

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591241

研究課題名(和文) 脱髄を伴う神経変性疾患の新規病態メカニズムの解明

研究課題名(英文) Explore a novel mechanism for neurodegenerative disease using Caspr deficient mutant mice

研究代表者

高岸 芳子 (Takagishi, Yoshiko)

名古屋大学・環境医学研究所・助教

研究者番号：50024659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：生後に歩行失調をあらわす突然変異マウス(shambling;shm)の変異遺伝子を同定し、神経系の異常を明らかにした。shmマウスの神経症状は加齢とともに重篤となることから、その病態病理を経時的に解析したところ、発症期には変異遺伝子に起因する部位(有髄神経線維のランビエ絞輪パラノード)にのみ見られた異常が、老齢期には神経細胞死まで波及することが分かった。更に、ヒトの神経変性疾患に共通する病態機序が考えられたことから、ヒトの病態モデルとしてのshmマウスの有用性を示した。

研究成果の概要(英文)：We identified a mutation of the Caspr gene in a mouse mutant shambling (shm). We analyzed dysfunction of the paranode at nodes of Ranvier and impaired nerve conduction in myelinated nerves of shm mice. The shm mice manifest the progressive neurological defect as mice age. We studied a pathophysiological process of the disease in the nervous system of shm mice and found that axons and neurons were severely damaged and resultant loss of neurons occurred in various regions of the nervous system in aged mice but not in young or adult mice. This study is a first demonstration of neuron death in the nervous system among the paranodal mutants. Further in this study we identified various parallelisms between shm mice and human neurodegenerative disease. We would like to propose that our study provides a novel prospect in a study to explore a mechanism of human neurodegenerative disease.

研究分野：医歯薬学・内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：神経変性疾患 ランビエ絞輪 パラノード 遺伝性疾患マウス

## 1：研究開始当初の背景

我々は、生後に失調歩行をあらわす突然変異マウス *shambling* (*shm*) の原因遺伝子を同定して、ランビエ絞輪両側のパラノード部に局在する膜タンパク Caspr をコードする遺伝子の領域内に二塩基の挿入変異を見つけた。この変異は、Caspr タンパクの著しい産生減少と、これによる軸索膜とミエリンループ膜の間に形成される隔壁様の結合装置（パラノードジャンクション）の欠損、さらには、有髄神経線維の興奮伝導の低下をもたらした。このような神経系の異常が、このマウスの神経症状の主たる原因となっていると考えられた。しかしながら、*shm* マウスは長期生存するにも拘わらず、加齢とともに神経症状が進行し、老齢マウスではほぼ歩行不全となる。従って、進行性の神経症状は、(1) どのような病態生理学的な過程を経るのか、また、(2) その機序はどのようなものであるか、そして、(3) 変異遺伝子に起因するパラノードの異常とどのように関わるのかを明らかにする研究を立案した。

## 2：研究の目的

*shm* マウスの進行性の神経症状と加齢との関連を明らかにし、経時的に神経系の異常とその病態変化を解析する。病態進行の機序を解明し、ヒトの神経変性疾患との関連性を検討する。具体的には、幼仔期、成獣期、老齢期のマウスを用いて以下の研究を行う。(1) マウスの行動量や運動パターンを解析する(2) 中枢、末梢神経系の異常を、各部位における有髄神経線維ならびに神経細胞を光学・電子

顕微鏡で観察して明らかにする。(3) 神経線維や神経細胞の機能分子、ならびに変性に関わる分子の発現や分布を免疫組織学的に解析する。(4) 有髄神経線維の興奮伝導を電気生理学的に計測する。

## 3：研究の方法

### (1) マウスの育成

米国ジャクソン研究所から導入した *shambling* マウスを、C57BL/6 マウスに遺伝子導入したコンジェニック系統を確立して、本研究に用いた。実験には、生後2週齢（幼仔期）、生後3～6ヶ月（成獣期）、生後1年齢以上（老齢期）のマウスを用いた。

### (2) 行動の解析は以下の実験を行う。

各年齢段階のマウスをビデオ撮影してその行動パターンを観察する。マウスの前・後肢に塗料を塗布して歩行パターンを観察する。

ホームケージ活動性テストによって、一定時間のマウスの行動量を計測する。オープンフィールドテストを行い、マウスの活動量とパターンを解析する。

### (3) 末梢神経、中枢神経の形態異常を光学・電子顕微鏡によって観察する。

マウスを2%パラフォルムアルデヒド(PFA)・2.5%グルタルアルデヒド固定液で灌流固定し、末梢神経系では坐骨神経、中枢神経系では小脳、脊髄の各組織を摘出した。パラフィンならびに樹脂包埋切片を作成して、それぞれ光学顕微鏡、電子顕微鏡で有髄神経線維や神経細胞の異常を観察した。

(4) 神経細胞や神経線維軸索の変性と細胞死を免疫組織化学的に検討する。

4% PFA 固定液で灌流固定したマウスの各臓器の凍結切片を作成し、免疫組織化学染色に供した。切片は、目的に応じたタンパク分子に対する抗体を用いて免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(5) タンパク量の変化をウェスタンブロット法によって解析する。

坐骨神経、小脳、脊髄の各臓器から、タンパクを抽出し、SDS 電気泳動を行った。分離したタンパクを PDVF 膜に転写した後、抗体と反応させてバンドの検出を行い、定量解析した。

(6) 興奮伝導速度の計測を電気生理学的に行う。

マウスから坐骨神経を取り出し、一定温度(32°C)に保ったチャンパー内に保持した。抹消側に刺激電極を置き刺激を与えた後、中枢側で記録電極から活動電位を測定した。

#### 4: 研究成果

(1) 行動解析による *shm* マウスの神経症状の進行

神経症状を発症した直後の幼仔期の *shm* マウスは、後肢の外側への伸展によりふらつき、歩行パターンや運動量に正常マウスとの違いがみられた。成熟期 *shm* マウスも同様であったが、症状の進行はみられなかった。しかしながら、月齢とともに後肢の麻痺が顕著となり、老齢 *shm* マウスでは下半身がほぼ不動となった。運動量は有意に低下しており、歩行

パターンも著しく乱れていた。

(2) 有髄神経線維、神経細胞の形態学的な異常

微細構造の異常: 幼仔期の異常としては、パラノードジャンクションの欠失とミエリンループの反転(中枢の有髄神経線維でのみ)が観察された。成獣期では、パラノードとその周辺域(ランビエ絞輪の絞輪部位)の軸索細胞質内に、肥大したミトコンドリアなど細胞内小器官(オルガネラ)の異常な蓄積が観察された。老齢期になると、ランビエ絞輪間の軸索細胞質内にも種々の異常なオルガネラが存在した。これらのオルガネラには、オートファジーに関連した封入体が多く局在していたことから、軸索変性にはオートファジーが関連していると考えられた。また、小脳、脊髄の神経細胞の細胞質にも同様な構造物が存在した。しかしながら、パラノード構造の異常は、幼仔期と同様であり、加齢による異常の進行はみられなかった。

光学顕微鏡的観察: 坐骨神経組織切片の定量解析によって、老齢期では太い有髄神経線維(運動神経線維)が有意に減少していることが明らかとなった。神経細胞特異染色によって、小脳ではプルキンエ細胞の多量の脱落が観察された。

(3) 神経特異分子の免疫組織細胞化学ならびにウェスタンブロット法による研究  
軸索の主要な細胞骨格タンパクであるニューロフィラメント(NF)の発現と分布を、

リン酸化、非リン酸化抗 NF 抗体を用いて検討した。坐骨神経の有髄神経軸索では、老齢期の正常マウスで主に発現・分布しているリン酸化 NF が、*shm* マウスでは減少しており、逆に非リン酸化 NF が幼仔期同様に高く発現していた。小脳プルキンエ細胞では、成獣期から局所的に肥大した軸索内にリン酸化、非リン酸化 NF が集積した。老齢期では、残存しているプルキンエ細胞の軸索肥大部にリン酸化 NF が、細胞体には非リン酸化 NF がそれぞれ凝集していた。更に、これらの部位には、オートファジー特異分子 LC3 が局在した。

#### (4) 坐骨神経における複合活動電位の測定

坐骨神経の興奮伝導速度は、各年齢において、*shm* マウスで有意に低下した。しかしながら、老齢期における速度の低下に成獣期からの有意な減少はみられず、加齢による興奮伝導遅延の進行はないと考えられた。一方、活動電位の大きさをあらかず peak amplitude は、成獣期と老齢期の *shm* マウスで有意に低下し、老齢期では更に低下が進行した。組織学的な研究では、老齢マウスの坐骨神経で運動神経線維が脱落しており、この結果と一致する。

以上の研究から、*shm* マウスの神経系では *Caspr* 遺伝子の変異によって発症した有髄神経線維パラノードの構造異常が、加齢とともに、神経軸索の全域に更には神経細胞体にも波及し、神経細胞死をもたらしたと考えられた。この病態進行過程には軸索骨格タ

ンパク NF の発現とリン酸化動態の異常、さらにオートファジーの破綻が関与していると考えられる。このような病態機序は、ヒトの神経変性疾患においても提唱されていることから、*shm* マウスの病態モデルとしての有用性が示された。本研究は、現在国際雑誌に投稿中である。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計6件)

1: 高岸芳子, 鴻田一絵, 村田善晴: 有髄神経線維パラノードルジャンクションの欠失がもたらしたオートファジー様神経細胞死. 第35回日本神経科学大会. 2012年9月18-21日. 名古屋国際会議場(名古屋市)

2: Yoshiko Takagishi, Yusuke Yanagi, Ichie Koda, Yoshiharu Murata. Defect of neuron-glia interaction at the paranode alters the axonal structure and causes autophagic neuronal cell death in shambling mice with a *Caspr* mutation. 42th Annual Meeting of Society for Neuroscience. October 13-17, 2012, New Orleans, USA

3: 高岸芳子, 佐々木郁磨, 村田善晴: 有髄神経線維パラノードタンパクに遺伝子変異を持つ shambling マウスにみられる神経軸索変性の分子基盤. 第36回日本神経科学大会・第56回日本神経化学学会大会・第23回日本神経回路学会大会. 2013年6月20-23日. 国立京都国際会館(京都市)

4 : Yoshiko Takagishi, Kimiaki Katanosaka, Ikuma Sasaki, Yoshiharu Murata. Axonal pathology in myelinated nerves of a *Caspr* mutant mouse with deficient paranodal junctions at the paranode. 43th Annual Meeting of Society for Neuroscience. November 9-13, 2013, San Diego, USA

5: 大堀洋揮、高岸芳子: ランピエ絞輪パラノードに異常を持つ shamb ling マウスの小脳では、加齢によってプルキンエ細胞の軸索変性と細胞死が進行する。第 37 回日本神経科学大会. 2014 年 9 月 11-13 日. パシフィコ横浜 (横浜市)

6 : Yoshiko Takagishi, Hiroki Oohori, Hiroyuki Mizoguchi. Impaired axon-glia interactions cause axonal degeneration and cell death of neurons in the cerebellum of *Caspr*-deficient shamb ling mice with progressive neurological phenotypes in aging. 44th Annual Meeting of Society for Neuroscience. November 15-19, 2014, Washington DC, USA

(1)研究代表者

高岸 芳子 ( TAKAGISHI, Yoshiko )  
名古屋大学・環境医学研究所・助教  
研究者番号 : 50024659

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

片野坂 公明 ( KATANOSAKA, Kimiaki )  
中部大学・生命健康科学部・生命医科学科・  
准教授

溝口 博之 ( MIZOGUCHI, Hiroyuki)

名古屋大学・環境医学研究所・次世代創薬研究センター・助教

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

6 . 研究組織