

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500355

研究課題名（和文） 髄鞘シグナルによる神経軸索輸送の調節に関する研究

研究課題名（英文） Regulation of axonal transport by local interaction with myelin

研究代表者

馬場 広子（HIROKO BABA）

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：40271499

研究成果の概要（和文）：神経細胞が正常に機能する上で、軸索輸送は重要な役割を果たす。本研究では、軸索輸送に対する髄鞘の関与を明らかにすることを目的とした。髄鞘異常を伴うマウスを用いた詳細な組織学的および生化学的解析の結果、髄鞘-軸索間結合の欠損により輸送を含む局所的な軸索の変化が生じ、週齢に伴い軸索腫脹や変性が進行することを明らかにした。また、これらの変化に局所のカルシウム濃度変化が関与する可能性を示した。本研究により新たな髄鞘の役割が示され、今後軸索変性機序や予防などの研究に役立つ重要な知見を得た。

研究成果の概要（英文）：In order to elucidate the role of myelin on axonal transport, immunohistological and biochemical analyses were performed in the central and peripheral nervous systems of myelin mutant mice. In these mice, paranodal axo-glial junctions (AGJ) were disrupted but compact myelin was preserved. The present results demonstrated that disruption of AGJ caused local axonal swellings containing various axonal components and changes of axonal transport-related molecules. Involvement of local calcium change was suggested. Focal axonal swellings were first observed at early stage of myelination and progressive with age. Axonal degeneration became more prominent in aged mice. Thus, the axo-glial interaction at the paranode is important for local axonal homeostasis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,250,000

研究分野：分子神経生物学

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：グリア細胞

1. 研究開始当初の背景

神経系の機能は、神経回路を介した情報処理によって行われる。個々の神経細胞からの情報の出力には、軸索上の興奮伝導と終末部でのシナプス伝達に関与する。軸索周囲に一

定間隔で巻き付いた膜様構造物である髄鞘は、これまで単なる絶縁体として考えられてきた。しかし、髄鞘がランビエ絞輪軸索へのイオンチャネル集積に関与することが近年明らかとなるなど、軸索-グリア（髄鞘）間の

局所シグナルの神経機能への重要性が認識され初めている。本研究代表者は、軸索-髄鞘間で形成される細胞間結合 (paranodal axo-glia junction: AGJ) の形成不全マウスの末梢神経において軸索絞輪部が異常に膨らみ、変性したミトコンドリアや小胞などが蓄積することを見出したことから (Hoshi et al, 2007)、軸索輸送に関する髄鞘の局所的な関与を調べるのが重要と考え、本研究を申請した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、神経軸索輸送の調節の中でも特に髄鞘の役割に着目し、髄鞘からの外的シグナルによる軸索輸送調節機構を明らかにすることを目的とした。このため、本研究では、上述した軸索変化〔腫脹〕を伴う髄鞘異常マウスを利用して、以下を明らかにすることを申請当初の目標とした。(1) 髄鞘異常による軸索輸送関連分子の量的あるいは質的变化の解析、(2) 同マウスの軸索部分におけるリン酸化タンパク質の変化の解析、(3) 培養系における軸索輸送変化の解析。

3. 研究の方法

本研究では、中枢および末梢神経系において軸索異常を来す AGJ 形成不全マウスとして、スルファチド合成酵素 (cerebroside sulfotransferase: CST) 欠損ホモマウスを用いた。このマウスでは、髄鞘自体は形成されるが、ランビエ絞輪に接した髄鞘両端のパラノード部分における髄鞘と軸索との間の結合 (AGJ) が十分に形成されない。AGJ は、電気的絶縁の他、軸索表面の膜タンパク質の側方移動に対するバリアとしてはたらく。このため、CST 欠損マウスの中枢神経系では軸索上のイオンチャネルの分布やチャネルサブタイプに変化を生じることが明らかになっている (Ishibashi et al, 2002; Suzuki et al, 2004)。一方、末梢神経系では絞輪における Na⁺チャネルの分布は変わらないが、K⁺チャネルの分布異常と成熟マウスの絞輪部分の軸索腫脹が見られる (Hoshi et al, 2007)。そこで、この CST 欠損マウスにおける中枢および末梢神経系の軸索変化を以下の方法で解析した。

(1) AGJ 欠損マウスにおける輸送関連分子の量的あるいは質的变化の解析：

CST 欠損マウスおよびワイルドマウスを麻酔した後末梢神経および脳や脊髄を取り出し、ホモジネートを作製した。SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動後にタンパク質を膜に転写し、軸索輸送関連タンパク質などの特異抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った。

(2) AGJ 欠損マウスにおける輸送変化に対する形態学的解析：

発達段階あるいは成熟した CST 欠損マウスおよびワイルドマウスを麻酔した後灌流固定し、取り出した末梢神経および脳を用いて凍結切片あるいは超薄切片を作製した。坐骨神経はときほぐし標本も作製して用いた。凍結切片およびときほぐし標本は各種抗体で染色し、蛍光顕微鏡あるいはレーザー共焦点顕微鏡下で解析した。リン酸化修飾されたタンパク質の局在解析に関しては、各々のリン酸化タンパク質に対する特異抗体を用いて解析した。超薄切片は電子顕微鏡で形態を観察した。

(3) 培養系を用いた解析：

研究開始当初は、AGJ 欠損マウスから樹立したシュワン由来株化細胞を用いた髄鞘形成培養系の確立とその利用を予定していたが、(1) および (2) の解析からカルシウムイオンとの関連性が推測されたため、培養スライスを用いたカルシウムイオン変化の解析に変更した。

本研究における動物実験に関しては東京薬科大学動物実験規程に基づいて実験計画の承認を受け、規程を遵守した上で実施した。また、遺伝子組換え動物の飼育および実験への使用に関しては、東京薬科大学薬学部 DNA 組換え実験委員会の承認を得た上で実施した。

4. 研究成果

(1) AGJ 欠損マウスにおける輸送関連分子の量的あるいは質的变化の解析：

成熟 AGJ 欠損マウス坐骨神経ホモジネートを用いたウエスタンブロット解析の結果、コントロールのワイルドマウスに比してキネシンやダイニンなどの順行性あるいは逆行性軸索輸送にはたらく一連のモータータンパク質含有量が明らかに変化していた。これらの結果から、AGJ 欠損マウスの末梢神経系では、軸索輸送分子の量的異常が絞輪軸索の腫脹やミトコンドリアの異常と関連している可能性が考えられた。また、同様の変化は脊髄でも認められたことから、中枢神経系においても軸索輸送変化が生じている可能性があるため、(2) のように形態学的に解析する必要があると考えられた。

(2) AGJ 欠損マウスにおける輸送変化に対する形態学的解析：

まず、AGJ 欠損マウスの坐骨神経凍結切片 (あるいはときほぐし標本) をミトコンドリア関連分子に対する特異抗体で免疫組織学的解析を行った。その結果、ミトコンドリア

の機能に関連する分子の絞輪部への蓄積の他に、ミトコンドリア自体の輸送に関与する KIF1Balpha や tau などの局在にも異常が見られた。(1) で示したウエスタンブロット解析の結果と合わせ、以前報告した末梢神経軸索の部分的腫脹と輸送変化との関連性が示唆された。

また、(1) のウエスタンブロット解析から中枢神経系における輸送関連タンパク質の量的変化も疑われたことから、中枢神経系の軸索変化を組織学的に解析した。その結果、成熟した AGJ 欠損 (CST 欠損) マウスにおいて、小脳プルキンエ細胞の軸索の部分的腫脹が多数認められた。発達段階を含め、異なる週齢のマウスを用いた解析の結果、この軸索変化は髄鞘が形成される頃から観察されはじめ、週齢と共に軸索の腫脹した部分自体が大きくなり、数も増加することが確認された。また、小型と大型の軸索腫脹を断面で比較すると、腫脹内におけるニューロフィラメントの分布が異なり、腫脹が大きくなると共に腫脹部分へのリン酸化ニューロフィラメントの異常蓄積がおきていることがわかった。これらの腫脹部分をそれぞれ数え、統計解析した結果、週齢に伴って数が増加し、大きさも増加することがわかった。

アミロイド前駆タンパク質 (amyloid precursor protein: APP) の分布を解析したところ、ニューロフィラメントより遅い段階で軸索の腫脹部位に蓄積することが明らかになった。さらに、40 週齢以降のマウスにおいては部分的な腫脹のみならず、明らかな軸索変性が認められた。また、末梢神経軸索と異なり、AGJ 欠損マウス中枢神経系における軸索腫脹はランビエ絞輪部分ではなく髄鞘膜に覆われたインターノード部分に存在することがわかった。さらに、軸索の腫脹部位では、細胞内局所のカルシウムイオン濃度の調節に関与する小胞体上の分子も髄鞘形成早期から異常集積することが明らかになった。これらの形態的变化は電顕でも確認された。

以上の組織学的解析から、AGJ の欠損により、末梢神経軸索では主にランビエ絞輪部分を中心としてミトコンドリアや小胞、それらの輸送関連分子の変化が認められ、中枢神経系、特に小脳ではインターノード部分の軸索において、局所的軸索腫脹と様々な分子の腫脹部分への蓄積が引き起こされ、それが経時的に進行し、最終的には軸索変性が引き起こされることがわかった。

(3) 培養系を用いた解析：

上述のように、本研究 (1) (2) の結果から、髄鞘膜自体が軸索を取り巻いていたとしても AGJ が形成されない場合には、軸索に局所的な腫脹とその部位への様々な分子

の蓄積が生じること、輸送関連分子の量的変化や分布異常が認められること、これらの変化に局所のカルシウム異常が関わる可能性があることがわかった。このため、培養系を用いて髄鞘異常と軸索のカルシウム濃度変化との関連性の解析を試みた。

本研究開始時の計画では、CST 欠損マウスあるいはワイルドマウスから採取したミエリン形成細胞と神経細胞を共培養した髄鞘形成培養を用いて、髄鞘異常が軸索に与える影響を解析する予定で準備を行った。しかし、上述のように局所のカルシウムイオン濃度変化が関与することが考えられたことから、これがより解析しやすいスライス培養系に変更した。スライス培養系を用いて軸索上のカルシウムイオン濃度変化を指示薬によって解析する系を作製したが、この系では明らかな結果を得ることができなかった。培養系の調製に関してさらに工夫が必要と考えられ、研究期間終了後も引き続き実験を行っている。

以上、本研究期間内にカルシウムイオンの関与を直接的に証明することはできなかったが、カルシウム結合タンパク質や小胞体からのカルシウム放出関連分子が早期に軸索腫脹内に集積し、週齢が進むと共に腫脹が増大し、軸索変性へと進行することから、AGJ 異常に伴う軸索局所のカルシウム濃度変化がこれらの一連の軸索変化に関与することが示唆された。本研究を通して、軸索機能維持に対する新たな髄鞘 (特に AGJ) の役割を明らかにすることができ、今後の軸索変性機序やその予防などの研究に役立つ重要な所見が得られた。

本研究で得た成果は、以下に示すように国内および国際学会で発表した。両神経系共に培養系の結果も含めてそれぞれ成果をまとめる予定であったため論文作成が遅れたが、本研究により十分な結果が得られたことから、現在論文作成中である。

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 0 件) 現在投稿準備中。

[学会発表] (計 5 件)

国際学会 3 件 (うち招待講演 1)、国内学会 2 件

① Tomoko Ishibashi, Hiroko Baba, Disruption of axo-glial interaction causes focal damages in cerebellar Purkinje neurons. 10th Biennial

International Society for Neurochemistry
satellite Meeting on Myelin Biology. Crete
(Greece) 2011年8月24-26日

②Hiroko Baba, Disruption of the axo-glial
interaction causes focal axonal damages in
cerebellar Purkinje neurons. 10th Biennial
Meeting of the Asian Pacific Society for
Neurochemistry. Phuket, Thailand 2011年
10月17-20日 (シンポジウム招待講演)

③児玉明子、立石陽子、石橋智子、馬場広子
末梢神経系パラノーダル・ジャンクション形
成異常における軸索の変化 第52回日本
神経化学学会大会 伊香保 (群馬県) 2009年6
月23日

[その他]

ホームページ等

<http://www.ps.toyaku.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬場 広子 (HIROKO BABA)

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：40271499