

令和元年5月27日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10990

研究課題名(和文)末梢神経傷害後の組織酸素ダイナミクスとシュワン細胞機能調節機構の解析

研究課題名(英文) Hypoxia induced factor 1 alpha participates in Schwann cells differentiation in peripheral nerves.

研究代表者

氏名 悠佳(小林悠佳)(Ujii, Yuka)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 疾病研究第五部・流動研究員

研究者番号：20511562

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：発達期および病態時の末梢神経髄鞘形成におけるHIF1 α の関与について検討した。マウス坐骨神経においてHIF1 α 蛋白質は発達期で発現増加し、シュワン細胞に局在していた。低酸素培養または水酸化部位をアミノ酸置換した変異体の過剰発現によってシュワン細胞においてミエリン関連遺伝子の発現が増加した。HIF1 α の安定化剤によってマウス胎仔由来DRGの*in vitro* myelinationが促進した。また、傷害後神経においてもシュワン細胞の再分化時期にHIF1 α 蛋白質を発現するシュワン細胞が増加していた。したがって、HIF1 α が末梢神経髄鞘化および再髄鞘化に対する促進因子となる可能性が示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

末梢神経の髄鞘形成にはシュワン細胞の分化制御が重要であるが、髄鞘化までのシュワン細胞分化制御に関わる分子機構の全貌は未だ不明である。出生によって胎児を取り巻く酸素環境は大きく変化することから、酸素環境の変化がミエリン形成を誘導する可能性に着目した。また、末梢神経発達期の髄鞘化に関わる遺伝子スクリーニング解析結果からHIF1 α を見出した。シュワン細胞におけるHIF1 α の生理的役割を明らかにし、発生・発達および病態の観点から、末梢神経髄鞘化におけるHIF1 α 重要性について精査することで、シュワン細胞の分化制御機構および末梢神経障害病態における分子基盤の解明にも貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Schwann cell (SC) differentiation plays an important role in PNS myelination. However, underlying mechanisms of SC differentiation remain unclear. Here, we investigated the role of HIF1 α in PNS myelination. Culturing in hypoxia or overexpression of HIF1 α bearing mutation to be resistant to proteasomal degradation resulted in upregulation of myelin related gene expressions in SCs. Expression of HIF1 α in SC increased during development of peripheral nerves. HIF1 α stabilizing drug that inhibits prolyl hydroxylation was able to upregulate myelin protein expression and promoted myelination in culture. Transient hypoxic incubation also facilitated *in vitro* myelination. Expression of HIF1 α was also observed in SC in peripheral nerves after injury. The number of myelinating axons was increased by a local application of a HIF1 α stabilizing drug. Collectively, HIF1 α might be involved in SC differentiation and peripheral myelination during development as well as regeneration after injury.

研究分野：神経科学

キーワード：末梢神経 髄鞘化 シュワン細胞 *in vitro* myelination 低酸素誘導因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

末梢神経の大部分を構成するシュワン細胞はミエリン形成の制御に重要な役割を果たし、液性因子を介して神経細胞の保護を担っている。シュワン細胞はヒトでは胎生中期から生後数日にかけてシュワン細胞が軸索へと遊走し、生後1歳までにはミエリン形成が活発化する。ミエリン形成に至るまでにはいくつかの転写因子の活性化に準ずる遺伝子発現増加を伴って段階的に分化することが示されているが、依然としてシュワン細胞の分化制御の分子機構の全貌は不明である。

中枢神経では血中の酸素分圧の上昇に伴いミエリン形成の活発化することが明らかにされており(*Cell*, 2015)、ミエリン化誘導制御には神経組織の酸素環境の変化が深く関与する可能性が示されている。本研究では、シュワン細胞の分化制御と酸素ダイナミクスとの関連性を明らかにし、シュワン細胞の分化制御に関わる責任分子を探索することを目的とする。そこで、酸素環境の変化により発現制御を受ける低酸素誘導因子(Hypoxia-inducible factor 1 α : HIF1 α)に着目した。これまでに、*in vitro* myelination 誘導による HIF1 α の遺伝子発現増加、低酸素暴露後のシュワン細胞における HIF1 α とミエリン関連因子の発現増加に相関性があることを明らかにしており、酸素環境の変動に伴い発現する HIF1 α がシュワン細胞の分化誘導に関与する可能性を見出している。

HIF1 α はがん研究領域では盛んに研究されており、血管新生を促す血管内皮細胞増殖因子の転写を促進し、癌細胞増殖に寄与することが知られている。最近では、HIF1 α が神経細胞や中枢グリア細胞への分化に寄与することやオリゴデンドロサイトによる中枢神経系のミエリン化制御に重要であることが報告されてきている(*J Neurosci*, 2010, *Stem Cell Report*, 2017)。しかしながら、依然として末梢神経系における HIF1 α の機能は明らかにされていない。

本研究により神経系における HIF1 α の新たな機能が明らかにできる可能性が期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、末梢神経ミエリン化におけるシュワン細胞における HIF1 α の機能に着目する。シュワン細胞の分化制御と酸素ダイナミクスとの関連性を明らかにし、末梢神経発達における神経ミエリン化および末梢神経障害後の神経再生における再ミエリン化に繋がる基盤分子機構の探索を目的とする。

3. 研究の方法

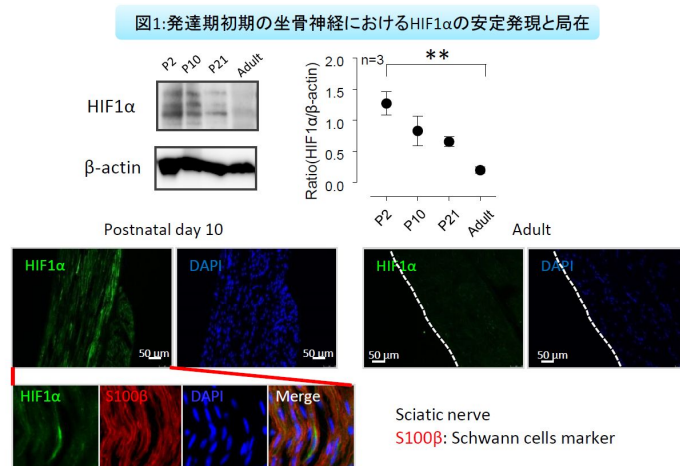
発達期の各ステージおよび坐骨神経挫滅モデルマウスの坐骨神経を採取し、HIF1 α の発現および局在を生化学的および組織化学的に解析した。初代培養シュワン細胞は生後2日目の新生児ラットから採取した坐骨神経から単離し、培養に用いた。培養下でのミエリン化は、マウス胎仔から採取した DRG を explant し、一定期間培養後にミエリン化を誘導した。誘導開始から約2週間経過後、ミエリン蛋白および軸索染色を行い、ミエリン形成を評価した。病態時の再ミエリン化に対する HIF1 α 安定化剤の効果は、採取した坐骨神経のトルイジンブルー染色により組織化学的に評価した。また、神経機能に対する薬効評価には、マウスの握力を指標とする Grip test を用いた。

4. 研究成果

(1) 発達期マウス坐骨神経における HIF1 α の発現変化と局在

マウスの坐骨神経では、ミエリン形成は生後2~3日に開始し、生後1週でシュワン細胞が軸索に沿って突起を伸ばし、生後3週間後には多重層構造のミエリンを形成し始め、ミエリン完成までに約2か月を要する。そこで、生後2日、10日、3週齢および成獣マウスの坐骨神経を採取し、HIF1 α の mRNA および蛋白の発現変化を解析した。HIF1 α 蛋白は成獣マウスと比較して生後2日齢において豊富に存在した。意外なことに HIF1 α の mRNA は生後2日齢よりも成獣マウスにおいてわずかに発現増加が認められるのみであった。したがって、HIF1 α mRNA

の発現レベルは発達期を通してほぼ一定であるのに対し、HIF1 α 蛋白はミエリン形成開始期では安定的に発現し、ミエリンが完成する成獣では分解されると考えられた。HIF1 α を発現する細胞を免疫組織化学により同定したところ、生後10日齢のマウス坐骨神経では、HIF1 α は核およびシュワン細胞の核内に局在した。これらのことから、ミエリン形成初期の HIF1 α が安定発現することがシュワン細胞の分化誘導、ミエリン形成の制御に関与する可能性が示唆された。(図1)

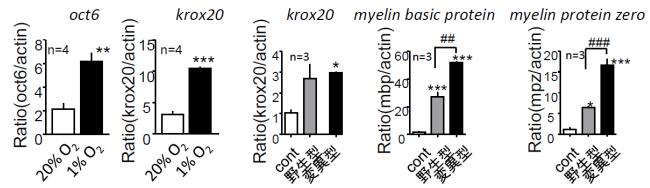


(2) シュワン細胞におけるミエリン関連遺伝子の発現に対する低酸素暴露または変異体過剰発現による HIF1 α 安定化発現の影響

生後2日目のラットから坐骨神経を採取し、シュワン細胞を調製した。得られた初代培養シュワン細胞はホルスコリンおよびグリア増殖因子(GGF)を含む培地で継代することができる。シュワン細胞を低酸素環境(酸素濃度1%)にて培養し、免疫染色によりHIF1 α の局在を観察したところ、低酸素暴露4時間後および24時間後ではHIF1 α がシュワン細胞の細胞質および核内に局在し、内因性のHIF1 α の安定化と核内移行が観察された。24時間後ではおよそ80%以上のシュワン細胞でHIF1 α が核内移行した。低酸素暴露後のシュワン細胞を回収し、定量的PCRにてミエリン関連遺伝子の発現変化を解析すると、Oct6、krox20およびMBP遺伝子の発現レベルが通常酸素環境(酸素濃度20%)と比較して有意に上昇した。プロリン残基をアラニン残基に置換し、水酸化による分解を免れて安定的に発現するHIF1 α 変異体を導入したシュワン細胞は、対照群と比較してkrox20およびMBP遺伝子の発現レベルが増加した。これらのことから、シュワン細胞においてHIF1 α の発現と分化には正の相関があることが示唆された。

(図2)

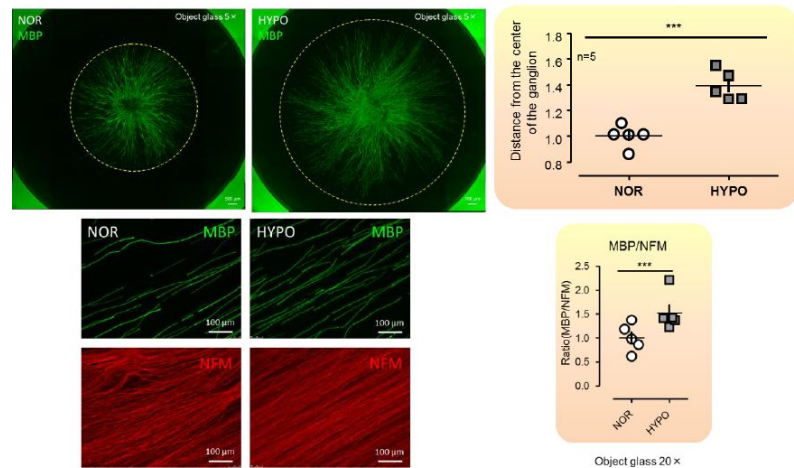
図2: HIF1 α 安定発現によるミエリン関連遺伝子の増加



(3) *in vitro* myelination に対する HIF1 α の安定化発現の影響

これまでの結果から、HIF1 α の安定発現がミエリン形成を誘導することが示唆される。この仮説を裏付けるため、低酸素暴露によるミエリン形成への影響を explant 法により検討した。低酸素環境で6時間培養した後、通常酸素環境に戻し、ミエリン形成誘導培地で3週間培養を継続した。低酸素環境に暴露した培養では軸索の密度や伸長には変化が見られないが、通常酸素環境のみの培養と比較してミエリンセグメント数が有意に増加した(図3)。さらに、プロリン水酸化酵素を阻害することでHIF1 α 蛋白を安定化する薬剤(HIF1 α 安定化剤)を用いてミエリン形成への影響を検討した。HIF1 α 安定化剤を与えたシュワン細胞ではHIF1 α 蛋白がほぼすべての細胞でHIF1 α 蛋白は核に局在した。ミエリン形成誘導開始時にこの濃度でHIF1 α 安定化剤を添加して72時間培養した後、ミエリン形成誘導培地で12日間培養してミエリン形成を評価したところ、ミエリンセグメントの数が増加した。これらのことから、低酸素および薬剤によりHIF1 α 蛋白が一過性に安定して発現することでミエリン形成を促進する可能性が強く示唆された。

図3: 低酸素培養による *in vitro* myelination の促進効果



(4) 病態時再ミエリン化に対する HIF1 α の安定化発現の影響

神経発達に伴うシュワン細胞分化と何らかの原因により脱髄を受けた神経が再生する時のシュワン細胞の再分化では類似する分子機構が働くことが多数報告されている。しかしながら、シュワン細胞が巻き付く軸索の状態は発達期と病態時では異なる。そこで、HIF1 α がシュワン細胞の再分化にも同様に寄与するかを検討した。坐骨神経の挫滅後数日でシュワン細胞の再分化し、再ミエリン化が開始する。HIF1 α 蛋白は挫滅した坐骨神経において再ミエリン化の開始とともに発現が安定し、シュワン細胞に局在していた。また、HIF1 α 安定化剤を再ミエリン化が開始する挫滅後4日目から4日間腹腔内投与すると溶媒投与群と比較してエリン化軸索の数が増加していた。さらに、末梢神経特異的に脱髄を引き起こすCharcot-Marie-Tooth病(TypeA1)のモデルマウスを用いて同様に検討した。HIF1 α 安定化剤を1日1回、4週間腹腔内投与することで、ミエリン化軸索数は増加し、マウスの握力の回復傾向が認められた。

本研究結果より、シュワン細胞の HIF1 α はシュワン細胞の分化誘導に関与し、末梢神経髄鞘化の促進因子として機能しており、また、神経再生時の再髄鞘化に対する促進因子としても働く可能性が示唆された。今後は、発達期の末梢神経において HIF1 α が誘導されるメカニズムや HIF1 α による直接的あるいは間接的な髄鞘化の分子メカニズムに焦点を当て、末梢神経髄鞘化についてさらに詳細に検討する計画である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

氏家 悠佳、若月 修二、荒木 敏之。
低酸素応答による末梢神経のミエリン形成制御。
日本応用酵素協会誌. 総説. 53, 27-32, 2018.

〔学会発表〕(計 3 件)

氏家 悠佳、若月 修二、荒木 敏之。
末梢神経ミエリン化における低酸素応答系の関与。
第 137 回日本薬理学会関東部会. 2017.10.28. 東京.

Yuka Ujiie, Shuji Wakatsuki, Toshiyuki Araki.
Hypoxia-induced factor 1 alpha promotes myelination during development of the peripheral nervous system.
第 40 回日本神経科学大会. 2018. 7. 26-29. 兵庫.

氏家 悠佳、若月 修二、荒木 敏之。
末梢神経のシュワン細胞分化における低酸素誘導因子の関与。
第 92 回日本薬理学会年会. 2019. 3. 14-16. 大阪.

〔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

<https://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r5/index.html>

(疾病研究第五部 | 国立精神・神経センター 神経研究所)

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。