

令和 6 年 6 月 22 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06863

研究課題名(和文) 髄鞘軸索間結合パラノーダルジャンクション依存の軸索恒常性維持機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of paranodal axoglial junction-dependent axonal homeostasis

研究代表者

石橋 智子 (Ishibashi, Tomoko)

東京薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：50453808

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：有髄神経軸索のランビエ絞輪隣には、髄鞘-軸索間結合paranodal axoglial junction (AGJ)が存在する。本研究では、AGJ形成が軸索表面の膜タンパク質の局在化、軸索小器官の分布に影響を及ぼすだけでなく、樹状突起の形成にも重要であることを明らかにした。AGJ形成不全マウス小脳プルキンエ細胞軸索には、軸索局所におけるIP3R1集積を引き金に、さまざまな分子が集まり、軸索輸送障害が認められる。加えて、樹状突起では骨格タンパク質の局在変化、さらにはシナプス形成にも異常が認められた。すなわち、AGJが神経細胞恒常性維持に極めて重要な役割を担っていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊椎動物神経軸索の多くは、生後軸索周囲に髄鞘を形成することにより跳躍伝導を可能にする。しかしながら一旦形成された髄鞘が障害を受けると、無髄軸索に戻るのではなく軸索変性が生じる。軸索に髄鞘を繋ぎ止める部位であるAGJは、損傷を受けやすい構造であり、わずかなAGJの崩壊が限局した軸索腫脹を引き起こすことが本研究から示唆された。また、軸索腫脹の引き金が、カルシウム恒常性維持に関与する分子IP3R1の軸索局所での過剰発現であることを示し、IP3R1の発現を抑制すると軸索腫脹およびその後の神経細胞死を改善することができた。この結果は多発性硬化症など脱髄性疾患の初期病態を理解する一助となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Myelin loops attach to the axonal membrane and form paranodal axoglial junctions (AGJ) at paranodes adjacent to nodes of Ranvier. AGJ play important roles in the organization and maintenance of molecular domains in myelinated axons. To better understand how AGJ regulate axonal functioning, we studied cerebroside sulfotransferase knockout (CSTko) mice that partially lack of AGJ. In this study, I show that AGJ formation not only affects the localization of membrane proteins on the axon surface and the distribution of axonal organelles, but is also important for dendrite formation, and impaired axonal transport is observed. In addition, abnormalities were observed in the localization of skeletal proteins and synaptogenesis in dendrites. These findings suggest that AGJ plays a pivotal role in neuronal homeostasis.

研究分野：分子神経科学

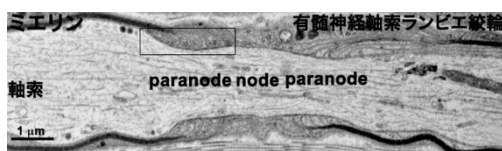
キーワード：ミエリン 軸索 パラノーダルジャンクション 小脳プルキンエ細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

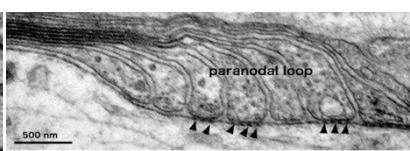
1. 研究開始当初の背景

脊椎動物が進化の過程で獲得した構造“髄鞘(ミエリン)”は跳躍伝導を可能にし、我々の生活を劇的に変化させた (Salzer and Zalc, *Curr. Biol.* 26: 971-975. 2016)。しかしながら、一旦形成された髄鞘が障害を受けると多発性硬化症 (MS) に代表される慢性進行性の経過をたどる神経変性疾患を引き起こす。損傷を受けた髄鞘が自然に修復することはほぼなく、特に中枢神経系では極めて難しい。では一体何が髄鞘の修復を困難にしているのだろうか。その要因の一つは、有髄神経軸索の構造ではないだろうか。

髄鞘膜はオリゴデンドロサイトが突起を軸索に単純に巻きつけるだけではなく、自らを等間



有髄神経軸索ランビエ絞輪(node)周辺の構造。髄鞘(ミエリン)は絶縁体として働き、跳躍伝導を引き起こす。



左図黒枠を拡大。矢頭はparanodal axoglial junctionを指す。

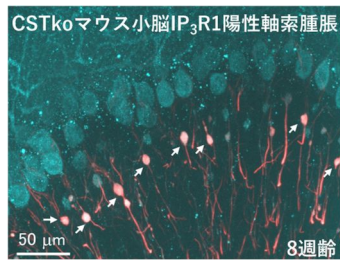
隔に軸索表面に繋ぎ止めるため、ランビエ絞輪(node)の両隣、パラノード部位

(左図)で paranodal axoglial junction (AGJ; 右図矢頭) を形成する。生後軸索周囲を髄鞘が巻き始め AGJ を形成すると、軸索表面全体に存在していた電位依存性 Na^+ チャンネルはランビエ絞輪に、電位依存性 K^+ チャンネルはパラノードの隣ジャクスタパラノードに局在を変える (Ishibashi *et al.*, *J Neurosci.* 22:6507-6514. 2002; Ishibashi *et al.*, *J Neurosci.* 24:96-102. 2004)。このチャンネル局在化が我々脊椎動物の有髄軸索に跳躍伝導を可能にする (Tasaki, *Am. J. Physiol.* 127:211-227. 1939)。すなわち AGJ は軸索膜上のチャンネルの局在変化・維持に必須の障壁である。ところが、僅かな AGJ の崩壊がチャンネルの局在異常を伴う神経伝導速度の低下のみならず軸索腫脹を引き起こし、ミトコンドリアの局在変化など軸索輸送障害、さらには軸索変性および神経細胞死をも生じさせる (Teigler *et al. Hum Mol Genet.* 18:1897-1908. 2009; Ishibashi *et al.*, *J Neurosci Res.* 93:19-27. 2015; Takagishi *et al.*, *Neurobiol Aging.* 43:34-46. 2016)。脱髄に伴う軸索変性の好発部位がパラノード近傍であり、脱髄が生じる前に同領域付近で軸索腫脹が認められることは以前より知られている (Griffiths *et al.*, *Science.* 280:1610-1613. 1998)。申請者は AGJ 形成不全を呈するマウスを用いた研究より、軸索腫脹の引金が IP_3 誘導性のカルシウムチャンネル $\text{IP}_3\text{R1}$ を介した軸索内カルシウム濃度の不均衡であることを示唆する結果を得ている (Ishibashi *et al.*, *J Neurosci Res.* 93:19-27. 2015; Neuro2022 学会発表)。さらに、最近 AGJ 形成不全により樹状突起の形態およびシナプス形成が変化することを見出した (第 66 回日本神経化学学会発表)。すなわち脊椎動物が獲得した構造、AGJ が極めて障害を受けやすい部位であり、かつ軸索恒常性維持機構に重要であると考えられる。しかしながら、パラノード領域 AGJ がどのように軸索機能制御の鍵になっているのか具体的な機序は明らかではない。

2. 研究の目的

有髄神経軸索ランビエ絞輪両隣には、活動電位発生を担っているチャンネル分子の局在化に必須の構造、髄鞘-軸索間結合 paranodal axoglial junction (AGJ) が存在する。AGJ は軸索表面のチャンネルの局在変化・維持に必要な障壁であるが、それ以上に軸索機能維持、特にカルシウム恒常性維持に重要な部位であると考えている。本研究ではその証拠を得るために、AGJ の状態と、小胞体に存在するカルシウムチャンネル $\text{IP}_3\text{R1}$ および、ミトコンドリア-小胞体膜間領域(MAM)との関係を明らかにすることを目的とした。AGJ は極めて障害を受けやすい部位であり、脱髄疾患の初期に変化を来す。本研究は、長い軸索に等間隔に存在する AGJ が、細胞体から遠く離れた遠位の

軸索機能調節の中心であり、“AGJ 依存的軸索恒常性維持機構”という考え方を提唱し、白質病変を含めた神経障害の病態の解明に寄与すると考えている。



3. 研究の方法

AGJ 形成不全を呈する Cerebroside sulfotransferase 欠損 (CSTko) マウスを用いた軸索腫脹の変化は、小脳プルキンエ細胞で顕著に認められるため(左図)、実験は小脳組織を用いて行った。本研究ではこれまで組織学的解析で見出した AGJ 形成不全軸索で認められた IP₃R1 陽性腫脹の意義を調べるために、IP₃R1、ER およびミトコンドリアと髄鞘の関係、さらに AGJ の状態が樹状突起の形態維持に変化を及ぼすのか明らかにした。

i) 正常および AGJ 形成不全マウス小脳組織由来 *in vitro* 髄鞘培養細胞を用いたプルキンエ細胞軸索の解析

神経軸索は非常に細く髄鞘との関係を調べる上で *in vitro* の系は不可欠である。申請者はプルキンエ細胞の効率よい培養方法を用いて、組織学的解析で腫脹部に認められた IP₃R1 を中心に ER およびミトコンドリアの動向と髄鞘の状態の関係を調べた。

ii) AGJ 形成不全が引き起こす細胞体および樹状突起への影響

AGJ 形成不全の影響が軸索のみならず、樹状突起にも変化を引き起こしている可能性を調べるために組織学的および生化学的に AGJ 形成不全マウス小脳を調べた。

iii) AGJ 形成不全と小胞体ストレスの関係

IP₃R1 は ER に局在する分子であるが、ER 膜の中でもミトコンドリア近接部位 MAM に豊富に存在することが報告されている (Vance *Biochim Biophys Acta*. 1841:595-609. 2014; Area-Gomez *et al., Cell Death Dis.* 9:335. 2018)。AGJ 形成不全プルキンエ細胞軸索の限局した部位で、IP₃R1 に加えて MAM に豊富に存在する分子(SigmaR1, VDAC1, Mitofusion2) が過剰に集まっている所見を組織学的解析で得ている。これら分子に加え小胞体ストレスに関与する分子の局在などを調べた。

4. 研究成果

(1) 髄鞘培養細胞を用いたプルキンエ細胞軸索の解析

以前の研究より正常マウス髄鞘形成時期に、AGJ 形成と IP₃R1 局在変化を調べた結果、軸索全体に存在していた IP₃R1 が、AGJ のマーカーである Caspr のパラノードへの局在化に伴いインターノード部分に限局することを見出している。本研究では、髄鞘形成培養系で、髄鞘形成に伴う IP₃R1 の局在を詳細に調べた結果、髄鞘形成に伴い、ミエリンタンパク質である MBP 陽性のインターノード部位に IP₃R1 に集まっていることが分かった。他のミエリンタンパク質である PLP、AGJ のマーカーとして NF155 との関係も調べ、IP₃R1 がミエリン形成に伴い、よりインターノードに集まることを再確認した。それに対して、細胞質に存在するカルシウム結合タンパク質である Calbindin は MBP の局在に関係なく、軸索全体に分布していた。小胞体自体が髄鞘形成に伴い軸索内の局在変化を引き起こしているのか、あるいは小胞体内での IP₃R1 の分布が変化しているのか今後調べる必要がある。

(2) AGJ 形成不全が引き起こす細胞体および樹状突起への影響

生後 4~5 ヶ月齢の CST^{+/+}と CST^{-/-}マウス小脳凍結切片を用いて、抗 MAP2 抗体と抗 Calbindin 抗体を用いた免疫組織学的解析を行った。CST^{+/+}では、A の分子層における MAP2 の染色性が比較的均一な樹状突起の染色性が認められた (Fig.1 上段)。一方、CST^{-/-}では CST^{+/+}とは異なりドット状のような不均一な染色性が認められた (Fig. 1 下段)。また Calbindin において CST^{-/-}では CST^{+/+}とは異なり、

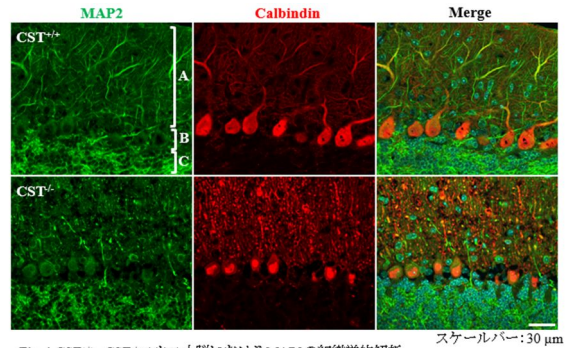


Fig. 1 CST^{+/+}, CST^{-/-}マウス小脳におけるMAP2の組織学的解析
生後4~5ヶ月齢のCST^{+/+}とCST^{-/-}マウス小脳凍結切片で、抗MAP2抗体(緑)と抗Calbindin抗体(赤)を用いた蛍光二重免疫染色の結果。
A: 分子層 B: プルキンエ細胞層 C: 顆粒層
スケールバー: 30 μm

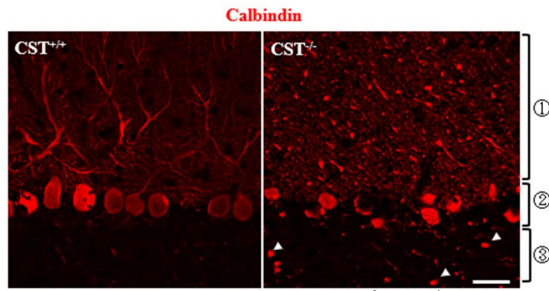


Fig. 2 CST^{+/+}, CST^{-/-}マウス小脳におけるCalbindinの組織学的解析
生後4~5ヶ月齢CST^{+/+}, CST^{-/-}マウス小脳凍結切片で、抗Calbindin抗体(赤)を用いた蛍光免疫染色の結果で矢頭はプルキンエ細胞軸索腫脹を示す。①分子層②プルキンエ細胞層③顆粒層
スケールバー: 30 μm

体ずつの小脳ホモジネートを用いたウエスタンブロッティングを行った。ローディングコントロールとして抗 α -Tubulin 抗体を用いて、検出したバンドの輝度をそれぞれ定量化した。その結果、CST^{-/-}において MAP2 のタンパク量が有意に増加していた (Fig. 3)。樹状突起に局在する MAP2 のタンパク量が有意に増加していたことから AGJ 形成不全が樹状突起に影響を及ぼしていることが示唆された。

り、A の分子層において MAP2 と同様にドット状の様な不均一な樹状突起の染色性が認められた (Fig. 2 右側)。また IP₃R1 でも同様な染色性の違いが認められた。このことから AGJ 形成不全が分子層にあるプルキンエ細胞樹状突起に影響を及ぼしていることが示唆された。

小脳全体での MAP2 のタンパク量の変化を調べるために、5~5.5 ヶ月齢 CST^{+/+}, CST^{-/-} 各 3 個

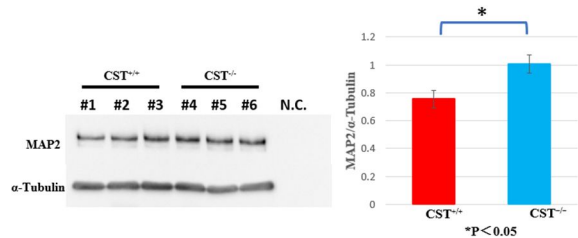


Fig. 3 CST^{+/+}, CST^{-/-}マウス小脳におけるMAP2の生化学的解析
生後5~5.5ヶ月齢CST^{+/+}, CST^{-/-}マウス小脳ホモジネートで抗MAP2抗体および抗 α -Tubulin抗体を用いたウエスタンブロッティング解析の結果および各レーンのMAP2陽性バンドの輝度を α -Tubulin陽性バンドの輝度で除した値のグラフ。n=3, *P<0.05

(3) AGJ 形成不全と小胞体ストレスの関係

CST 欠損マウス小脳の Ca²⁺濃度が上昇しているのかを調べるために行った Slo1 の解析の結果、Ca²⁺活性化 K⁺チャンネル Slo1 のタンパク量は、2 ヶ月齢で CST 正常マウスと比較して CST 欠損マウス小脳で増加傾向にあった (Fig. 1A)。したがって、CST 欠損マウス小脳では Ca²⁺濃度が上昇している可能性が示唆された。小胞体ストレスの指標として GRP78 のタンパク量を比較すると、特に5~5.5 ヶ月齢において CST 正常マウスに比べて CST 欠損マウス小脳で有意に増加していた (Fig. 1B)。この結果から、

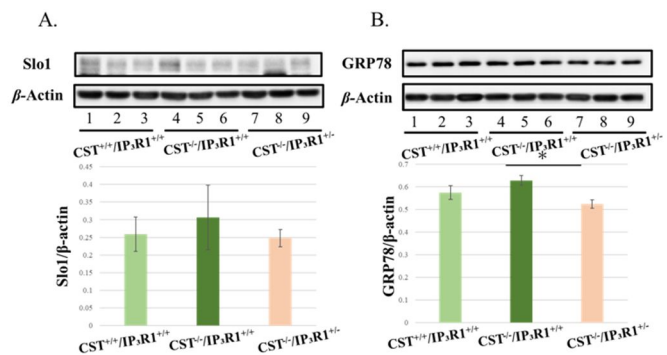


Fig. 1 CST^{+/+}/IP₃R1^{+/+}, CST^{-/-}/IP₃R1^{+/+}, CST^{+/+}/IP₃R1^{-/-}マウス小脳における (A) Slo1 および (B) GRP78 のタンパク量の定量比較

CST 欠損マウス小脳内は小胞体ストレス状態にあることが示唆された。また、CST 欠損マウス小脳の SNPH とミトコンドリアの量的変化を確認するために行った SNPH と VDAC の解析結果では、特に 2 ヶ月齢の CST 欠損マウスにおいて増加傾向がみられた (Fig. 2)。

したがって、過去の組織学的解析から CST 欠損マウス小脳において局在変化が明らかになっている SNPH は、ミトコンドリアとともに量が増加していることが示唆された。次に、これらの異常と IP_3R1 の関係性を裏付けるために 2 ヶ月齢の CST 正常、欠損マウスに加えて $CST^{-/-}/IP_3R1^{+/-}$ マウス小脳ホモジネートを用いて解析を行った。その結果、Slo1 は若干の個体

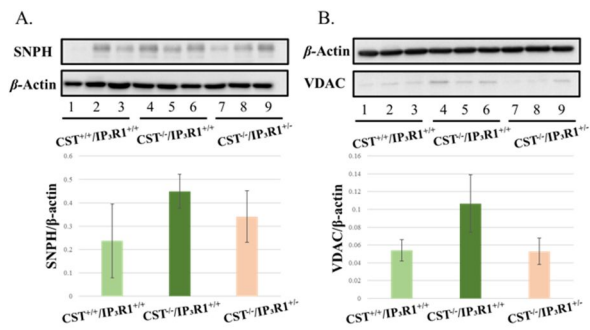


Fig. 2 $CST^{+/+}/IP_3R1^{+/+}$, $CST^{-/-}/IP_3R1^{+/+}$, $CST^{-/-}/IP_3R1^{+/-}$ マウス小脳における (A) SNPH および (B) VDAC のタンパク量の定量比較

差はあるものの、タンパク量は CST 欠損マウスと比較して $CST^{-/-}/IP_3R1^{+/-}$ マウスで減少していた (Fig. 1A). GRP78 のタンパク量は CST 欠損マウスと比較して $CST^{-/-}/IP_3R1^{+/-}$ マウスで有意に減少していた (Fig. 1B). また、SNPH と VDAC も同様に、両タンパク量ともに CST 欠損マウスと比較して、 $CST^{-/-}/IP_3R1^{+/-}$ マウスで減少していたことが分かった (Fig. 2). これらの結果から、CST 欠損マウス小脳内の軸索腫脹に特徴づけられた異常は IP_3R1 の発現量およびタンパク量に依存している可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

T. Ishibashi and H. Baba. Paranodal Axoglial Junctions, an Essential Component in Axonal Homeostasis. *Front Cell Dev Biol*, 10, 951809 (2022)

〔学会発表〕(計 2 件)

T. Ishibashi, A. Shimura, K. Sugawara, and H. Baba. The importance of the paranodal axoglial junctions in Purkinje axonal homeostasis. Neuro2022 第 45 回日本神経科学大会 / 第 65 回日本神経化学学会大会 / 第 32 回日本神経回路学会大会. 沖縄県 20220630

Y. Setoguchi, A. Hayashi, A. Kawada, D. Yanaoka, S. Kasai, Y. Yamaguchi, T. Ishibashi, H. Baba, and H. Ohtaki. Immunoglobulin therapy improves the lysolecithin-induced demyelination of mouse sciatic nerve via anti-inflammatory macrophage accumulation. 第 96 回日本薬理学会横浜市 20221130

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Yuki Setoguchi, Akiko Hayashi, Ayami Kawada, Ayako Ibusuki, Daigo Yanaoka, Ryota Saito, Tomoko Ishibashi, Hiroaki Takimoto, Yoshihide Yamaguchi, Hirokazu Ohtaki, and Hiroko Baba	4. 巻 99
2. 論文標題 Intravenous Immunoglobulin Preparations Attenuate Lysolecithin Induced Peripheral Demyelination in Mice and Comprise Anti-Large Myelin Protein Zero Antibody	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci	6. 最初と最後の頁 48-60
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2183/pjab.99.004.	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 Tomoko Ishibashi and Hiroko Baba	4. 巻 10
2. 論文標題 Paranodal Axoglial Junctions, an Essential Component in Axonal Homeostasis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Cell Dev Biol	6. 最初と最後の頁 951809
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2022.951809.	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 T. Ishibashi, A. Shimura, K. Sugawara, and H. Baba
2. 発表標題 The importance of the paranodal axoglial junctions in Purkinje axonal homeostasis
3. 学会等名 Neuro2022 第45回日本神経科学大会 / 第65回日本神経化学会大会 / 第32回日本神経回路学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tomoko Ishibashi, Yuika Takei, Shiho Ohshima, Kouichi Hashimoto, Hiroyuki Konishi, Hiroshi Kiyama, Hiroko Baba
2. 発表標題 Distribution of Mac2-positive cells in developing white matter
3. 学会等名 第64回日本神経化学会
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------