

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20500370

研究課題名（和文）

神経軸索変性疾患モデルとしての *shambling* マウスの病態解析と評価

研究課題名（英文）

A study of shambling mice with a *Caspr* mutation; as a model for the neurodegenerative disease

研究代表者：

高岸 芳子 (Takagishi Yoshiko)

名古屋大学・環境医学研究所・助教

研究者番号：50024659

研究成果の概要（和文）：

有髄神経のランビエ絞輪パラノード部に局在する膜タンパク Caspr の遺伝子に変異を持つ突然変異マウス (*shambling*; *shm*) の中枢ならびに末梢神経系を生後早期から老齢期において研究し、マウスの進行性の病変との関連を検討した。神経症状の発症した直後の生後早期には、パラノード部におけるパラノードジャンクションの欠失や構成タンパクの局在・発現減少がみられた。しかしながら、神経症状が重篤となった加齢期のマウスでは、パラノード部の異常のみならず、神経線維軸索内の封入体形成、さらに小脳プルキンエ細胞の消失が観察された。従って、*Caspr* 遺伝子の変異は生後早期にはパラノード構造の異常をもたらし、これが月齢とともに進行して、神経線維軸索の異常や細胞死をもたらすことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

The *shambling* (*shm*) mouse with mutation of a *Caspr* gene exhibits ataxia and hind limb paresis at 2~3 weeks of age after birth. Caspr is a major component of the paranode in myelinated nerves. Disrupted paranodal junctions and aberrant localization of ion channels at the nodal/paranodal regions were found in the central and peripheral nervous system of mutant mice, suggesting a major cause of the mouse neurological phenotype. In aged mice showing progressive neurological deficits, altered axons containing abnormal inclusions and, further, a loss of neuronal somata were found. These findings suggest that the disrupted paranodal junction at the paranode causes the axonal degeneration and neuronal cell death, thus the *shm* mice is a potential animal model for human neurodegenerative disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：疾患モデル、有髄神経線維、ミエリン、軸索

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、生後に失調歩行を表す突然変異マウス *shambling (shm)* の原因遺伝子がランビエ絞輪両側のパラノード部に局在する膜タンパク Caspr をコードする遺伝子にあることを同定して、この遺伝子の領域内に二塩基の挿入変異を見つけた。この変異は、細胞膜および細胞質内ドメインを欠失した Caspr タンパクの著しい産生減少をもたらした。Caspr は、軸索膜とミエリンループ膜の間に形成される隔壁様の結合装置（パラノードルジャンクション）の主要な構成タンパクである。

パラノードルジャンクションの働きは、有髄神経線維の活動電位興奮伝導に関わるイオンチャネルの機能ドメインを軸索上に形成すること、また、軸索-ミエリン間の情報伝達の場として、ミエリンの維持や軸索の成長を調節することにある。従って、*shm* マウスでは、Caspr の遺伝子変異がパラノードルジャンクションの正常な形成を阻害して有髄神経線維の興奮伝導に障害をもたらし、これがこのマウスの神経症状の原因となっていると考えられる。また、ヒトの脱髄疾患である多発性硬化症や Charcot-Marie-Tooth disease (CMT) 病においても有髄神経線維における Caspr の分布異常やパラノードルジャンクションの欠失が観察されている。

## 2. 研究の目的

*shm* マウスの有髄神経線維を分子、細胞、組織レベルで研究してその異常を解明し、ヒトの脱髄、軸索変性疾患の病態モデルとする。

具体的には、

(1) 神経症状の発症した幼弱期のマウスで中枢ならびに末梢神経系の有髄神経線維のパラノードとその近傍ならびに軸索の超微細構造を観察して、パラノードルジャンクション形成の形態学的な異常を明らかにする。次に、免疫組織細胞化学法によってパラノード領域（ランビエ絞輪部を含む）における Caspr、パラノード構成タンパク、活動電位の発生に関わるイオンチャネルの局在などを調べ、パラノードルジャンクションとこの領域の分子的な基盤の異常を明らかにする。

(2) *shm* マウスの神経症状は進行性であることから、生後1年齢以上のマウスで同様にパラノードの異常を観察するとともに、有髄神経線維軸索とその細胞体の異常を微細構造レベル、細胞骨格や細胞死に関わる分子の免疫組織細胞化学法によって解析し、病態の発症と進行の機序を解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) マウスの育成

米国ジャクソン研究所から導入した *shm* マウスを、C57BL/6 マウスに遺伝子導入したコンジュニック系統を確立して、本研究に使用した。実験には、生後2週～1ヶ月未満のマウスと生後1年齢以上のマウスを用いて解析した。

### (2) 末梢神経、中枢神経の光学・電子顕微鏡観察

マウスを2%パラフォルムアルデヒド・2.5%グルタルアルデヒド固定液で灌流固定した。末梢神経系では坐骨神経、中枢神経系では視神経、小脳、大脳、脊髄の各組織を摘出し、パラフィンならびに樹脂包埋切片を作成して、それぞれ組織構築や有髄神経線維の異常を研究した。

### (3) 免疫組織化学法による研究

4%パラフォルムアルデヒド固定液で灌流固定したマウスの上記臓器の凍結切片を作成して免疫組織化学研究に供した。切片を研究目的に応じたタンパクに対する抗体を用いた免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

### (4) ウェスタンブロット法によるタンパク発現の解析

坐骨神経、小脳、大脳、脊髄の各臓器から、タンパクを抽出し、SDS 電気泳動を行った。分離したタンパクを PDVF 膜に転写した後、抗体と反応させてバンドの検出を行い、定量解析した。

## 4. 研究成果

(1) 生後2週から2ヶ月齢のマウスを用いて以下の研究を行った。マウスは、運動失調や後肢の突っ張りの症状が明らかとなる。

### ① 坐骨神経、視神経の微細構造レベルでの異常

有髄神経線維のミエリン形成に正常との違いはみられなかった。しかしながら、

パラノード部でミエリンループと軸索膜の間に形成されるパラノードジャンクションが欠失していた(図1)。さらに、視神経ではミエリンループの形成も異常であった。また絞輪部位の軸索細胞質内には、肥大したミトコンドリアなどの細胞内小器官の異常な蓄積が観察された。

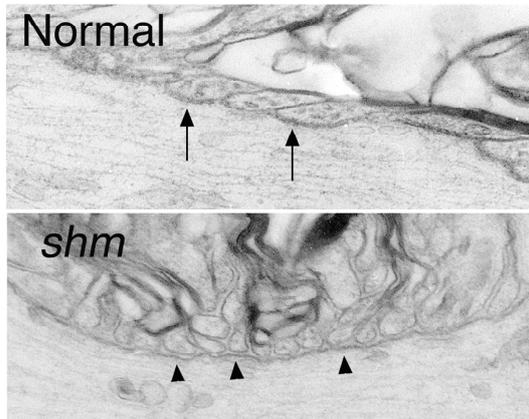


図1  
パラノードジャンクションの電子顕微鏡画像。正常では軸索膜とミエリンループの間に電子密度の高い物質が存在する(矢印)。shmマウスでは、このような構造が欠失している(矢頭)。

### ②坐骨神経の免疫組織細胞化学

Casprの細胞外領域を認識する抗体を用いた免疫染色では、パラノード部位における染色が著しく減少していた(図2)。さらに、パラノードジャンクション形成の分子基盤となるパラノード複合体を構成する他のタンパクもCasprと同程度にパラノード部位における局在が減少していた。

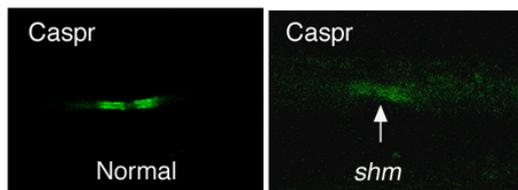


図2  
坐骨神経線の抗Caspr抗体を用いた免疫染色画像。正常では、パラノードが染まっているが、shmマウスの染色はかなり弱い(矢印)。

### ③ウェスタンブロット法によるCasprタンパ

### クの発現量の解析

小脳、大脳の組織から取り出したタンパクで検討したところ、shmマウスで産生されているCasprタンパクは発現量が著しく低下しており、分子量も減少していることが明らかとなった。

(2) 神経症状が進行して後肢の不全が顕著となった生後1-1.5年齢のマウスで中枢と末梢神経系における有髄神経線維の異常を解析した。

### ①中枢、末梢神経系の形態学的異常の検索

大脳運動野と基底核、小脳、脊髄、坐骨神経のパラフィン、樹脂包埋標本を作成して光学顕微鏡レベルの観察を行った。それぞれの組織構築に異常は観察されなかった。しかしながら、脊髄白質には変性細胞が、坐骨神経には変性した神経線維が存在した。

### ②有髄神経線維の微細構造観察

末梢神経系では坐骨神経、中枢神経系では小脳の白質で有髄神経線維を観察したところ、両者ともにパラノードジャンクションの欠失がみられた。さらに小脳では、軸索内に異常なミトコンドリアやライソゾーム、変性した細胞内小器官を含む封入体が観察された(図3)。このことから、生後2-3ヶ月齢で観察されたパラノードやランビエ絞輪部の異常が軸索全体に進行していると考えられた。

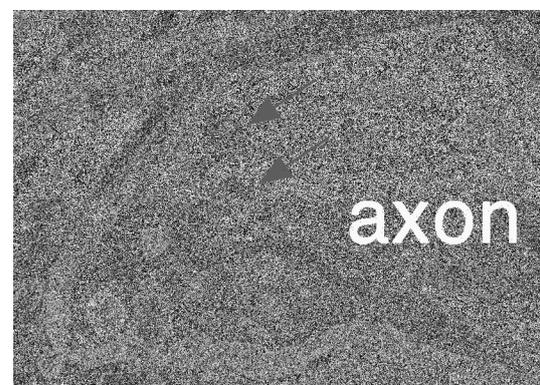


図3  
shmマウス小脳プルキンエ細胞軸索の電子顕微鏡画像。軸索内にライソゾーム様顆粒が存在する(矢印)。

### ③有髄神経線維の消失

マウスの坐骨神経、大脳運動野と基底核、小脳、脊髄で、ミエリン構成タンパク Myelin Basic Protein (MBP) に対する抗体を用いた免疫組織化学法とウェスタンブロット法を行って、有髄神経線維の消失を検討した。小脳では、皮質顆粒層で明らかな抗 MBP 抗体陽性神経線維の減少が観察された。それ以外の部位では、正常マウスに比べると染色性の低下傾向が観察されたものの、有髄神経の減少、消失は明らかではなかった。タンパク量の解析では、小脳で有意な減少がみられたが、他の部位での MBP タンパク量の低下に有意差はみられなかった。

### ④神経細胞の変性と細胞死の検討

上記の観察により有髄神経線維軸索の異常が進行していることが明らかとなったことから、神経細胞体についてその変性や細胞死の有無を検討した。*shm* マウスの小脳では、多数のプルキンエ細胞の消失がみられた。TUNEL 法による解析では、プルキンエ細胞の細胞死はアポトーシスではないことが示唆された。が、抗ユビキチン抗体を用いた免疫組織化学法により、プルキンエ細胞の変性と細胞死には、ユビキチン化が関与していると考えられた。

## 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 1 件)

Sun XY, Takagishi Y, Okabe E, Chishima Y, Kanou Y, Murase S, Mizumura K, Inaba M, Komatsu Y, Hayashi Y, Peles E, Oda SI, Murata Y. A Novel Caspr mutation causes the shambling mouse phenotype by disrupting axoglial Interactions of myelinated nerves. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 68(11): 1207-1218, 2009 査読有り

[学会発表] (計 2 件)

1:Takagishi Y, Okabe E, Chishima Y, Sun XY, Senoo S, Inaba M, Mizumura K, Komatsu Y, Oda SI, Murata Y. Morphological and functional analysis of the nervous system in shambling mice a *Caspr1* mutation. The Society for Neuroscience 38<sup>th</sup> Annual Meeting, (15-19, November, 2008, Washington DC, USA)

2:Takagishi Y, Sun XY, Tobe A, Oda SI, Murata Y. Distribution of neuron-glia interaction at the paranodal junctions in myelinated nerves causes the axonal degeneration and cell death. The XVII<sup>th</sup> International Congress of Neuropathology (ICN 2010) (11-15, September, 2010, Salzburg, Austria)

[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

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

高岸芳子 (Takagishi Yoshiko)

名古屋大学・環境医学研究所・助教

研究者番号: 50024659

(2) 研究分担者

織田銑一 (Oda Sen-Ichi)

岡山理科大学・理学部・教授

研究者番号: 60023660

林良敬 (Hayashi Yoshitaka)

名古屋大学・環境医学研究所・准教授

研究者番号: 80420363

(3) 連携研究者

なし ( )