

## 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：34310

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15342

研究課題名(和文) 中枢神経系における無髄学創成へのチャレンジ

研究課題名(英文) The challenge for the study of unmyelinated fibers in central nervous system

研究代表者

貫名 信行 (Nukina, Nobuyuki)

同志社大学・脳科学研究科・教授

研究者番号：10134595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経系における無髄神経の存在部位の確認に関しては、現在のところ既報のようにNav1.2が瀰漫性に軸索上に存在することが無髄神経のマーカーとなることに基づき、中枢神経系の無髄神経を網羅的に同定している。線条体投射線維、小脳平行線維、海馬苔状線維などの既知の線維に加え、脳梁、分界条にNav1.2の分布が瀰漫性に存在する繊維の存在を認めている。電子顕微鏡による検討においても脳梁、分界条に無髄繊維の存在を認め、現在免疫電顕による確認を行っている。

研究成果の概要(英文)：Unmyelinated fibers in central nervous systems(CNS) are not well known. Recently, we found Nav 1.2 localizes on the axons of unmyelinated fibers diffusely, not as concentrated localization in the Ranvier nodes on myelinated fibers. Based on this property, we investigated the localization of unmyelinated fibers in the CNS of mice. We found Nav 1.2 diffuse localization on the axons of mossy fibers in hippocampus, parallel fibers in cerebellum, and projection fibers of striatum which are already know to be unmyelinated. In addition to those fibers, we found diffuse localization of Nav 1.2 on the axons in stria terminals and some part of corpus callosum. We also found unmyelinated fibers by electron microscopy. The results suggest, there are still unknown or uninvestigated unmyelinated fibers in CNS.

研究分野：病態脳科学

キーワード：無髄神経 Nav1.2 有髄神経

## 1. 研究開始当初の背景

われわれはハンチントン病における遺伝子発現異常を検討し、sodium channel beta4 subunit(以下 beta4 subunit)が早期からモデルマウスにおいて減少していること、また剖検脳においても発現が低下していることを見出した(Oyama F et al J Neurochem 2006)。Beta4 subunit はナトリウムイオンが通過するチャンネルポア部分を形成する  $\alpha$  subunit に beta1 subunit とともに付帯し(アクセサリサブユニット)、イオンチャンネルの機能を制御していると考えられている。一方われわれは beta subunit1-4 が細胞接着因子類似の構造を持っていることから、アルツハイマー病のアミロイド前駆タンパク質(APP)と同様に  $\beta$  セクレターゼと  $\gamma$  セクレターゼによって切断される基質であることを報告した(Wong HK et al J Biol Chem 2005)。また beta4 subunit の発現が突起伸長を引き起こし、これが  $\beta$  セクレターゼ(BACE1)によって制御されることも報告した(Miyazaki H et al BBRC 2007)。そこでわれわれは beta4 subunit の発現低下がどのような病態を引き起こすかを明らかにするため、ノックアウトマウスを作製し、その症状や病理像を検討していたが、beta4 subunit の局在を検討していたところ、beta4 subunit は錐体路や小脳などでは Ranvier node や axon initial segment に局在するが、線条体においては軸索に瀰漫性に存在し、他の系のような局在を認めなかった。さらに beta4 subunit のプロモーターによって蛍光タンパク質 Venus を発現するトランスジェニックマウスを作製したところ、Venus が発現した軸索には sodium channel の Ranvier node への局在が認められなかった。Beta4 subunit は線条体においては medium spiny neuron(MSN)に発現しており、黒質、淡蒼球のそれぞれに投射するニューロンに発現している。この投射線維において Ranvier node が存在しないことを様々な方法で確認することにより、また免疫電顕の検討によって、線条体投射線維は無髄線維であることを明らかにした(Miyazaki et al Nat Commun 2014)。この研究を行っていく過程で、中枢神経系における無髄線維の役割は明らかになっておらず、脊椎動物において伝導効率の良い有髄線維が形成されたのに対して、無髄線維は単純に遅れた系と考えられており、その存在意義の考察すらなされていないことに気づいた。

## 2. 研究の目的

これまでほとんど解明されていなかった中枢神経系における無髄神経の存在意義を明らかにする。中枢神経系における無髄神経の分布を詳細に検討し、さらにこれと有髄神経系との比較から、中枢神経系における髄鞘形成のメカニズム：有髄無髄の制御機構解明の研究基盤を形成し、無髄神経の研究領域「無

髄学」を形成する。この領域の形成により、ハンチントン病、パーキンソン病など基底核疾患の新たな病態研究、治療法開発に結びつく可能性がある。

## 3. 研究の方法

### (1)MSN の遺伝子発現解析：無髄線維ニューロン特異発現の検討

本研究では線条体 MSN における、ハンチントン病モデルマウスの遺伝子発現異常の検討の際に得られたデータを利用した。MSN で Venus を発現するトランスジェニックマウス (*Scn4b-Venus*) と HD トランスジェニックマウス (R6/2) を交配し、FACS (BD Biosciences) を用いてマウス線条体から MSN を精製した。本研究は早期に変動する遺伝子に着目しているため 4 週齢のマウスを使用した。精製 MSN サンプルは HD マウス (R6/2;*Scn4b-Venus*) とコントロールマウス (WT;*Scn4b-Venus*)、それぞれ 4 例ずつ用意した。これらのサンプルから Total RNA を抽出し、Ovation Pico WTA System V2 (NuGEN) により cDNA の増幅を行い、ラベル化して SurePrint G3 Mouse GE 8x60K Microarray Kit (Agilent) にハイブリダイズした。正規化は GeneSpring GX 13.1.1 (Agilent) を用いて 75 percentile shift で行った。統計処理は student t-test を行い、*p*-value cut-off は蛋白質をコードする遺伝子では 0.01、lncRNA は 0.05 とした。また Raw signal cut-off は蛋白質をコードする遺伝子では 500 に設定したが、lncRNA は発現量が低いため行わなかった。これらの条件を満たしサンプル間で 1.5 倍以上の発現変動が認められる遺伝子を抽出した。

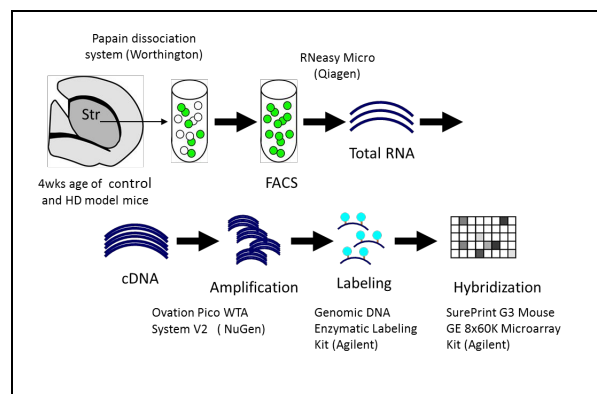


図 1. MSN サンプルの調整とマイクロアレイ解析

### (2)大脳皮質神経細胞における無髄神経の同定

大脳皮質神経細胞において無髄神経が存在するかどうかはこれまで明確には認識されていなかった。われわれは上記線条体無髄神経の存在の検討の過程で Nav1.2 が無髄神経の軸索にびまん性に存在することを同定した(Miyazaki et al Nat Commun 2014)。そこ

で中枢神経における Nav1.2 の染色性から無髄神経を投射している細胞の同定を試みることにした。

#### 4. 研究成果

##### (1) MSN の遺伝子発現解析: 無髄線維ニューロン特異発現の検討

マウス線条体から精製した MSN 画分から MSN 以外の細胞が除去されていることを確かめるため、細胞特異的な発現を示す遺伝子のプライマーを用いて RT-PCR を行った。

すると MSN 画分ではオリゴデンドロサイト、アストロサイト、マイクログリア、インターニューロン特異的遺伝子の発現が著しく減少した。この結果は FACS によって MSN のみを精製することに成功したことを示している。ところがわれわれが MSN を分離し、遺伝子発現を DNA array によって検討したところ、ミエリン塩基性タンパク質 (MBP) が発現しているという結果を得た。しかしながら、MBP は中枢神経の髄鞘形成に関わるオリゴデンドロサイトに発現する分子であるが、無髄神経系では当然ながら MBP 発現と軸索が解離している。この奇妙な結果を検討したところ、MBP はゲノム上 Golli と呼ばれる分子の下流にあり、Golli と MBP の一部が融合した分子が発現することが知られており、実際発現していたのは Golli であった。Golli は小脳平行線維や海馬の苔状線維に発現することも知られており (Landry et al. J. Neurosci 1996)、無髄特異的分子である可能性が高い。さらに発達過程で髄神経の多い領域の神経細胞で発現が減少する。Golli は興味深いことに脊椎動物で髄神経がないヤツメウナギにおいても発現しており、ヤツメウナギにおいては真の MBP はゲノムにみられない (Werner HB Front Cell Neurosci 2013)。この事実は MBP シークエンスが Golli の下流に挿入された後、有髄神経が現れた可能性を示唆している。

われわれも *in situ* hybridization により、Golli の発現を検討したが、上記の無髄神経を投射している神経細胞を中心に発現していることが示唆された。今後これらの神経細胞における機能を明らかにするため、Golli コンディショナルノックアウトマウスを作製する予定である。

##### (2) 大脳皮質神経細胞における無髄神経の同定

すでに beta4 subunit による瀰漫性の染色が無髄神経の特徴であることを報告しているが (Miyazaki et al Nat commun 2014)、これは beta4 発現細胞についてのみいえることであり、新たな無髄神経の同定にはより広範囲の神経細胞に関して特徴的な染色を示すマーカーが必要であった。この点に関しては sodium channel subunit の一つである Nav1.2 が線条体投射線維、小脳平行線維、海馬苔状線維を瀰漫性に染めることから、より

広範な無髄神経のマーカーとなる。われわれはすでに Nav1.2 に対するホルマリン固定標本でも染色可能なモノクローン抗体を作製している。なお有髄線維では Ranvier node には Nav1.6 が存在する。現在 Nav1.2 の染色性から脳梁の一部、分界条床核からの線維が無髄であることが示唆されており (図 2)、これについて免疫電顕などの手法で確定しようとしている。また起始細胞の同定が重要であるので、想定される起始細胞に GFP を発現して、その軸索と Nav1.2 の染色性が一致するかどうかを検討する予定である。

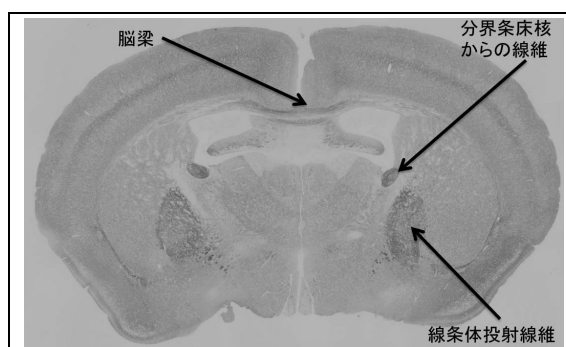


図 2 Nav1.2 による染色。線条体投射線維、分界条床核からの線維、脳梁 (膨大部ではより強染する部分が存在する) に強染する部分が存在し、無髄線維の存在が示唆される。

#### 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 17 件)

1. Yamanaka T, Tosaki A, Miyazaki H, Kurosawa M, Koike M, Uchiyama Y, Maity SN, Misawa H, Takahashi R, Shimogori T, Hattori N, Nukina N. Differential roles of NF-Y transcription factor in ER chaperone expression and neuronal maintenance in the CNS. Sci Rep. 2016;6:34575. 査読有 doi: 10.1038/srep34575.
2. Kino Y, Washizu C, Kurosawa M, Yamada M, Doi H, Takumi T, Adachi H, Katsuno M, Sobue G, Hicks GG, Hattori N, Shimogori T, Nukina N. FUS/TLS acts as an aggregation-dependent modifier of polyglutamine disease model mice. Sci Rep. 2016;6:35236. 査読有 doi: 10.1038/srep35236.
3. Kurosawa M, Matsumoto G, Sumikura H, Hatsuta H, Murayama S, Sakurai T, Shimogori T, Hattori N, Nukina N. Serine 403-phosphorylated p62/SQSTM1 immunoreactivity in inclusions of neurodegenerative diseases. Neurosci Res. 103:64-70(2016). 査読有 doi:

- 10.1016/j.neures.2015.08.002.
4. Misawa H, Inomata D, Kikuchi M, Maruyama S, Moriwaki Y, Okuda T, Nukina N, Yamanaka T. Reappraisal of VAcHt-Cre: Preference in slow motor neurons innervating type I or IIa muscle fibers. *Genesis*. 2016;54(11):568-72. 査読有 doi: 10.1002/dvg.22979.
  5. Ohno M, Kimura M, Miyazaki H, Okawa K, Onuki R, Nemoto C, Tabata E, Wakita S, Kashimura A, Sakaguchi M, Sugahara Y, Nukina N, Bauer PO, Oyama F. Acidic mammalian chitinase is a proteases-resistant glycosidase in mouse digestive system. *Sci Rep*. 2016;6:37756. 査読有 doi: 10.1038/srep37756.
  6. Shimizu H, Miyazaki H, Ohsawa N, Shoji S, Ishizuka-Katsura Y, Tosaki A, Oyama F, Terada T, Sakamoto K, Shirouzu M, Sekine S, Nukina N, Yokoyama S. Structure-based site-directed photo-crosslinking analyses of multimeric cell-adhesive interactions of voltage-gated sodium channel beta subunits. *Sci Rep*. 2016;6:26618. 査読有 doi: 10.1038/srep26618.
  7. Freyermuth F, Rau F, Kokunai Y, Linke T, Sellier C, Nakamori M, Kino Y, Arandel L, Jollet A, Thibault C, Philipps M, Vicaire S, Jost B, Udd B, Day JW, Duboc D, Wahbi K, Matsumura T, Fujimura H, Mochizuki H, Deryckere F, Kimura T, Nukina N, Ishiura S, Lacroix V, Campan-Fournier A, Navratil V, Chautard E, Auboeuf D, Horie M, Imoto K, Lee KY, Swanson MS, Lopez de Munain A, Inada S, Itoh H, Nakazawa K, Ashihara T, Wang E, Zimmer T, Furling D, Takahashi MP, Charlet-Berguerand N. Splicing misregulation of SCN5A contributes to cardiac-conduction delay and heart arrhythmia in myotonic dystrophy. *Nat Commun*. 7:11067(2016). 査読有 doi: 10.1038/ncomms11067.
  8. Bosch MK, Nerbonne JM, Townsend RR, Miyazaki H, Nukina N, Ornitz DM, Marionneau C. Proteomic analysis of native cerebellar iFGF14 complexes. *Channels (Austin)*. 1-16(2016). 査読有 doi: 10.1080/19336950.2016.1153203.
  9. Yamanaka T, Tosaki A, Kurosawa M, Shimogori T, Hattori N, Nukina N. Genome-wide analyses in neuronal cells reveal that upstream transcription factors regulate lysosomal gene expression. *FEBS J*. 283(6):1077-87(2016). 査読有 doi: 10.1111/febs.13650.
  10. Inobe T, Nozaki M, Nukina N. Artificial regulation of p53 function by modulating its assembly. *Biochem Biophys Res Commun*. 467(2):322-7(2015). 査読有 doi: 10.1016/j.bbrc.2015.09.162.
  11. Imai Y, Kobayashi Y, Inoshita T, Meng H, Arano T, Uemura K, Asano T, Yoshimi K, Zhang CL, Matsumoto G, Ohtsuka T, Kageyama R, Kiyonari H, Shioi G, Nukina N, Hattori N, Takahashi R. The Parkinson's Disease-Associated Protein Kinase LRRK2 Modulates Notch Signaling through the Endosomal Pathway. *PLoS Genet*. 11(9):e1005503(2015). 査読有 doi: 10.1371/journal.pgen.1005503.
  12. Ogawa M, Shidara H, Oka K, Kurosawa M, Nukina N, Furukawa Y. Cysteine residues in Cu,Zn-superoxide dismutase are essential to toxicity in *Caenorhabditis elegans* model of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 463(4):1196-202(2015). 査読有 doi: 10.1016/j.bbrc.2015.06.084.
  13. Matsumoto G, Shimogori T, Hattori N, Nukina N. TBK1 controls autophagosomal engulfment of polyubiquitinated mitochondria through p62/SQSTM1 phosphorylation. *Hum Mol Genet*. 24(15):4429-42(2015). 査読有 doi: 10.1093/hmg/ddv179.
  14. Kino, Y., Washizu, C., Kurosawa, M., Yamada, M., Miyazaki, H., Akagi, T., Hashikawa, T., Doi, H., Takumi, T., Hicks, G.G., Hattori, N., Shimogori, T. & Nukina, N. FUS/TLS deficiency causes behavioral and pathological abnormalities distinct from amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol Commun* 3, 24 (2015). 査読有 doi: 10.1186/s40478-015-0202-6
  15. Kino Y, Washizu C, Kurosawa M, Oma Y, Hattori N, Ishiura S, Nukina N. Nuclear localization of MBNL1: splicing-mediated autoregulation and repression of repeat-derived aberrant proteins. *Hum Mol Genet*. 24(3):740-56(2015). 査読有 doi: 10.1093/hmg/ddu492.
  16. Wimmer, V.C., Harty, R.C., Richards, K.L., Phillips, A.M., Miyazaki, H., Nukina, N. & Petrou, S. Sodium channel beta1 subunit localizes to axon initial segments of excitatory and inhibitory neurons and shows regional heterogeneity in mouse brain. *J Comp*

Neurol 523, 814-30 (2015). 査読有 doi: 10.1002/cne.23715

17. Kurosawa, M., Matsumoto, G., Kino, Y., Okuno, M., Kurosawa-Yamada, M., Washizu, C., Taniguchi, H., Nakaso, K., Yanagawa, T., Warabi, E., Shimogori, T., Sakurai, T., Hattori, N. & Nukina, N. Depletion of p62 reduces nuclear inclusions and paradoxically ameliorates disease phenotypes in Huntington's model mice. Hum Mol Genet 24, 1092-105 (2015). 査読有 doi: 10.1093/hmg/ddu522

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 貫名信行. 大脳基底核疾患研究の病態脳科学的展開. 第57回日本神経学会学術大会(榎林賞受賞講演)神戸コンベンションセンター(兵庫、神戸) 2016/5/19
2. Yamanaka T., Nukina N. NF-Y inactivation induces differential, cell type-specific neuropathology. "Brain Protein Aging and Dementia Control 1st International Symposium" Nagoya University(Nagoya, Japan) 2015/10/09-10
3. 貫名信行. ハンチントン病: その病態とタンパク質の品質管理. 第9回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres. 品川プリンスホテル(東京、品川) 2015/10/15
4. Haruko Miyazaki, Fumitakaka Oyama, Ritsuko Inoue, Hiroshi Kiyonari, Yoshihiro Kino, Masaru Kurosawa, Ikuo Ogiwara, Kazuhiro Yamakawa, Tomomi Shimogori, Nobutaka Hattori, Masami Miura, Nobuyuki Nukina. Singular localization of sodium channel 4 subunit in unmyelinated fibres in the striatum. 第38回日本神経科学大会, 神戸コンベンションセンター(兵庫、神戸), 2015/7/28-31
5. 山中智行, 戸崎麻子, 宮崎晴子, 黒澤大, 小池正人, 内山安男, Sankar N. Maity, 三澤日出巳, 服部信孝, 貫名信行. Cell type-specific neuropathologies in NF-Y mutant mice. 第38回日本神経科学大会, 神戸コンベンションセンター(兵庫、神戸), 2015/7/28-31
6. Nukina, N. The pathomechanism of Huntington disease: factors related to its pathological cascades (ハンチントン病の分子病態). 第120回日本解剖学会・第92回日本生理学会大会合同大会 神戸国際会議場(兵庫、神戸), 2015/03/21-23.

〔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〕

ホームページ等

<<http://brainscience.doshisha.ac.jp/introduction/pat/ca.html>>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

貫名 信行 (Nukina Nobuyuki)

同志社大学・脳科学研究科・教授

研究者番号: 10134595