medical and Dental Sciences*

#### 要 旨

外胚葉から分化した神経管において、中心管近傍の神経上皮細胞から分化した運動ニューロンは前角へと移動しつつ、標的に向かって軸索を伸長する。標的と接触した後、約半数の運動ニューロンは「プログラムされた細胞死」を起こして死ぬ。この過程は、ニューロンがその標的である筋線維からのシグナルによってコントロールされる標的由来因子依存性の生存あるいは死である。さらにアセチルコリン受容体の競合的阻害剤であるクラールレ (d-tubocurarine) の投与によってこの時期の神経筋活動を抑制すると、この細胞死は完全に抑制され、筋内の神経分枝が発達し、シナプス (神経筋接合部) が増加する。従って、脊髄運動ニューロンの形態形成を考える上で、その標的である筋の形態形成を無視することはできない。すなわち運動ニューロンとその標的である筋は一体として理解することが重要である。

キーワード：運動ニューロン, 骨格筋, 神経筋接合部, 発生

#### はじめに

発生過程において、最終分裂が終了した運動ニ

ューロンはその軸索を特異的且つ正確に標的 (骨格筋) に向かって伸長する。標的との初期接触の後、運動ニューロンの約半数は「プログラムされ

Reprint requests to: Noboru SATO  
Division of Gross Anatomy and  
Morphogenesis Niigata University  
Graduate School of Medical and Dental Sciences  
1-757 Asahimachi - dori Chuo - ku,  
Niigata 951 - 8510 Japan

別刷請求先：〒951-8510 新潟市中央区旭町通 1-757  
新潟大学大学院医歯学総合研究科肉眼解剖学分野  
佐藤 昇

た細胞死」によって失われることが古くから知られている<sup>1)</sup>。この細胞死は標的由来の栄養因子に依存することから「標的依存性細胞死」とも呼ばれる<sup>1)2)</sup>。一方、骨格筋の基になる筋芽細胞は、沿軸中胚葉から起こった後、融合して筋管を形成し、体肢において原始的な筋塊を形成する。この筋塊はさらに発生とともに個別の筋へと分化する。この過程において、前述のように体肢の骨格筋は脊髄の運動ニューロンからの初期接触・入力を受けるが、その詳細については未だに明らかでない点が多い。本稿では、運動ニューロンの発生とその過程で起こる細胞死について、筋の形態形成との関連に焦点を当てて、その歴史的な背景に加え我々の最近の研究の方向性を交えて考察してみたい。

### 運動ニューロンの発生における 標的(筋)の役割

運動ニューロンの発生にその標的が重要な役割を果たしていることを最初に示したのは発生生物学者の Victor Hamburger である。Hamburger は

1934年に発育鶏胚を用いた上肢芽(将来の羽になる部分)除去の実験で、その投射ニューロン(DRGニューロンと運動ニューロン)の減少を報告した<sup>3)</sup>。これはニューロンの標的がそのニューロンの発生に重要であることを示した初めての報告であり、その後この発見は Rita Levi-Montalcini の神経栄養因子(NGF)の発見(1986年ノーベル生理・医学賞)へとつながって行く。またこれらの発見からニューロンが発生過程において一部脱落することが明らかになった(神経系における「プログラムされた細胞死」の発見)。

Hamburger の最初の発見からおよそ半世紀を経て、Hamburger の弟子である Oppenheim と彼のポストドクであった Pittman は、ニコチン型アセチルコリン受容体の競合的阻害剤であるクラレ(d-tubocurarine)の投与によって神経筋活動を抑制すると、この発生過程で起こる運動ニューロン死が抑制されることを発見した<sup>4)</sup>。すなわち標的である筋と運動ニューロンとの間のアセチルコリンを介した神経筋活動が、運動ニューロンの発生に重要であることが示されたのである。

これらの発見は運動ニューロンの発生にその軸

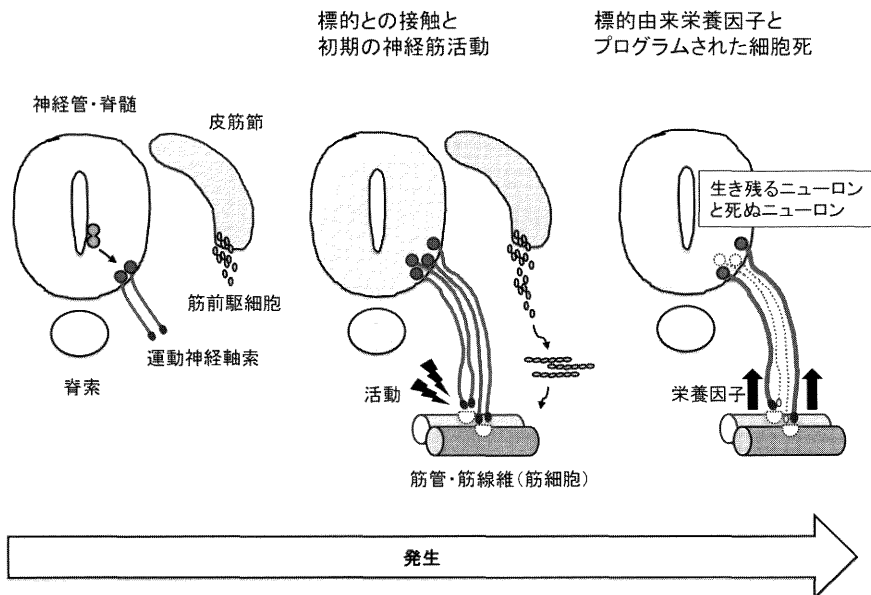


図1 運動ニューロンと筋の発生の概略

索がシナプスを形成する相手である筋が重要であることを意味しており、以後現在に至るまで運動ニューロンが標的である筋とどのように末梢神経回路を形成するのかが発生生物学における重要な問題の一つとなっている。

### 運動ニューロンはどのように標的へ コンタクトしていくのか？

骨格筋の発生は細胞レベルで見ると、体節から由来する多分化幹細胞が筋芽細胞となり、移動して鎖状に配列し、細胞が癒合して筋管を形成し、やがて成熟した筋繊維となる<sup>5)</sup>。そして運動ニューロン軸索先端（成長円錐）が初期の筋管とひとたび近接・接触すると、アセチルコリンレセプターを誘導し、シナプス伝達は脆弱であるが速やかに起こる<sup>6)</sup>。

それでは運動ニューロンはその軸索をどのように標的である筋へ投射するのであろうか。神経管から出た体肢を支配する運動ニューロンの軸索は、発生の初期に体肢芽に侵入する。その時期の体肢芽内には後の体肢筋となる筋原基は存在するものの、まだ個別の筋に分化しておらず、腹側及び背側の筋塊として認められる<sup>7)</sup>。体肢芽に侵入した運動ニューロンの軸索はこの筋塊中で既に、個別の筋に分離した時と同様の形態（投射パターン）をとることが知られている<sup>8)</sup>。また電気生理学的な解析によっても、個別の筋に分離した成熟時と、未だに未成熟な筋塊として分離・分化の途中とで比較した場合、相同な結果となることが示されている<sup>9)</sup>。これら体肢における腹側及び背側に出現する未熟な筋塊と運動ニューロンの投射パターンの形成については、我々が最近になって確認したところ、従来指摘されていたより早期から確立していることが予想された。これらのことから運動ニューロンの標的（筋）への投射パターンは筋の分化・成熟より大分早い時期に既に決定されていることが窺われる。

### 標的にコンタクトした運動ニューロンの運命： Neurotrophic theory

下肢を支配する運動ニューロンは腰仙骨レベルの脊髄前角から起こり、発育鶏胚においては孵卵開始6日目～10日目に「プログラムされた細胞死」が認められる。前述のHamburgerによる標的運動ニューロン発生における重要性が示された結果、この分野の研究が進み、標的由来の神経栄養因子が運動ニューロンの生存に重要であることが明らかになった。標的となる組織を余分に移植すると、運動ニューロンの「細胞死」は減り、逆に標的を部分的に除去すると通常より「細胞死」が増えることなども明らかになり、運動ニューロンの生存と死は標的由来の神経栄養因子のボリュームによって制御されていると考えられている（neurotrophic theory：神経栄養仮説<sup>2)</sup>）。

発育鶏胚で運動ニューロンの「プログラムされた細胞死」が起こるE6～E10は、ちょうど胚が動き始める時期に一致している。すなわち、筋と運動ニューロンのコンタクトが起こり、未熟ではあるが神経筋活動が起こり始める時期である。当時は「プログラム細胞死」によって死ぬ運動ニューロンは、誤った標的にコンタクトしたニューロンではないかと一部では考えられた。間違った標的に向かったニューロンが細胞死を起こして死ぬというストーリーは、なかなか魅力的であったが、「プログラムされた細胞死」の前後で運動ニューロンの投射パターンに変化がないことが示され、この仮説は否定された<sup>8)10)</sup>。

前述したように運動ニューロンの投射パターンは、標的である筋の最終分化より大分以前に決定されており、その投射パターンは「プログラムされた細胞死」の前後で変化が認められない。従って全ての運動ニューロンはいったん本来の正しい標的にコンタクトすると考えられる。その上で、標的からの限られた量の栄養因子を、その標的にコンタクトしている運動ニューロンが競合的に奪い合う結果、生き残るニューロンと「プログラムされた細胞死」によって除去されるニューロンに分かれると考えられている<sup>2)</sup>。

### 初期の神経筋活動の意味するところ

運動ニューロンと筋の初期のコンタクトによって、未熟で微弱であるが神経筋活動が観察される。それは結果として、胚の動きとして観察することができる。この神経筋活動をニコチン型アセチルコリンレセプターの競合的阻害剤であるクラレの投与によって抑制すると、驚くべきことに「プログラムされた細胞死」によって死ぬ運動ニューロンはなくなり、ほぼすべての運動ニューロンは生き残る<sup>4)</sup>。さらにこの時、運動ニューロンの筋内での分枝は発達し、神経筋接合部(NMJ)が著しく増加する<sup>11)12)</sup>。

この現象の発見以来、多くの発生生物学者がそのメカニズムを明らかにしようと挑戦してきたが、未だに詳細は明らかになっていない。しかしながら、ニコチン型アセチルコリンレセプターは骨格筋に存在するタイプと神経に存在するタイプがあり、クラレがそのどちらに作用しているかについては議論があったが、骨格筋のアセチルコリンレセプターに効いているらしいことがはっきりしてきた<sup>11)13)</sup>。問題は骨格筋のアセチルコリンレセプターを阻害することで、なぜ運動ニューロンの「プログラムされた細胞死」が抑制され、筋内での神経分枝が発達し、NMJが増加するのからである。またこれらの現象の相互関係も興味を持たれるところである。

いずれにしろ標的である筋とそれを支配する運動ニューロンとの活動が、運動ニューロンの発生と細胞死に大きな影響を与えることは間違いなく、標的は neurotrophic theory の主役としての役割だけではなく、別の役割も合わせて演じている可能性がある。

### 今後の展望

Humburger による発見から大きく進展してきたニューロンの発生研究であるが、未だに明らかになっていない重要な疑問がいくつかある。

まず、最も支持されている「neurotrophic theory」であるが、やはりいくつかの解決すべき問題

がある。現在の仮説は、運動ニューロンはほぼ等しく標的とコンタクトし、その標的から供給される栄養因子の受容の優劣によってニューロンの生死が決まると考えられている。ある特定の筋とそこに投射する運動ニューロンの集団(核)を想定すれば、この仮説は良くマッチしている。しかしながらその中の個別のニューロンの立場に立った場合、それが生き残るのか死ぬのかは全く偶然なのであろうか。あるいはこれらのニューロンは本当に等しいものであるのか。我々の Bcl-2 遺伝子ファミリーを用いた発現実験からは、個々のニューロンで細胞死シグナルに関して感受性が異なることが示唆されている<sup>14)</sup>。従って個々のニューロンは同じ標的に投射するものでも等価でない可能性がある。

今までの知見から示されるように、ほとんどの運動ニューロンが一旦は正しい標的に投射回路を形成することは間違いないと思われる。しかしながらすべての運動ニューロンについて正しい標的に投射した際に、NMJを形成するか否か、あるいはどのような初期の接触があるか、についての詳細も今後明らかにされるべき疑問の一つである。我々の最近の研究結果からは、NMJは筋管の成熟にしたがって次第に明瞭に認められ、一度できたNMJの一部が失われる所見は認められなかった。従って細胞死を起こすニューロンは初期の標的との接触が、生き残るニューロンのそれと異なっている可能性がある。

そして、神経筋活動についてもNMJ形成の問題とも相まって、さらに検討されるべき点がある。特に同じ標的に投射するニューロンが、全て同様な活動を行っているのかは、神経筋活動と細胞の生死の関連を考察する上でも解決されるべき問題である。

これらの問題にアプローチするために、我々は現在、特定の筋とその投射ニューロンに限局して解析する系を準備している。そして近い将来、同じ標的に投射する個別の運動ニューロンの形態形成に関する知見を得ることを期待している。

本稿で触れた我々の研究の一部については、科

学研究費補助金、新潟大学プロジェクト研究経費、新潟大学医学研究助成金（有壬基金）の助成を受けて行っている。尚、本稿の要旨は第 651 回新潟医学会にて報告した。

## 文 献

- 1) Oppenheim RW: Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 14: 453 - 501, 1991.
  - 2) Oppenheim RW: The neurotrophic theory and naturally occurring motoneuron death. *Trends Neurosci* 12: 252 - 255, 1989.
  - 3) Hamburger V: The effects of wing bud extirpation on the development of the central nervous system in chick embryos. *J Exp Zool* 68: 449 - 494, 1934.
  - 4) Pittman RH and Oppenheim RW: Neuromuscular blockade increases motoneurone survival during normal cell death in the chick embryo. *Nature* 271: 364 - 366, 1978.
  - 5) Biressi S, Molinaro M and Cossu G: Cellular heterogeneity during vertebrate skeletal muscle development. *Dev Biol* 308: 281 - 293, 2007.
  - 6) Sanes J R and Lichtman J W: Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu. Rev. Neurosci* 22: 389 - 442, 1999.
  - 7) Schramm C and Solursh M: The formation of pre-muscle masses during chick wing bud development. *Anat Embryol (Berl)* 182: 235 - 247, 1990.
  - 8) Landmesser L: The development of motor projection patterns in the chick hind limb. *J Physiol* 284: 391 - 414, 1978.
  - 9) Landmesser L and Morris DG: The development of functional innervation in the hind limb of the chick embryo. *J Physiol* 249: 301 - 326, 1975.
  - 10) Oppenheim RW: Cell death of motoneurons in the chick embryo spinal cord V. Evidence on the Role of Cell Death and Neuromuscular Function in the Formation of Specific Peripheral Connections. *The Journal of Neuroscience* 1: 141 - 151, 1981.
  - 11) Oppenheim RW, Prevet D, D'Costa A, Wang S, Houenou LJ and McIntosh JM: Reduction of neuromuscular activity is required for the rescue of motoneurons from naturally occurring cell death by nicotinic - blocking agents. *J Neurosci* 20: 6117 - 6124, 2000.
  - 12) Usiak MF and Landmesser LT: Neuromuscular activity blockade induced by muscimol and d - tubocurarine differentially affects the survival of embryonic chick motoneurons. *J Neurosci*. 19: 7925 - 7939, 1999.
  - 13) Oppenheim RW, Calderó J, Cuitat D, Esquerda J, McArdle JJ, Olivera BM, Prevet D and Teichert RW: The rescue of developing avian motoneurons from programmed cell death by a selective inhibitor of the fetal muscle - specific nicotinic acetylcholine receptor. *Dev Neurobiol*. 68: 972 - 980, 2008.
  - 14) Sato N, Sakuma C, Sato Y, Gould TW, Oppenheim RW and Yaginuma H: Distinct susceptibility of developing neurons to death following Bax over-expression in the chicken embryo. *Cell Death Differ* 13: 435 - 445, 2006.
-