

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 8 月 17 日現在

機関番号：82612  
研究種目：基盤研究(B) (一般)  
研究期間：2013～2016  
課題番号：25290028  
研究課題名(和文)末梢神経のミエリン形成を抑制する分子機構の解明

研究課題名(英文) Negative regulation of axonal myelination

## 研究代表者

山内 淳司 (Yamauchi, Junji)

国立研究開発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) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳動物の髄鞘(ミエリン)形成は正と負の細胞内外のシグナル伝達分子により制御されていると考えられているが、その実体に不明な点が多い。当該研究においては、とくに解明が遅れている末梢神経系の抑制性シグナルに着目し研究を行った。その結果、サイトヘジンを中心とした新しいミエリン形成シグナル伝達経路を明らかにし、それが正と負の小経路により制御されていることを見つけた。今後、これらの分子経路を詳細に解析することで、ミエリン形成不全疾患の創薬標的候補分子を明らかにできると期待できる。

研究成果の概要(英文)：It is believed that myelination in mammals is regulated by positive and negative signaling molecules; however, it remains to be understood what and how molecule controls myelination. Here we investigate inhibitory signaling for myelination in the peripheral nervous system. We clarify that the molecular pathway controlled by cytohesin regulates myelination. We also find that this pathway is composed of two reciprocal signaling pathways. Further studies allow us not only to understand the detailed mechanism of myelination but also to identify a potential therapeutic target for demyelination diseases.

研究分野：神経薬理学

キーワード：ミエリン形成 脱ミエリン現象 抑制シグナル 促進シグナル サイトヘジン Arf6 シグナル伝達分子 脱ミエリン疾患

## 1. 研究開始当初の背景

末梢神経組織の特徴のひとつはグリア細胞にある。末梢神経組織に存在する主要なグリア細胞はシュワン細胞であり、それは中枢神経組織に存在する2種類のグリア細胞（オリゴデンドロサイトとアストロサイト）の機能を担っていると考えられている。つまり、シュワン細胞は感覚神経細胞に代表される末梢神経細胞の軸索の周りに髄鞘（ミエリン）を形成するとともに、神経細胞に栄養を供給する役割を担うユニークな細胞である。このシュワン細胞が分化してできたミエリン膜は軸索の周りを幾重にも巻き、あたかも絶縁体のように働くミエリン鞘を形成する。それは神経伝達における跳躍伝導を担うために必要不可欠な構造であり、さまざまな外的ストレスから神経軸索を保護する役割も担っている。しかし、ミエリンはこのような重要な役割をもっているにもかかわらず、その形成過程に未だ不明な点が多い。

さて、一般的に、多くの組織の形成過程では、促進シグナルと抑制シグナル（正と負のシグナル）の厳密なバランスによって、最適な時期に最適な場所で、それぞれ関係する細胞が分化し、最終的に成熟組織が形成されることが知られている。しかし、神経組織形成過程におけるミエリン形成の研究に目を向けると、この抑制シグナルはほとんど解明されていない。その理由は実験的なことがあげられる。一般的にミエリン形成に関与する分子を探索する実験では、他の類似した生物実験と同様に、目的とする分子の機能を阻害し、その効果を確認することがその目的とする分子の役割を理解する有効な手段になっているからである。

現在まで、ミエリン形成に関与すると分かっている分子は数えるほどしか分かっていない。しかし、その数例の結果をみても「ミエリン形成を促進するシグナルを阻害するよりもミエリン形成を抑制するシグナルを阻害した方が、予想されたよりもはるかにインパクトのある（効果の強い）実験結果」がでていた。このことはインビトロでミエリンを形成させる共培養実験でも遺伝子改変マウスを用いたインビボの実験でもそうである。

これまで当該研究者はミエリン形成を促進するシグナルの解明に重点を置いていたが、ここではミエリン形成を抑制するシグナル伝達分子およびその経路を明らかにすることを目的とし研究を進める。また、このことによって、末梢神経のミエリン形成を司る正と負の両面のシグナル伝達分子ネットワークを明らかにでき、ミエリン形成を制御する分子基盤を総合的に理解することが可能になるのではないかと期待している。

## 2. 研究の目的

末梢神経のミエリン形成メカニズムに関する研究は、増殖因子受容体や転写因子の解明に重点が置かれてきた。しかし、これらの分子はシュワン細胞の運命決定や生存そのものに関与する機会が多く、今もなお、どのようなタイミングで、どのようにミエリン膜が神経軸索を巻き、どのくらいミエリン膜が作られるのかというミエリン形成に関する基本的な研究命題に関して、未解明なままである。

シュワン細胞がつくるミエリン膜の表面積は、ミエリン膜をつくる前のシュワン細胞のそれに比べて100倍以上になることもある。しかし、その表面積の拡大は永遠におきるものではなく、齧歯類では生後数か月で必ず止まる。神経組織という限られた空間内で、一定の発生期に、このようなダイナミックな形態変化を達成するためには促進系シグナルばかりではなく、抑制系シグナルによる協調的な制御のもと、はじめてミエリン鞘が完成されるのではないかと推定できる。したがって、本研究において、インビトロとインビボの両面からの研究から抑制シグナルの分子経路を明らかにし、その主要な経路とともに働く補助経路に関しても解明を進める。

## 3. 研究の方法

【末梢神経のミエリン形成を抑制するシグナル伝達分子の候補を明らかにする】

（1）その候補となる遺伝子群に関して：議論はあるものの、シュワン細胞は神経軸索がないと完全なミエリン膜を形成できないと考えられている。しかし、その過程の一部はシュワン細胞内でcAMP濃度を上昇させることで模倣できると考えられている。当該研究者は、高純度に精製したラットのシュワン細胞に1mMのジブチルcAMPを添加してミエリン膜に類似した膜構造を形成させ、その添加前後でトランスクリプトーム解析を行った。その結果、複数の遺伝子の増減が観察された（未発表データ）。上昇する遺伝子群の多くはミエリン塩基性蛋白質（MBP）に代表されるミエリン膜構成蛋白質をコードしていたが、今回は低下する遺伝子に着目した。その理由は、これらの遺伝子がミエリン形成に抑制的に機能していると予想できるからである。膜形成誘導後に大きく低下する遺伝子は18個種類であった（厳密な数値補正後に約5.0倍以上のものをあげた。約2.5倍以上にすると、さらに50種類程度増える）。そのほとんどは機能未知のものであったが、そのドメイン構造からこれらの遺伝子の70%以上がシグナル伝達に関与する遺伝子

である可能性が考えられた。

(2) インビトロコ培養によるミエリン形成とシュワン細胞への特異的遺伝子導入：次に、これらの遺伝子がミエリン形成に抑制的に関与するのかどうかを検討する。そのための共培養と遺伝子導入方法を順番に述べる。まず、その検定系である共培養に関して記載する。マウスやラットの末梢神経のミエリン形成は生後すぐに始まり、その後約2か月してほぼ完成すると考えられている。当該研究者はこの長期間に渡るミエリン形成を生体内とほぼ同じタイムコースで、安定してインビトロコで再現することに成功している。簡単に述べると、それはマウスやラットの脊髄側端にある後根神経節から神経細胞を、座骨神経からシュワン細胞を、それぞれ95%以上の純度で単離し共培養するというものである。共培養後、その時間経過と共にシュワン細胞が徐々に神経軸索の周りにミエリン膜を巻く様子が観察される。電子顕微鏡を用い、これが座骨神経内のミエリン鞘の構造とほぼ同等のものであることを確認している。

次に、線状RNA (shRNA) の導入方法に関して述べる。シュワン細胞への遺伝子導入はレトロウイルスを用いる。共培養直後、シュワン細胞は神経軸索上で激しく増殖するのでレトロウイルスはそこに感染できるが、神経細胞は増殖性ではないので感染しない。感染時に、ある程度高濃度(高力価)のウイルス粒子を用いれば、2か月の共培養下で安定した遺伝子発現がなされることを確認している。

さて、このシステムを用いて、先述した遺伝子がミエリン形成に抑制的に機能するかどうかを決める。具体的にはマーカーとなる蛍光蛋白質を発現する配列とshRNA配列をコードする遺伝子をもったウイルス粒子を作製し、それをシュワン細胞に感染させる。もし標的となる遺伝子がミエリン形成に抑制的に機能する場合は、その遺伝子産物のノックダウンでミエリン形成が促進されるはずである。ここで、ミエリンができたかどうかの検定に関して述べる。それは、ミエリンマーカーである独自に作製したMBP抗体を用いた蛍光染色で定性的に、その蛍光画像の複雑度を計算することで定量的に判定できる。

【候補分子と相互作用する分子を明らかにし、抑制シグナル伝達分子ネットワークを解明する】

(3) 候補遺伝子産物に対するプロテオーム解析によるインビトロコレベルでの分子ネットワークの構築：具体的にはまず候補遺伝子にmycなどのタグをコードする塩基配列を付加する。それをシュワン細胞株RT4-D6P2Tで発現させタグ抗体で免疫沈降後、結合する蛋

白質の質量分析(MS)解析を行う。RT4-D6P2T細胞は株化細胞であるが、ジブチルcAMPによるミエリン様の膜の形成能力をもち、そのトランスクリプトーム解析でもmRNAの種類は初代シュワン細胞と約80%同じであることが分かっている。

そして、前述の研究と同様に、これらの結合分子をシュワン細胞で特異的にノックダウンし、そのときにミエリン形成が促進されるかどうかを検討する。

【遺伝子改変マウスを用いたミエリン形成抑制メカニズムの研究】

(4) 末梢神経特異的に目的の分子がノックダウンされるマウスの作製：インビトロコでミエリン形成に抑制的に働く分子の候補とその結合分子が、実際にインビボレベルで末梢神経のミエリン形成に関与しているかどうかを明らかにしなければならない。その場合、ノックアウトマウスを作製するのが一般的である。しかし、その目的の遺伝子に対するコンディショナルノックアウトマウスES細胞がES細胞のバンクに存在しない場合、それを作製することから始めなければならない。そのため、目的とする研究が設定期間内に達成できない可能性が高くなる。さらに、本研究計画では複数の遺伝子を扱うため、ノックアウト技術によるインビボ解析は本研究には適さないかもしれない。したがって、当該研究者が開発に成功したノックダウンマウス作製技術を発展させた末梢神経特異的ノックダウンマウス作製技術を利用し、末梢神経特異的に目的とする分子をノックダウンさせ、それがミエリン形成に影響を及ぼすかどうかを検討する。この作製技術はトランスジェニックマウス作製のそれをベースにしているため、比較的短期間で多くのマウスを作製することを可能にするものである。

最終的に、末梢神経の断面の染色写真や電子顕微鏡写真を撮影することで、ミエリン鞘の形成促進効果があるかどうかを形態的に調べる。さらに時間的に可能であれば、末梢神経の電気伝導速度を測定するなど末梢神経の機能アッセイも行う。

#### 4. 研究成果

(1) サイトヘジンというシグナル伝達分子を中心にした新しい末梢神経のミエリン形成に関与する分子経路を明らかにした。サイトヘジンは細胞の形態変化に関わるArf6の活性化因子である。マウスやラットのミエリン形成には胎生中期から生後2か月までかかるが、この前半の過程にはサイトヘジン1が、後半の過程にはサイトヘジン2が関与する。

(2) この分子経路はミエリン形成に正に働くサイトヘジン1と2からArf6の活性化調節経路、および、ミエリン形成に負に働くACAP1と2からなるArf6の抑制経路で構成さ

れる。

(3) これらの分子経路の直接的上流には Fyn キナーゼがあることが判明した。

(4) これらの分子経路の上流には Tyro3 とよばれる新しい受容体があることが明らかになった。

(5) 遺伝子改変マウスを用いて人為的にこれらの分子経路の活性を調節することで、シャルコーマリーツース病 (CMT 病) モデルマウスの脱ミエリン病態が改善されることが判明した。例えば、トランスジェニックマウスを用いて、サイトヘジンシグナルを増強すると、病態改善の傾向を示すことに成功した。

#### 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: Picked up as 'cover image'. (DOI: 10.1126/scisignal.2003661)

Yuki Miyamoto, Natsuki Yamamori, Tomohiro Torii, Akito Tanoue, and Junji Yamauchi (2014) Rab35, acting through ACAP2 switching off Arf6, negatively regulates oligodendrocyte differentiation and myelination. *Mol. Biol. Cell* 25, 1532-1542: Picked up as 'cover image'. (DOI: 10.1091/mbc.E13-10-0600)

Yuki Miyamoto, Tomohiro Torii, Shuji Takada, Nobuhiko Ohno, Yurika Saitoh, Kazuaki Nakamura, Akihito Ito, Toru Ogata, Nobuo Terada, Akito Tanoue, and Junji Yamauchi (2015) Involvement of the Tyro3 receptor and its intracellular partner Fyn signaling in Schwann cell myelination. *Mol. Biol. Cell* 26, 3489-3503: Picked up as 'cover image'. (DOI: 10.1091/mbc.E14-05-1020)

[学会発表](計4件)

宮本 幸、山内淳司: Tyro3 receptor and the binding partner Fyn promotes PNS myelination. 日本神経科学学会大会(シンポジウム)・2016年7月・横浜

宮本 幸、山内淳司: ErbB3 is required for Schwann cell precursor migration. 日

本神経科学学会大会(ミニシンポジウム)・2015年7月・神戸

山内淳司: 末梢神経の髄鞘発生とオンとオフを制御するスイッチ・シグナル 日本神経化学学会大会(シンポジウム)・2014年9月・奈良

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 日本生化学会大会(シンポジウム)・2013年9月・横浜

[図書]

無し

[産業財産権]

無し

[その他]

ホームページ: <http://nch.go.jp/pharmac/>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

山内 淳司 (YAMAUCHI, JUNJI)  
国立研究開発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

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し

(4)研究協力者

川原 和子 (KAWAHARA, KAZUKO)  
国立研究開発法人国立成育医療研究センター・薬剤治療研究部・研究補助員  
研究者番号: 無し