

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：63904

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830050

研究課題名(和文) 受容体型蛋白質チロシン脱リン酸化酵素によるオリゴデンドロサイト分化制御機構の解明

研究課題名(英文) Determination of the receptor type protein tyrosine phosphatase of to the oligodendrocyte differentiation

研究代表者

久保山 和哉 (KUBOYAMA, Kazuya)

基礎生物学研究所・統合神経生物学研究部門・特別協力研究員

研究者番号：20619671

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題の目的は、オリゴデンドロサイトの分化とミエリン化/再ミエリン化を抑制的に調節している受容体型タンパク質チロシン脱リン酸化酵素(RPTP)であるPTPRZの活性を調節している機構の解明である。脱髄疾患病態モデル動物や、我々が新たに樹立したオリゴデンドロサイト系譜細胞であるOL1細胞を用いた検討を行った結果、脱髄時に神経軸索から放出されるpleiotrophinが、周囲のオリゴデンドロサイト前駆細胞の膜上に存在する受容体型のPTPRZに作用し、PTPRZの酵素活性を抑制することによって、オリゴデンドロサイトの分化抑制が解除されて、再ミエリン化が促進していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to determine the regulatory mechanism of protein tyrosine phosphatase receptor type Z (PTPRZ), which inhibits oligodendrocyte differentiation and myelination/remyelination. Here we revealed that the expression of pleiotrophin is transiently upregulated in damaged neurons after demyelination. Pleiotrophin may be released from demyelinated axons and bind to PTPRZ at the cell surface of oligodendrocyte precursor cells, thereby releases the block of differentiation into oligodendrocyte, so the remyelination of neighboring axon is initiated.

研究分野：神経薬理学

 キーワード：神経科学 タンパク質チロシンリン酸化シグナル チロシンホスファターゼ オリゴデンドロサイト
 脱髄疾患 グリア細胞 脳・神経

1. 研究開始当初の背景

髄鞘(ミエリン鞘)は、オリゴデンドロサイトがその細胞膜を神経軸索に巻き付けることによって形成される。ミエリン鞘による絶縁は、跳躍伝導と呼ばれる非常に速い神経伝導に必須である。ミエリン鞘が損なわれる脱髄疾患では、四肢の麻痺や失明などの神経症状が引き起こされるが、最も有名な脱髄疾患である多発性硬化症は、厚生労働省の指定難病の一つで、有効な治療法の確立が待ち望まれている。

脱髄疾患に対する既存治療は、炎症や自己抗体によるミエリン鞘の破壊の抑制が主体であるが、近年、脱髄の修復を効果的に促す、再ミエリン化誘導薬の開発が根治的な治療につながる創薬コンセプトとして注目されている(図1)。

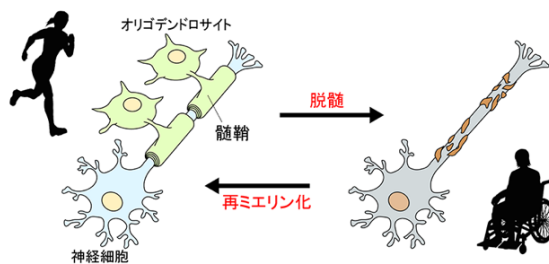


図1: 脱髄と再ミエリン化

脳神経系の有髄神経の軸索は、オリゴデンドロサイトの細胞膜で覆われている。この覆われた部分は髄鞘と呼ばれ、絶縁シートとして働く。健康人では、髄鞘が傷ついても修復(再ミエリン化)されるが、脱髄疾患では、この髄鞘がひどく損傷した状態になっており、運動障害などが引き起こされる。

オリゴデンドロサイト前駆細胞(OPCs)の分化・成熟および、ミエリン鞘の形成は、チロシンキナーゼ(PTK)とチロシンホスファターゼ(PTP)で制御されるタンパク質の特定のチロシン残基の可逆的なリン酸化修飾反応が関与する事が知られている(*J Neurobiol.* **49**: 62-78, 2001)。

我々は、これまでに、受容体型PTPに属するPTPRZの遺伝子欠損(*Ptprz*-KO)マウスでは、脳内のミエリン鞘の形成時期が早まっており、脱髄疾患病態モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAEモデル)に対して抵抗性を示すことを明らかにしていた(*PLoS ONE* **7**: e48797, 2012)。この先行知見は、PTPRZのホスファターゼ活性を阻害する事によって再ミエリン化を促進できる可能性を示した。しかしこれまで、再ミエリン化時におけるPTPRZの活性制御機構は判っていなかった。

2. 研究の目的

本研究課題では、オリゴデンドロサイトの分化とミエリン化/再ミエリン化を抑制的に調節している受容体型PTPであるPTPRZの活性を調節している機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 脱髄・再ミエリン化におけるPTPRZの機能的関与の解析

① 野生型または*Ptprz*-KOマウスに2%クプリゾンが含有した餌を6週間与えることによって脱髄を誘発した。その後、通常の餌に戻し、5週間の再ミエリン化を誘導した。

② クプリゾン投与試験に供したマウスから、経時的に脳を採取し、パラホルムアルデヒドで固定した。脱髄の程度を定量的に評価するために、小型動物用X線コンピューター断層撮影(マイクロX-CT)、ルクソールファストブルー染色(ミエリン鞘染色)、抗ミエリン塩基性タンパク質(MBP)に対する免疫組織染色を実施した。

③ 脱髄・再ミエリン化時におけるPTPRZシグナルを解析するために、上記の脳切片をPTPRZ関連分子に対する抗体を用いて免疫組織染色した。

(2) オリゴデンドロサイトの分化・成熟におけるPTPRZの機能的関与の解析

① 野生型および*Ptprz*-KOのマウス新生児脳由来の混合グリア細胞の初代培養系を用いて、pleiotrophin-PTPRZシグナルがオリゴデンドロサイトへの分化・成熟に与える影響を解析した。

② *p53*-KOマウスの脳由来細胞から、オリゴデンドロサイト系譜細胞であるOLI細胞を樹立し、pleiotrophinがPTPRZの基質分子のチロシンリン酸化に与える影響について生化学的な解析を実施した。

4. 研究成果

ミエリン鞘を選択的に破壊するクプリゾンを含む食餌を野生型および*Ptprz*-KOマウスに6週間与えたところ、両者の脳梁部に誘導された脱髄は同程度であったことから、クプリゾンに対するオリゴデンドロサイトの抵抗性にPTPRZは関与しないと判断された。一方、脱髄誘発後からの回復(再ミエリン化)に関しては、*Ptprz*-KOマウスは野生型マウスよりも早いことが判明した(図2)。すでに我々は、PTPRZがオリゴデンドロサイトの分化に対して抑制的に働くことは明らかにしていた(*PLoS ONE* **7**: e48797, 2012)。そのため、脱髄部位が再ミエリン化される際には、PTPRZの活性が抑制されているのではないかと考えた。そこでPTPRZおよびPTPRZに対して抑制的に働くことが培養細胞レベルで実証されている内因性リガンド分子の発現を免疫組織染色によって詳細に調べたところ、PTPRZのリガンド分子の一つであり、健全な成体脳組織でほとんど産生されていないpleiotrophinが、脱髄誘導時に発現していることが見出された。興味深いことに、この発現は、一過性であり、再ミエリン化が進行するにつれて健全状態のレベルまで低下した(図3A, B)。細胞マーカーとの共染色の結果、脳梁部の

pleiotrophin は、ダメージを受けた神経軸索のマーカであるアミロイドβ前駆タンパク質 (APP) と共局在しており、脳梁に交連線維を送る大脳皮質に存在するニューロン内においても検出された。大脳皮質ニューロンにおける pleiotrophin のパッチ状の染色は、神経ベシクルマーカーのシナプシン (SYN1) と共局在していた (図 3C)。以上の結果は、クプリゾン投与による脱髄でダメージを受けたニューロンが pleiotrophin を発現し、それを軸索輸送に乗せて脱髄部位から放出し、それが OPC 膜上の PTPRZ に作用して、オリゴデンドロサイトへの分化を促している可能性が考えられた。

実際、pleiotrophin を野生型マウス新生児脳由来の初代培養混合グリア細胞に作用させたところ、オリゴデンドロサイトへの成熟が促進し、*Ptprz*-KO マウス由来のグリア細胞に対して pleiotrophin は分化促進作用を示さないことが判明した (図 4)。しかしこれだけでは、この pleiotrophin のオリゴデンドロサイトの分化促進作用が PTPRZ の細胞内ホスファターゼ活性の抑制によるものとする証明には十分でない。

そこで、我々は、*p53*-KO マウスの新生児脳より、分化能を保持したオリゴデンドロサイト系譜 OL1 細胞を樹立し、これまで混合グリア細胞ではできなかった、リン酸化分子の生化学的解析を可能にした (図 5A)。未分化状態の OL1 細胞には、*in vivo* における PTPRZ と同様にコンドロイチン硫酸糖 (CS) 鎖によって高度に修飾されており、初代培養グリア細胞と同様に pleiotrophin 刺激によって分化が促進することも確認された (注: PTPRZ の CS 鎖は pleiotrophin の高親和性結合サイトの形成に必須である; *J Cell Biol.* **142**: 203-216, 1998)。この OL1 細胞を pleiotrophin で刺激すると、PTPRZ の生理的基質分子で、オリゴデンドロサイトの分化を制御する細胞シグナルの重要な中継分子である p190RhoGAP のチロシンリン酸化が亢進することが実証された (図 5B)。

以上、本研究課題の成果をまとめると、脱髄によって傷ついたニューロンは pleiotrophin を産生し、それが軸索上の脱髄部位から分泌されることで、その周囲に存在する OPCs の PTPRZ が抑制され、これによってオリゴデンドロサイトへの局所的な分化と再ミエリン化が効率的に進められる新規なメカニズムが提唱された (図 6)。またこのことは、多発性硬化症などの脱髄病巣部に存在する未分化状態の OPCs を積極的に分化させる創薬標的として PTPRZ の高い有望性を示した。

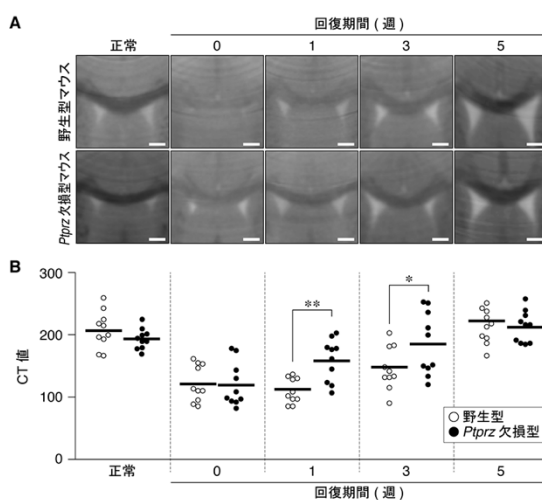


図2: *Ptprz*-KOマウスにおける再ミエリン化の促進

A, 野生型および *Ptprz*-KOマウスにクプリゾン食餌を与え、脳梁領域における脱髄の回復過程をX線CTで観察した。脱髄が進むと脳梁部のCT値が増加 (黒色から白色) する。B, CT値の定量評価。各丸はマウス1個体の数値であり、横線はそれらの平均値を示している。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

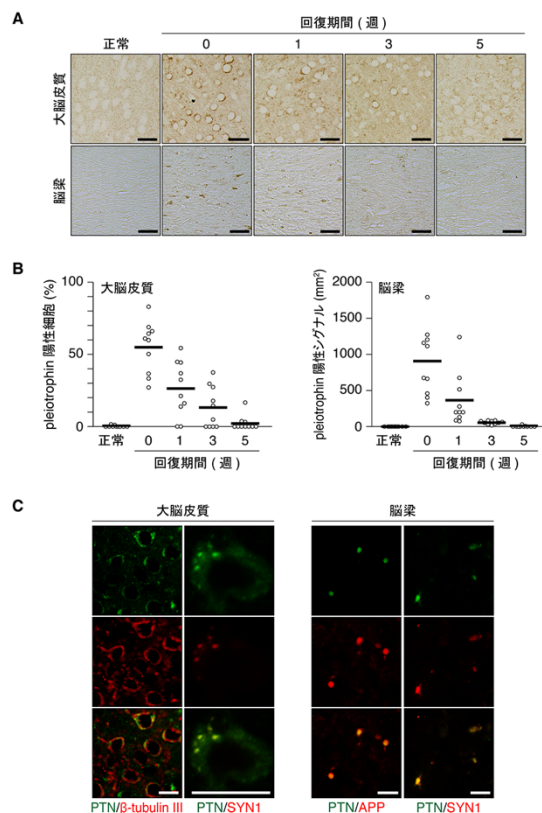


図3: クプリゾン脱髄によるpleiotrophinの一過性発現

A, B, クプリゾンを含む餌をマウスに6週間与えて脱髄を誘導した (0週)。その後、通常餌に戻し1~5週間回復させた。正常群は通常餌のみで飼育した。大脳皮質と脳梁 (ミエリン鞘をもつ有髄神経繊維束の通る部分) における pleiotrophin の免疫組織染色 (A) とその定量評価 (B)。各丸はマウス1個体の数値であり、横線はそれらの平均値を示している。C, 大脳皮質および脳梁における pleiotrophin (緑色) と β -tubulin III (神経細胞のマーカー) (赤色) の免疫蛍光染色像。最下段は上の二つの重ね合わせ。黄色は赤色と緑色のシグナルが重なっていることを示す。

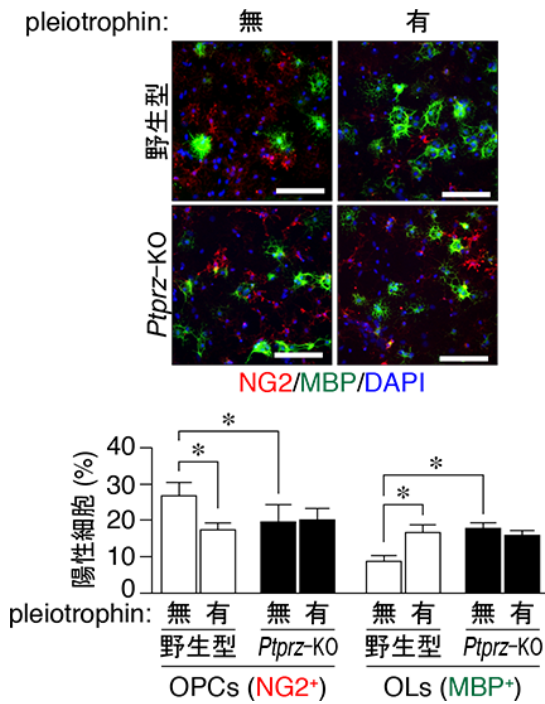


図4: pleiotrophinによるPTPRZを介したオリゴデンドロサイトの分化成熟の促進

初代培養混合グリア細胞に対するpleiotrophinの作用。野生型もしくはPtpz-KOマウス脳由来細胞をpleiotrophinの有もしくは無の状態にて6日間培養した。野生型由来細胞ではpleiotrophin存在下では、NG2陽性のOPCs (赤色)が減り、MBP 陽性のオリゴデンドロサイト (緑色)が増えている。一方、Ptpz-KO由来細胞は既に分化が促進しているが、pleiotrophinを追加しても、相加的な効果は見られない。* $P < 0.05$ 。

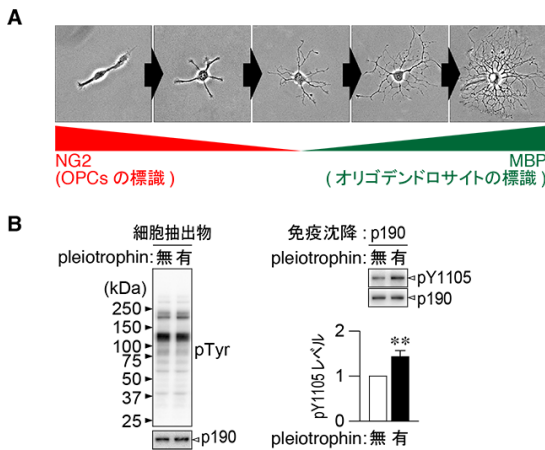


図5: pleiotrophinによるPTPRZのホスファターゼ活性の抑制

A, OL1細胞のOPCsからオリゴデンドロサイトへの分化の様子。未分化なOL1細胞には、OPCsのマーカ分子であるNG2が多く発現している。一方、成熟したOL1細胞では、NG2の発現は消失し、オリゴデンドロサイトのマーカ分子であるMBPが発現するようになる。分化に伴い、細胞形態は双極状から複数のプロセス (突起) が伸出し、さらに複雑な網の目状のプロセスをもつものに変化していく。B, p190 RhoGAPのリン酸化状態に対するpleiotrophinの効果。OL1細胞をpleiotrophinの有もしくは無の状態にて1時間培養した。p190 RhoGAPの1105番目のチロシンリン酸化レベルはpleiotrophinによって有意に上昇している。** $P < 0.01$ 。

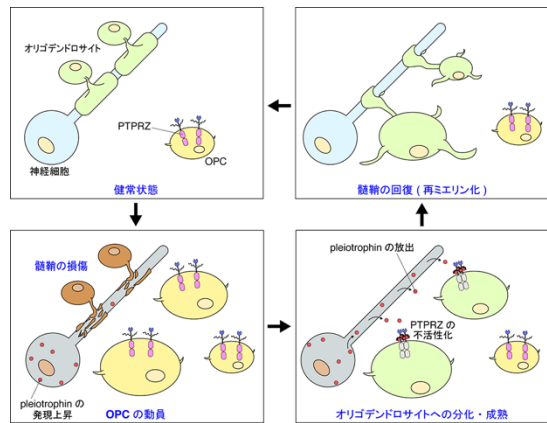


図6: 脱髄修復を促すpleiotrophin-PTPRZシグナリング
髄鞘が壊れていない状態では、PTPRZはOPCsの未分化状態の維持に働いている (左上)。髄鞘が傷つくと、神経細胞はpleiotrophinを産生し、これを神経軸索から放出すると考えられる。また脱髄の生じた領域にはOPCsが集まってくるが、OPCsの集積にはPTPRZやpleiotrophinは関与していないようである (左下)。放出されたpleiotrophinは、OPCs上のPTPRZに結合することで分化抑制ブレーキを解除し、オリゴデンドロサイトへの分化・成熟を促し (右下)、オリゴデンドロサイトが再び髄鞘をつくることで神経機能は回復する (右上)。

本研究課題の成果は、多発性硬化症などの脱髄疾患において再ミエリン化を積極的に促すような薬剤として、PTPRZの働きを止める化合物の有望性を示している。また、本研究の成果には以下のようなミエリン化促進薬の探索を推進する新技術が含まれている。培養細胞を用いたバイオアッセイは、化合物の初期評価で最も重要視されるステップである。これまでミエリン化促進の評価系の多くは、実験ごとにマウスやラット脳から細胞を分離して行われてきたが、本課題ではマウスからOPCsの形質を良好に保存したオリゴデンドロサイト系譜細胞 (OL1細胞) を樹立した。OL1細胞は、適切な培養下で成熟したオリゴデンドロサイトへと再現良く分化する (動画参照:オリゴデンドロサイトOL1細胞)。OL1細胞を評価系として用いることで、化合物の生物活性の評価の迅速化が期待できる。

また、これまで脱髄やその回復を評価する方法は、動物から脳を取り出し、パラフィン組織切片を作成し、ルクソールファストブルー (髄鞘の染色法) などの組織染色によって行われていた。この方法は多くの時間と熟練した技術を必要とするが、これに変わる簡便な解析手法の開発にも成功した。取り出した脳を造影剤に浸漬し、コンピューター断層 (CT) 撮影することで、脱髄の程度が定量的に評価できることを見出し、この原理を用いた評価系を実用化した (動画参照:マウス脳のX線CT)。CT解析後のサンプルは、通常の組織解析にも利用可能であることも大きな利点である。in vivoにおける薬効評価の定量性の向上とともに、迅速化と低コスト化につながる新技術である。

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5件)

① Fujikawa A, Nagahira A, Sugawara H, Ishii K, Imajo S, Matsumoto M, Kuboyama K, Suzuki R, Tanga N, Noda M, Uchiyama S, Tomoo T, Ogata A, Masumura M, and Noda M. “Small-molecule inhibition of PTPRZ reduces tumor growth in a rat model of glioblastoma.” *Sci Rep* 6: 20473, 2016 (査読有)
<http://dx.doi.org/10.1038/srep20473>

② Kuboyama K, Fujikawa A, Suzuki R, and Noda M. “Inactivation of protein tyrosine phosphatase receptor type Z by pleiotrophin promotes pemyelination through activation of differentiation of oligodendrocyte precursor cells.” *J Neurosci* 35: 12162–12171, 2015 (査読有)
<http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2127-15.2015>

③ Almuriekhi M, Shintani T, Fahiminiya S, Fujikawa A, Kuboyama K, Takeuchi Y, Nawaz Z, Nadaf J, Kamel H, Kitam AK, Samiha Z, Mahmoud L, Ben-Omran T, Majewski J, and Noda M. “Loss of function mutation in APC2 causes Sotos Syndrome features.” *Cell Reports* 10: 1585–1598, 2015 (査読有)
<http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2015.02.011>

④ Fujikawa A, Matsumoto M, Kuboyama K, Suzuki R, and Noda M. “Specific dephosphorylation at tyr-554 of git1 by ptpz promotes its association with paxillin and hic-5.” *PLoS ONE* 10: e0119361, 2015 (査読有)
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0119361>

⑤ Matsumoto M, Hiyama TY, Kuboyama K, Suzuki R, Fujikawa A, and Noda M. “Channel properties of Nax expressed in neurons.” *PLoS ONE* 10: e0126109, 2015 (査読有)
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0126109>

〔学会発表〕(計4件)

① 久保山和哉, 藤川顕寛, 鈴木亮子, 野田昌晴 “pleiotrophin-PTPRZ シグナルによるオリゴデンドロサイトの分化と再ミエリン化の制御機構” 『第7回日本ホスファターゼ研究会学術集会』、愛知県岡崎市(岡崎カンファレ

ンスセンター)、2016年01月29日～2016年01月30日

② 久保山和哉, 藤川顕寛, 鈴木亮子, 野田昌晴 “Role of Pleiotrophin-PTPRZ Signaling in Oligodendrocyte Differentiation and Remyelination.” 『第88回日本生化学会大会』、兵庫県神戸市(神戸ポートアイランド)、2015年12月01日～2015年12月04日

③ 新谷隆史, Fahiminiya S, Almuriekhi M, 藤川顕寛, 久保山和哉, 竹内靖, Nawaz Z, Nadaf J, Kamel H, Kitam AK, Samiha Z, Mahmoud L, Ben-Omran T, Majewski J, 野田昌晴 “Loss of function mutation in APC2 causes Sotos Syndrome features.” 『第38回日本神経科学大会』、兵庫県神戸市(神戸ポートアイランド)、2015年07月28日～2015年07月31日

④ Fujikawa A, Matsumoto M, Kuboyama K, Suzuki R, and Noda M. “Specific dephosphorylation at tyr-554 of git1 by ptpz promotes its association with paxillin and hic-5.” 『第11回プロテインホスファターゼ国際カンファレンス』、宮城県仙台市(東北大学)、2014年11月12日～2014年11月14日

〔その他〕

① 髄鞘再生に関わる分子機構の解明 ～神経回路の絶縁シートが回復する仕組み～
<http://www.nibb.ac.jp/press/2015/09/03.html>

② オリゴデンドロサイト系譜 OLI 細胞 (YouTube 動画)
<https://www.youtube.com/watch?v=nqxigfwvJ4I>

③ マウス脳のX線CT (YouTube 動画)
https://www.youtube.com/watch?v=O_ReIADiR0I

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保山 和哉 (KUBOYAMA, Kazuya)
基礎生物学研究所・統合神経生物学研究部門・特別協力研究員
研究者番号：20619671