

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20500348

研究課題名(和文)

老齢脳における再ミエリン化機構の解明とミエリン再生療法の開発に関する研究

研究課題名(英文) Elucidating the mechanism of CNS remyelination and development of an effective therapeutic approach in age-induced demyelination

研究代表者

阿相 皓晃 (ASOU HIROAKI)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：30104160

研究成果の概要(和文): 生薬チンピが再ミエリン化機構にトリガー分子として関与している免疫グロブリン Fc 受容体と Fyn チロシンキナーゼ活性を増強することを明らかにした。さらにチンピ投与群ではミエリン形成担当細胞の前駆細胞(OPC)の増加・分化も促進されその作用機序には FcR/Fyn-MBP のシグナルカスケードが関与し、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)のリン酸化 21.5kDa のアイソフォームが調節することによって老齢脳の脱髄回復を行っていることが示唆された。

研究成果の概要(英文): We report that chinpi, upregulates the FcR-Fyn-MBP signaling cascade resulting in a potentially therapeutic effect against age-induced demyelination. In addition we observed that phosphorylated (activated) FcR/Fyn upregulated the expression of the 21.5 kDa isoform of myelin basic protein, inducing rapid morphological differentiation, when oligodendrocyte precursor cells (OPCs) were cultured in the presence of hesperidin and narirutin which participate in the FcR-Fyn-MBP signaling pathway in OPCs causing these cells to differentiate into myelinating oligodendrocytes.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：神経科学・脳神経疾患・再生医学

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 老化によるミエリンの減少やミエリン崩壊を理解するためには、何よりもまず正常のミエリン形成機構を解き明かす必要があったが、しかしミエリン形成の分子機構は複雑でこれまでの分子仮説では説明できなかった。ミエリン形成は初期のミエリン新生に始まり、成熟とともに脱髄と再生を繰り返し行うこと

によって動的平衡を保ちながら機能的なミエリンを一生にわたって維持し続けるものと考えられている。ミエリンの仕組みの全容解明のためにはこれらの3つのステップをセットとして解明することは不可欠であることから、これらをセットとしたミエリン形成の分子機構の解明に取り組み、ミエリン形成に関与するトリガー分子がFcR /Fynであることを明らかにし、新たなミエリン形成の分子メカニ

ズムとしてFcR /Fyn/CD45-MBPのシグナルカスケードモデルを提唱した。(Nakahara et al., Dev. Cell. 4:841-852, 2003)さらにこれらのトリガー分子は、下流で分子スイッチとして働くRhoGTPase (Cdc42/Rac1)の活性化に関与し、そのエフェクター分子MAPキナーゼの活性化を調節し標的タンパクであるMBPをリン酸化することによって機能的に安定したミエリン膜を維持していることが明らかになった。(Seiwa et al., JNR 85:954-966, 2007)

(2) ミエリン形成の分子機構に関するトリガー分子(FcR /Fyn)は老齢脳での脱髄時に著しく減少することから、これらの分子をターゲットとするミエリン再生療法の研究を押し進め、生薬から抽出した配糖体(ヘスペリジン、ナリルチン)を投与すると、トリガー分子を増加させ、老齢脳での脱髄が回復することが判明した。

そしてこれらの脱髄回復薬の薬効メカニズムの解明が脳老化のメカニズムの解明にも寄与するのではないかと考えて、本研究の着想にいたった。

## 2. 研究の目的

脳の発達に伴うミエリン形成はミエリンの新生に始まり、成熟脳では脱髄と再ミエリン化の繰り返しが行われることによって機能的なミエリンを一生にわたって維持し続けていると考えられる。このようなミエリンの新生・脱髄・再生の分子機構には謎が多く、ミエリンの仕組みの全容解明のためにこれらの3つのステップがセットとして解き明かすことが不可欠である。我々はこれまでにミエリン形成の分子機構に関するトリガー分子が免疫グロブリンFc受容体(FcR)とFynチロシンキナーゼ(Fyn)であることを明らかにし、初期のミエリン形成(新生)の仕組みを解明した。一方、老齢脳で起こる脱髄はオリゴデンドロサイト前駆細胞(OPC)の数の減少に起因すると考えられてきたが、これまでの研究成果より老齢脳にもFcR /Fyn陽性OPCが存在していることが判明したが、なぜ再ミエリン化が出来るのかについては依然として謎のままだった。ところが生薬より抽出した配糖体(ヘスペリジン、ナリルチン)を老齢動物に投与すると脱髄が回復するという画期的なことが明らかになったことから、本研究課題では老齢脳でのミエリン化機構異常のメカニズムを解明し、生薬に含まれる配糖体の再ミエリン化の薬効機序の解明とミエリン再生療法を開発することによって脳老化機構の解明と老化予防法の確立を目指すことを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) ミエリン形成機構の関与するトリガー分子Fc受容体の脳内生理的リガンドを明らかにするために、ミエリン形成担当細胞の前駆細胞(OPC)を新たに確立した方法を用いて、マウス脳より単離・採取し、IgGと抗原によるクロスリンクングによって、OPCがミエリン形成細胞担当細胞(オリゴデンドロサイト)へと分化・成熟するかどうかを調べ、引き続きニューロンとの共培養で軸索に巻き付くことができるかどうかをIn Vitroで調べる。この時にIgGとクロスリンクングに用いる抗原として21.5kDaを用いる。正常IgGがミエリン膜と結合することが知られていることに加えて、ミエリン膜タンパクの中でMBP(リン酸化フォーム/脱リン酸化フォーム)が脳の可溶化分画内に唯一抽出されることや脱髄脳で21.5kDaが抗原となり、MBPの抗体を産生することから考えた。

(2) ミエリン形成に関するトリガー分子Fc受容体とFynを欠損したマウス脳より、OPCを採取しての野生型マウスOPCで分化誘導をかけた時と同じ方法で、IgGとクロスリンクングクロスリンクングした場合に、分化・成熟してミエリン膜を形成するか否かを調べる。さらに、先天的にMBPを欠損したマウス(shi/shi)よりOPCを分離・採取してIgGと抗原でクロスリンクングした時にMBP欠損ミュータントマウスのOPCも分化誘導されるかどうか、そしてニューロンとの共生誘導でミエリン膜を形成できるかどうかをリアルタイムでの可視解析法を用いて調べる。

(3) 成熟脳でのミエリン形成は、脱髄と再ミエリン化を繰り返しながら機能的なミエリンを維持していくことから、この機構を検討するための実験動物作製に取りかかる。まず脱髄モデルマウスを0.2%カプリゾン混入餌で5週間飼育して作製した後、さらに正常食に戻して2週間飼育して、再ミエリン化マウスを作製する。このようなモデル動物の脳よりオリゴデンドロサイトの形質膜からなるミエリン膜を採取して、正常・脱髄・再生時のそれぞれのケースでミエリン膜形成機構に関するトリガー分子FcR/Fyn、さらに下流の分子スイッチ機能を持つ

Rho/GTPase(cdc42/Rac)とその活性制御タンパク質群; グアニンヌクレオチド交換促進因子(GEF)、グアニンヌクレオチド交換反応抑制因子(GOI)、グアニンヌクレオチド交換反応抑制因子(GOI)、GTPase活性促進因子(GAP)やMAPキナーゼ、さらに最終標的分子となるMBPの発現フォームの変化を抗体を用いてタンパクレベルで調べる。

(4) 0.2%カプリゾン混入餌で5週間飼育時に同時に生薬から抽出した配糖体の(ヘスペリジン、ナリルチン)を投与することによって正常食に戻すことなく脱髄が回復されるような動物を作製することができたこと

から、このモデルマウスでも正常食に戻した時に再生が認められるように、同じ FcR/Fyn のシグナルカスケードを出発としてその下流の Rho/GTPase(cdc42/Rac1)、さらに MAP キナーゼと MBP のリン酸化/脱リン酸化が脱髄の再生シグナルとなるのかについて実験を行う。

Rho/GTPase(cdc42/Rac1)の活性制御機構を明らかにするために、cdc42/Rac1 の特異的活性制御タンパク質 (GAP, GEFi および GDI) の脱髄・再生脳より採取したミエリン膜での発現がどのように変動しているかについて、まず野生型マウスとトリガー分子を欠損したミュータントマウスで調べる。

脱髄・再ミエリン化機構のスイッチ「オン」「オフ」の切り替えには、cdc42/Rac1 の GTP 結合型 (活性型) と GDP 結合型 (不活性型) の発現形態が、下流のエフェクターである MAP キナーゼを介した最終標的タンパク (MBP) のリン酸化/脱リン酸化を制御することになるので、cdc42/Rac1 のエフェクタータンパク質のアフィニティービーズを利用したアフィニティー沈降法 (pull-down assay) を用いて、その活性化度を調べる。同様の実験を、トリガー分子を欠損したミュータントマウス脳を用いても行ってその成果を踏まえて、老齢脳での再ミエリン化機構の分子機構の解明の分子基盤を考察する。

(5) 老齢マウス脳の脱髄回復薬として今回発見された配糖体(ヘスベリジン、ナリルチン)が、脱髄を回復してミエリン再生化への新しい化学療法の開発へつながらどうかを検討するために、老化によって脳の生理的機能が減退し痴呆症状を示した痴呆犬などを用いて薬効効果があるか否かを検討する。

#### 4. 研究成果

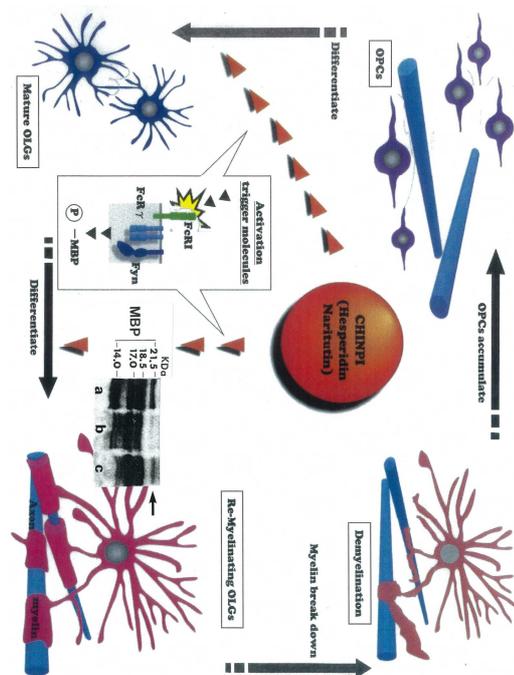
(1) 老齢脳におけるミエリン形成機構の解明とミエリン再生療法の開発について研究を進めた。老齢脳では若齢脳に比べ再ミエリン化が起こりにくく、その原因の一つとしてミエリン形成担当細胞の前駆細胞 (OPC) の数の減少によるものであると考えられてきたが、今回の研究の結果から老齢脳でも OPC が存在していることが明らかになった。

(2) これまで私たちは若齢脳での OPC の増殖・分化機構に免疫グロブリン Fc 受容体と Fyn チロシンキナーゼがトリガー分子として関与していることを明らかにしたが、老齢脳での OPC の増殖・分化にも FcR/Fyn がトリガー分子として関与していることがわかったので、これらの分子をターゲットとするミエリン再生療法の開発に取り組み、漢方薬・人參養榮湯の構成成分の生薬・チンピに OPC の増殖・分化作用のあることを発見した。

(3) さらにその薬効作用機序の解明を行うために FcR/Fyn を欠損したミュータントマウスや老齢マウスあるいはカプリゾン投与による脱髄モデルマウスにチンピを投与して OPC の動態と脱髄回復効果について免疫組織化学的・生化学的手法を駆使して調べたところ、チンピ投与群で明らかに OPC の増殖・分化が促進され脱髄回復効果もあることが明らかになり、その作用機序は FcR/Fyn-G protein MAPK-MBP のシグナル伝達系が関与しミエリン構成タンパク質のリン酸化 MBP の 21.5kDa と 17kDa のアイソフォームが必須であることが判明した。

(4) 本研究課題の結論として FcR/Fyn を欠損したマウスでは脱髄回復効果が認められなかったことから、チンピによるミエリン再生機序はミエリン形成分子機構の FcR/Fyn-small G protein MAPK-MBP シグナルカスケードの調節/制御によって行われることが強く示唆された(図1)。

図1



#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

Hypothermia-induced increase of oligodendrocyte precursor cells: Possible involvement of plasmalemmal voltage-dependent anion channel 1. Imada S, Yamamoto M, Seiwa C, Watanabe K, Kamei Y, Kozuma S,

Taketani Y, Asou H. J Neurosci Res. 2010, Dec;88(16):3457-66 査読あり  
Caspase-9 activation revealed by semaphoring 7A cleavage is independent of apoptosis in the aged olfactory bulb. Ohsawa S, Hamada S, Asou H, Kuida K, Uchiyama Y, Yoshida H, Miura M. J Neurosci. 2009 Sep 9;29(36):11385-92 査読あり  
A new monoclonal antibody A3B10, specific for astrocyte-lineage cells recognizes calmodulin-regulated spectrin-associated protein 1 (Camsap 1). Yamoto M, Yoshimura K, Kitada K, Nakahara J, Seiwa C, Ueki T, Shimoda Y, Ishige A, Watanabe K, Asou H. J Neuro Sci Res. 2009 Feb;87(2):502-1 査読あり

〔学会発表〕(計4件)

陳皮の有効成分による老齡脳での脱髓回復効果について Rui Zhan、清和千佳、渡辺賢治、阿相皓晃 第53回日本神経化学会大会、平成22年9月3日、神戸国際会議場

カプリゾン脱髓モデルマウスにおける陳皮の脱髓回復効果に関する研究 味澤佑美、渡辺賢治、阿相皓晃 第53回日本神経化学会大会、平成22年9月3日、神戸国際会議場

発達段階による MBP isoform の分布や特性の違い 漆瀬道洋、築地謙治、佐藤菜名子、佐藤友里恵、石毛敦、阿相皓晃、深井文雄、渡辺賢治 第51回日本神経化学会大会、平成20年9月12日、富山国際会議場

オリゴデンドロサイトの成熟に伴う MBP の局在の変化 佐藤菜名子、清和千佳、築地謙治、漆瀬道洋、佐藤友里恵、品川理佳、下田泰治、阿相皓晃、渡辺賢治 第51回日本神経化学会大会、平成20年9月12日、富山国際会議場

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿相皓晃 (ASOU HIROAKI)  
慶應義塾大学・医学部・教授  
研究者番号：30104160

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし