

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22300123

研究課題名（和文） 感覚神経のミエリン発生と脱ミエリン現象を司る新規分子基盤の解明

研究課題名（英文） Elucidation of a molecular mechanism controlling myelination in normal and disease states

研究代表者

山内 淳司（YAMAUCHI JUNJI）

（独）国立成育医療研究センター・薬剤治療研究部・室長

研究者番号：20335483

研究成果の概要（和文）：神経軸索の電気伝導効率を増加させ（跳躍電導）、それを保護する役割をもつミエリンの形成に関与するシグナル伝達メカニズムに関しては不明な点が多い。本研究においてはミエリン形成に関与する細胞内シグナル伝達分子をさまざまな手法で探索し、明らかにした。その結果、それを正に制御する分子と負に制御する新規の細胞内シグナル伝達分子を明らかにすることに成功した。また、それらの分子は脱ミエリン現象にも関わっており、ミエリン病態との関連性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The myelin sheath consists of a unique multiple-layer structure that acts as an insulator between neuronal axons to enhance the propagation of the action potential. In the developing peripheral nervous system, myelin sheaths form as Schwann cells wrap individual axons. Yet, little is known about the intracellular signaling mechanisms, as well as those in demyelinating phenomena. Here we identify the signaling through new molecular networks to control myelination or demyelination. These results could provide a new therapeutic target for demyelination and dysmyelination diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2011年度	3,913,000	903,000	4,816,000
2012年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
年度			
年度			
総計	13,413,000	3,753,000	17,166,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：ミエリン形成、脱ミエリン現象、シグナル伝達、キナーゼ、低分子量 GTP 結合蛋白質

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の末梢神経組織は、主に、末梢神経細胞とグリア細胞の一種であるシュワン細胞から成り立ち、中枢神経組織と比べると比較的単純な細胞構成をとっている。この末梢神経の特徴のひとつであるシュワン細胞は、グリア細胞のなかでも、きわめてユニ

クな細胞で、髄鞘（ミエリン）をつくる役割と末梢神経細胞の代謝活動を支える役割を併せもつ。また、ミエリンは、神経軸索の電気伝導効率を増加させる（跳躍電導）ばかりではなく、神経軸索を強く保護する効果（外的刺激に対する耐久性の向上）を有する。このミエリンの形状はきわめて特殊化された

もので、シュワン細胞の細胞膜が分化してできる多重層から構成される。また、ミエリンには跳躍電導に必要なランビエ絞輪などの特殊構造もある。したがって、このようなミエリンの発生は、マウスやラットでも一ヶ月以上を費やし、ヒトに至っては一年以上かかると言われている。また、その間、絶えず、シュワン細胞は末梢神経細胞と相互作用している。

感覚神経は代表的は末梢神経で、例えば、痛覚情報などを中枢神経に伝える重要な役割をしている。応募者らは以前、独自のシュワン細胞-感覚神経細胞共培養系を用いて、感覚神経から特定の神経栄養因子や可溶性ニューレグリンなどの増殖因子が初期のミエリン発生過程で放出され、それらがシュワン細胞膜上の特異的受容体に結合し、シュワン細胞による初期のミエリン形成を制御することを明らかにした。また、活性化された受容体がそれぞれ特異的な既知および新規の低分子量GTP結合蛋白質活性化因子(または交換因子)を直接または間接的に活性化することを見出した。これらの研究は、初めて、ミエリン発生の初期過程の分子メカニズムを明らかにしたものである。しかし、先述したように、ミエリン発生の分子メカニズムには、その形成期間が長期に渡ることやシュワン細胞と神経細胞の細胞間相互作用の複雑さなどが原因で、依然として多くのミッシングリングが存在している。

2. 研究の目的

本研究では、感覚神経のミエリン形成の分子メカニズムを、特に、シュワン細胞内のシグナル伝達メカニズムの解明に絞り、点在する現在までの知見を線につなげるべく、研究を遂行する。

さて、不完全ミエリン構造や脱ミエリン現象を伴う代表的な先天性感覚神経変性疾患(I型 Charcot-Marie-Tooth (CMT) 病)の有病率は2000-3000人に1人にもものぼる。しかし、現在、その特異的治療標的分子も治療方法も知られていない。そこで、本研究のもうひとつの目的として、脱ミエリン現象の誘導に関わる根底の分子メカニズムを明らかにすることを挙げる。シュワン細胞による不完全なミエリン形成や脱ミエリン現象を研究することは、正常なミエリン発生を研究することと表裏一体の関係にあるので、ミエリン発生の分子メカニズムを明らかにすることにもつながる。

3. 研究の方法

【感覚神経のミエリン発生過程ごとに、in vitro で、ミエリン形成の分子メカニズムを明らかにする】

(1) ミエリン発生の各過程を in vitro 共

培養系で再現する。感覚神経のミエリン発生は、マウスやラットでは胎生中期から生後一ヶ月以上の長期間に渡る。その過程は、過程①：感覚神経の軸索に沿ってシュワン細胞が末梢まで移動する細胞遊走期、過程②：シュワン細胞が神経軸索上で二極性の突起を伸長する前ミエリン形成期、過程③：シュワン細胞がダイナミックに分化して神経軸索をミエリン膜で幾重にも巻くミエリン形成期に分類される。

マウスまたはラットのシュワン細胞(座骨神経由来)と感覚神経細胞(脊髄側端にある感覚神経節由来)共培養系は、これらのミエリン発生の各過程を、生体内とほぼ同様なタイムコースで再現でき、以下の研究に用いられる。

(2) ミエリン発生過程に沿ってミエリン発生に関与する分子を明らかにする。ここでは、多方面からのアプローチから、発生過程ごとの分子メカニズムを探る。シュワン細胞特異的RNA干渉法を利用し、個々のミエリン発生過程に関与する分子を明らかにする

まず、in vitro で、シュワン細胞による感覚神経ミエリン発生の分子メカニズムを明らかにする。そのために、レトロウイルスによる遺伝子導入法を用いることは、この目的に合致する。レトロウイルスは増殖している細胞にしか感染しない。すなわち、それは増殖しているシュワン細胞のみに感染し、増殖能が停止した感覚神経細胞には感染できないことを意味する。この性質を利用して、共培養系に、既知および未同定の細胞内シグナル伝達分子に特化したRNA干渉配列をコードしたレトロウイルスライブラリーを添加し、シュワン細胞内のミエリン形成に必要な分子を明らかにする。

次に、それぞれのミエリン発生過程ごとに、そこに必要な分子を明らかにする。それは、レトロウイルスを共培養系に添加するタイミングとその量によって調べられることが予備実験的に明らかになっている。レトロウイルスは感染細胞のゲノムに挿入され、「その細胞がRNA干渉配列を断続的に発現し」「蓄積する」という特性をもっている。したがって、共培養開始時に大量のウイルスを添加した場合、過程①ないし過程②の機能に関与する分子が同定できる。過程①と過程②を区別することは難しいが、ウイルスの添加量を厳密に調節することにより、それを区別できる可能性があり、現在試験中である。過程③に関与する分子を調べるためには、共培養後数日経って少量のウイルスを添加すれば、過程③に影響する分子が明らかになる。

さらに、細胞膜透過性ペプチドや低分子阻害剤を用いて、ミエリン発生に関与する分子間相互作用を明らかにする。現在、蛋白質間やその他の生体分子との相互作用に関与す

るアミノ酸配列をいくつかの公開データベースから抽出中である。このアミノ酸配列に HIV の Tat 蛋白質由来のおよそ 10 アミノ酸を N 末端に付加したオリゴペプチドは、細胞膜透過性のペプチドであることが知られており、実際に、その有効性を確かめている。これらを共培養系に添加し、ミエリン発生に関与する分子間相互作用を明らかにする。また、市販の、既知のシグナル伝達分子に対する阻害剤や活性化物質を共培養系に加え、その効果を試す実験も併行する。

【脱ミエリン現象が、どのシグナル伝達経路の異常で誘導されるのかを明らかにする】

(1) 脱ミエリン現象を *in vitro* 共培養系で再現する。ここで用いる培養系は、基本的には先述の共培養系と同じである。相違点は、予め、シュワン細胞に I 型 CMT 病を発症する点変異をもった四回膜貫通型の推定構造をもつ pmp22 遺伝子をエレクトロポレーション法で導入しておき、この病態と組織学的に類似した不完全なミエリンや脱ミエリン状態を再現させることにある。

(2) 脱ミエリン現象に関与する分子メカニズムを明らかにする。明らかにされたミエリン発生に関与する分子の RNA 干渉配列やその活性変異体などを、上述の脱ミエリン現象を再現する培養系に導入し、どのシグナル伝達分子やどの経路の異常が脱ミエリン現象を誘導するのかを明らかにする。ここで関与しているものは、正常なミエリンの発生にも、きわめて重要であり、また I 型 CMT 病の治療標的分子になる可能性が高いため、優先的に *in vivo* レベルの実験で、その是非を検証する。

【*in vivo* で RNA 干渉を行い、ミエリン発生の分子メカニズムを検証する】

in vitro 共培養を用いた実験で明らかになったシグナル伝達分子やその経路に含まれる最も重要な分子を *in vivo* レベルで解析する。ここで用いる方法は Short hairpin (Sh) RNA を発現する RNA 干渉配列のトランスジェニック (ノックダウン) マウスの作成である。この方法は、トランスジェニックマウス作成方法と同じ要領で、RNA 干渉配列をコードした遺伝子断片を受精卵にインジェクションし、遺伝子改変マウスを作成するものである (参考文献: Peng ら PNAS (2006) Vol. 103, pp2252-2256)。応募者らはインジェクションする配列のプロモーター付近と転写終了直後の配列に改良を加え、*in vivo* でのノックダウン効率を上昇させることに成功した。この方法の利点は、動物作成期間が短く、かつ比較的安価で、*in vitro* での結果を *in vivo* で検証できることである。また、将来的に、最も重要だと判断される遺伝子に関しては、

そのノックアウトマウスを作成する前段階の実験としても役立つ。

4. 研究成果

(1) ミエリン形成を正に制御する新しい分子経路を同定することに成功した (Science Signaling 2012)。この新規経路では cytohesin-1 という分子がその中心に存在している。Cytohesin-1 は Arf6 とよばれる低分子量 GTP 結合蛋白質の活性化因子である。Cytohesin-1 と Arf6 はミエリン形成とともに活性化され、神経軸索を巻くミエリン膜の形成に深く関与することが判明した。さらに、Cytohesin-1 は細胞質型チロシンキナーゼ Fyn によってリン酸化され活性化されることも明らかにされた。これらの知見は、共培養レベルばかりではなく、マウスを用いたインビボ解析でも証明されている。

(2) ミエリン形成を負に制御する新しい分子経路を同定することに成功した (Journal of Neuroscience 2011)。この新規経路では Dock7 という分子がその中心に存在している。Dock7 は Rac1 と Cdc42 とよばれる低分子量 GTP 結合蛋白質群の活性化因子である。Dock7 と Rac1 および Cdc42 はミエリン形成とともに部分的に不活性化され、過剰なミエリン膜形成を妨げる役割をもつと推定された。ただし、Dock7 の活性は膜型チロシンキナーゼ ErbB2 によってリン酸化され活性化されるため、ミエリン形成とともに Dock7 を負に制御する可能性がある脱リン酸化酵素などの分子の同定が今後の課題である。これらの知見は、共培養レベルばかりではなく、マウスを用いたインビボ解析でも証明されている。

(3) CMT 病のモデル共培養系における Cytohesin-1 と Dock7 の役割も解析した。病態下では、Cytohesin-1 は不活性化されており、Dock7 が部分的に活性化されていることが判明した。今後、これらの現象がインビボでも成立しているかどうか検討が必要になる。もし共培養での結果がそのままインビボでも成立していれば、それぞれの分子が新しい CMT 病の標的分子になる可能性が期待される。

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 2 件)

① Junji Yamauchi, Yuki Miyamoto, Tomohiro Torii, Shou Takashima, Kazumi Kondo, Katsumasa Kawahara, Noriko Nemoto, Jonah R. Chan, Gozoh Tsujimoto, and Akito Tanoue (2012) Phosphorylation of cytohesin-1 by Fyn is required for initiation of myelination and the extent

of myelination during development. Sci. Signal. 5, ra69 (DOI: 10.1126/scisignal.2002802): Picked up as 'cover image': Phosphorylation of cytohesin-1 by Fyn is required for initiation of myelination and the extent of myelination during development. Sci. Signal. Vol. 5, No. 243 (2012)

② Junji Yamauchi, Yuki Miyamoto, Hajime Hamasaki, Atsushi Sanbe, Shinji Kusakawa, Akane Nakamura, Hideki Tsumura, Masahiro Maeda, Noriko Nemoto, Katsumasa Kawahara, Tomohiro Torii, and Akito Tanoue (2011) The atypical guanine-nucleotide exchange factor, Dock7, negatively regulates Schwann cell differentiation and myelination. J. Neurosci. 31, 12579-12592 (DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2738-11.2011)

[学会発表] (計2件)

① 宮本 幸、山内淳司 : Novel signal transduction pathway controlling myelination (シンポジウム New dynamic signaling to form unique structures between glial and neuronal cells) 日本神経科学学会大会 2012年9月・名古屋

② 山内淳司 : ダイナミックな形態分化を伴い、神経軸索のミエリン化を制御するマウス Rho 活性化因子 Dock7 (シンポジウム 細胞の形態・運動を制御するシグナル伝達ネットワーク) 日本生化学会大会 2011年9月・京都

[産業財産権]

○出願状況 (計3件)

名称：ペリチェウス・メルツバッハ病治療方法及びそれに用いる治療剤
発明者：山内淳司、田上昭人、宮本 幸、鳥居知宏、前田雅弘
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2012-21272
出願年月日：2012年2月3日
国内外の別：国内

名称：中枢神経髄鞘形成不全の治療用組成物及び治療剤
発明者：山内淳司、田上昭人、宮本 幸、鳥居知宏、友岡康弘
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2010-281777
出願年月日：2010年12月17日
国内外の別：国内

名称：末梢神経軸索の再生剤及び再生方法
発明者：山内淳司、田上昭人、宮本 幸、鳥居知宏
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2010-209899
出願年月日：2010年10月4日
国内外の別：国内

[その他]
ホームページ等
<http://nch.go.jp/pharmac/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山内 淳司 (YAMAUCHI JUNJI)
(独)国立成育医療研究センター・薬剤治療研究部・室長
研究者番号：20335483

(2) 研究分担者

無し ()
研究者番号：

(3) 連携研究者

無し ()
研究者番号：