

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26830054

研究課題名(和文) グリア細胞と神経の相互作用を起点に髄鞘形成および破綻の機序を解き明かす

研究課題名(英文) FROM THE QUESTION OF HOW GLIAL CELLS WRAP THEIR MEMBRANE WITH AXONS TO THE POSSIBLE SOLUTION OF HOW DEMYELINATING DISORDERS WERE RECOVERED

研究代表者

宮本 幸 (Miyamoto, Yuki)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・薬剤治療研究部・研究員

研究者番号：50425708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：グリア細胞は神経細胞と互いに影響を及ぼし合いながら、ダイナミックな髄鞘構造を維持しているが、発生各時期にどのような分子が機能しているか、不明な点が多く残されている。そこで、髄鞘発生過程のメカニズムを明らかにするため、独自のグリア細胞と神経細胞の共培養システムを利用して発現分子の網羅的解析を行った。その結果、これまで主に免疫系で機能すると考えられてきた接着分子受容体がグリア細胞にも発現しており、特に髄鞘形成初期において、神経細胞との相互作用のもと中心的な役割を果たしていることを明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：During postnatal development in the central nervous system (CNS), oligodendrocytes differentiate to wrap their plasma membranes around neuronal axons, forming the myelin sheath. Although a neuronal cue is one of the regulator elements controlling this process, the overall picture remains elusive. Our experiments using microarray analysis in primary oligodendrocytes have revealed that vascular cell adhesion molecule (VCAM) 1, which plays a key role throughout the immune system, is one of their transcripts. VCAM1 contributes to the initiation of myelination through ligand ligation, demonstrating that an intercellular molecule whose primary role is in the immune system can also play an unexpected role in the CNS.

研究分野：神経化学

キーワード：髄鞘 グリア細胞 神経細胞 共培養

1. 研究開始当初の背景

ニューロンの数の 10 倍も存在するグリア細胞は、末梢神経系においてはシュワン細胞と呼ばれ、中枢神経系のグリア細胞であるアストロサイト、上衣細胞、ミクログリア、そしてオリゴデンドロサイトの役割を一手に担っている。シュワン細胞の主な機能の一つに、神経軸索の周囲に髄鞘（ミエリン）を形成することが挙げられる。シュワン細胞はミエリンを形成することによって神経電位を軸索末端側へすばやく伝達すると同時に、軸索を強固に保護する上で大きな役割を果たしている。そのため髄鞘が変性すると、グリア細胞のみならず神経細胞を含む神経組織全体の変性、萎縮が起こると考えられる。このように、グリア細胞は神経細胞と互いに密接な関係を保ちながら、複雑で多機能な神経活動を支えている。

現在、国内における神経科学の分野では神経細胞をターゲットとした基礎研究や創薬研究が大半を占め、グリア細胞に特化した研究は国外と比較して非常に少ない。しかしグリア細胞主体の病態を示す患者数は比較的多く、さらに近年神経変性疾患においてもグリア細胞の関与を指摘する報告が数多くなされていることから、グリア細胞を標的とした研究がブレイクスルーとなる可能性は高い。グリア細胞には未知の多彩な機能が隠れていることは間違いないと予想される。また、髄鞘発生の分野では国内外問わず体系的な研究は行われていない。申請者らは以前までの「シグナル伝達様式と細胞形態変化」の研究で培った細胞生物学や生化学の知識・技術を「髄鞘の発生学」と融合させることで、「髄鞘の発生過程をシグナル分子の挙動で説明する」ユニークな研究分野を開拓し、これに独自に開発した共培養技術を適用することで髄鞘の初期から成熟期にわたる新規シグナル経路を明らかにしてきており、当該分野において非常に独創的な研究を行っている。

2. 研究の目的

近年、神経細胞が病変の主体であると考えられてきた神経疾患において、グリア細胞の関与を示唆する報告が相次いでなされている。しかし、グリア細胞をターゲットとした基礎研究ならびに国内製薬企業の創薬研究は、未だ神経細胞を対象としたものが大半を占めている。

現在、髄鞘変性に対する治療が試みられているが、その方法は神経保護薬物ないし蛋白質性増殖因子を用いた対症療法にとどまっている。これは、病態発症の分子機構に関しての基盤不足が原因だと考えられる。申請者は以前、髄鞘変性の病態発症に深く関与するキナーゼを明らかにした。このキナーゼは、髄鞘発生過程においても中核を担う分子であった。つまり、発生過程と病態発症のメカニズムには共通する部分が多いことが推察される。申請者らは、髄鞘発生の研究で得られる結果や技術を応用することで、脱髄疾患治療薬の探索研究を推し進める第一段階のスクリーニングを推し進め、さらには脱髄疾患全般の根本的な分子病態メカニズムの解明に貢献したいと考えている。

3. 研究の方法

共培養に用いる神経細胞は、胎生 15 日目のラットの後根神経節から実体顕微鏡を用いて単離した。単離後細胞を分散させ、I 型コラーゲン基質でコートしたカバーガラス上に神経細胞をまき、神経栄養因子入りの培養液で約 3 週間培養した。一方、共培養に用いるグリア細胞は、我々のグループが独自に開発・改変したペトリディッシュを用いる方法により、胎児ラット大脳から単離した。2 回の継代を経ることで、グリア前駆細胞が高効率で精製される。

神経軸索を伸ばした神経節細胞上に、

グリア前駆細胞をまいた。この状態で共培養すると、次第にグリア前駆細胞が神経軸索に沿って増殖し、髄鞘構造を有するグリア細胞に分化する。この状態で3-4週間共培養すると、神経軸索の周囲に成熟した髄鞘組織が形成された。免疫染色によるマーカー蛋白質の確認や電子顕微鏡による構造解析により、この共培養システムは、インビボの髄鞘発生過程を忠実に模倣していることが分かっている。

この共培養法を活用し、グリア細胞上に特異的に発現する接着分子受容体に着目し、ミエリン形成過程における役割を解析した。

4. 研究成果

本研究では髄鞘形成過程を司るシグナルカスケードを明らかにするために、共培養系を用いたスクリーニングを実施すると共に、グリア細胞に発現している新規受容体の結合蛋白質の探索を行った。次にスクリーニングで明らかとなる分子群の機能を神経細胞との相互作用の下で検定、さらにこれらの分子の中で、髄鞘形成に対して効果の最も大きな分子の機能阻害トランスジェニックマウスを作製し、*in vitro* から *in vivo* に渡って仮説の普遍性を実証した。

【共培養系を用いた髄鞘形成時のシグナルネットワークの解析】

昨年度から行ってきた、グリア細胞の発生過程の mRNA マイクロアレイによる網羅的解析により、膜受容体の中に免疫細胞の遊走や接着に深く関わる接着分子受容体が、グリア細胞の発生初期に特異的に発現上昇していることをつきとめた。この受容体は、神経細胞上のリガンドとの相互作用によってグリア細胞の髄鞘形成初期を制御していた(宮本ら、*Nat. Commun.* 7, 13478 (2016))。さらに、この神経細胞上のリガンドは、多発性硬化症の抗体治療薬ナタリツマブの分子標的でもあった。多発性硬化症は血液中

の炎症細胞が血管内皮から脳へ浸潤し、脳の髄鞘を破壊し、神経変性を引き起こす炎症性の脱髄疾患で、抗体薬であるナタリツマブは炎症細胞にあるインテグリン受容体をブロックすることで、炎症細胞の脳内への浸潤を抑制している。しかし、ナタリツマブが病態を進行させる(神経変性を促進する)という重篤な副作用があることが知られている。今回、ナタリツマブの分子標的であるインテグリン受容体が、脳の神経細胞にも存在し、それが神経細胞の成熟に重要な役割があることを明らかにした。また、インテグリン受容体の機能発現には脳内にある特異的分子(CD69)の活性化が必須であることが判明した。したがって、ナタリツマブの副作用は、脳内の神経細胞の成熟を阻害することで神経変性を促進すると考えられるが、これは脳内のCD69を活性化することで、この副作用を減弱させることができるかと期待された(宮本ら、*Nat. Commun.* 7, 13478 (2016))。

以上より、独自の共培養システムを活用し、生化学および分子生物学の技術を取り入れることにより、免疫系細胞においてのみ機能すると考えられていた接着分子受容体が、ミエリン形成初期に大きな役割を果たしていることを明らかにした。この受容体は、神経細胞上のリガンドとの相互作用によって機能を発揮することからも、本共培養系の有用性が実証された。さらに、このリガンドが中枢神経脱髄疾患の治療薬の分子標的でもあることから、発生と病態のメカニズムが表裏一体であるという仮説が本研究により支持された

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計14件)

- (1) [Yuki Miyamoto](#), Tomohiro Torii, Akito Tanoue, and Junji Yamauchi: VCAM1 acts in parallel with CD69 and is required

- for the initiation of oligodendrocyte myelination.
Nat. Commun. 7, 13478-13494 (2016)
- (2) Manabu Makinodan, Daisuke Ikawa, Yuki Miyamoto, Junji Yamauchi, Kazuhiko Yamamuro, Yasunori Yamashita, Michihiro Toritsuka, Sohei Kimoto, Kazuki Okumura, Takahira Yamauchi, Shin-ichi Fukami, Hiroki Yoshino, Akio Wanaka, and Toshifumi Kishimoto: Social isolation impairs remyelination in mice through modulation of interleukin-6.
FASEB J. 30, 4267-4274 (2016)
- (3) Yuki Miyamoto, Tomohiro Torii, Kazuko Kawahara, Akito Tanoue, and Junji Yamauchi: Dock8 interacts with Nck1 in mediating Schwann cell precursor migration.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 6, 113-123 (2016)
- (4) Yuki Miyamoto, Moe Tamano, Tomohiro Torii, Kazuko Kawahara, Kazuaki Nakamura, Akito Tanoue, Shuji Takada, and Junji Yamauchi: Data supporting the role of Fyn in initiating myelination in the peripheral nervous system.
Data Brief 7, 1098-105 (2016)
- (5) Yuki Miyamoto, Megumi Funakoshi-Tago, Nanami Hasegawa, Takahiro Eguchi, Akito Tanoue, Hiroomi Tamura, and Junji Yamauchi: Data supporting mitochondrial morphological changes by spastic paraplegia (SPG) 13-associated HSPD1 mutants.
Data Brief 6, 482-488 (2016)
- (6) Tomohiro Torii, Yuki Miyamoto, Masahiro Yamamoto, Katsuya Ohbuchi, Hideki Tsumura, Kazuko Kawahara, Akito Tanoue, Hiroyuki Sakagami, and Junji Yamauchi: Data supporting Arf6 regulation of Schwann cell differentiation and myelination.
Data Brief 5, 388-395 (2015)
- (7) Yuki Miyamoto, Tomohiro Torii, Shuji Takada, Nobuhiko Ohno, Yurika Saitoh, Kazuaki Nakamura, Akihito Ito, Toru Ogata, Nobuo Terada, Akito Tanoue, and Junji Yamauchi: Involvement of the Tyro3 receptor and its intracellular partner Fyn signaling in Schwann cell myelination.
Mol. Biol. Cell 26, 3489-3503:
Picked up as 'cover image': Mol. Biol. Cell Vol. 26, No. 20 (2015)
- (8) Tomohiro Torii, Yuki Miyamoto, Masahiro Yamamoto, Katsuya Ohbuchi, Hideki Tsumura, Kazuko Kawahara, Akito Tanoue, Hiroyuki Sakagami, and Junji Yamauchi: Arf6 mediates Schwann cell differentiation and myelination.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 465, 450-457 (2015)
- (9) Yuki Miyamoto, Takahiro Eguchi, Kazuko Kawahara, Nanami Hasegawa, Kazuaki Nakamura, Megumi Funakoshi-Tago, Akito Tanoue, Hiroomi Tamura, and Junji Yamauchi: Hypomyelinating leukodystrophy-associated missense mutation in HSPD1 blunts mitochondrial dynamics.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 462, 275-281 (2015)
- (10) Tomohiro Torii, Nobuhiko Ohno, Yuki Miyamoto, Kazuko Kawahara, Yurika Saitoh, Kazuaki Nakamura, Shou Takashima, Hiroyuki Sakagami, Akito Tanoue, and Junji Yamauchi: Arf6 guanine-nucleotide exchange factor cytohesin-2 regulates myelination in nerves.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 460, 819-825 (2015)
- (11) Tomohiro Torii, Yuki Miyamoto, Kenji Tago, Kazunori Sango, Kazuaki Nakamura, Atsushi Sanbe, Akito Tanoue, and Junji Yamauchi*: Arf6 guanine-nucleotide exchange factor cytohesin-2 binds to CCDC120 and is transported along neurites to mediate neurite growth.
J. Biol. Chem. 289, 33887-33903 (2014)
- (12) Tomohiro Torii, Yuki Miyamoto, Shuji Takada, Hideki Tsumura, Miyuki Arai, Kazuaki Nakamura, Katsuya Ohbuchi, Masahiro Yamamoto, Akito Tanoue, and Junji Yamauchi: *In vivo* knockdown of ErbB3 in mice inhibits Schwann cell precursor migration.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 452, 782-788 (2014)
- (13) Yuki Miyamoto, Takahiro Eguchi, Tomohiro Torii, Kazuaki Nakamura, Akito Tanoue, and Junji Yamauchi: Hypomyelinating leukodystrophy-associated missense mutant of FAM126A/hyccin/DRCTNNB1A aggregates in the endoplasmic reticulum.
J. Clin. Neurosci. 21, 1033-1039 (2014)
- (14) Yuki Miyamoto, Natsuki Yamamori, Tomohiro Torii, Akito Tanoue, and Junji Yamauchi: Rab35, acting through ACAP2 switching off Arf6, negatively regulates oligodendrocyte differentiation and myelination.
Mol. Biol. Cell 25, 1532-1542 (2014)

〔学会発表〕(計4件)

(1) 宮本 幸、山内 淳司

Tyro3 受容体と Fyn キナーゼは、ミエリン形成を司る新しいシグナル複合体を形成する

日本分子生物学会・日本生化学会合同年会、2015年12月3日、神戸

(2) 宮本 幸、山内 淳司

Disease-associated modification of hereditary demyelinating disorder-related protein dynamics.
日本神経化学会、2015年9月13日、大宮

(3) 山下 智子、土井 綾乃、小林 桜子、小野 貴史、鈴木 豊、荒木 利博、青木 久範、佐藤 直也、宮本 幸、山内 淳司、板東 良雄、吉田 成考

Derivation of oligodendrocytes from human iPS cells and monkey ES cells maintained in a single-cell and feeder-free culture.

日本神経科学会大会、2015年7月29日、神戸

(4) 宮本 幸、山内 淳司

ErbB2 is required for Schwann cell precursor migration

日本神経科学会大会、2015年7月29日、神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮本 幸 (MIYAMOTO, Yuki)

国立成育医療研究センター・薬剤治療研究部・上級研究員

研究者番号：50235708

(2) 研究協力者

川原 和子 (KAWAHARA, Kazuko)

国立成育医療研究センター