

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：82612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23650200

研究課題名(和文) 独自に作成したミエリン肥厚化マウスを用い、脱ミエリン病の治療標的分子を解明する

研究課題名(英文) Evaluation of a drug-target-molecule for demyelinating disorders using Dock7 knockdown mouse

研究代表者

山内 淳司 (Yamauchi, Junji)

独立行政法人国立成育医療研究センター・薬剤治療研究部・室長

研究者番号：20335483

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：末梢神経の神経軸索の電気伝導効率を増加させ、外的な物理的刺激などから神経軸索を保護する役割をもつ髄鞘(ミエリン)は複層構造を有し、特殊分化したシュワン細胞膜である。シュワン細胞は末梢神経に存在する唯一のグリア細胞であるが、このシュワン細胞に病変をもつ病気は多く知られ、なかでも遺伝性の脱ミエリン病であるシャルコーマリーツース病が有名である。本疾患には特異的な治療標的分子や治療薬は知られておらず、その解明は急務であった。本研究において、当該研究者らが以前独自に遺伝子単離した「Dock7とよばれる低分子量GTP結合蛋白質の活性化因子が本疾患の治療標的分子である」可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：During development of the peripheral nervous system (PNS), Schwann cells (SCs) wrap axons to form a multilamellar structure called myelin, which functions as an insulator surrounding axons. In peripheral neuropathies such as Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease, chronic demyelination and defective remyelination are repeated, causing more severe neuropathies. It is thus thought that development of a drug that promotes healthy myelination, with minimal side effects, may lead to useful therapeutic methods for these diseases. However, specific therapeutic drug targets that healthily promote myelination have hitherto remained unclear. In this study, we generated new transgenic mice expressing shRNA for Dock7, which knocked down Dock7 protein levels. We describe that knockdown of Dock7 specifically promotes myelination in vivo and in vitro. To the best of our knowledge, this is the first report of a possible therapeutic target molecule that promotes myelination without reduced axon thickness.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経化学・神経薬理学

キーワード：ミエリン形成 脱ミエリン現象 交換因子 低分子量GTP結合蛋白質 創薬標的分子 先天性疾患 グリア細胞 人工組織構築

## 1. 研究開始当初の背景

(1)哺乳動物の髄鞘（ミエリン）は、神経軸索の電気伝導効率を増加させる役割と神経軸索を保護する役割を有している。哺乳動物の神経系は大きく中枢神経系と末梢神経系に分類されるが、後者を構成するグリア細胞は主としてシュワン細胞である。その役割はきわめて重要で、ミエリン形成を担うばかりではなく、神経細胞に栄養を供給する。したがって、シュワン細胞の発生や分化に異常がおき、それが機能不全に陥ると、重篤な疾病が引き起こされる。

(2) その疾病のひとつに、Charcot-Marie-Tooth (CMT) 病がある。CMT 病は 2500 人に 1 人の頻度で病因（遺伝子変異）を有する遺伝性末梢神経変性症である脱髄（脱ミエリン）病の総称として用いられる。近年、CMT 病の原因遺伝子の同定に関する研究は飛躍的に進展し、それが 20 種類以上存在することが明らかにされ、現在もその数が増加し続けている。これに対して、CMT 病の遺伝子変異で、なぜミエリン形成不全が起きるのか、また、どのように脱ミエリン現象が誘導されるかなど、CMT 病の分子メカニズムに関する研究には多くの未解明な課題がある。そのため、現在でも、その治療標的分子も明らかにされておらず、特異的治療薬も開発されていない。

## 2. 研究の目的

(1)当該研究者らは、以前、Rho ファミリーの低分子量 GTP 結合蛋白質の活性化因子である dock7 遺伝子をクローニングし、それが初期の末梢神経ミエリン発生に重要であることを見出した（当該研究者ら J Cell Biol.2008; 宮本、当該研究者 Cell.Signal.(review)2010）。そこで、in vivo で Dock7 の役割を解明するために、Dock7 の RNA 干渉配列を発現するマウスを作成した。興味深いことに、そのマウスは「生存に異常がなく、ミエリン形成が促進され、肥厚したミエリンをもつ」表現形を示した。また、in vitro の当初は予備実験データであったものの、1A 型 CMT 病の原因遺伝子の変異で起きる脱ミエリン現象が Dock7 のノックダウンで改善された。本研究では、独自に作成したミエリン肥厚化マウスを利用し、CMT 病治療の分子基盤を明らかにする。

(2)Dock7 をノックダウンすると、脱ミエリン現象が改善されるため、おそらく Dock7 は病態発症に関与するシグナル伝達経路を担っているはずである。したがって、Dock7 とその経路の特性が明らかになれば、脱ミエリン現象を伴う CMT 病の治療標的分子を体系的に

明らかにでき、それが初めての CMT 病の特異的治療薬の開発につながるはずである。

## 3. 研究の方法

(1)脱ミエリン現象を再現する共培養に関して。胎生 15 日目のラットの後根神経節(DRG)を単離し、トリプシンで細胞を分散させ、それをコラーゲンコートしたシャーレにまく。その後 3 週間の間 NGF を含む培養液と NGF とフルオロウリジンを含む培養液で交互に培養することによって、線維芽細胞とシュワン細胞前駆細胞を除去し、精製 DRG 神経細胞を得る。一方、新生児ラットの座骨神経からトリプシン溶液を用いて細胞を分散し、コラーゲンシャーレにまき、AraC 処理を行い、線維芽細胞を除去し、精製シュワン細胞を得る。このシュワン細胞をトリプシン溶液で、はがし、先に精製した DRG 神経細胞上にまき、ミエリンを形成させる（培養方法に関する文献：当該研究者ら Proc.Natl.Acad.Sci.USA 2004,101,8774-8779）。共培養後、CMT 病変異をもった原因遺伝子をコードした少量のレトロウイルスをシャーレに添加する。このとき、増殖性のシュワン細胞にしかレトロウイルスは感染できないため、病態遺伝子はシュワン細胞でしか発現しない。その後、共培養を継続すると、一か月後から脱ミエリン現象が起こる。これは当該研究者が独自に開発した培養系である。ミエリンの有無はマーカー蛋白質の染色で判断される。

(2)Dock7 経路をノックダウンし、脱ミエリン現象が改善されるかを in vivo で検討する。Dock7 ノックダウンマウスの作成は、Dock7 を標的とした RNA 干渉（ノックダウン）配列をコードし、緑色蛍光蛋白質を発現する配列を有した DNA 断片を、通常のトランスジェニック（TG）マウスの作成方法と同じ要領で受精卵にインジェクションし、行う（参考文献：Peng ら Proc.Natl.Acad.Sci.USA 2006,103,2252-2256）。当該研究者らはインジェクションする RNA 干渉配列のプロモーター付近と転写終了直後の配列に改良を加え、in vivo でのノックダウン効率を上昇させることに成功した。この方法の利点はマウスの作成期間が短く、かつ比較的安価で、in vitro で得られた結果を、それとほぼ同じ方法で in vivo で検証できることである。Dock7 を in vivo でノックダウンさせると、同腹のノントランスジェニック（NTG）と比べ、座骨神経のミエリン形成が促進され、ミエリンが肥厚していることが分かった。in vivo でのミエリン形成は、電子顕微鏡を用いて検定できる。Dock7 ノックダウンマウスは座骨神経以外の組織に異常は観察されず、Dock7 は生存維持に強く関係しているわけではないようだ。し

たがって、Dock7 やその下流の分子を標的に創薬が可能になった場合、それらは副作用が少ない治療薬になると考えられる。そこで、まず、in vitro のデータを in vivo で検討するため、Dock7 ノックダウンマウスと IA 型 CMT 病モデルマウスを掛け合わせ、脱ミエリン現象が改善されるかを検討する。次に、異なった遺伝子変異に起因する数種類の CMT 病モデルマウスに対しても改善効果があるかを検討する。さらに、Dock7 経路に属する他の分子のノックダウンマウスを作成し、同様の交配実験を行い、それらの病態改善効果を検討する。

#### 4 . 研究成果

(1)研究開始当初は Dock7 がミエリン形成の抑制因子であるという既存のデータの他には、予備実験データしか存在しなかった。まず、CMT 病を再現するインビトロ共培養システム（主として不完全ミエリン形態を示す）を用いて、このインビトロ条件下で、ノックダウン法によって Dock7 の発現を減弱させると、CMT 病の病態が改善することを明らかにした。

(2)研究開始当初、Dock7 の下流に存在する低分子量 GTP 結合蛋白質経路もミエリン形成に負に作用すると推定されたが、ここにおいては予想された結果が得られなかった。その理由としては、低分子量 GTP 結合蛋白質は、さまざまな細胞機能を有するため、Dock7 経路ばかりではなく、他の多くの上流経路によって活性化される可能性があり、細胞機能維持の根柢をなすような分子群であるためであると考えられる。

(3)独自に作成された Dock7 の発現を減弱させるマウスと CMT 病のモデルマウスを交配すると CMT 病態（主として後足に力が入らない症状を示す）が改善されることが判明した。しかしながら、完全に改善されたわけではないため、今後、電気伝導速度の測定等を含め、更なる末梢神経機能の解析を行う必要がある。

(4)当該研究者のデータおよび公的データバンクから Dock7 は RNA レベルではマウスやラットの多くの組織に存在しているが、蛋白質レベルでは座骨神経と一部の脳組織および肝臓の一部にしか発現が見られない。したがって、この事実と Dock7 を全身でノックダウンしても致死を示さないという事象を加味すると、Dock7 は創薬標的分子としての適性をもっていると考えられる。Dock7 の立体構造は不明であるが、関連する分子の立体構造をベースに Dock7 の活性部位または活性調節領域の構造を推定し、実際に創薬標的分子と

して相応しいポケット等を有するかどうか、今後、慎重に検討する必要がある。

(5)現在、Dock7 が他の末梢神経の脱ミエリン疾患に関与しているかどうか検討しているところである。

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Yuki Miyamoto, Tomohiro Torii, Natsuki Yamamori, Toru Ogata, Akito Tanoue, and Junji Yamauchi (2013) Akt and PP2A reciprocally regulate the guanine nucleotide exchange factor Dock6 to control axon growth of sensory neurons. *Sci. Signal.* (サイエンス姉妹誌) 6, ra15: (DOI: 10.1126/scisignal.2003661): Picked up as 'cover image'.

Junji Yamauchi, Yuki Miyamoto, Tomohiro Torii, Shou Takashima, Kazumi Kondo, Katsumasa Kawahara, Noriko Nemoto, Jonah R. Chan, Gozoh Tsujimoto, and Akito Tanoue (2012) Phosphorylation of cytohesin-1 by Fyn is required for initiation of myelination and the extent of myelination during development. *Sci. Signal.* (サイエンス姉妹誌) 5, ra69 (DOI: 10.1126/scisignal.2002802): Picked up as 'cover image'.

Junji Yamauchi, Yuki Miyamoto, Hajime Hamasaki, Atsushi Sanbe, Shinji Kusakawa, Akane Nakamura, Hideki Tsumura, Masahiro Maeda, Noriko Nemoto, Katsumasa Kawahara, Tomohiro Torii, and Akito Tanoue (2011) The atypical guanine-nucleotide exchange factor, Dock7, negatively regulates Schwann cell differentiation and myelination. *J. Neurosci.* 31, 12579-12592 (DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2738-11.2011)

〔学会発表〕(計 5 件)

宮本 幸、山内淳司：Dock6 交換因子の Akt のリン酸化状態によって制御される軸索伸長の新規メカニズム (シンポジウム) 日本生化学会大会 2013 年 9 月・横浜

山内淳司：Fyn キナーゼと Arf6 交換因子 cytohesin-1 による新規のミエリン形成メカニズム (シンポジウム) 日本生化学会大会 2013 年 9 月・横浜

宮本 幸、山内淳司：低分子量 GTP 結合蛋白質による新規のミエリン形成メカニズム (シンポジウム) 日本解剖学会大会 2013

年 3 月・香川

宮本 幸、山内 淳司 : Novel signal transduction pathway controlling myelination (シンポジウム) 日本神経科学会大会 2012 年 9 月・名古屋

山内 淳司 : ダイナミックな形態分化を伴い、神経軸索のミエリン化を制御するマウス Rho 活性化因子 Dock7 (シンポジウム) 日本生化学会大会 2011 年 9 月・京都

〔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

(1)<http://www.ncchd.go.jp/research/nch/pharmac/index.html>

(2)<http://nch.go.jp/pharmac/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山内 淳司 (YAMAUCHI JUNJI)

(独) 国立成育医療研究センター研究所・

薬剤治療研究部・室長

研究者番号 : 20335483

### (2) 研究分担者

無し ( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

無し ( )

研究者番号 :