

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 29 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500404

研究課題名(和文) 髄鞘形成および髄鞘再生におけるCYP51の機能的役割の解明

研究課題名(英文) Study of the functional role of CYP51 in myelination and remyelination.

研究代表者

宋 時榮 (Song, Si-Young)

徳島文理大学・大学共同利用機関等の部局等・教授

研究者番号：00399693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：コレステロール合成に関わる唯一のCYP酵素LDMは、中枢・末梢神経の髄鞘形成を担うオリゴデンドログリア、シュワン細胞で発現している。抗LDM抗体を用いた免疫組織化学、laser capture microdissectionと組み合わせたWestern blotにより、LDMは髄鞘形成期の生後2-3週に発現のピークを示した後、減少し、cuprizone投与による脱髄後の髄鞘再生過程で再度の発現増大を認めた。LDMの発現増大による脱髄性疾患の治療可能性を探るため、PLP遺伝子のプロモーターを用いてオリゴデンドログリア特異的にLDMを高発現するトランスジェニックマウスを作成した。

研究成果の概要(英文)：LDM is the only cytochrome P450 enzyme that is involved in cholesterol biosynthesis and is expressed in central and peripheral myelin-forming cells, oligodendroglia and Schwann cell. Immunohistochemical analysis and Western blot analysis combined with laser capture microdissection using anti-LDM antibody revealed that LDM-immunoreactivity (IR) reached its peak at the stage of myelination, postnatal 2-3 weeks. The same kind of analyses indicated that LDM-IR in the white matter increased during the processes of remyelination following demyelination induced in mice by feeding diet containing cuprizone that injures oligodendroglia. To examine the possibility to treat demyelinating disorder by the upregulation of LDM, transgenic mice were raised using PLP gene-promoter, which express high level of LDM specifically in oligodendroglia.

研究分野：神経解剖・神経病理

科研費の分科・細目：神経病理

キーワード：LDM CYP51 オリゴデンドログリア シュワン細胞 髄鞘形成 脱髄 髄鞘再生 cuprizone

1. 研究開始当初の背景

Lanosterol 14- α Demethylase (LDM, CYP51) は真核生物におけるステロール合成経路に必須であり、哺乳類では lanosterol を脱メチル化し、follicular fluid meiosis-activating sterol (FF-MAS) への代謝を触媒する。哺乳類における LDM 発現は、コレステロール合成の盛んな肝臓や副腎、精巣、卵巣に多く、肝臓は脂質代謝、精巣と卵巣では生殖細胞の分化における LDM の機能的役割という観点から、多くの研究が成されている。

生化学的研究によって、LDM が脳で発現しており、脳における全チトクロム P450 量当たりの LDM 活性は肝臓の約 4 倍である事が報告されている (J Biochem. 120:982-986,1996)。しかし、発現細胞の同定も含めて、LDM の神経系における機能的役割は不明の点が多い。

2. 研究の目的

我々の見出した LDM が脳内ではオリゴデンドログリアに発現しており、髄鞘の生後発達過程や髄鞘再生時に発現レベルが増大する知見を基に、LDM の髄鞘形成への関与を明確に証明し、多発性硬化症など、ヒトの脱髄性疾患の治療への応用の可能性を探る。

3. 研究の方法

- (1) 抗 LDM 抗体を用いて、脳の生後発達過程での髄鞘形成と LDM の発現変化の関連性を免疫組織化学的検索および Western blot 分析によって明らかにする。特に後者については laser capture microdissection と高感度 Western blot 分析とを組み合わせ、白質特異的な LDM 発現変化を解析する。
- (2) 神経細胞とグリア細胞から成る aggregate culture を導入し、髄鞘形成に伴う LDM の発現変化が生体内の髄鞘形成に伴う LDM の発現変化と関連することを確認する。
- (3) ミクロソーム画分を用いた CO 差還元スペクトルの測定と、精製 lanosterol を基質とした LDM による脱メチル化反応を LC-MS で定量的に測定することによる LDM の酵素活性測定系を導入し、LDM 遺伝子の SNP による酵素活性の違いを検討する。
- (4) LDM をオリゴデンドログリア 特異的に高発現する transgenic mice を作出し、様々な実験的脱髄法に対する反応性を対照動物と比較し、LDM をターゲットとする脱髄疾患治療の可能性を探る。

4. 研究成果

- (1) 脳における LDM の発現と髄鞘形成過程での発現変化
これまでに、抗 LDM 抗体を用いた免疫組織化学的検索によって、LDM 免疫活性は幼弱ラットでは神経細胞でも免疫活性が認め

られたが、その後の生後発達過程では中核および末梢の髄鞘を形成するオリゴデンドログリアおよびシュワン細胞に発現が限局すること、無髄神経である末梢の自律神経組織の軸索周囲には LDM 免疫活性が認められないことを確認した。

生後各週齢のラット大脳皮質、白質での LDM の発現を免疫組織化学的解析、laser capture microdissection (LCM) 顕微鏡によって取り分けた皮質、白質から抽出したタンパクを用いた Western blot 分析によって検討したところ、皮質では出生直後から認められ、この発現レベルは P14 まではほとんど変化が認められず、その後の生後発達過程で減少し、生後 8 週では痕跡的な発現しか認められなくなるのに対し、白質では出生直後の発現は弱く、P14 まで次第に増加した後、減少し、髄鞘の生後発達と関連する変化が認められた。

In vitro で明瞭な髄鞘形成が認められる神経細胞とグリア細胞から成る aggregate culture を用いて、髄鞘形成に伴う LDM の発現変化を免疫細胞化学的解析によって検討したところ、LDM 免疫活性は主に、軸索とは無関係に四方へ突起を伸展したオリゴデンドログリアと、進展した軸索を覆う様なものの二種類が確認され、培養日数が経つごとに後者の割合が増加した。また、LDM 活性の大部分が CNP (2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase) や MBP (myelin basic protein) の免疫活性と共存していた。

これらの結果は、LDM が生後の髄鞘形成過程に関与していることを示唆する所見と考えられる。

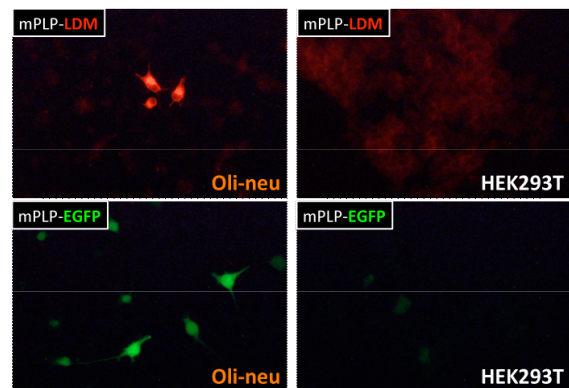
- (2) 髄鞘再生過程での LDM の発現変化
ICR マウスに 0.3% (w/w) cuprizone 添加飼料を 6 週間投与すると、脳梁や大脳脚などに実験的脱髄を誘発することができる。その後、正常飼料に戻すと髄鞘再生が認められる。正常飼料を 5 週間投与して誘発される後の髄鞘再生過程で、LCM 顕微鏡によって取り分けた白質から抽出したタンパクを用いた Western blot 分析では、正常対象に比べて脱髄過程では 2 倍、髄鞘再生過程では 3 倍程度、増加していた。これらの結果は、LDM の再生への関わりを示唆する。
- (3) マウス LDM 遺伝子の SNP の意義
ICR マウスの LDM 遺伝子 exon 2 の proline rich region に、histidine (通常型) から tyrosine (変異型) へアミノ酸の置換を伴う SNP が報告されているが、その酵素活性に与える影響は不明である。前項の実験的脱髄・髄鞘再生モデルマウスを用いて、通常型および変異型における脱髄の程度について解析を行った結果、通常型マウスでは強い脱髄の見られた個体が多いのに対し、変異型マウスでは、脱髄が軽微かほとんど見られない個体が多かった。ヘテロ型マウスの脱髄は野生型マウスよりも軽微であったが、変

異型マウスよりも強かった。これらの結果から、SNP による酵素活性への影響が示唆された。そこで各遺伝子型のマウスの脳および肝臓から抽出したマイクロソーム画分を用いて CO 差還元 Spectrum による CYP 活性測定を行った結果、いずれの遺伝子型でも 450nm に吸収極大を持つ活性型 CYP が回収されていることがわかったが、遺伝子型による活性の違いは見出せなかった。次いで C57BL/6 マウス肝臓由来 cDNA から LDM cDNA をそれぞれクローニングし、PCR 変異導入法によって、LDM の変異型 cDNA をクローニングした後、これらを動物細胞用発現ベクターに組換え、HEK293-T 細胞に遺伝子導入して組み替え蛋白を強制発現させた。HEK293-T 細胞の細胞分画を行った結果、発現した LDM、LDM 変異体はいずれも、主にマイクロソーム画分に存在することがわかった。CO 差還元スペクトルにより CYP 酵素活性を検討したところ、野生型および変異型 LDM のいずれも 450 nm に吸収極大を持つことから、CYP 酵素としての活性があることがわかった。また対象試料である遺伝子導入をしていない HEK293-T 細胞由来のマイクロソーム画分では、内在性 CYP の 450 nm における吸収が見られなかったことから、観察された 450 nm の吸収は強制発現させた LDM に由来していると考えられた。通常型、変異型いずれについても活性型の LDM を回収することができたが、CO 差還元スペクトルでは両者の活性の強さに有意な違いは見られなかった。

(4) オリゴデンドログリア特異的に LDM を高発現させるトランスジェニックマウスの作成

以上のデータから、LDM は cholesterol 合成を通じて髄鞘の再生に関与していると考えられる。そこで LDM の発現を高めることで髄鞘の再生を加速することができるかどうかを個体レベルで解明するための実験系として、オリゴデンドログリア特異的に LDM を過剰発現するトランスジェニックマウスの作製を試みた。このために、髄鞘の生後発達過程ならびに脱髄後の髄鞘再生過程において LDM と同様の発現パターンを示す proteolipid protein (PLP) 遺伝子の promoter を用いた。遺伝子発現カセットの構築に必要な multi cloning site を導入した vector に、マウス由来の PLP promoter (mPLPp)、LDM 遺伝子、SV40 由来の polyadenylation signal のクローニングを行った。次に、培養細胞 (HEK293T, Oli-neu) を用いて、構築した vector による mPLPp 依存的な LDM の発現を確認した。遺伝子導入後に免疫染色を行った結果、Oli-neu 細胞においてのみ LDM タンパク質の強い発現を確認でき、構築した LDM 発現カセットを導入したトランスジェニックマウスでは、内在性の LDM に加えて mPLPp 依存的な、oligodendrocyte での LDM の発現が期待さ

れる。この遺伝子発現カセットを用いてトランスジェニックマウスの作出に成功した。



Oli-neu 細胞では mPLP 遺伝子プロモーター (mPLPp) を用いて LDM および EGFP の強い発現が、それぞれの特異抗体によって確認されるのに対し、HEK293T 細胞では LDM、-EGFP いずれの発現も認められなかったことを示す図。

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)

[学会発表] (計 5 件)

1. Song S.-Y., Kato C., Nakashima K. (2011) Expression of lanosterol 14alpha-demethylase (LDM, CYP51) in the central and peripheral nervous system and its changes in the processes of postnatal myelination and remyelination. Neuroscience 2011, The 34th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. Sep 14-17, Yokohama, Japan.
2. Nakashima K., Hashimoto N., Kato C., Song S.-Y. (2011) Quantitative analysis of gene expression at cellular-scale using laser capture microdissection and real-time PCR. Neuroscience 2011, The 41th annual meeting of the Society for Neuroscience. Nov. 12-16, Washington DC, U.S.A.
3. Nakashima K., Hashimoto N., Kato C., Song S.-Y. (2011). Cellular scale quantitative gene expression analysis of fixed pathological specimens by using laser capture microdissection. The 34th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. December 13-16, Yokohama, Japan.
4. Nakashima K., Koiso N., Kato C., Song S.-Y. (2011). Cellular-scale gene expression analyses by laser capture microdissection for the histopathological specimens of the brain fixed with paraformaldehyde and immunostained. The 35th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. December 11-14, Fukuoka, Japan.

5. Song S.-Y., Kato C., Nakashima K. (2013)
Expression of lanosterol 14alpha-demethylase in
the nervous system and its role in myelination.
FENS Featured Regional Meeting. Sep 11-1,
Prague, Czech Republic.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宋 時栄 (SONG, SI-Young)

研究者番号：00399693

(2) 研究分担者

中島 健太郎 (Nakashima Kentaro)

研究者番号：20449911

(3) 連携研究者

()

研究者番号：