

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700462

研究課題名（和文）代謝型グルタミン酸受容体を介したシュワン細胞の分化調節機構

研究課題名（英文）Metabotropic glutamate receptor regulates Schwann cell differentiation and proliferation

研究代表者

齋藤 文典 (SAITOH FUMINORI)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：50435723

研究成果の概要（和文）：

グルタミン合成酵素(GS)の基質であるグルタミン酸はシュワン細胞の分化制御に関与しているが、その分子機序は明らかになっていなかった。本研究によって、シュワン細胞で代謝型グルタミン酸受容体 2 (mGluR2) の発現が高いことが明らかとなった。また、mGluR2 を介したシグナルを阻害することで末梢神経傷害時のシュワン細胞の脱ミエリン化が遅延し、再生時には再ミエリン化が促進することを明らかにした。このことから、mGluR2 を介したグルタミン酸シグナルはシュワン細胞の分化制御において重要な役割を担っている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Glutamate promotes Schwann cells proliferation and inhibits Schwann cell myelination, but its precise mechanism has remained unclear. We found that glutamate activates Erk signaling, which is important for Schwann cell de-differentiation and proliferation. This glutamate mediated Erk activation was blocked by mGluR2/3 antagonist. Furthermore, blockade of mGluR2 signaling promotes differentiation. These results indicate that the glutamate-mGluR2 signaling may play an important role in regulating Schwann cell differentiation and proliferation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：(1)シュワン細胞 (2)代謝型グルタミン酸受容体

1. 研究開始当初の背景

末梢神経系において、シュワン細胞は神経軸索でミエリンを形成し神経の跳躍伝導を支えている。また神経傷害時には、脱ミエリン化(脱分化)、増殖し神経の再生を促進する。シュワン細胞のミエリン形成および脱分化は、ミエリン構成タンパク質である MBP や P0 遺伝子などの発現調節を必要とするが、これらのタンパク質はミエリン形成に必須の

Krox20 や脱分化を促進する c-Jun などの転写因子によって厳密に制御されている。

最近では、ゼブラフィッシュのシュワン細胞で、G タンパク質共役型受容体ファミリーに属する Gpr126 が細胞内 cAMP の濃度を上昇させ、Krox20 を活性化しミエリン形成を促進すること (Science, 325: pp1402-1405, 2009)、c-Jun が Krox20 の機能を阻害しミエリン形成を抑制することが報告された(J

Cell Biol, 181: pp625-637, 2008)。シュワン細胞のミエリン形成または脱分化のメカニズムの解明は、シャルコー・マリー・トゥース病のようなミエリン形成不全疾患の治療法の開発につながる可能性があり注目されている。

申請者の所属する研究室では、末梢神経傷害後に損傷部位の末梢側のシュワン細胞で発現が誘導される分子をスクリーニングし、ユビキチンリガーゼ (E3) として機能するタンパク質 zinc finger/RING finger (ZNF1) を発見した (J Biol Chem. 276: pp34131-41, 2001)。ZNF1 は末梢神経発達過程のシュワン細胞において、生後 1 日目の発現量が高くその後徐々に減少するなど、発現様式は神経再生に関与することが知られている p75NGFR などと類似しており、ZNF1 が末梢神経の変性・再生に関与する E3 である可能性が示唆されたが、基質タンパク質および機能は明らかになっていなかった (J Neurosci. 23: pp9385-94, 2003)。

申請者は、ZNF1 と結合する分子のスクリーニングを行い、シュワン細胞における標的分子として GS を同定した。GS はグルタミン酸をグルタミンに変換する酵素であり、末梢神経系ではミエリン化したシュワン細胞に発現しているが、傷害刺激などに伴った GS の発現制御およびシュワン細胞における機能は不明であった。培養細胞を用いた実験から GS は ZNF1 と結合し、ユビキチン化されユビキチン・プロテアソーム (UPS) 系で分解されることを明らかにした。マウスの坐骨神経傷害後モデルを用いた実験から、神経傷害後のシュワン細胞において GS は脱分化に伴って ZNF1 に依存してタンパク質の発現が低下することを明らかにした。この発現様式は MBP や P0 などのミエリン形成型のシュワン細胞のフェノタイプを特徴づける分子群に共通するものだが、こうした分子が転写調節によって制御されているのに対し、GS は UPS 系で ZNF1 依存的なタンパク質分解によって制御され、mRNA の発現は変化しないという特異な調節様式を示すことが明らかになった。

さらに、シュワン細胞と神経細胞の共培養する実験系 (*in vitro* myelination) において GS を過剰発現させたシュワン細胞では神経突起のミエリン形成を有意に亢進することから、GS は単にグルタミンを合成する代謝酵素というだけでなく、シュワン細胞の分化制御に関与することを明らかにした。

GS の基質であるグルタミン酸は *in vitro*

myelination 系で神経突起のミエリン形成を抑制し、シュワン細胞の単独培養系では増殖を促進する。このことから、グルタミン酸がシュワン細胞の脱分化・増殖のシグナルとして機能することを明らかにした。グルタミン酸は、中枢神経系においては神経細胞に対する興奮毒性およびアストロサイトの活性化など多くの研究報告がなされているが、シュワン細胞の脱分化・増殖の関する報告はない。申請者は、mGluRs 拮抗薬がグルタミン酸によるシュワン細胞の増殖を抑制することを観察していた。mGluR は 8 種類のサブタイプが存在することが報告されている。これらのサブタイプは、薬理的性質、シグナル伝達系および作動薬に対する選択性の違いにより大きく 3 種類グループに分類されており、各サブタイプ特異的な阻害剤も入手可能であった。このことから、シュワン細胞の脱分化・増殖に関与する mGluR のサブタイプを同定し、阻害剤を用いて mGluR を制御することで、脱分化およびミエリン化を制御できるのかを解析することに着想するに至った。

2. 研究の目的

申請者は、シュワン細胞における GS の機能解析を通し、末梢神経系において、グルタミン酸がシュワン細胞の増殖・脱分化に関与するシグナル分子であることを明らかにした。このシグナル伝達は mGluR を介していると考えられるが、詳細なメカニズムは不明である。mGluR には 8 種類のサブタイプが存在することが報告されている。そこで、本研究はシュワン細胞の分化に関与する mGluR のサブタイプを同定し、シュワン細胞におけるグルタミン酸シグナルの全貌を明らかにすることを旨とした。

3. 研究の方法

シュワン細胞の増殖・脱分化に関与する mGluR のサブタイプを同定し、mGluR を制御することで、シュワン細胞の分化制御ができるのかを明らかにするために、下記の実験を行った。

- (1) シュワン細胞における mGluR の各サブタイプの発現の解析および、シュワン細胞の増殖・分化に関与する mGluR のスクリーニング
- (2) グルタミン酸シグナルがシュワン細胞の脱分化・増殖に与える影響 (*in vivo*) の解析
- (3) 神経細胞との共培養系 (*in vitro* myelination) を用いた、mGluR の制御によるシュワン細胞の再分化に与える影響

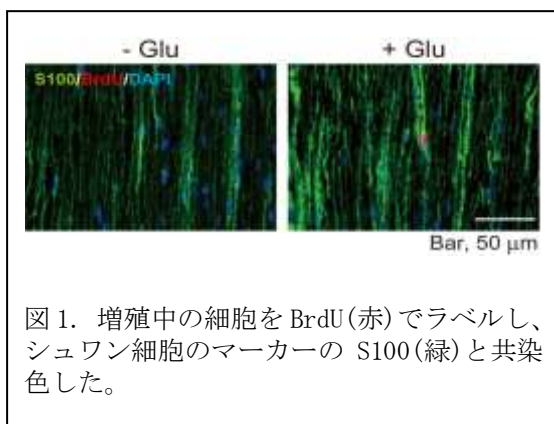
の解析

- (4) シャルコー・マリー・トゥース病モデルマウスを用いた、mGluR 阻害剤投与によるシュワン細胞の脱分化・増殖に与える影響の解析

3. 研究成果

(1) PCR 法を用いてシュワン細胞における各 mGluR の発現を解析した結果、シュワン細胞で mGluR1, 2, 4, 5 および 8 の発現を確認した。その中でも、mGluR2 の発現が特に高いことが明らかになった。初代培養シュワン細胞にグルタミン酸を添加すると、細胞増殖が亢進する。このことから、シュワン細胞の分化および増殖に関わることが報告されている AKT および Erk の活性化をウェスタンブロット法を用いて解析した結果、初代培養シュワン細胞にグルタミン酸を添加することにより、AKT の活性化には影響を与えないが、Erk の活性化が亢進することが明らかになった。さらに、このグルタミン酸による Erk の活性化は、mGluR2/3 の阻害剤および、shRNA を用いて内在性の mGluR2 をノックダウンすることにより阻害されることを明らかにした。このことから、mGluR2 がシュワン細胞の増殖に関与していると考えられた。

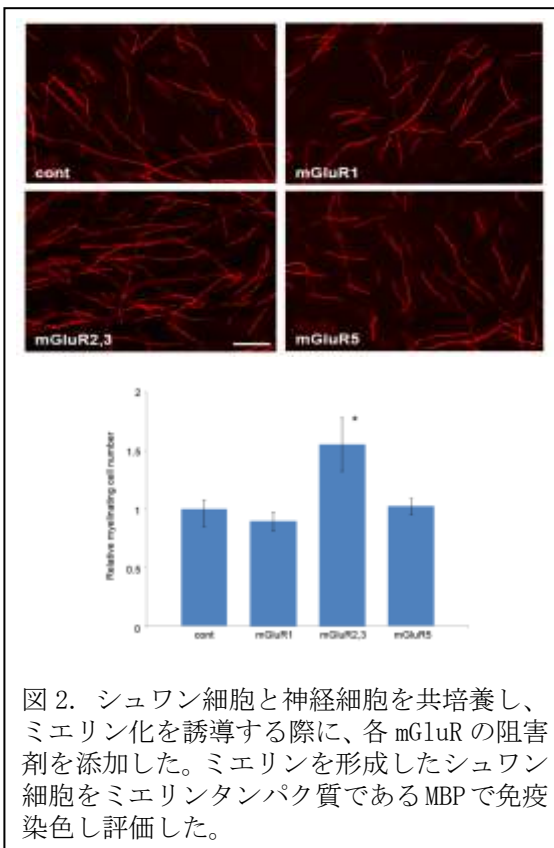
(2) 生体内において、グルタミン酸がシュワン細胞の脱分化・増殖に与える影響を解析した。マウス坐骨神経にコラーゲンゲルを用いてグルタミン酸を局所投与した結果、生体内においても、シュワン細胞が増殖することを明らかにした (図1)、さらに、マウス坐骨神経を切断する末梢神経傷害モデルにおいて、切断部位に mGluR2/3 の阻害剤を局所投与することで、シュワン細胞の脱ミエリン化が遅延することが明らかになった。



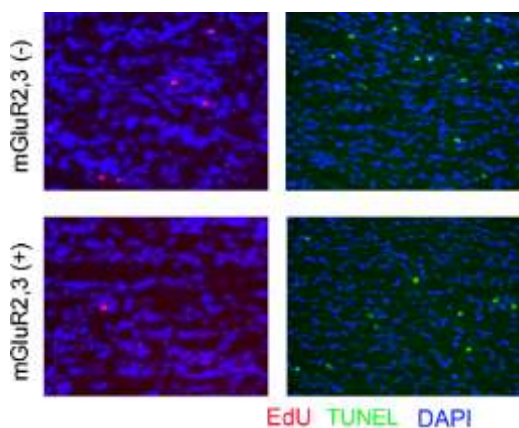
これらのことから、mGluR2 を介したシグナルが、生体内においてもシュワン細胞の脱分化・増殖を促進すると考えられた。

- (3) mGluR2 を介したグルタミン酸は、シュワ

ン細胞の脱分化・増殖を促進する。このことから、mGluR2 を阻害することで、シュワン細胞の再分化が促進できるのかどうかを *in vitro* myelination の実験系を用いて解析した。神経細胞とシュワン細胞の共培養系にアスコルビン酸を添加しミエリン形成を誘導する際に、mGluR2/3 の阻害剤を添加した結果、神経突起のミエリン形成が亢進することが明らかになった (図2)。



(4) シャルコー・マリー・トゥース病モデルマウスとして、PMP22 の異常により脱髄を起こすことが報告されている (Trembler NCNP マウス, Neuroscience, 79 : 735-744, 1997) を用いて解析を行った。通常、成獣マウスの坐骨神経ではシュワン細胞の増殖は確認できないが、Trembler NCNP マウスではシュワン細胞の脱分化・再分化が恒常的に起こっていることから、増殖しているシュワン細胞が多数確認された。このマウスの坐骨神経に mGluR2/3 の阻害剤を局所投与した結果、増殖している細胞が減少することが明らかになった。また、その際に、アポトーシスによる細胞死には影響を与えなかった。このことから、(2) の坐骨神経傷害モデルと同様に脱髄疾患のモデルマウスにおいても、mGluR2 を介したグルタミン酸シグナルが、シュワン細胞の脱分化・増殖を制御している可能性が考えられた。



これら結果から、mGluR2 を介したグルタミン酸シグナルがシュワン細胞の脱分化、増殖・再分化の各過程の制御に関与することが強く示唆された。

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)

① Shuji Wakatsuki, Fuminori Saitoh and Toshiyuki Araki., ZNRF1 promotes Wallerian degeneration by degrading Akt to induce GSK-3 β -dependent CRMP-2 phosphorylation, Nature Cell Biol., 13, 1415-1423, 2011, DOI:10.1038/ncb2373, 査読有

[学会発表] (計3件)

- ① 齋藤文典, 若月修二, 荒木敏之, 代謝型グルタミン酸受容体を介したシュワン細胞の増殖・分化制御機構, 第35回日本分子生物学会年会, 2012. 12. 12, 福岡
- ② 萩原裕子, 齋藤文典, 若月修二, 荒木敏之, 糖化タンパク質が関与する末梢神経ミエリン化調節機構の解明と脱髄性疾患への治療応用, 第35回日本分子生物学会年会, 2012. 12. 12, 福岡
- ③ 齋藤文典, 若月修二, 荒木敏之, Metabotropic glutamate receptor regulates Schwann cell differentiation and proliferation, 第34回日本分子生物学会年会, 2011. 12. 13, 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 文典 (SAITOH FUMINORI)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号：50435723