

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300117

研究課題名(和文)軸索髄鞘形成因子ナルディライジンの病態生理学的意義の解明

研究課題名(英文)Pathophysiological roles of nardilysin, critical factor for axonal maturation and myelination

研究代表者

西 英一郎(Nishi, Eiichiro)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30362528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,400,000円、(間接経費) 4,620,000円

研究成果の概要(和文)：我々はnardilysin (NRDc)が膜タンパク質細胞外ドメインシェディングの活性化因子であること、ニューレギュリン1シェディングを介して神経軸索成熟と髄鞘形成を制御していることを明らかにした。一方NRDc欠損マウスは、明らかな低血圧・徐脈を呈したが、意外なことにその交感神経活動は亢進していること、心臓交感神経分布パターンに明らかな変化を認めることが明らかになった。一方薬理的神経遮断や単離ペースメーカー細胞の解析から、NRDc欠損マウスの内因性心拍数が低下していることも明らかになった。この成果は、NRDcが交感神経、心筋双方で独立した役割を介して、循環動態を制御していることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：We originally identified a metalloendopeptidase nardilysin (NRDc) as a binding partner of HB-EGF and reported that NRDc enhances ectodomain shedding of multiple membrane proteins. We generated NRDc-deficient (Nrd1^{-/-}) mice and demonstrated that NRDc critically regulates axonal maturation and myelination in the central and peripheral nervous system through the regulation of neuregulin-1 shedding. Here, we demonstrate that Nrd1^{-/-} mice show severe hypotension and bradycardia. In spite of these phenotypes, analysis of heart rate variability and serum catecholamine levels revealed that sympathetic activity is upregulated in Nrd1^{-/-} mice. Furthermore, Nrd1^{-/-} mice showed abnormal sympathetic innervation patterning. Pharmacological blocking of autonomic nervous system showed that the intrinsic heart rate of Nrd1^{-/-} mice was significantly decreased. In conclusion, NRDc critically regulates circulatory dynamics through modulating intrinsic heart rate and cardiac sympathetic innervation.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経科学一般

キーワード：メタロプロテアーゼ 髄鞘形成 交感神経 循環動態

1. 研究開始当初の背景

膜近傍部でのタンパク分解により、膜タンパク質の細胞外ドメインが不可逆的に切断される現象を、細胞外ドメインシェディング (以下シェディングと略す) という。増殖因子やサイトカインの前駆体など、多岐にわたる膜タンパク質がシェディングによる制御 (活性化、非活性化、機能転換など) を受けており、生体においても重要な生理的および病理的役割を担うと考えられるが、その活性化機構はよくわかっていない。

我々は膜型増殖因子 HB-EGF の結合蛋白質として同定したメタロプロテアーゼ nardilysin (NRDc) が、ADAM プロテアーゼの活性化を介して HB-EGF のシェディングを増強すること、NRDc のシェディング増強効果は HB-EGF に限定されず、TNF- α やアミロイド前駆体蛋白質を含む広範な膜蛋白質に及ぶことを明らかにしてきた (Nishi 他 EMBO J, 2001, Nishi 他 JBC, 2006, Hiraoka 他 J. Neurochem, 2007, Hiraoka 他 BBRC, 2008)。生体における NRDc の機能を明らかにするため、NRDc 欠損マウスを作製したところ、同ホモ接合体 (NRDc $^{-/-}$) は大脳皮質の菲薄化や側脳室の拡大を呈し、軸索および髄鞘低形成が原因であることが明らかになった。さらに、神経細胞特異的 (CAMKII プロモーター) NRDc 過剰発現マウス (NRDc-Tg) においては、トランスジーン発現部位特異的に髄鞘過形成をきたすことが判明し、髄鞘の厚みが NRDc の量依存的に調節されることが示唆された。さらに、NRDc $^{-/-}$ の坐骨神経においても軸索および髄鞘の低形成を認め、NRDc が中枢神経同様、末梢神経においても軸索成熟および髄鞘形成を制御していることが明らかになった (Ohno 他 Nat. Neurosci. 2009)。

NRDc による髄鞘形成制御の分子機構を考える上で、我々はニューレギュリン 1 (NRG1) に注目した。NRG1 は末梢神経の髄鞘形成の主要制御因子であると同時に、HB-EGF と同じ EGF ファミリーに属し、シェディングによる機能制御を受ける。NRG1 のシェディングを司る酵素として、これまでに TACE を含む ADAM プロテアーゼと、アミロイド産生酵素のひとつである セクレターゼ BACE1 が報告されている。BACE1 に関しては、その欠損マウスが髄鞘低形成を呈したことから NRG1 との関連が検討され、BACE1 が NRG1 を切断することが報告されている。そこで、NRDc の NRG1 シェディングにおける役割を検討したところ、NRDc は TACE のみならず、BACE1 とも協調して、NRG1 のシェディングを増強することがわかった。

我々の研究は、NRDc が発現量依存的に髄鞘厚を制御していることを明らかにし、髄鞘形成において NRDc が本質的な役割を果たしていることを示した。したがって、脱髄と再髄鞘化を主病態とする多発性硬化症の病態に NRDc が関与する可能性が示唆された。

一方 NRDc $^{-/-}$ マウスは、上記の中枢・末梢神経系表現型以外にも、明らかな低血圧・徐脈など、交感神経調節系の異常を示唆する特徴的な表現型を呈した。交感神経節前線維は有髄、節後線維は無髄線維であり、無髄線維における神経伝達速度は、その直径に依存する。心不全や不整脈など循環器疾患における交感神経系の重要性は、ブロッカーの臨床的有用性からも明らかだが、心臓交感神経支配や、その成熟を司る分子機構は十分解明されていない。

2. 研究の目的

以上の背景と研究成果をもとに、本申請においては、1) NRDc による BACE1 活性制御の分子機構解明、2) MS における NRDc の意義、3) 交感神経支配を介する循環動態調節における NRDc の意義の解明、を目的とした。3) では、生理学、遺伝子工学的手法を用いて、「NRDc が、心筋における交感神経節後線維の走行、成熟度の制御を介して、循環動態を調節する」という仮説の検証を目的とする。神経系表現型が循環動態表現型とどのようにリンクしているかを明らかにしたい。

3. 研究の方法

1) NRDc による BACE1 活性制御の分子機構解明: NRDc の BACE1 翻訳後修飾、細胞内分布における役割、NRDc の NRG1 以外の BACE1 基質タンパク質切断における役割を検討する。2) 多発性硬化症における NRDc の意義: MS モデル (Cuprizone 含有食摂取モデル) を用いて、NRDc 発現の増加あるいは減少が病態 (脱髄、再髄鞘化) に及ぼす影響を解明する。3) 交感神経支配を介する循環動態調節における NRDc の意義の解明: NRDc 欠損マウスにおける心臓交感神経の組織学的解析、循環動態の生理学的検討、組織特異的 NRDc 欠損あるいは強発現マウスを用いた検討を行う。

4. 研究成果

目的 1) NRG1 以外の BACE1 の基質であるアミロイド前駆体タンパク質 (APP) に注目し、NRDc が *in vivo* で BACE1 の APP 切断活性 (セクレターゼ活性) に及ぼす影響を検討するため、アルツハイマー病モデルマウスと前脳特異的 NRDc 強発現マウス (NRDc-Tg) を交配し、アミロイド斑形成を検討した。その結果、NRDc 強発現によりアミロイド斑は有意に減少したが、この効果は NRDc のセクレターゼ活性増強によるもので、セクレターゼ活性に明らかな変化は認めなかった (Neurobiol. Aging 2014)。この結果は、NRDc が基質タンパク質特異的に BACE1 活性を制御する可能性を示唆した。

目的 2) Cuprizone 投与による脱髄の程度を、野生型および NRDc-Tg で比較したところ、意外なことに NRDc-Tg においてより強い脱髄を認めた。一方 Cuprizone 投与中止後の再髄鞘化は NRDc-Tg で増強していた (論文準備中)。

この結果は、NRDc が異なる機能を介して脱髄および再髄鞘化を制御している可能性を示唆した。

目的 3) NRDc 欠損マウスにおいて、心臓交感神経分布パターンに明らかな変化を認め、さらに内因性心拍数が低下していること、交感神経活動が亢進していることも明らかになった(論文準備中)。この成果は、NRDc が交感神経、心筋双方で独立した役割を介して、循環動態を制御していることを示唆した。

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 4 件)

Hiraoka Y, Matsuoka T, Ohno M, Nakamura K, Saijo S, Matsumura S, Nishi K, Sakamoto J, Chen Po-Min, Inoue K, Fushiki T, Kita T, Kimura T and Nishi E*

Critical roles of nardilysin in the maintenance of body temperature homeostasis

Nat. Commun. 5: 3224, 2014.

doi: 10.1038/ncomms4224

Ohno M, Hiraoka Y, Lichtenthaler S, Nishi K, Saijo S, Matsuoka T, Tomimoto H, Araki W, Takahashi R, Kita T, Kimura T and Nishi E*

Nardilysin prevents amyloid plaque formation by enhancing α -secretase activity in an Alzheimer's disease mouse model

Neurobiol Aging 35: 213-22, 2014.

doi:

10.1016/j.neurobiolaging.2013.07.014.

Li J, Chu M, Wang S, Chan D, Qi S, Wu M, Zhou Z, Li Z, Nishi E, Qin J and Wong J

Identification and Characterization of Nardilysin as a Novel Dimethyl H3K4 Binding Protein Involved in Transcriptional Regulation

J Biol Chem, 287:10089-98, 2012.

doi: 10.1074/jbc.M111.313965

Kanda K, Komekado H, Sawabu T, Ishizu S, Nakanishi Y, Nakatsuji M, Akitake-Kawano R, Ohno M, Hiraoka Y, Kawada M, Kawada K, Sakai Y, Matsumoto K, Kunichika M, Kimura T, Seno H*, Nishi E*, and Chiba T (*Co-corresponding author)

Nardilysin and ADAM proteases promote gastric cancer cell growth by activating intrinsic cytokine signaling via enhanced ectodomain shedding of TNF- α

EMBO Mol Med, 4:396-411, 2012.

doi: 10.1002/emmm.201200216

[学会発表](計 32 件)

Nishi K, Sato Y, Ohno M, Hiraoka Y, Saijyo S, Sakamoto J, Chen P, Kita T, Inagaki N, Kimura T, Nishi E.

Nardilysin controls glucose metabolism through the regulation of insulin secretion

第 78 回日本循環器学会学術集会(2014 年 3 月 21 日、東京)

Saijo S, Hiraoka Y, Matsuoka T, Ohno M, Nakamura K, Matsumura S, Nishi K, Sakamoto J, Chen P, Kita T, Kimura T, Nishi E.

Nardilysin Regulates Adaptive Thermogenesis and Body Temperature Homeostasis through Modulation of PGC-1

第 78 回日本循環器学会総会(2014 年 3 月 21 日、東京)

Sakamoto J, Chen PM, Saijo S, Nishi K, Ohno M, Kita T, Kimura T, Nishi E.

Nardilysin is Involved in Pressure Overload-induced Dysfunction and Fibrosis of Left Ventricle.

第 78 回日本循環器学会学術集会(2014 年 3 月 21 日、東京)

Hiraoka Y, T. Matsuoka, M. Ohno, K. Nishi, K. Nakamura, K. Kita, T. Kimura and E. Nishi.

Critical roles of a metalloendopeptidase nardilysin in cold-induced adaptive thermogenesis

ASCB (American Society for Cell Biology), Dec 14-18, 2013, New Orleans, USA

西城さやか, 平岡 義範, 松岡 龍彦, 大野 美紀子, 中村 和弘, 松村 成暢, 西 清人, 坂本 二郎, 陳 博敏, 北 徹, 木村 剛, 西 英一郎

ナルディライジンは PGC-1 を制御することで体温恒常性維持機構と適応熱産生を調節する

第 36 回日本分子生物学会年会(2013 年 12 月 3-6 日、神戸)

西 清人, 佐藤 雄一, 大野 美紀子, 平岡 義範, 西城 さやか, 坂本 二郎, 陳 博敏, 松岡 龍彦, 北 徹, 稲垣 暢也, 木村 剛, 西 英一郎

ナルディライジンはグルコース応答性インスリン分泌を制御する

第 36 回日本分子生物学会年会(2013 年 12 月 3-6 日、神戸)

大野 美紀子, 平岡 義範, Lichtenthaler Stefan F, 富本 秀和, 荒木 互, 高橋 良輔, 坂本 二郎,

陳 博敏, 北 徹, 木村 剛, 西 英一郎

アルツハイマー病におけるナルディライジンの意義

第 36 回日本分子生物学会年会(2013 年 12 月 3-6 日、神戸)

Nishi K, Sato Y, Ohno M, Hiraoka Y, Saijyo S, Sakamoto J, Chen P, Kita T, Inagaki N, Kimura T, Nishi E. Nardilysin is a critical regulator of insulin secretion and glucose metabolism American Heart Association scientific sessions 2013. Nov 18 (15-19), 2013, Dallas, USA.

西城さやか, 平岡 義範, 松岡 龍彦, 大野美紀子, 中村 和弘, 松村 成暢, 西 清人, 坂本二郎, 陳 博敏, 北 徹, 木村 剛, 西 英一郎 体温恒常性維持におけるナルディライジンの役割
平成 25 年度 温熱生理研究会 (2013 年 9 月 5-6 日、岡崎)

大野美紀子, 平岡義範, 松浦博, 西清人, 西城さやか, 坂本二郎, 陳博敏, 牧山武, 北徹, 木村剛, 西英一郎
ナルディライジンによる心拍数制御機構 (学会奨励賞受賞)
第 18 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会 (2013 年 8 月 16-17 日、大阪)

Ohno M, Watanabe S, Hiraoka Y, Nishi K, Saijo S, Sakamoto J, Chen PM, Kita T, Nishi E, Kimura T. Nardilysin, an Activator of Ectodomain Shedding, is a Novel and Potent Biomarker for Acute Coronary Syndrome (English session 最優秀賞)
第 115 回日本循環器学会近畿地方会(2013 年 6 月 15 日 京都)

Ohno M, Watanabe S, Hiraoka Y, Matsuoka T, Nishi K, Saijo S, Sakamoto J, Chen PM, Inoue K, Kita T, Kimura T, Nishi E. Nardilysin, an Activator of Ectodomain Shedding, is a Novel and Potent Biomarker for Acute Coronary Syndrome (口頭)
第 77 回日本循環器学会総会 (2013 年 3 月 15-17 日 横浜)

Nishi K, Hiraoka Y, Ohno M, Matsuoka T, Saijo S, Sakamoto J, Chen PM, Kita T, Kimura T, Nishi E. Nardilysin Controls Glucose Metabolism through the Regulation of Insulin Secretion (ポスター)
第 77 回日本循環器学会総会 (2013 年 3 月 15-17 日 横浜)

Nishi E. Nardilysin promotes cancer development through activation of ectodomain shedding 1st International Symposium on Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation

of Signaling. Feb1-2. 2013. Tokyo

Hiraoka Y, Yoshitane H, Nunokawa R, Fukada Y, Kimura T and Nishi E Nardilysin regulates the mammalian circadian clock via modulating PER2 stability
ASCB (American Society for Cell Biology), Dec 15, 2012, San Francisco, USA

Ohno M, Hiraoka Y, Matsuoka T, Nishi K, Saijo S, Kita T, Kimura T, Nishi E. Nardilysin regulates sinus node automaticity and sympathetic nerve innervation (ワークショップ「発生生物学の最前線：個と全体をつなぐ新規メカニズム」)
第 35 回日本分子生物学会年会 (2012 年 12 月 11-14 日福岡)

Nishi K, Hiraoka Y, Ohno M, Matsuoka T, Saijyo S, Sakamoto J, Chen P, Kita T, Kimura T, Nishi E. Nardilysin controls glucose metabolism through the regulation of insulin secretion
第 35 回日本分子生物学会年会(2012 年 12 月 11-14 日、福岡)

Ohno M, Hiraoka Y, Matsuura H, Matsuoka T, Nishi K, Saijo S, Sakamoto J, Chen PM, Kita T, Kimura T, Nishi E. NRDC regulates circulatory dynamics through modulating sinus node automaticity and cardiac sympathetic innervation
Neuro-Vascular Wiring Symposium 2012, Nov 12-13, 2012, Nara.

Nishi E, Hiraoka Y, Matsuoka T, Ohno M, Nishi K, Saijo S, Kita T, Kimura T Nardilysin regulates adaptive thermogenesis via modulation of transcriptional coactivator PGC-1 α (Selected for oral presentation)
Cold Spring Harbor Meeting (Nuclear Receptors & Diseases), Oct 30-Nov3, 2012, Cold Spring Harbor, NY, USA

神田啓太郎, 妹尾浩, 千葉勉, 西英一郎 ナルディライジンは TNF- α のシグナリングを促進し、マウス腸腫瘍を増大させる(口演)
第 71 回日本癌学会学術総会 2012.9.19 札幌

②Ohno M, Watanabe S, Hiraoka Y, Matsuoka T, Nishi K, Saijo S, Kita T, Nishi E, Kimura T. Nardilysin, an activator of ectodomain shedding, is a novel and potent biomarker

for acute coronary syndrome
ESC Congress 2012, 25-29 Aug 2012, Munich-
Germany 口頭発表

②Ohno M, Hiraoka Y, Matsuoka T, Nishi K,
Saijo S, Kita T, Kimura T, Nishi E.
NRDc regulates circulatory dynamics
through modulating sinus node
automaticity and cardiac sympathetic
innervation
ESC Congress 2012, 25 Aug 2012- 29 Aug 2012,
Munich- Germany ポスター発表

③西清人、平岡義範、大野美紀子、松岡龍彦、
西城さやか、坂本二郎、陳博敏、北徹、木村
剛、西英一郎
ナルディライジンはインスリン分泌調節を
介して糖代謝を制御する
(学会奨励賞受賞)
第 17 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会
(2012 年 8 月 10-11 日、浜松)

④Ohno M, Hiraoka Y, Matsuoka T, Nishi K,
Saijo S, Kita T, Kimura T, Nishi E.
Nardilysin regulates circulatory dynamics
through modulating sympathetic nerve
innervation
第 76 回日本循環器学会総会 (2012 年 3 月
16-18 日 福岡)

⑤Hiraoka Y, Matsuoka T, Ohno M, Nishi K,
Saijo S, Kimura T, Kita T, Nishi E.
Critical roles of a metalloendopeptidase
nardilysin in cold-induced adaptive
thermogenesis. 口頭およびポスター発表
第 34 回日本分子生物学会年会(2011 年 12 月
13-16 日、横浜)

⑥Ohno M, Hiraoka Y, Matsuoka T, Nishi K,
Saijo S, Kimura T, Nishi E.
Nardilysin prevents amyloid plaque
formation by enhancing □-secretase
activity in vivo. 口頭およびポスター発表
第 34 回日本分子生物学会年会(2011 年 12 月
13-16 日、横浜)

⑦Ohno TM, Hiraoka Y, Matsuoka T, Nishi K,
Saijo S, Kimura T, and Nishi E
Nardilysin regulates circulatory dynamics
through modulating sympathetic nerve
innervation
The 84th Scientific Sessions of American
Heart Association, Nov 16, 2011, Orland,
Florida

⑧神田啓太郎、米門秀行、妹尾浩、千葉勉、
西英一郎
ナルディライジンは TNF- のシェディング
を促進し内因性サイトカインシグナル経路
を活性化して胃癌細胞の増殖を制御する(口

演)
第 70 回日本癌学会学術総会 2011.10.3 名
古屋

⑨Nishi E.: Nardilysin regulates axonal
maturation and myelination in the central
and peripheral nervous system.
**10th Biennial ISN Satellite Meeting on
Myelin Biology** (Aug 24 - 27, 2011,
Kolymvari, Crete, Grace) 招待講演

⑩Ohno M, Nishi E.: Demyelination and
remyelination are distinctly regulated by
nardilysin in the murine cuprizone model.
Poster presentation
**10th Biennial ISN Satellite Meeting on
Myelin Biology** (Aug 24 - 27, 2011,
Kolymvari, Crete, Grace)

⑪Ohno M, Hiraoka Y, Matsuoka T, Nishi K,
Saijo S, Kimura T, and Nishi E
Nardilysin prevents amyloid plaque
formation by enhancing□□-secretase
activity in vivo.
AALCAD (Alzheimer's Association
International Conference on Alzheimer's
Disease) 2011, July 16-21, Paris, France

⑫Nishi E.: Multiple pathophysiological
roles of nardilysin, an enhancer of
ectodomain shedding.
Gordon Research Conference (Regulated
Proteolysis of Cell Surface Proteins)
(July 10 - 15, 2011, Davidson, NC, USA)
招待講演

〔図書〕(計 4 件)
西英一郎
がん基盤生物学 -革新的シーズ育成に向け
て-、第 II 部 10 章
細胞外ドメインシェディング活性化因子を
標的とする抗がん療法
総編集 清木元治、2013 年、南山堂

Nishi E
Nardilysin (MS: 328)
The Handbook of Proteolytic Enzymes (The
3rd Edition), 20 Dec 2012
Edited by Neil D. Rawlings and Guy Salvesen
Academic Press

西城さやか、西英一郎
健康長寿大事典-EBM から QOL まで-、III
部 4 章 e) 深部静脈血栓症
監修: 北徹、編集: 横出正之、荒井秀典、2012
年、西村書店

古川裕、西英一郎
心臓血管外科 Knack & Pitfalls、冠動脈外科
の要点と盲点 (第 2 版)

III. 冠疾患診断の Knack & Pitfalls、3. 冠
動脈病変の重症度分類
監修：高本眞一、編集：坂田隆造、2012 年、
文光堂

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西 英一郎 (Nishi Eiichiro)
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号：30362528

(2) 研究分担者

大野 美紀子 (Ohno Mikiko)
研究者番号：10583198