

平成22年 5月31日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19500340

研究課題名（和文）

末梢神経変性症に関する細胞内シグナル伝達の解明

研究課題名（英文）

Studies on cellular signal transduction of PNS demyelination

研究代表者

山内淳司（YAMAUCHI, JUNJI）

国立成育医療センター（研究所）・薬剤治療研究部・室長

研究者番号：20335483

研究成果の概要（和文）：典型的な末梢神経変性症である Charcot-Marie-Tooth (CMT) 病はその病変組織により大きく2種類、1型 CMT 病と2型 CMT 病に分けられる。1型 CMT 病は末梢グリアであるシュワン細胞に主たる病変がみられ、個人差はあるものの、シュワン細胞の分化形態であるミエリン（髄鞘）が壊れる。2型は末梢神経軸索そのものに病変がみられ、最終的には軸索退縮が起こる。本研究では、特に、四回膜貫通型蛋白である PMP22 を原因遺伝子としてもつ 1A 型 CMT 病に関する病態シグナル伝達とその改善を目的としていた。その結果、神経栄養因子受容体や Rho ファミリー低分子量 GTP 結合蛋白質などのいくつかの病態シグナル経路が明らかにされ、さらに新規遺伝子産物 Dock7 がこの経路に関与することを明らかにした。この後、この新規経路を手がかりとして、脱ミエリン病の治療に役立てたい。

研究成果の概要（英文）：Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease is the most common inherited neuropathy of the peripheral nervous system (PNS) and is genetically and clinically heterogenous. CMT disease is characterized by progressive sensory neuron loss and by weakness, beginning in the legs and manifesting later in the hands. Based on nerve electrophysiology, most patients with CMT are categorized into two major types: CMT disease type 1 (CMT1) and CMT disease type 2 (CMT2). While many of the genes and mutations responsible for CMT disease have been identified, we still do not know what compound protects against nerve fiber loss, nor how it may be reversed. Here, we have found that some small compounds (inhibitors for neurotrophin receptors and Rho family small GTPases) impairs demyelination in in vitro CMT1A model (the responsible gene: PMP22) and have now tried to apply to the effects on in vivo model. Thus, these results have a previously unknown potential to improve defective myelinogenesis associated with CMT1A in vitro, indicating that their associated signaling pathways (primarily in the new gene *dock7*) should be a potential therapeutic targets for treatments aimed at improving defective myelinogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学 神経化学・神経薬理学

キーワード：末梢神経・神経栄養因子・ミエリン化・脱髄疾病・低分子量 GTP 結合蛋白質

### 1. 研究開始当初の背景

末梢神経系の唯一のグリア細胞として知られるシュワン細胞が分化した形態であるミエリンは、神経軸索の電気伝導効率を上昇させ神経信号伝達に最適な効率を達成させる（情報処理能力の向上）ばかりではなく、神経軸索を強固に保護する効果（外的刺激に対する耐久性の向上）を有している。末梢神経ミエリンは、形態学的にきわめて特殊化したもので、シュワン細胞の細胞膜が幾重にも軸索を囲む複雑な構造をしている。つまり、その形成過程は、神経系の発生期に、長期間に渡って続く複雑なグリア-神経細胞相互作用の代表例であると言っても過言ではない。従って、脱ミエリン現象もまた、形態的にさまざまである。代表的な末梢神経変性症として知られる Charcot-Marie-Tooth (CMT) 病は、後根神経節 (DRG) 等の末梢神経節神経細胞由来の軸索、または、それを取り囲む末梢ミエリンにおいて起こる脱ミエリン疾患の総称として用いられている。一般的に、前者をII型、後者をI型と呼び、重軽症の差はあるが、統計学的数字によると2500人に1人の頻度でおこる。また、地域差はあるものの、I型が70-80%を占めると言われている。さらに、発症時期も異なり、生後まもなく起こる場合と比較的進行が遅い場合がある。CMT病の原因は遺伝的な要因によるものであるが、ここ15年間の研究で、20種類以上の原因遺伝子（ミエリンの構造に直接関係したものの、シグナル伝達因子、転写因子、並びに輸送蛋白等）が単離された。しかし、その基本的な発症メカニズムと有効な治療薬標的分子は明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

申請者は、2005年度から2006年度までの科学研究費補助金若手研究Bを受け、その研究課題のもとに、試験管内共培養系を用い末梢神経系のグリア-神経細胞相互作用を解明している。その研究過程において、主にDRG神経細胞から放出される生存維持及び増殖因子が末梢神経系の初期発生に重要な役割を果たしていることを見出し、シュワン細胞において、その受容体下流の細胞内シグナル伝達経路を明らかにした。CMT病の変異をもつ病態シュワン細胞は、① 前ミエリン期において遊走及び増殖能が上昇し、② それに関

与すると考えられるキナーゼ型受容体を過剰に発現している、ことである。従って、これらのことが脱ミエリンを引き起こす原因の一部となる可能性が考えられた。実際、神経栄養因子受容体キナーゼの阻害剤を、CMT病の変異をもつシュワン細胞の共培養系に添加すると、その脱ミエリン現象が部分的に改善されることが分かった。以上の予備的知見から、申請者らは、本研究課題において「病態シュワン細胞の遊走・増殖能を抑制できれば、脱ミエリン現象が抑えられる可能性がある」という仮説のもとに病態発症に関与するシグナル伝達経路の解明に焦点を定め、研究を進める。

### 3. 研究の方法

(1) CMT病の発症に関与する細胞内シグナル伝達分子の検索

- ① 病態発症を再現する病態シュワン細胞と感覚神経DRG神経細胞の共培養系によるin vitro 脱ミエリンの再現系を確立し、以下のスクリーニングを行う。
- ② 病態発症共培養系を利用し、阻害剤などの低分子化合物ライブラリーを用いたスクリーニング系を利用して、その改善候補分子を明らかにする。
- ③ 病態発症共培養系を利用し、siRNAライブラリーを用いたスクリーニング系を利用して、その改善候補分子を明らかにする

(2) シグナル伝達経路上に存在する分子ネットワークの全容解明

- ① 候補分子を阻害する低分子化合物ををベイトにした樹脂を用いてのクロマトグラフィー法により、定法に則り相互作用する分子を確認（または単離）する。
- ② siRNAライブラリーから単離された分子をベイトにした酵母ツーハイブリッド法を用いて、定法に則り相互作用する分子を単離し、ネットワークの全容解明に供する。

(3) 病態モデルマウスを用いた個体レベルでの発症シグナルの抑制に関する研究

- ① 当初、まず生体内へのsiRNAの直接導入により脱ミエリン現象が抑制されるかどうかを観察する予定であったが、この方法は結果として有効ではなかった。おそらく標的組織である座骨神経にsiRNAが到達しなかったためであると考察される。

② そこで、生体レベルでのノックダウンを試み、ノックダウン配列に改良を加え、座骨神経でも siRNA を発現しうるマウスの作成にはじめて成功した。

#### 4. 研究成果

(1) 遺伝性の末梢神経変性症の50%を占めると言われるIA型CMT病はPMP22という四回膜貫通型構造を有する蛋白をコードする遺伝子の点変異、増幅、または欠損により生じる。PMP22は末梢ミエリンの膜蛋白のおよそ1%を占めるにすぎないが、PMP22がIA型CMT病の原因となるのは、膜表面での局在とその厳密な発現量の調節が成熟した末梢ミエリンの維持に重要であることを表している。本年度は、PMP22遺伝子の膜貫通領域にIA型CMT病と同一の点変異をもつ典型的な自然発症型の病態モデルマウス(トランベラーヤトランベラーJ)由来のシュワン細胞を用い、病態シグナルに関与する候補分子を明らかにすることを試みた。まずその共培養系の確立に関してであるが、グリア-ニューロンとも単離する胎生時期をあわせることで、病態系の共培養系を再現することができた。しかし、これに関してはさらなる再現性の向上とスクリーニング数の上昇に関与するまだ改良の余地が多く残されている。しかし、現在の確立しつつある系を用いて当研究室にある低分子化合物ライブラリーから改善物質のスクリーニングをはじめているところである。その結果、低分子量化合物に関しては、MAPキナーゼ系の阻害物質や低分子量GTP結合蛋白シグナル伝達経路を阻害する物質が有効な改善効果を示した。また、二次スクリーニングとして情報伝達分子によりターゲットを絞られるsiRNAを用いた。先のスクリーニングとこのスクリーニングで共通した標的分子が病態発症に関与するシグナル伝達に含まれている可能性が高い。現在も、さらにスクリーニング継続中である。

(2) PMP22以外の病態原因遺伝子を初代培養細胞にトランスフェクションして、それら病態を再現できるかを試みた。しかしながら、すべての遺伝子病態を再現することは難しかったため、汎用性の高い実験系の開発を今後の課題としたい。一方で、その共通性の高い病態発症に関与するシグナル伝達因子とそのユニークな経路の解析は進み、新規の遺伝子(Dock7; GenBank Acc. No. DQ118679/DQ118680/DQ309763/DQ109674/DQ124295)に関する論文を発表するに至った。これらの成果は、2008年度日本生化学会奨励賞受賞対象のひとつになった。

(3) 生体レベルでの病態シグナルを解析するために、病態を緩和させるDock7遺伝子の

RNA干渉配列を発現するマウスをつくることに成功し、現在そのマウスの座骨神経の病理解析を行っているところである(2010年度以降の科学研究費補助金研究により推進予定である)。

#### 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6件)

① Junji Yamauchi, Yuki Miyamoto, Mayu Murabe, Yoko Fujiwara, Atsushi Sanbe, Yoko Fujita, Shoko Murase, and Akito Tanoue Gadd45a, the gene induced by the mood stabilizer valproic acid, regulates neurite outgrowth through JNK and the substrate paxillin in N1E-115 neuroblastoma cells. *Exp. Cell Res.* 2007年 313巻 1886-1897頁

② Yuki Miyamoto, Junji Yamauchi, Jonah R. Chan, Atsumasa Okada, Yasuhiro Tomooka, Shin-ichi Hisanaga, and Akito Tanoue Cyclin-dependent kinase 5 regulates the differentiation of oligodendrocyte precursor cells through the direct phosphorylation of paxillin. *J. Cell Sci.* 2007年 120巻 4355-4366頁

③ Junji Yamauchi, Yuki Miyamoto, Jonah R. Chan, Akito Tanoue ErbB2 directly activates the exchange factor Dock7 to promote Schwann cell migration. *J. Cell Biol.* 2008年 181巻 351-365頁

④ Yuki Miyamoto, Junji Yamauchi, Akito Tanoue Cdk5 phosphorylation of WAVE2 regulates oligodendrocyte precursor cell migration through nonreceptor tyrosine kinase Fyn. *J. Neurosci.* 2008年 28巻 8326-8337頁

⑤ Junji Yamauchi, Yuki Miyamoto, Shinji Kusakawa, Tomohiro Torii, Reiko Mizutani, Atsushi Sanbe, Hideki Nakajima, Nobutaka Kiyokawa, Akito Tanoue Neurofibromatosis 2 tumor suppressor, the gene induced by valproic acid, mediates neurite outgrowth through interaction with paxillin. *Exp. Cell Res.* 314巻 2279-2288頁

⑥ Junji Yamauchi, Yuki Miyamoto, Tomohiro Torii, Reiko Mizutani, Kazuaki Nakamura, Atsushi Sanbe, Hiroshi Koide, Shinji Kusakawa, and Akito Tanoue Valproic acid-inducible Arl4D and cytohesin-2/ARNO, acting through the downstream Arf6, regulate neurite outgrowth in N1E-115 cells. *Exp. Cell Res.* 2009年 315巻 2043-2052頁

〔学会発表〕（計 1 件）

山内淳司 末梢神経ミエリン形成を司どるシグナル伝達（2008 年度日本生化学会奨励賞）日本生化学会・日本分子生物学会合同年会 2008 年 12 月 11 日 神戸国際展示場

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：中枢神経髄鞘形成不全の治療用組成物および中枢神経髄鞘形成促進方法

発明者：山内淳司、田上昭人、宮本 幸、鳥居知宏

権利者：山内淳司、田上昭人、宮本 幸、鳥居知宏

種類：特許

番号：特願 2008-208155

出願年月日：出願日 2008 年 8 月 12 日

国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nch.go.jp/pharmac/Home.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山内淳司 (YAMAUCHI, JUNJI)

国立成育医療センター（研究所）・薬剤治療研究部・室長

研究者番号：20335483

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：