

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07277

研究課題名（和文）シュワン細胞の発生・成熟における硫酸化糖脂質の生理的意義の解明

研究課題名（英文）Physiological significance of sulfated glycolipids in the development and maturation of Schwann cells.

研究代表者

和田 幸恵（平原幸恵）（HIRAHARA-WADA, Yukie）

関西医科大学・看護学部・教授

研究者番号：70457969

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：スフィンゴ糖脂質であるスルファチドは、様々な分子種が存在し、細胞プロセスに関連する多くの分子と相互作用することが示されている。本研究は、後根神経節の分子種解析、スルファチド欠損による表現型解析、発現時期の特定をおこなった。スルファチド分子種は、シュワン細胞発生初期から発現し、成体では分子種の種類が増加した。これらの分子種の欠損は、有髄シュワンのパラノード異常と無髄シュワン細胞が直径の大きな軸索を取り囲むなどの形態異常を示した。これらの結果から、スルファチド分子種の発現はシュワン細胞の生涯にわたって維持され、分子種特異的な相互分子が存在し、発現時期特異的な役割をもつ可能性が考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

スルファチドは、髄鞘に豊富に含まれる主要糖脂質であるため、中枢神経系におけるスルファチドの機能解析は様々な視点から研究が行われてきた。しかし、末梢神経系については報告がなかった。本研究では、様々な分子の詳細な同分析を可能とする質量顕微鏡技術を発生学に導入・融合することで糖脂質を分化マーカーとする細胞探索が可能となり、シュワン細胞におけるスルファチド分子種の時空間的情報さらにはスルファチド欠損マウスの詳細な解析をおこなった。これらの成果は、シュワン細胞系譜に新たな知見を加えることができ、ひいてはシュワン前駆細胞成熟誘導という難治性神経疾患の未来医療発展への一助となるであろう。

研究成果の概要（英文）：Sulfatide, a sphingoglycolipid, exists in a variety of molecular species and has been shown to interact with many molecules related to cellular processes. In this study, we analyzed the molecular species of dorsal root ganglia (DRG), analyzed the phenotype caused by their loss, and identified the timing of their expression. Sulfatide molecular species were expressed from early Schwann cell development, and the number of molecular species type increased in adults. Deletion of these molecular species resulted in abnormal paranode in myelinated Schwann and morphological abnormalities such as unmyelinated Schwann cells surrounding axons with large diameters. These results suggest that the expression of sulfatide molecular species is maintained throughout life of Schwann cells and that a molecular species-specific role may exist.

研究分野：神経科学

キーワード：スルファチド 後根神経節 シュワン細胞 ミエリン 質量顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

スルファチドは、髄鞘に豊富に含まれる硫酸化糖脂質で、脂肪酸の長さ、不飽和度、ヒドロキシ基の有無などにおける構造多様性をもち、奇数炭素数の脂肪酸、高飽和度のものを含め37種類もの分子種が知られている。われわれは、今までに、スルファチド欠損マウスにおいて、オリゴデンドロサイトの成熟とミエリン形成に異常がみられることを示してきた (Honke K and Hirahara Y. et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2002; Hirahara Y. et al., Glia, 2004)。さらに近年、脂質解析に最も有効な方法である質量顕微鏡の技術を取り入れ、オリゴデンドロサイト発生過程におけるスルファチド分子種の発現パターンを明らかにし、質量顕微鏡技術と発生学を組み合わせることで新たな知見が得られることを証明した (Hirahara Y. et al., J Neurochem, 2017)。また、スルファチドは、中枢神経系のみならず末梢神経のシュワン細胞系譜の追跡にも使えるマーカーとなる。シュワン細胞前駆体発生初期から無髄シュワン細胞・有髄シュワン細胞へと分化過程におけるスルファチドの機能は何か? どのようにスルファチド分子種が使い分けられるのか? スルファチドと共有し機能に関わる分子は何か? これらの学術的問いに対して解答を与える。

2. 研究の目的

スルファチドは、髄鞘に豊富に含まれる主要糖脂質であるため、中枢神経の髄鞘におけるスルファチドの機能解析は、われわれを含めこれまでに様々な視点から研究がおこなわれてきた。しかし、末梢神経系については、シュワン細胞のマーカーにはスルファチドが使われているもののその機能解析に関しては報告がない。シュワン細胞発生初期からの分化マーカーであるスルファチドは、シュワン細胞成熟過程において様々な機能をもつであろうことが考えられる。われわれは、これまでに、さまざまな分子の詳細な局在分析を可能とする質量顕微鏡技術を発生学に導入・融合することで糖脂質を分化マーカーとする細胞探索を可能にしてきた。それらの技術を駆使し、シュワン細胞におけるスルファチド分子種の時空間的情報とそれらに付随する分子の同定、さらにはスルファチド欠損マウスの詳細な解析をおこなう。これらの成果により、シュワン細胞系譜に新たな知見を加えることで、ひいてはシュワン前駆細胞成熟への誘導という難治性神経疾患の未来医療への展開に貢献するであろう。

3. 研究の方法

スルファチド分子種の時空間的局在を質量分析による分子情報と顕微鏡による形態情報を一度に解析し、生体試料の質量分析画像を取得できる質量顕微鏡 iMScope-prototype を用い、後根神経節 (DRG) のスルファチド分子種検出に適した蒸着再結晶法の条件を検討した。それらの条件下、ニワトリ胚または C57BL/6 野生型マウス DRG におけるシュワン細胞発生過程のスルファチド分子種の同定をおこなった。また、質量顕微鏡解析 (IMS 解析) に使用した試料の連続切片に対し、分化マーカーの組み合わせにより免疫組織化学を施し、質量顕微鏡像と比較することにより、スルファチド産生細胞の同定をおこなった。さらに、スルファチド欠損マウス DRG のシュワン細胞分化成熟度を調べ、有髄・無髄シュワンの形態を電子顕微鏡レベルで解析をした (動物実験研究課題承認番号: 20-086, 21-053, 22-076)。スルファチド分子種と共有する分子の同定をするために、EMARS 法の確立 (生きている細胞の表面膜上に存在する任

意の分子と近接する分子を標識し、細胞膜マクロドメインにおける膜上分子の相互作用解析ツール (Honke K. The J. Biochem, 2018) をおこなった。

4. 研究成果

ニワトリ E5 DRG 領域の免疫組織化学解析では、シュワン前駆細胞 (Sox10+/Sox2+) が確認されたがスルファチド抗体 D18 陽性シグナルは検出されなかった。一方の IMS 解析では、 m/z 778.5 (C16 スルファチド: 脂肪酸炭素数 16), m/z 806.5 (C18 スルファチド: 脂肪酸炭素数 18), m/z 888.6 (C24:1 スルファチド: 脂肪酸炭素数 24 のうち、不飽和結合を 1 含む), m/z 890.6 (C24 スルファチド: 脂肪酸炭素数 24) の 4 つのスルファチド分子種を検出した。ニワトリ E8 では、DRG の形態が明確になると共に、その領域にシュワン前駆細胞を確認し、さらにスルファチド抗体 D18 陽性シグナルがシュワン前駆細胞の周りにドッド状に検出され、発生が進むとともに DRG におけるシグナル強度が増した。IMS 解析においても、ニワトリ E5 で検出した 4 つのスルファチド分子種をより強度に検出した。DRG 発生初期では、C16 スルファチドが主であるが、発生に伴い C24 スルファチドも増加してくる。IMS 解析のスペクトル強度の比の比較 (Phosphatidylinositol (PI) : m/z 885.5 を内部標準とした) をおこなったところ、スルファチド分子種の産生量も増加することがわかった。スルファチド分子種のシグナル強度の推移を示したグラフは、免疫染色解析でのシグナル強度と相関がとれる結果となった。マウス胚に対する IMS 解析においては、E16 以降の DRG を含む末梢神経にスルファチド分子種が発現し始め、ニワトリ胚と同様の 4 種のスルファチド分子種が確認された。4 種以外の 3 分子種も早い発生時期に検出された。D18 免疫染色像と IMS 像の比較においても同様の分布強度を示した。

スルファチド分子種は、シュワン細胞前駆細胞から発現し、シュワン細胞の成熟に何らかの役割をもっていることが示唆されたので、スルファチド欠損マウス DRG におけるシュワン前駆細胞数の解析をおこなった。スルファチド欠損マウスでは生後 3 日で野生型と比較して、シュワン前駆細胞が増加し、生後 7 日で減少傾向が見られ、成熟亢進を示唆する結果が得られた。増殖に関わるものか分化促進に関わる変化かを明らかにするためには、さらなる分化マーカーを組み合わせた解析が必要となる。

一方で、マウス成獣 DRG では 14 種のスルファチドが検出された。発現パターンには PI の局在と同じ神経細胞体周囲領域と軸索リッチ領域に発現する分子種 (C16、C18 スルファチド) と軸索リッチ領域のみに局在する分子種が存在していた。分子種特異的局在傾向が見られることから無髄シュワン細胞、有髄シュワン細胞で異なった分子種のスルファチドが機能していることが考えられる。さらに、マウス成獣 DRG のスルファチド欠損は、無髄シュワン細胞と有髄シュワン細胞で微細構造の異常が電子顕微鏡解析により明らかとなった。無髄神経を支持する無髄シュワン細胞では、野生型と比較して、一つの無髄シュワンが取り囲む軸索の太さのばらつきが大きく、無髄シュワン細胞自体が軸索を全周的に囲めないなどの変化がみられた。有髄シュワン細胞に関しては、中枢神経系のオリゴデンドロサイトでみられたパラノードの異常と同様の構造変化がみられた。

スルファチド分子種と共局在する分子の同定をするために、初代培養が比較的容易にでき、分化ステージ細胞単一培養系を回収できるオリゴデンドロサイト前駆細胞を使って EMARS 法の確立をおこなった。スルファチド抗体 04 と D18 を使い、スルファチド近傍分子の FITC 標識を行い、それらの分子の回収をおこなった。プロテオーム解析は、東京医科歯科大学リサーチコアセンターに依頼した。しかしながら、プロテオーム解析用の十分なペプチドを得ることができず、さらなるサンプルの再調整、回収方法の改良等が必要となった。改良を続け、効率のよい回収法

は構築できたが、期限内にタンパク同定には至らなかった。

DRG においてシュワン細胞前駆体が発現してすぐに 4 種のスルファチド分子種が存在していることが明らかとなり、シュワン前駆細胞がスルファチド分子種を産生している可能性が示唆された。また、シグナル強度の比較から、発生初期には、脂肪酸の短いスルファチドが主に産生されること、成熟過程において脂肪酸の長い分子種の産生量も増加してくることが明らかとなった。中枢神経系においては、オリゴデンドロサイト初期発生で関与するスルファチドは、C16 スルファチド、C18 スルファチドのみで、髄鞘形成過程において C24 スルファチドが主になる。中枢神経系とのスルファチド分子種の役割の違いを示す結果である。加えて、スルファチド欠損マウス DRG では、生後 3 日でシュワン前駆細胞が増加し、生後 7 日で減少傾向が見られ、成熟亢進を示唆する結果が得られた。さらなるマーカーを用いた検討が必要であるが、中枢神経系でも見られているスルファチド分子種が成熟制御の負の制御因子として働いている可能性も示唆している。電子顕微鏡の結果からは、スルファチドが欠如することで無髄神経の構造でも変化が確認された。成獣の DRG の IMS 解析結果では、分子種特異的局在傾向が見られることから無髄シュワン細胞、有髄シュワン細胞で異なった分子種のスルファチドが機能していることが考えられる。この研究により、スルファチド分子種がシュワン細胞発生初期からシュワンの成熟に関わり、分子種特異的な役割を持って髄鞘形成、あるいは無髄神経に関与する無髄シュワン細胞の機能に役割を担っていることが明らかとなった（論文執筆中）。

<引用文献>

Sulfatide species with various fatty acid chains in oligodendrocytes at different developmental stages determined by imaging mass spectrometry. *J Neurochem.* 2017 140(3): (435-450) 2017

Paranodal junction formation and spermatogenesis require sulfoglycolipids. Honke K and Hirahara Y, et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(7): (4227-4232) 2002

Sulfatide is a negative regulator of oligodendrocyte differentiation: Development in sulfatide-null mice. Hirahara Y, et al., *Glia.* 45(3): (269-277) 2004

Biological functions of sulfoglycolipids and the EMARS method for identification of co-clustered molecules in the membrane microdomains. Honke K. *The Journal of Biochemistry.* 163 (4): (253-263) 2018

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakashima K, Hirahara Y, Koike T, Tanaka S, Gamo K, Oe S, Hayashi S, Seki-Omura R, Nakano Y, Ohe C, Yoshida T, Kataoka Y, Tsuda M, Yamashita T, Honke K, Kitada M	4. 巻 63(6)
2. 論文標題 Sulfatide with ceramide composed of phytosphingosine (t18:0) and 2-hydroxy FAs in renal intercalated cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Lipid Res	6. 最初と最後の頁 100210-100227
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jlir.2022.100210	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Koike T, Tanaka S, Hirahara Y, Oe S, Kurokawa K, Maeda M, Suga M, Kataoka Y, Yamada H	4. 巻 527(12)
2. 論文標題 Morphological characteristics of p75 neurotrophin receptor-positive cells define a new type of glial cell in the rat dorsal root ganglia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Comp Neurol	6. 最初と最後の頁 2047-2060
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cne.24667	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yukie Hirahara, Taketoshi Wakabayashi, Taro Koike, Keizo Gamo, Hisao Yamada	4. 巻 98(2)
2. 論文標題 Change in phospholipid species of retinal layer in traumatic optic neuropathy model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 325-337
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jnr.24500	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 2件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平原幸恵
2. 発表標題 組織細胞化学のための質量顕微鏡解析
3. 学会等名 第60回日本組織細胞化学会総会・学術集会および第13回日中合同組織細胞化学セミナー合同大会，神戸（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 蒲生恵三, 平原幸恵, 小池太郎, 大江総一, 林真一, 関亮平, 中野洋輔, 小野勝彦, 北田容章
2. 発表標題 スルファチド分子種はシュワン細胞系譜の初期から発現する
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会, 仙台
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平原幸恵, 北田容章
2. 発表標題 組織細胞化学のための質量顕微鏡解析
3. 学会等名 第62回日本組織細胞化学会総会・学術集会, 滋賀 (Web開催) . (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平原幸恵, 中島啓子, 小池太郎, 蒲生恵三, 田中進, 大江総一, 林真一, 関亮平, 中野洋輔, 大江知里, 吉田崇, 片岡洋祐, 津田雅之, 本家孝一, 北田容章
2. 発表標題 腎集合管に局在する2つのヒドロキシル基を持つ特殊なスルファチド分子種の同定
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会 大阪 (Web開催)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 蒲生恵三, 平原幸恵, 小池太郎, 大江総一, 田中進, 関亮平, 中野洋輔, 小野勝彦, 北田容章
2. 発表標題 末梢神経におけるスルファチド分子種の挙動と作用機序の検討
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会 大阪 (Web開催)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 蒲生恵三, 平原幸恵, 小池太郎, 大江総一, 小野勝彦, 北田容章
2. 発表標題 シュワン細胞成熟過程におけるスルファチド分子種の同定
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会、第98回日本生理学会大会 (Web開催)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Gamo K, Hirahara Y, Koike T, Ono K, Kitada M
2. 発表標題 Change of sulfatide species during Schwann cell differentiation
3. 学会等名 The 43rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平原幸恵, 蒲生恵三, 小池太郎, 小野勝彦, 北田容章
2. 発表標題 シュワン細胞におけるスルファチド分子種の発現と機能解析
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会 宇部
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中島啓子, 平原幸恵, 蒲生恵三, 大江知里, 吉田崇, 小池太郎, 田中進, 本家孝一, 北田容章
2. 発表標題 質量顕微鏡を使った腎臓における硫酸化糖脂質分子種の同定と可視化
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会 宇部
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	蒲生 恵三 (GAMO Keizo)		
研究協力者	小池 太郎 (KOIKE Taro)		
研究協力者	大江 総一 (OE Soichi)		
研究協力者	津田 雅之 (TSUDA Masayuki)		
研究協力者	本家 孝一 (HONKE Koichi)		
研究協力者	小野 勝彦 (ONO Katsuhiko)		
研究協力者	北田 容章 (KITADA Masaaki)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------