

博士論文

硫酸化糖脂質欠損に伴うグリア細胞の変化に関する研究

Studies on the changes of glial cells under the deficiency of sulfated glycolipids

東京薬科大学

2015 年

梶ヶ谷 仁志

目次

略語表.....	4
緒言.....	6
第1章 スルファチド欠損マウスにおける中枢神経系グリア細胞の解析.....	11
第1章 第1節 実験材料および実験方法.....	14
1-1-1 実験動物.....	14
1-1-2 灌流固定.....	14
1-1-3 凍結切片の作製.....	14
1-1-4 免疫染色法.....	15
1-1-5 BrdUを用いた増殖細胞検出法.....	15
1-1-6 免疫染色切片の定量的解析.....	15
1-1-7 電子顕微鏡による解析.....	16
1-1-8 <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション法.....	16
1-1-9 組織染色切片の定量的解析.....	17
1-1-10 統計解析.....	17
第1章 第2節 結果.....	18
1-2-1 成獣期の CSTKO マウス視神経におけるオリゴデンドロサイト系譜細胞の変化.....	18
1-2-2 CSTKO マウス視神経におけるアストロサイトの変化.....	21
1-2-3 CSTKO マウス視神経におけるミクログリアの変化.....	21
1-2-4 発達段階における CSTKO マウス視神経の OPC 数の比較.....	24
1-2-5 CSTKO マウス発達段階における視神経の部位別のオリゴデンドロサイト前駆細胞数と増殖細胞数の解析.....	27
1-2-6 CSTKO マウス視神経におけるミエリン形成時期の変化.....	31
第1章 第3節 考察.....	33
第1章 第4節 小括.....	36
第2章 スルファチド欠損マウスにおける末梢神経系グリア細胞の解析.....	37
2-1-1 実験動物.....	40
2-1-2 ラット全脳, 坐骨神経ホモジネートの調製.....	40
2-1-3 ウェスタンブロット解析.....	40
2-1-4 坐骨神経ときほぐし標本の作製.....	41
2-1-5 免疫染色.....	41
2-1-6 免疫染色切片の定量的解析.....	42
2-1-7 統計解析.....	42
第2章 第2節 結果.....	43
2-2-1 ラットおよびマウス神経系における DCUN1D2, NEDD8 の分布.....	43

2-2-2 シュワン細胞における DCUN1D2, NEDD8 の分布.....	46
2-2-3 神経線維の太さによる DCUN1D2, NEDD8 の分布の違い.....	49
2-2-4 坐骨神経の発達段階における DCUN1D2 の分布.....	52
2-2-5 CSTKO マウス末梢ミエリンにおける DCUN1D2, NEDD8 の局在変化.....	54
第2章 第3節 考察.....	57
第2章 第4節 小括.....	59
総括.....	60
謝辞.....	61
参考文献.....	62

略語表

本文中では、以下の略語を用いる。

BCA : bicinchoninic acid

BrdU : bromodeoxyuridine

BSA : bovine serum albumin

Caspr : contactin-associated protein

c-fms : colony stimulating factor 1 receptor

CGT : UDP-galactose:ceramide galactosyltransferase

CMT : Charcot-Marie-Tooth

CST : cerebroside sulfotransferase

CSTKO : cerebroside sulfotransferase knockout

DAPI : diamidino-2-phenylindole

DCUN1D2 : defective in cullin neddylation protein 1-like protein 2, DCUN1 domain-containing protein 2, DCN1-like protein 2

DEPC : diethylpyrocarbonate

GFAP : glial fibrillary acid protein

GLAST : glutamate-aspartate transporter

MAG : myelin associated glycoprotein

MAL : myelin and lymphocyte protein

MBP : myelin basic protein

M-CSF : macrophage colony-stimulating factor

MPZ : myelin protein zero

Nav1.2 サブタイプ : sodium channel, voltage-gated, type II, alpha

Nav1.6 サブタイプ : sodium channel, voltage-gated, VIII, alpha

NEDD8 : neural precursor cell expressed developmentally down regulated protein 8

NF155 : neurofascin155

OPCs : oligodendrocyte precursor cells

PB : phosphate buffer

PBS : phosphate buffered saline

PCR : polymerase chain reaction

PFA : paraformaldehyde

PLP : myelin proteolipid protein

PMP22 : peripheral myelin protein 22

POA: proligodendroblast antigen

PONY : potentiating neddylation domain

SD : standard deviation

SEM : standard error of the mean

SPF : specific pathogen free

ssDNA : single stranded DNA

TGF β RII : TGF β type II receptor

Wd type : wild type

緒言

神経系は、主に神経細胞とグリア細胞から構成されている。神経細胞は突起を伸ばし、互いにシナプスを介した情報伝達を行うことによって神経ネットワークを形成している。個々の神経細胞は、細胞体の他に入力専用の樹状突起と出力専用の軸索という2種類の突起を持ち、常に決まった方向に情報処理を行う。このような方向性を持った情報処理機能を保てるのは、神経細胞の構造が部位によって異なる特定の分子の局在化により構成されていることによる。細胞内での情報処理は電気的信号により行われている。それらの電気的信号は細胞膜を介したナトリウムイオンやカリウムイオンなどの移動によって発生する。このイオンの細胞内外への移動を制御しているのがイオンチャネルである。樹状突起や神経細胞体にあるシナプスを介して他の神経細胞から情報を受け取り、細胞体で情報処理した結果、活動電位が発生する。有髄神経の場合、活動電位は跳躍伝導により軸索上を素早く伝導する。近年、跳躍伝導には軸索上のイオンチャネルの特徴的な局在化が重要であることが示されている^{1), 2)}。しかしながら、イオンチャネルの各々特異的な部位の細胞膜への輸送や、その局在の保持等の機構がどのような細胞内あるいは細胞外シグナルにより調節されているかについてはまだ不明な点が多い。

中枢神経系は、およそ1000億の神経細胞とその10倍のグリア細胞が存在するといわれている。主なグリア細胞は、オリゴデンドロサイト、アストロサイト、ミクログリアの3種類からなる。オリゴデンドロサイトは軸索周囲にミエリンを巻き、アストロサイトの突起は中枢神経系の表面の大部分を覆うと共にシナプス周囲やランビエ絞輪部を取り囲んでいる。ミクログリアは周囲に伸ばした突起によって脳内局所における環境のモニタリングを行い、病的変化に素早く対応する。近年、これらのグリア細胞が脳の高次機能を発揮する上で重要な役割を果たすことが示されてきている。神経細胞に存在する多くの受容体、イオンチャネルおよびトランスポーターがこれらのグリア細胞にも存在することが報告され、各グリア細胞と神経細胞の間により密接な相互作用があることが示されている^{3), 4)}。

高等動物の軸索の多くは、中枢神経系ではオリゴデンドロサイト、末梢神経系ではシュワン細胞がそれぞれ形成するミエリンによって覆われている (Fig. 1A)。ミエリンにより、有髄神経軸索はランビエ絞輪、それに隣接するパラノード、ジャクスタパラノード、コンパクトミエリンに覆われたインターノードの4つの機能的ドメインに分かれる (Fig. 1B)^{1), 2)}。軸索の活動電位発生に関わる電位依存性ナトリウムイオンチャネルはランビエ絞輪に、電位依存性カリウムイオンチャネルはジャクスタパラノードにそれぞれ集積する。これらのイオンチャネルにはさまれたパラノード部分では、ミエリン膜と神経細胞の軸索膜が直接結合することによりパラノードルジャンクションを形成している。このジャンクションは神経細胞側およびグリア細胞側に存在する複数の接着分子より形成されている^{1), 2)}。これらの分子を欠損させたマウスにおいてはジャンクションが形成されないだけでなく、上述したような軸索上のイオンチャネルやパラノードに存在する分子の局在化にも異常を認めることから⁵⁾⁻¹¹⁾、イオンチャネルの適切な位置への配置に対する神経細胞とミエリン形成グリア細胞との相互作用の重要性とパラノードルジャンクションの関わりが強く示唆される。

ミエリンは構成成分の約 70%が脂質、30%がタンパク質から成り、きわめて脂質に富んだ特殊な膜である¹²⁾。特に、脂質に占める糖脂質の割合が約 30%であり、他の細胞膜（糖脂質数%）と比して圧倒的に高い。ガラクトセレブロシド（またはガラクトシルセラミド）とこれに硫酸基が付加されたスルファチドが、ミエリンの主要な糖脂質として知られている。糖脂質は脂質 2 重膜の外層に存在する。細胞膜表面を被う糖脂質は一般的に細胞間認識やラフトの形成、細胞シグナリングなど様々な機能を持つ。しかしながら、これらのスフィンゴ糖脂質がミエリンで果たす役割に関しては不明な点が多い。cerebroside sulfotransferase (CST) は、ガラクトセレブロシドから硫酸化糖脂質であるスルファチドを合成する酵素である (Fig. 2)。基質となるガラクトセレブロシドを合成する cerebroside galactosyltransferase (CGT)と共に中枢および末梢神経系のミエリン形成細胞に主に発現している。CST 欠損マウス (CST knockout; CSTKO マウス) の解析から、CST はスルファチドの他にオリゴデンドロサイト前駆細胞 oligodendrocyte precursor cells (OPCs)に存在する硫酸化糖脂質 *proliferating oligodendroblast antigen* (POA) の産生にも関わっていることが明らかになった¹³⁾。CSTKO マウスは、生後数週間は症状も現れず野生型マウス (Wild type; Wd type) と区別できないが、5 週目頃から運動失調やふるえなどの神経症状が出現し、進行する。中枢および末梢神経系では、コンパクトミエリン (ミエリン中央部の脂質 2 重膜の多層部分) は正常に形成されるが、両端のパラノーダルジャンクションの形成不全を来す。その結果、軸索上のチャネルの局在化に異常が見られ神経伝導速度の低下を生じることから、スルファチドがミエリンにとって重要な構成要素であることが明らかにされている^{10), 11)}。機能阻害抗体を用いた培養系における解析¹⁴⁾や CSTKO マウスの解析¹³⁾から、POA あるいはスルファチドがオリゴデンドロサイトの最終分化の調節因子として働く可能性も示されている。また、中枢神経系の発達段階では、OPC 数が調節されることにより正常な跳躍伝導に必要となる最終的なオリゴデンドロサイト数が決定されるが¹⁵⁾、発達期における OPC の調節にも硫酸化糖脂質が関わる可能性がある。このように、CST によって産生される硫酸化糖脂質が髄鞘のみならず発達段階のオリゴデンドロサイト系譜細胞にもはたらく可能性は示されているが、*in vivo* における役割は明らかではない。さらに、CSTKO マウスの末梢神経系でも、シュワン細胞においてスルファチドが欠損することにより、パラノーダルジャンクションが正常に形成されず神経伝導速度の低下などの異常が見られる^{16), 17)}。このため、CSTKO マウスは、中枢および末梢神経系において発達段階や出来上がったミエリンにおける硫酸化糖脂質の役割を解析するのに適している。

以上のことから、本研究ではミエリン主要構成成分であるスルファチドなどの硫酸化糖脂質が合成されないことによりミエリン形成に異常を来し進行性の神経症状を呈する CSTKO マウスの解析を通して、神経系における硫酸化糖脂質の役割を明らかにすることを目的とした。第 1 章では、硫酸化糖脂質欠損状態の中枢神経系における軸索周囲のグリア細胞の変化を調べた。第 2 章では *in silico* 解析によって我々が新たに見出したパラノード局在分子 DCUN1D2 (defective in cullin neddylation protein 1-like protein 2, DCUN1 domain-containing protein 2, DCN1-like protein 2) および NEDD8 (neural precursor cell expressed developmentally down regulated protein 8) に着目し、CSTKO マウスにおける DCUN1D2, NEDD8 の変化を調べることで硫酸化糖脂質の末梢神経系グリア

における役割を調べた。

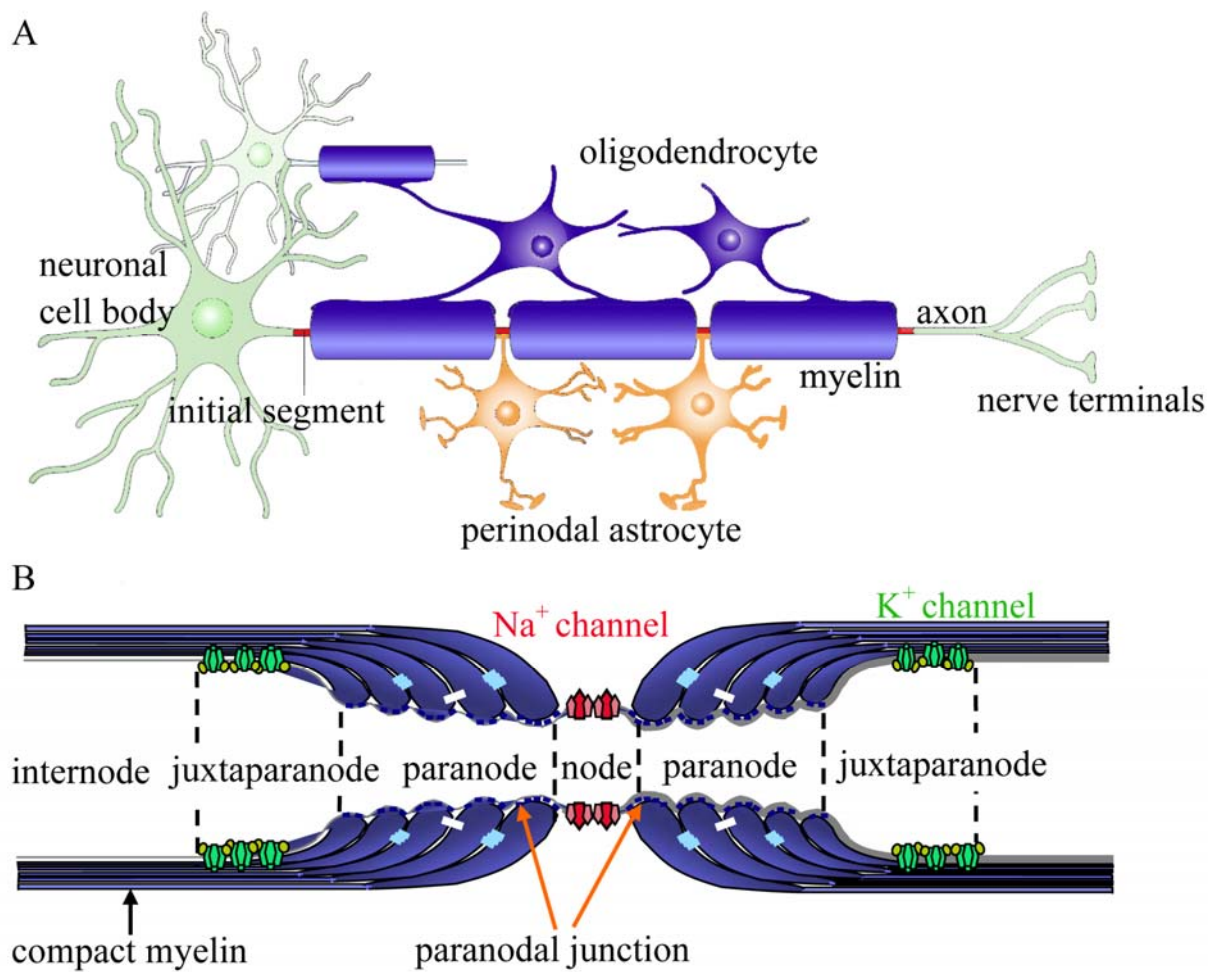


Fig. 1. Structure of myelinated axons.

(A) Myelinated axons and surrounding glias in the central nerve system (From Poliak, S., Peles, E., 2003²). (B) Schematic longitudinal section of myelinated axon around the node of Ranvier is illustrated. Four distinct regions of myelinated axon, including the node of Ranvier, paranode, juxtapanode and internode, are represented. Voltage-gated Na^+ channels are located at the node of Ranvier. In contrast, voltage-gated K^+ channels are concentrated at the juxtapanodal region, which is a flanking region of the paranode. At the paranode, paranodal axo-glial junction acts as a barrier to prevent lateral movement of these channels.

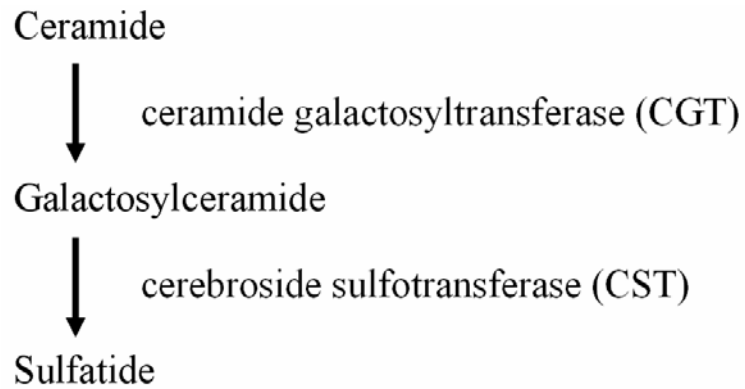


Fig. 2. Biosynthetic pathway of sulfatide.

Sulfatide is a major lipid component of the myelin sheath and synthesized in myelin-forming cells, oligodendrocytes in the central nervous system and Schwann cells in the peripheral nervous system. Sulfatide is biosynthesized via sequential reactions catalyzed by ceramide galactosyltransferase (CGT, EC 2.4.1.45) and cerebroside sulfotransferase (CST, EC 2.8.2.11).

第1章 スルファチド欠損マウスにおける中枢神経系グリア細胞の解析

中枢神経系のグリア細胞は、オリゴデンドロサイト、アストロサイト、ミクログリアの主に3種類に分類される。オリゴデンドロサイトは、神経軸索周囲にミエリンを形成する。ミエリンは絶縁膜として働く他、活動電位の発生とその伝導に必要な電位依存性イオンチャネルをランビエ絞輪周辺に集積させるのに重要な役割を果たしている^{1), 2)}。アストロサイトは、神経系の構築や細胞外液の恒常性の維持、血液脳関門の形成、神経細胞へのエネルギー源の供給など、神経系の基本的な構造および機能に重要な役割を果たしている³⁾。また、豊富な突起は中枢神経系の外周および血管周囲の他にシナプス周囲やランビエ絞輪部を取り巻き¹⁸⁾、それぞれの部位特異的に各種のトランスポーターや受容体あるいは細胞外マトリクスタンパク質を集積させることによって、これらの特殊な構造の維持や機能調節を行うことが最近明らかになってきた^{3), 4)}。さらに、中枢神経系の様々な病態時に活性化され、生理活性物質を分泌し、増殖して組織修復を行うことが知られている。これに対し、ミクログリアは、通常静止型 (resting type) として中枢神経系内随所に散在し、神経細胞周囲の環境変化に対するセンサーとしてはたらき¹⁹⁾、生理的あるいは病的状態で死んだ細胞などを貪食することによって、神経系の構造維持に役立っている。一方、神経系に炎症や損傷または虚血などの病的変化を生じると、様々な因子によって活性化される¹⁹⁾。活性化型ミクログリアは病巣部に遊走し、種々の成長因子やサイトカインを分泌することにより、周囲の神経細胞の保護あるいは変性に関与して病巣の修飾を行う²⁰⁾。

視神経は、脳や脊髄など他の中枢神経系の部位と同様に胎生期に神経管から形成され、網膜神経節細胞の軸索とこれらの3種類のグリア細胞によって構成されている。神経細胞体は眼球内の網膜上にあることから、視神経は神経細胞の軸索とグリア細胞の関連を *in vivo* で解析するのに適している。特にミエリンは生後早期に形成されるため、発達段階におけるオリゴデンドロサイト系譜細胞の分化とミエリン形成過程を追うことが可能である。OPCは胎生後期に第三脳室底で造られ、マウスやラットでは生直後から視神経内に入り視索および視交叉から網膜側に向かって移動する。OPCの移動は眼球近くの *lamina cribosa* (篩板) で終わる。移動したOPCは視神経内で増殖し、生後5-7日齢頃から最終分化してミエリンを形成し始める。オリゴデンドロサイトの数は、ミエリンの長さに関係し結果的には軸索の伝導速度にも関わることから、アポトーシスなどによって厳密に調節を受けている¹⁵⁾。しかし、OPCの移動、増殖、細胞死などに関わるOPC自体の調節機序に関しての詳細はまだ明らかではない。

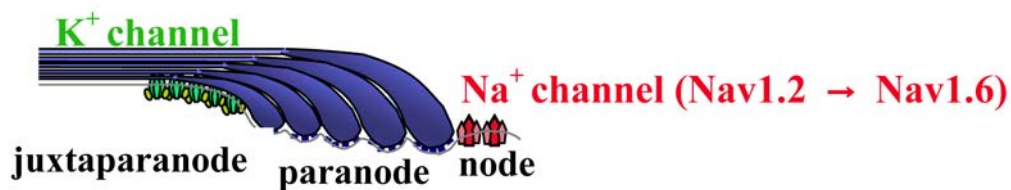
多発性硬化症のような中枢神経系の脱髄性疾患では、活性化したアストロサイトやミクログリアが病巣部の修飾に大きな役割を果たし²¹⁾、脱髄巣周囲を中心としてOPCの増殖や集積を生じる²²⁾。しかし、中枢神経系ではOPCの集積にも関わらず脱髄後にミエリンが十分に再生されないため、二次性軸索変性を引き起こして後遺症を残すことが、患者の予後を悪くする原因となっている。このため、視神経の病態形成を理解しミエリン再生を促進させるためには、これらのグリアの変化を知り、OPCの分化や数の調節、ミエリン形成などがどのような機序で行われるかを明らかにすることが重要である。

CSTは、緒言で示したように中枢および末梢ミエリンを構成する主要な糖脂質であるガラクト

セレブロシドに硫酸基を付加しスルファチドを合成する酵素である。また、CSTはOPCに存在するPOAの産生にも関わっている。CSTKOマウスの中樞神経系では、ミエリンのスルファチドが欠損することによって、コンパクトミエリンは存在するにもかかわらずミエリン両端のパラノーダルジャンクションが形成されない^{10), 11)}。しかし、神経系を構成するスルファチド以外の糖脂質には変化は見られない¹⁰⁾。このため、CSTKOマウスは、オリゴデンドロサイト系譜細胞やミエリンにおけるスルファチドやPOAなどの硫酸化糖脂質の役割あるいはパラノーダルジャンクションの役割を解析するのに適している。これまでの研究から、このマウスの中樞神経系では、ミエリン形成に伴って生じるはずの軸索上のナトリウムチャネルのNav1.2サブタイプ(sodium channel, voltage-gated, type II, alpha)からNav1.6サブタイプ(sodium channel, voltage-gated, VIII, alpha)への変換が不十分であり、ランビエ絞輪部の成熟度に異常が見られる²³⁾(Fig. 3)。また、明らかな脱髄はみられないが、加齢に伴ってランビエ絞輪およびその近傍軸索上のイオンチャネルクラスターが消失していき、それに伴って生後5-6週齢頃から進行性の神経症状が出現する^{10), 11)}。また、培養系を用いた解析では、スルファチドがオリゴデンドロサイトの最終分化に対する負の調節因子として働く可能性が示されている^{13), 14)}。このように、CSTによって産生される硫酸化糖脂質が成熟した中樞神経系のみでなく、発達段階においてオリゴデンドロサイト系譜細胞に関わる可能性は示されているが、詳細は明らかではない。

以上のことから、第1章では、CSTKOマウス視神経にみられるオリゴデンドロサイトおよび他のグリア細胞の変化を調べることにより、中樞神経系における硫酸化糖脂質の役割を明らかにすることを目的とした。このため、生後早期の発達段階やミエリン形成段階、あるいは成獣のCSTKOマウスにおけるオリゴデンドロサイト系譜細胞の変化を解析することにより、オリゴデンドロサイト系譜細胞における硫酸化糖脂質の役割を明らかにすると共に、ランビエ絞輪部でイオンチャネル集積がまだ見られる4週齢のCSTKOマウスと、チャネルの集積がなくなり明らかな神経症状を有する22週齢のCSTKOマウスにおける軸索周囲のグリアの変化について解析した。

A Wild Type Mice



B CSTKO Mice

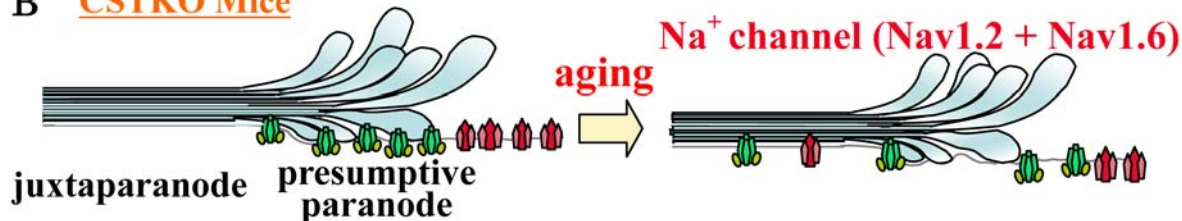


Fig. 3. Defect of paranodal junction formation and alteration of ion channel distributions in CSTKO mice.

The paranodal regions in wild-type (Wd-type) (A) and CSTKO mice (B) are illustrated. (A) In Wd-type mice, Na⁺ channels are restricted to the nodes of Ranvier, and the K⁺ channels are concentrated in the juxtaparanodes. Myelination causes subtype change of Na⁺ channels from Nav1.2 to Nav1.6, resulting in maturation of the nodes. (B) In young CSTKO mice, the widths of Na⁺ channel clusters are wider than those of wild type mice, and the K⁺ channels are aberrantly localized to the presumptive paranodes. These characteristic channel clusters gradually disappear with age and these channels become diffusely distributed in aged animals. Subtype change of Na⁺ channels was disturbed in CSTKO mice.

第1章 第1節 実験材料および実験方法

1-1-1 実験動物

CSTKO マウスはジーンターゲット法により作製され¹⁰⁾, 大阪大学 本家孝一先生 (現高知大学) より供与された. ヘテロ接合体マウス間の交配により生まれた仔の遺伝子型は, polymerase chain reaction (PCR) 法により確定し, Wild type (Wd type) およびホモ接合体を実験に用いた. 遺伝子診断用のプライマーは, Wd type の判定に 5'-CACACTGCTCAACATCCTGTTC-3', CSTKO マウスの判定には 5'-CTCATTCCTCCCCTCATGATC-3' をそれぞれフォワードプライマーとして用い, リバースプライマーはどちらも 5'-TACTCCTGCAGTAGCACCAAGT-3' を用いた. 正常コントロールには同腹あるいは同週齢の Wd type マウスを用いた.

実験動物は, 東京薬科大学実験動物施設において恒温 (23±1°C), 恒湿 (55±5%), 12 時間周期の定時照明化で飼料と水を自由に与え Specific Pathogen Free (SPF) の環境下で飼育した. 動物の取り扱いに関しては, 東京薬科大学実験動物規定に基づいて行った. 本実験計画は東京薬科大学実験動物委員会で承認の上で実施した.

1-1-2 灌流固定

発達段階の解析には, 生後 1 日齢, 3 日齢と 5 日齢のマウスを使用し, 屠殺する 24 時間前に BrdU (bromodeoxyuridine, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を体重あたり 100 µg/g で腹腔内投与した. 各日齢のマウスを CO₂ によって麻酔し, 仰臥位で固定した後, 開胸した. 注射針を心尖部より左心室内に刺入後, 0.01 M PBS (phosphate buffered saline), pH 7.4, 4°C を注入し, 右心耳切開により血液を洗い流した. 体重と同量の 4% PFA (paraformaldehyde) / 0.1 M PB (phosphate buffer), pH 7.4, 4°C で灌流固定し, 視神経を摘出し, 同液で一晩浸漬固定した.

4 週齢と 22 週齢のマウスをソムノペンチル 45 mg/kg 腹腔内投与によって麻酔し, 仰臥位で固定した後, 開胸した. 翼状針を心尖部より左心室内に刺入後, 0.01 M PBS, pH 7.4, 4°C をペリスタポンプを用いて流速 3 ml/min で注入し, 右心耳切開により血液を洗い流した. 体重と同量の 4% PFA / 0.1 M PB, pH 7.4, 4°C で灌流固定し, 視神経を摘出し, 同液で 4°C 一晩浸漬固定した.

1-1-3 凍結切片の作製

浸漬固定した神経を順次 10% sucrose / PBS, 30% sucrose / PBS に置換し, Tissue-Tek® O.C.T. Compound に包埋し, ドライアイスで凍結させた. 凍結した組織は -80°C で保存し, 使用時にクライオスタットで免疫染色用に 10 µm, *in situ* ハイブリダイゼーション用に 20 µm の薄切切片を作製し, MAS コートスライドにのせ, 風乾させ使用した.

なお, 発達段階の視神経の解析には, 横断面での薄切を行った. 眼球を出た直後から視神経を 10 µm の厚さで連続的に薄切して横断切片を作製し, それを 250 µm ずつ区分することにより, 1.5

mm の長さの視神経を 6 か所に分けた。区分した領域は眼球に近い順に 1 から 6 の番号をつけた (Fig. 9A 参照)。

1-1-4 免疫染色法

1-1-3 で作成した切片を PBTGS (0.1 M PB, 0.3% Triton X-100, 10% goat serum) で 1 時間室温にてブロッキング反応した後、一次抗体を PBTGS で希釈し一晩 4°C で反応させた。切片を 0.01 M PBS, pH 7.4 に浸し、室温で 5 分間×3 回洗浄した。その後、二次抗体を 0.01 M PBS, pH 7.4 で希釈し 1 時間室温で反応させ、切片を 0.01 M PBS, pH 7.4 に浸し、室温で 5 分間×3 回洗浄した。対比染色として diamidino-2-phenylindole (DAPI, Molecular Probes, Eugene, OR) あるいは propidium iodide (PI, Vector Laboratories, Burlingame, CA) を使用した。封入剤 (Vectashield Mounting Medium, Vector Laboratories, Burlingame, CA) とカバーガラス (Matsunami Glass Ind., Ltd.) を用いて封入し、風乾した。

Table 1 使用した抗体

抗体名	会社名	希釈倍率
Anti-NG2 rabbit polyclonal	Chemicon (Temecula, CA)	1:200
Anti-bromodeoxyuridine (BrdU) rat monoclonal	Abcam (Cambridge, UK)	1:100
Anti-single stranded DNA (ssDNA) rabbit polyclonal	DakoCytomation (Kyoto, Japan)	1:200
Alexa 488-conjugated anti-rabbit IgG	Molecular Probes (Eugene, OR)	1:3000
Alexa 594-conjugated anti-rat IgG	Molecular Probes (Eugene, OR)	1:3000

1-1-5 BrdU を用いた増殖細胞検出法

1-1-3 により作成した切片を DAPI で染色したのちに 4% PFA / 0.1 M PB, pH 7.4, 4°C で固定し、0.01 M PBS, pH 7.4 に浸し、室温で 5 分間×3 回洗浄した。その後、切片を室温で 2N HCl を用いて 10 分間処理し、室温で 0.1 M sodium borate buffer, pH 8.5 で 10 分間中和し、0.01 M PBS, pH 7.4 に浸し、室温で 5 分間×3 回洗浄した。その後、1-1-4 と同様に免疫染色をした。

1-1-6 免疫染色切片の定量的解析

1-1-4 で作成した免疫染色切片の染色像は Pascal laser scanning microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) を使用し、1-1-5 で作成した免疫染色切片の染色像は AxioCam HRc CCD camera (Carl Zeiss) を使用し画像を撮影した。定量化のための視神経の面積の算出には、AxioVisionRel.4.6 (Carl Zeiss) を用いて、各々の面積 (μm^2) を算出した。画像中にある染色陽性細胞数を計測した。解析した面積で計測した陽性細胞数を割りさらに 10000 を掛けることにより単位面積あたりの細胞数 (cell / 10000 μm^2) を算出し、統計解析を行った。

1-1-7 電子顕微鏡による解析

生後10日齢のWd typeとCSTKOマウスをソムノペンチル45 mg/kg腹腔内投与によって麻酔し、仰臥位で固定した後、開胸した。注射針を心尖部より左心室内に刺入後、2% PFA / 2.5% glutaraldehyde / 0.1 M cacodylate buffer, 4°Cを注入し、右心耳切開により血液を洗い流して灌流固定した状態で一晩4°Cにおいて固定した後、視神経を摘出した。その後1% osmium tetroxide / 0.1 M cacodylate bufferに浸し室温で2時間後固定を行った。サンプルはethanolで脱水し、Epon 812 (TAAB Laboratories, Berks, UK) に包埋した。視神経横断面の超薄切にはウルトラミクロトーム (EM UCG, Leica) を使用し, uranyl acetate と酢酸鉛を使用し染色した。サンプルは透過型電子顕微鏡 (JEM-1011, JEOL, Japan) を使用し撮影した。撮影した画像から全軸索数、コンパクトミエリンを形成している軸索数を測定し、コンパクトミエリン形成割合 (%) を算出し、統計解析を行った。

1-1-8 *in situ* ハイブリダイゼーション法

1-1-8-1 cRNA プローブの作製

鋳型となるcDNAは以下のとおりである。myelin proteolipid protein (PLP) についてはマウス PLP cDNA の翻訳領域を含む EcoRI 断片 1.4 kb を pSPT18 ベクター (Boehringer Mannheim) にサブクローニングしたものを使用し、直鎖化には SalI もしくは NheI を使用した²⁴⁾。macrophage colony stimulating factor 1 receptor (c-fms) については、IMAGE Clone 873436 (Genbank; AA473814) から塩基配列 1068~2100 に相当する 1 kb 断片を pBluescript ベクターにサブクローニングしたものを使用し、直鎖化には EcoRI もしくは NotI を使用した。glutamate-aspartate transporter (GLAST) についてはマウス GLAST cDNA より塩基配列 1746~2478 に相当する部位 0.7kb を pBluescript ベクターにサブクローニングしたものを使用し、直鎖化には SalI もしくは NheI を使用した²⁵⁾。直鎖化したcDNAはフェノール抽出により精製した。精製したcDNAからDIG RNA Labeling Kit (SP6, T7, T3) (Roche) を用いてDIGラベルされたcRNAプローブを合成した。合成したcRNAプローブは1%アガロースゲルで電気泳動した後、エチジウムブロマイドで染色し、RNA ラダー (0.1~2 kb, invitrogen) と比較し濃度を算出した。

1-1-8-2 ハイブリダイゼーション

1-1-3で作製した凍結切片を50°Cにて15分間乾燥後、4% PFA / PBS に室温で20分間浸して固定した。0.1% Diethylpyrocarbonate (DEPC) 処理を行った PBS (DEPC-PBS) で5分間×2回の洗浄を行い、20 µg/ml Proteinase K / PK buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 5 mM EDTA) にて室温で30分間処理した。DEPC-PBS で5分間洗浄し、4% PFA / PBS に室温で15分間再固定後、0.1% DEPC 処理した蒸留水 (DEPC-DW) に通してすすいだ。使用直前に調整した0.3% acetic anhydride / 0.1 M triethanolamine-HCl 中に切片をいれてスターラーで攪拌しながら室温に15分間おき、アセチル化を行った。DEPC-PBS に5分間浸して洗浄した後、65°Cに温めておいた Hybridization buffer (50% formamide, 5×SSC, 0.2 mg/ml yeast tRNA, 100 mg/ml Heparin, 1×Denhardt's solution, 0.1% Tween20, 0.1% CHAPS, 5 mM EDTA) に切片を移し、65°Cで3~4時間プレハイブリダイゼーションを行っ

た。その後、モイストチャンバーに切片を水平におき、Hybridization buffer で 1~3 ng/ μ l に希釈した DIG-labeled cRNA プローブ (1-1-7-1 で作製) をのせ、気泡が入らないようにパラフィルムでカバーして 65°C で一晩反応させた。その後、予め 65°C に温めておいた 1×SSC (150 mM NaCl, 15 mM sodium citrate, pH 7.0) / 50% formamide にハイブリダイゼーション後の切片を浸して、65°C で 15 分間、および 30 分間の洗浄を行った。さらに、予め 65°C に温めておいた 0.1×SSC を用いて 65°C で 30 分間洗浄した。

1-1-8-3 シグナルの検出

切片を MABT (100 mM maleic acid, 150 mM NaCl, pH 7.5, 0.1% Tween20) に浸し、室温で 30 分間×2 回洗浄した。切片をモイストチャンバーにおき、Blocking buffer (20% heat inactivated sheep serum / PBT) をのせ、室温で 30 分間ブロッキング反応を行った。次に Blocking buffer で 2,000 倍希釈した anti-DIG-AP, Fab fragments を切片にのせ、4°C で一晩反応させた。その後、切片を MABT に浸して室温で 30 分×3 回、AP buffer (100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 50 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0.1% Tween20) に浸して室温で 5 分間 2 回の洗浄を行った。AP buffer に 5 mM levamisole, 0.5 μ l/ml nitro blue tetrazolium (NBT; Roche), 3.5 μ l/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP; Roche) となるようにそれぞれの試薬を加えた後、その溶液に切片を浸し、室温、遮光状態で発色反応を行った。発色確認後、1 mM EDTA/PBS を用いて発色を停止した。nuclear fast red solution (Sigma) でカウンター染色を行った後、70%、80%、90% ethanol に順次 1 分間ずつ、ethanol に 2 回、xylen に 10 分間 3 回、それぞれ切片を浸し脱水を行った。封入剤 (Entellan, Merck) とカバーガラスを用いて封入し、風乾した。

1-1-9 組織染色切片の定量的解析

1-1-8 で作成した組織染色切片の染色像は、倒立落射型顕微鏡 Axiovert 200 M (Carl Zeiss Co., Ltd.) を使用し AxioVision3.1 (Carl Zeiss Co., Ltd.) で位相差の画像を取り込んだ。定量化のための視神経の面積の算出には、photoshop 6.0 (Adobe) 上で視神経切片の端の部分トリミングし、各々の面積 (μ m²) を算出した。画像中にある染色陽性細胞は 2D image viewer (Amersham Pharmacia) を使用し、intensity 25.0 以上の設定を行い計測した。解析した面積で計測した陽性細胞数を割りさらに 10000 を掛けることにより単位面積あたりの細胞数 (cell / 10000 μ m²) を算出し、統計解析を行った。

1-1-10 統計解析

実験結果は、平均値±標準誤差 (standard error of the mean, SEM) で表した。統計学的検定法として、正規分布に従っていることを F 検定で確認し、群間比較の統計解析には Student's *t*-test を用いた。測定値の統計学的比較には、95%の信頼度 (P<0.05) をもって有意とみなした。これら統計処理には、Microsoft Excel 2003 (Microsoft Corporation) を用いた。

第1章 第2節 結果

1-2-1 成獣期の CSTKO マウス視神経におけるオリゴデンドロサイト系譜細胞の変化

硫酸化糖脂質欠損がミエリン形成後の視神経においてオリゴデンドロサイト系譜細胞数に与える影響を解析した。オリゴデンドロサイト系譜細胞の検出には、PLP cRNA プローブによる *in situ* ハイブリダイゼーションと抗 NG2 抗体を用いた免疫染色を用いた。PLP は中枢神経ミエリンの主要な構成タンパク質であるため、この PLP mRNA 強陽性となるミエリン形成後の成熟オリゴデンドロサイトと NG2 陽性の OPC について視神経で解析した (Fig. 4, Fig. 5)。

ミエリン形成がまだ続いている 4 週齢のマウスでは、CSTKO マウスも Wd type と同様に PLP mRNA を大量に発現している (Fig. 4A, B)。これに対して、22 週齢のマウスでは、どちらのマウスも 4 週齢に比べて PLP mRNA の発現が減少している傾向がみられた (Fig. 4C, D)。このように、ミエリン形成期では PLP mRNA の発現が多く、維持期では発現量が減少するのは正常な発達でも見られており、この量的変化は CSTKO マウスでも変わりなかった。しかしながら、CSTKO マウスの視神経においては、Wd type より PLP 陽性の成熟したオリゴデンドロサイトの数が 4 週齢、22 週齢ともに優位に多かった (Fig. 4E)。

次に、4 週齢のマウス視神経を用いて、オリゴデンドロサイト前駆細胞のマーカーである NG2 の免疫染色によって OPC を検出し、陽性細胞数を計測した。4 週齢のマウスでは、未分化な OPC は Fig. 5A, B のように NG2 陽性細胞 (赤) として染色される。面積あたりの NG2 陽性細胞数は 4 週齢の CSTKO マウスで有意に増加していた (Fig. 5C)。これに対して、全細胞数に占める NG2 陽性細胞数の割合 (%) は、Wd type に比較して CSTKO マウスでは減少していた (Fig. 5D)。

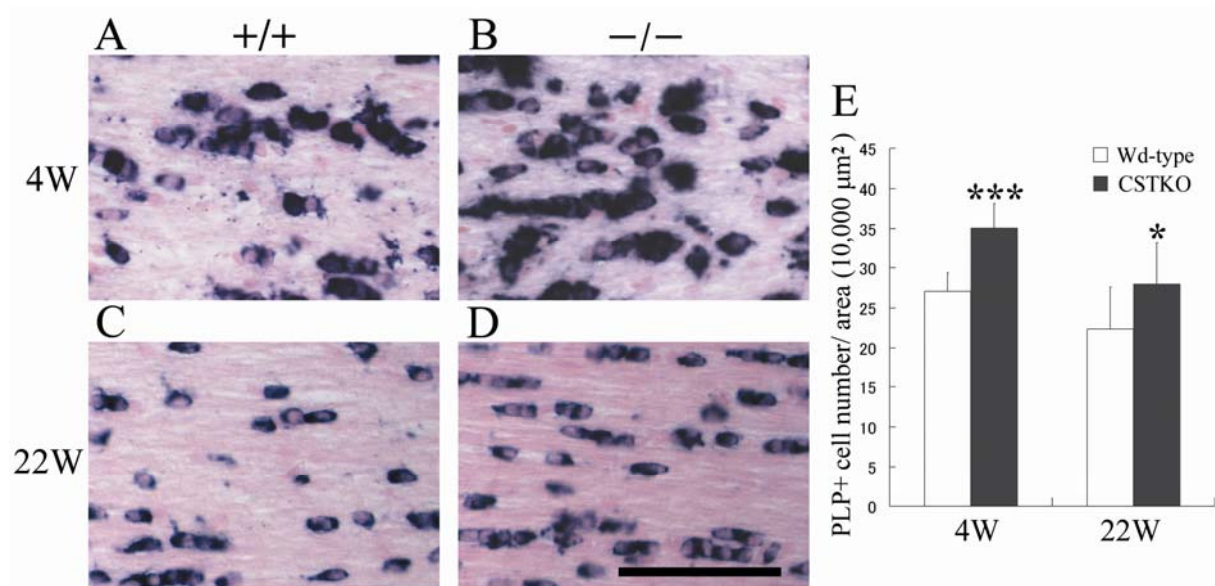


Fig. 4. PLP-positive cells in adult optic nerves of Wd-type and CSTKO mice.

(A–D) The mRNA expression pattern of the oligodendrocyte marker PLP in 4- (A, B) and 22-week-old (C, D) wild-type (Wd-type; +/+) and CST-deficient (CSTKO; -/-) mice were examined by in situ hybridization. Scale bar indicates 100 μm. (E) Comparative cell densities of PLP mRNA-positive cells in the optic nerves are shown. Each value represents the mean ± SEM of the data obtained from four animals. *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$ vs. Wd-type mice.

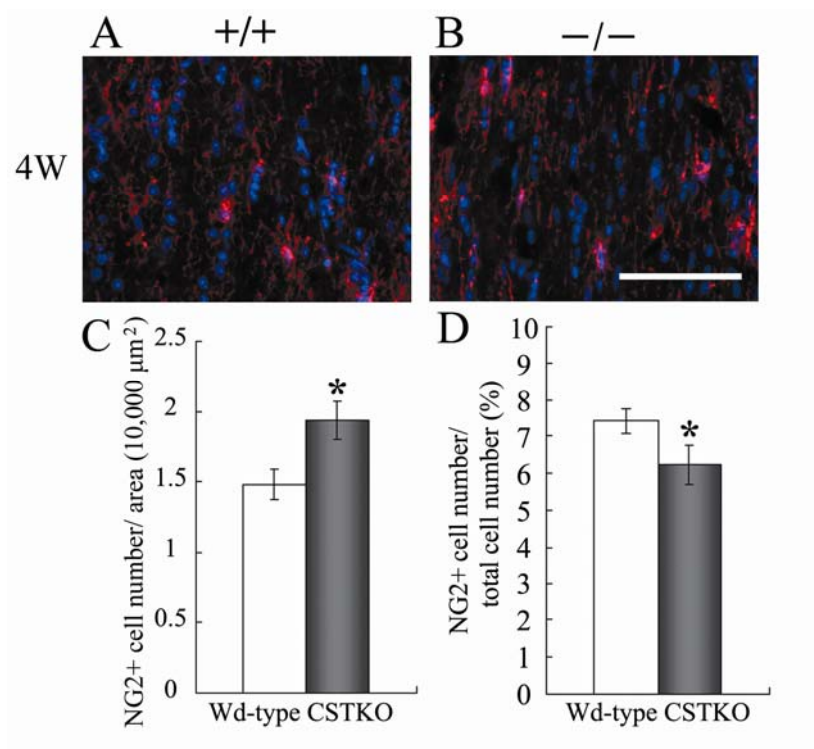


Fig. 5. NG2-positive cells in the optic nerve of 4-week-old Wd-type and CSTKO mice.

(A, B) The expression pattern of the oligodendrocyte precursor cell marker, NG2, in wild-type (Wd-type; +/+) and CST-deficient (CSTKO; -/-) mouse optic nerves were examined using an antibody specific to NG2. Scale bar indicates 50 μm . (C) Comparative cell densities of NG2-positive cells are shown. (D) The total cell number and number of NG2-positive cells were counted in each nerve area and the percentage of NG2-positive cells was calculated. Each value represents the mean \pm SEM of the data obtained from four animals. *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$ vs. Wd-type mice.

1-2-2 CSTKO マウス視神経におけるアストロサイトの変化

視神経においてアストロサイトの突起は軸索のランビエ絞輪部を取り囲むように存在する。アストロサイトはミクログリア同様に様々な病的状態で活性化されることから、CSTKO マウスで見られる軸索の変化は、周囲のアストロサイトの変化と関連している可能性が考えられる。そこで、4週齢および22週齢の Wd type および CSTKO マウス視神経におけるアストロサイトの変化を *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて解析した。GLAST はグルタミン酸トランスポーターの一種であり、視神経ではアストロサイトのみが存在する²⁶⁾ことからこれをマーカーとして用いた。Fig. 6 で示すように、Wd type および CSTKO マウスの両者で、視神経全体に GLAST 陽性のアストロサイトが見られた。アストロサイトは活性化に伴い増殖し、形態変化を生じる。しかし、解析したどちらの週齢の CSTKO マウスにおいても、Wd type と比較して、GLAST 陽性細胞数の明らかな増加は見られなかった。

1-2-3 CSTKO マウス視神経におけるミクログリアの変化

ミクログリアは様々な病的状態で活性化され、神経保護因子あるいは神経障害因子を分泌し、病態を修飾することが知られている¹⁹⁾。そこで、CSTKO マウス視神経におけるミクログリアの変化を調べた。c-fms はミクログリアにおいてマクローフェージコロニー刺激因子 (M-CSF) の受容体として働き、活性化に伴う形態変化や増殖、移動、貪食作用および生理活性物質の分泌などに関与する²⁷⁾。このため、*in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて c-fms 陽性細胞を調べた。Fig. 7 に示すように、4週齢の Wd type (A) および CSTKO (B) マウスのどちらの視神経においても、突起を持った c-fms 陽性細胞が認められた。軸索上のイオンチャンネルクラスターが減少し、明らかな神経症状が見られる22週齢のマウス (C, D) でも4週齢と同じように c-fms 陽性細胞が認められた。ミクログリアの活性化は著明な形態変化と増殖を伴う。そこで、ミクログリアの数の変化を見るため、Wd type および CSTKO マウスの各週齢の視神経における c-fms 陽性細胞数を比較した。しかし、Fig. 7E のグラフに示すように、これらのマウス間での有意な差はみられなかった。

以上の結果から、CSTKO マウス視神経における細胞数の増加は、オリゴデンドロサイト系譜細胞特異的に生じていることがわかった。従って、1-2-1 で示された総細胞数に対する NG2 陽性細胞割合の減少は、PLP 陽性の成熟オリゴデンドロサイト数の増加に起因していることが推測された。このことから、CST 欠損による硫酸化糖脂質の異常が同週齢の Wd type マウスと比較してオリゴデンドロサイト系譜細胞数の増加、特に成熟したオリゴデンドロサイト数の増加を引き起こしていることが示された。この結果は脊髄での結果と一致し²⁸⁾、また、培養系でスルファチドがオリゴデンドロサイトの分化過程の阻害因子として働くという報告^{13), 14)}とも矛盾しないことがわかった。

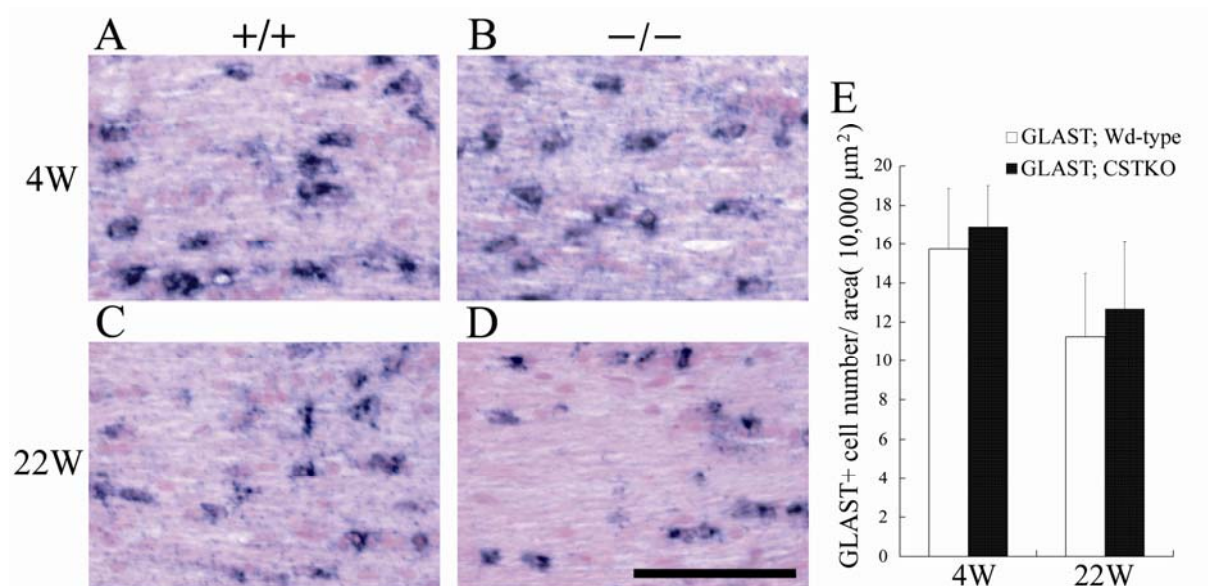


Fig. 6. GLAST-positive astrocytes in the optic nerves of Wd-type and CSTKO mice.

The expression patterns of astrocyte marker GLAST mRNA in Wd-type and CSTKO mice of 4 weeks of age (A, B) and 22 weeks of age (C, D) were examined by *in situ* hybridization analysis. (E) Each column showed comparative cell density of GLAST-positive cells in the optic nerve. Scale bar in (D) indicates 100 μm. Each value represents the mean ± SEM of the data obtained from four animals.

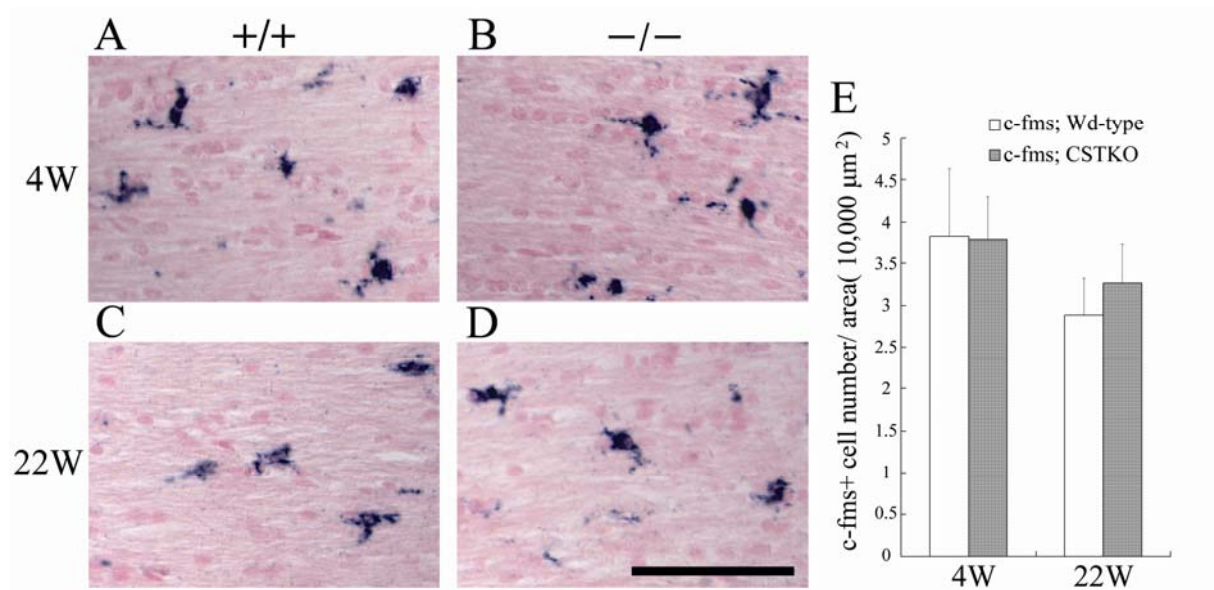


Fig. 7. c-fms-positive microglia in the optic nerves of Wd-type and CSTKO mice.

The expression patterns of microglial marker c-fms mRNA in Wd-type and CSTKO mice of 4 weeks of age (A, B) and 22 weeks of age (C, D) were examined by *in situ* hybridization analysis. (E) Each column showed comparative density of c-fms-positive cells in the optic nerves. Scale bar in (D) indicates 100 μm. Each value represents the mean ± SEM of the data obtained from four animals.

1-2-4 発達段階における CSTKO マウス視神経の OPC 数の比較

ミエリンを形成するオリゴデンドロサイトの数は、各ミエリンの長さや 1 個のオリゴデンドロサイトが造るミエリン数に影響を与える。このため、正常な発達段階において、オリゴデンドロサイトの数はオリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖、分化と共にプログラム細胞死によって適正に調節されている¹⁵⁾。4 週齢の CSTKO マウスでの OPC 数の増加が何に起因しているかを調べるために、ミエリン形成開始直前の生後 5 日齢の切片を抗 NG2 抗体によって免疫染色し、Wd type と比較した。視神経中の全細胞数は、PI によって核染色し計測した。Fig. 8 で示すように、生後 5 日齢の視神経において、NG2 陽性細胞は神経線維に沿って並んでいる (Fig. 8A-F)。視神経中の全細胞数、NG2 陽性細胞数と全細胞数に占める NG2 陽性細胞の割合の全てにおいて、CSTKO マウスで Wd type よりも有意に増加していた (Fig. 8G-I)。生後 5 日齢の視神経の免疫染色では、ミエリンのマーカータンパク質である PLP, myelin associated glycoprotein (MAG) や myelin basic proteins (MBP) の発現はまだ認められなかった (data not shown)。このことから、CSTKO マウスにおける OPC 数の増加はミエリン形成前からすでに起こっていることがわかった。

CSTKO マウスの生後 5 日齢での OPC 数の増加が増殖によるものか、細胞死の減少によるものか明らかにするために、増殖細胞のマーカーとして BrdU を生後 4 日目に投与し、5 日齢の視神経に対してアポトーシスのマーカーとして ssDNA (single stranded DNA) の免疫染色を行った。Fig. 8J で示したように、この時期の視神経におけるアポトーシス細胞の数は、Wd type と CSTKO マウスの両者ともに極めて少ないことが分かった。BrdU 陽性細胞数も Wd type と CSTKO マウスの間で差は認められなかった (Fig. 8K)。これらのことから、CSTKO マウスでの OPC 数の増加は生後 5 日齢よりも以前に生じることが示唆された。

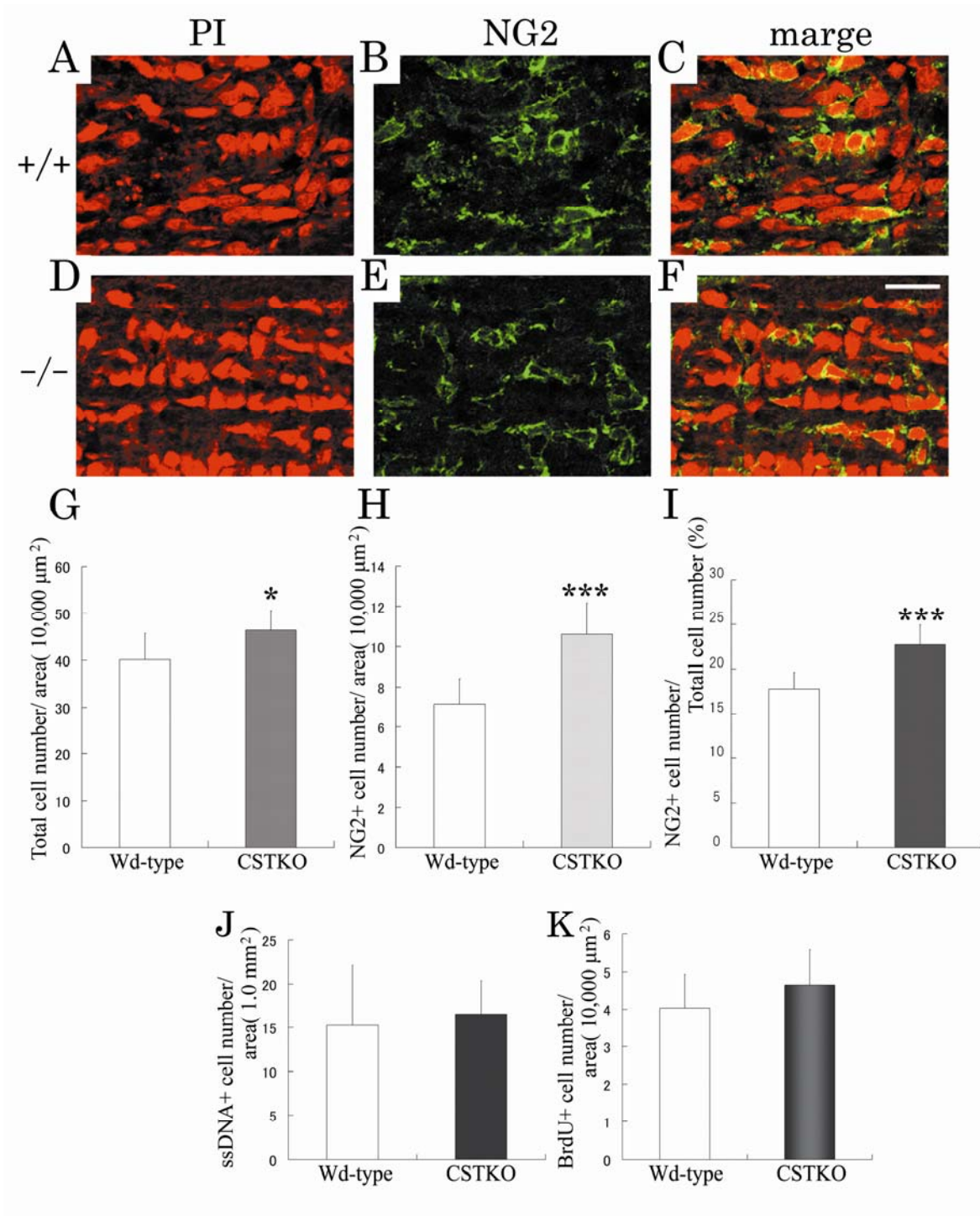


Fig. 8. Number of OPCs and the proportion of dying or proliferating cells in 5-day-old optic nerves of Wd-type and CSTKO mice.

(A–F) Double labeling of NG2 (green)/PI (red) was performed on optic nerves from 5-day-old Wd-type (+/+; A–C) and CSTKO (-/-; D–F) mice. Scale bar represents 25 μm. (G–I) Total cell numbers (G) or the number of NG2-positive cells (H) per area, and percentages of NG2-positive cells (I) in both Wd-type and CSTKO optic nerves are shown. (J, K) One day after BrdU injection, the densities of dying cells (J) and

proliferating cells (K) were examined using specific antibodies against ssDNA or BrdU, respectively. Each value represents the mean \pm SEM of the data obtained from three individual animals of each genotype. *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$ vs. Wd-type mice.

1-2-5 CSTKO マウス発達段階における視神経の部位別のオリゴデンドロサイト前駆細胞数と増殖細胞数の解析

視神経の発達過程では、前述したように第三脳室底で生まれた OPC が、視神経交叉から視神経内を一方方向性に移動し、網膜近くの篩板に到達する。視神経内に入った OPC は増殖し、分化して成熟オリゴデンドロサイトとなり、軸索に対してミエリンを形成する。前述のようにいったん過剰に産生されたオリゴデンドロサイトは、細胞死を生じることによって軸索に対して適正な数のオリゴデンドロサイトが残ると言われている¹⁵⁾。発達段階のマウスでは、第三脳室底由来の双極性 OPC は生後 0 日齢には視交叉に到達する。生後 4 日齢では遊走してきた OPC が篩板に到達し、生後 7 日齢には視神経全体で OPC を認めるようになり²⁹⁾、ミエリンが形成され始める。1-2-4 の結果、CST 欠損に伴う OPC の増加は生後 5 日目にすでに生じていることから、生後 1 日齢および 3 日齢におけるオリゴデンドロサイト系譜細胞の解析を行った。視神経内を移動する細胞を検出するために OPC のマーカーである NG2 の抗体染色をおこなった。増殖している細胞の検出には、生後 0 日齢と生後 2 日齢のマウス（解析の 24 時間前）にそれぞれ BrdU を投与し、作製した切片に対して抗 BrdU 抗体染色を行った。OPC の移動に対するスルファチドあるいは POA の影響を調べるため、視神経を Fig. 9A のように 6 つのポジションに区分して、各日齢で細胞がどこまで到達しているかを調べた。横断面の面積は 6 つのすべての部位で Wd type マウスと CSTKO マウス間で差がなかった。

Fig. 9B-G に生後 3 日齢視神経の各部位 (B, C; position 1, D, E; position 3, F, G; position 6) における代表的な 3 重染色像 (赤; NG2, 緑; BrdU, 青; DAPI) を示した。赤く染色された NG2 陽性細胞は、視交叉側 (F, G) に多く、眼球側に近づくにつれて減少する傾向があることがわかる。各部位 (position 1-6) における単位面積中の NG2 陽性細胞数 (H, K), 全細胞数における NG2 陽性細胞数の割合 (%) (I, L), NG2 陽性細胞に占める BrdU 陽性細胞の割合 (%) (J, M) を生後 1 日齢 (H-J) および生後 3 日齢 (K-M) でそれぞれ計測してグラフ化した。白いカラムで示した Wd type マウスに注目すると、生後 1 日齢 (Fig. 9H) の position 1 ではまだ NG2 陽性の OPC が到達していないが、生後 3 日齢 (Fig. 9K) になると少数の OPC が position 1 でも見られるようになった。また、生後 1 日齢に比べて生後 3 日齢では全てのポジションで NG2 陽性細胞数や全細胞に占める NG2 陽性細胞の割合が増加していた (Fig. 9H-L)。一方、増殖している NG2 陽性細胞の割合は、生後 1 日齢の position 2 や生後 3 日齢の position 1 のような移動の先頭部分では、ほかのポジションよりも少ない傾向があった。このことから、生後 1 日齢から 3 日齢の間に OPC は活発に移動し、その後増殖することがわかった。

一方、Fig. 9 (H-J) の青いカラムに示されている生後 1 日齢の CSTKO マウスの position 2 (細胞移動の先頭部分) では、Wd type マウスと比較して NG2 陽性細胞数やその割合には差がなかった。このことから、OPC の移動自体には CSTKO マウスと Wd type マウスの間で明らかな違いがないことが示唆された。これに対して、生後 1 日齢の position 2 以外のすべての部分において、NG2 陽性細胞数 (Fig. 9H), NG2 陽性細胞の全細胞数に占める割合 (Fig. 9I) や増殖している NG2 陽性細胞の割合 (Fig. 9J) は Wd type マウスに比べて CSTKO マウスで有意に増加していた。また、

生後 3 日齢では、移動先端部を含む全てのポジションで NG2 陽性細胞およびその割合が Wd type マウスに比べて CSTKO マウスで増加していた (Fig. 9K, L). これらの結果より、CSTKO マウス視神経の発達段階の早い時期における OPC の増加は、移動する細胞数の違いではなく視神経内の OPC の増殖の亢進によって引き起こされていることが示唆された.

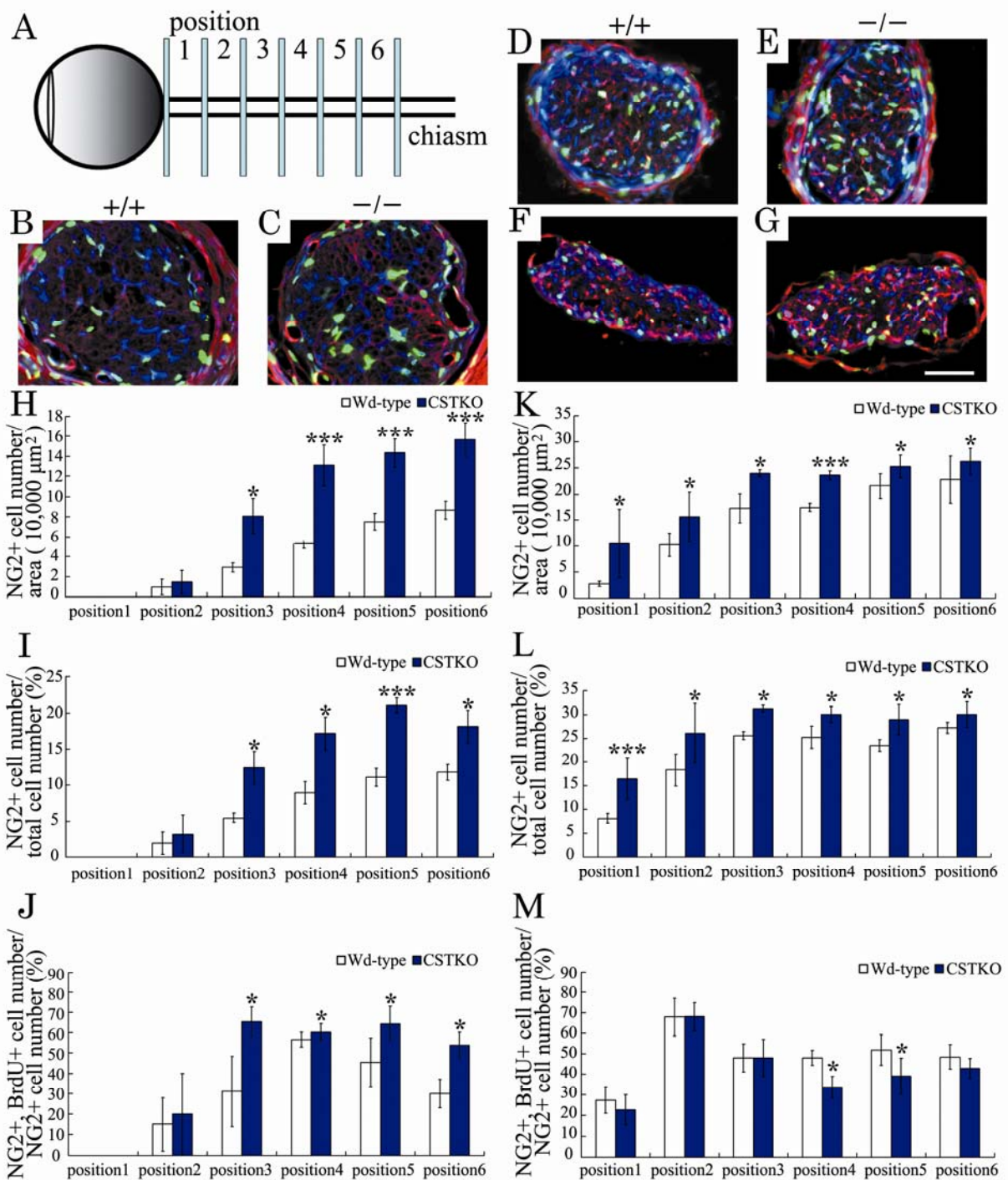


Fig. 9. Regional differences in OPC numbers during early development of optic nerves in Wd-type and CSTKO mice.

Transverse serial cryosections (10 μm) were prepared by cutting 1-day-old (H–J) and 3-day-old (B–G; K–M) optic nerves of Wd-type and CSTKO mice from the retinal to the chiasm side. (A) A schematic representation of the optic nerve regions (positions 1 to 6) is illustrated. Optic nerves of Wd-type (+/+) and CSTKO (-/-) mice were divided into six regions (250 μm each, for a total of 1.5 mm; see the materials and

methods for details). (B–G) The 10- μ m-thick sections from each region were triple stained with NG2 (red), BrdU (green) and DAPI (blue). Representative pictures in B/C, D/E, and F/G were obtained from positions 1, 3 and 6, respectively. (H–M) The average number of NG2-positive cells per nerve area (H, K), percentages of NG2-positive cells (I, L) and percentages of BrdU-positive cells in NG2-positive cell populations (J, M) from three sections at each optic nerve position are represented as mean \pm SEM. Each value represents the mean of the data obtained from two individual animals (H–J; 1-day-old mice) and three individual animals (K–M; 3-day-old mice) of each genotype. *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$ vs. Wd-type mice.

1-2-6 CSTKO マウス視神経におけるミエリン形成時期の変化

CSTKO マウスの初代培養では成熟オリゴデンドロサイトあるいはミエリンのマーカである MBP の発現が早くなることから、スルファチドがオリゴデンドロサイトの負の調節因子として働く可能性が示唆されている¹³⁾。さらに、これまでの研究で、7 日齢の CSTKO マウスの脳で PLP mRNA 陽性の成熟オリゴデンドロサイトの増加が認められている¹³⁾。ミエリンの分子マーカを用いたこれらの研究からは、CSTKO マウスでミエリン形成が早期に行われることが示唆された。しかし、ミエリン形成を直接観察してはいないことから、本研究では、CST 欠損による *in vivo* のミエリン形成時期への影響を確認するために、電子顕微鏡によってミエリンを有している軸索を観察した (Fig. 10)。その結果、生後 10 日齢の CSTKO マウスでは、Wd type マウスに比べてコンパクトミエリンに囲まれた有髄軸索数の全軸索数に対する割合 (%) に有意な減少が認められた (Fig. 10C)。このことから、CSTKO マウスの視神経ではオリゴデンドロサイト系譜細胞数は増加するが、ミエリン形成時期自体は遅れることが示唆された。

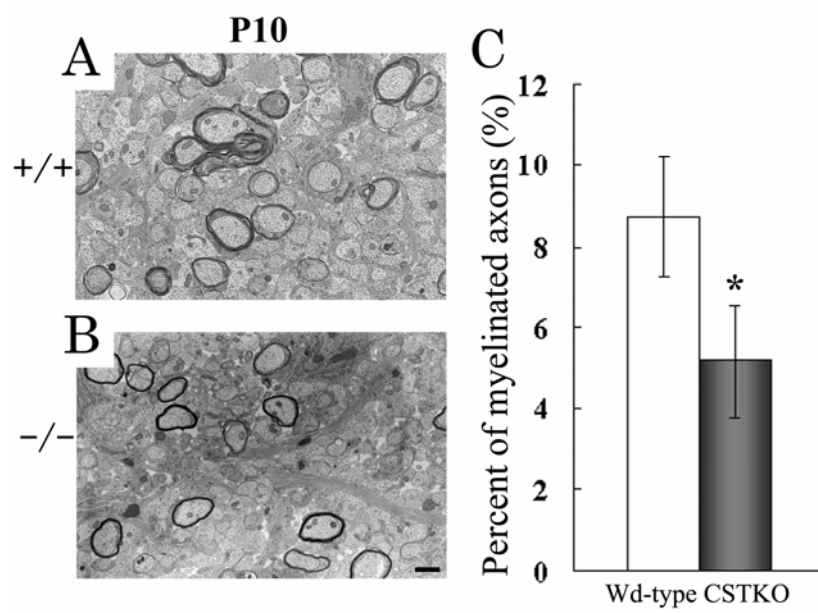


Fig. 10. Myelinated axons in 10-day-old CST-deficient optic nerves.

(A, B) Optic nerves prepared from 10-day-old wd-type (A) and CST-deficient (B) mice were examined by electron microscopy. Scale bar in (B) indicates 1 μ m. (C) The percentages of myelinated axons are shown. Each value represents the mean \pm SEM of the data obtained from two animals of each genotype. *, $P < 0.001$ vs. Wd-type mice.

第1章 第3節 考察

本章では、CSTKO マウス視神経における軸索周囲のグリア細胞の変化を解析した。CSTKO マウス成獣の視神経では、成熟したオリゴデンドロサイトの数が明らかに増加していた。生後5日目からすでにNG2陽性OPCの増加がみられることから、オリゴデンドロサイト系譜細胞の増加は発達初期の段階に生じることがわかった。また、生後早期から調べることにより、この細胞増加が移動数の増加や細胞死の減少ではなく、移動後のOPCの増殖の亢進によることが明らかとなった。生後10日齢の解析から、ミエリン形成の開始は遅れる傾向があった。これらのことから、本研究によって、CSTによって合成される硫酸化糖脂質は、これまでに報告されたミエリンパラノーダルジャンクションの形成にはたらくだけでなく、発達早期においても移動後のオリゴデンドロサイト系譜細胞の増殖とミエリン形成時期の調節に関与していることが明らかとなった。

Hiraharaらは、ミエリン形成が始まる時期である生後7日目のCSTKOマウス脳においてPLP mRNA陽性の成熟オリゴデンドロサイト数が増加していたと報告している¹³⁾。また、Shroffらは、7ヶ月齢のCSTKOマウス脊髄においてもCC1陽性成熟オリゴデンドロサイトの増加が持続していることを報告している²⁸⁾。本研究では、ミエリン形成がほぼ終了する4週齢および22週齢の視神経において成熟オリゴデンドロサイト数の増加を認めた。これらの結果から、CSTが欠損し、硫酸化糖脂質の合成が行われない状態では、中枢神経系の様々な部位においてオリゴデンドロサイト数の増加が持続的に維持されていることがわかった。同様な結果は、ガラクトセレブロシドとスルファチドの両方が欠損するCGT欠損マウスにおいても報告されている³⁰⁾ことから、スルファチドなどの硫酸化糖脂質の欠損が中枢神経系におけるオリゴデンドロサイトの細胞数の変化に関わると考えられる。

正常な発達では、オリゴデンドロサイトの数は軸索によって厳密に調節を受けている。結果の部分でも述べたように、ミエリンで覆われるべき軸索の本数と長さに応じて、生き残るオリゴデンドロサイトの数が決まる。これは、軸索に接するかどうかでオリゴデンドロサイト同士が生存に関わる因子を競合し合うことによって引き起こされると考えられている^{31),32)}。以前の当研究室での研究から、単位面積あたりのランビエ絞輪の数(ナトリウムイオンチャネルクラスター数)は4週齢CSTKOマウス視神経においてWd typeマウスと変わらないことから、このマウスでは個々のミエリンの長さには違いがないと考えられる。また、Shroffら²⁸⁾は、2日齢のCSTKOマウス脊髄では個々のオリゴデンドロサイトの突起数が少ないことを報告している。視神経におけるオリゴデンドロサイトの突起数自体は調べられてはいないが、数多くのオリゴデンドロサイトが生存し続けていることから、ミエリンを持たないオリゴデンドロサイトが生存し続けているというよりは、個々のオリゴデンドロサイトがつくるミエリンの数が少ない可能性が考えられる。

Fig. 9で示したように、NG2陽性細胞は、主に移動を終えた段階から増殖し始める。今回の結果からは、この増殖の亢進がCSTKOマウスの視神経全体におけるNG2陽性細胞数の増加を引き起こし、さらにその後の成獣における成熟オリゴデンドロサイト数の増加にもある程度関連している可能性が示された。このように、硫酸化糖脂質の欠損は、OPCの移動には影響せず、分裂を促進すると考えられる。スルファチドは、OPCが分化したミエリン形成前段階のオリゴデンドロ

サイト (premyelinating oligodendrocyte) に多く存在することから³³⁾, OPC の増殖自体にスルファチド自体がどの程度関わるかは不明である. CST mRNA は胎生期から認められており, 発達が進むと共に発現量が増加する¹³⁾. このため, スルファチドが産生される前の発達初期の段階ではたらく他の硫酸化糖脂質の存在が示唆される. 培養オリゴデンドロサイト系譜細胞の分化過程において, 後期 OPC の段階で O4 モノクローナル抗体 (スルファチドを認識する抗体) と反応する硫酸化糖脂質の存在が確認されており, 分子としての同定はされていないが POA と名付けられている³³⁾. CST 欠損マウスでは, スルファチドと共にこの POA も欠損することから¹³⁾, スルファチド以外の候補として POA が正常な視神経の発達において移動後の OPC の分裂を抑制するのに働いている可能性が考えられる.

これまでの *in vivo*¹³⁾あるいは *in vitro*^{13), 14)}の実験によって, スルファチドがオリゴデンドロサイトの最終分化を抑制する因子であると報告されている. しかし, 本研究の電子顕微鏡解析の結果から, 10 日齢 CSTKO マウス視神経においてはミエリン形成が早期に開始されるような結果は得られなかった. 中枢神経系のミエリン形成の開始には, 軸索あるいはアストロサイトなど周囲のグリア細胞との相互作用が重要であると言われている^{15), 34)-40)}. このような周囲の軸索やグリアとの相互作用による代償が働いたことにより, CSTKO マウス視神経で早期にミエリン形成が開始されなかったことが考えられる.

硫酸化糖脂質の欠損によって生じたこれらの異常が, どのようにして引き起こされるのかは現段階では不明である. これまでにスルファチドの機能に関しては, 数々の報告がある. 負にチャージしたスルファチドは, ラミニン⁴¹⁾, tenascin-R⁴²⁾, tenascin-C⁴³⁾のような細胞外マトリクスタンパク質のような正にチャージしたタンパク質と結合する. 細胞外マトリクスは, 細胞の増殖や分化などに影響する. また, CGT 欠損マウスにおいてラフト画分への NF155 の集積の異常が見られることから⁴⁴⁾, スルファチドがリピッドラフトへのタンパク質の集積を調節する役割を持つ可能性も指摘されている. スルファチドが細胞外シグナルの受容体としてはたらき, 細胞内シグナル伝達系を介して細胞内カルシウムイオン濃度を増加させるという報告もある⁴⁵⁾. CSTKO マウスでは, 硫酸化糖脂質が欠損したことにより, OPC が細胞外からのシグナルを受け取ることができず, その結果として OPC の増殖やミエリン形成の開始時期の異常を来した可能性も考えられる.

本研究では, パラノーダルジャンクションの障害により軸索上のイオンチャネル集積が異常になる 22 週齢の CSTKO マウスにおいても, 4 週齢のマウスと同様にアストロサイトやミクログリアの数に明らかな変化を認めなかった. 今回, アストロサイトのマーカーとして, グリア型のグルタミン酸トランスポーターである GLAST cRNA を用いた^{26), 46)}. 軸索とグリア細胞しか存在せず, シナプス部分は存在しない視神経において, GLAST あるいは GLT-1 といったグルタミン酸トランスポーターがどのような役割を果たしているかは不明であるが, 通常シナプス部分ではグルタミン酸を取り込むのに対して, 白質あるいは視神経ではトランスポーターを介してグリアから分泌されるグルタミン酸によって, 軸索—グリア間のダイナミックなコミュニケーションが行われている可能性が考えられている⁴⁶⁾. 今回, CSTKO マウス視神経ではアストロサイトの数は変化していないことから, 脊髄白質でみられたような明らかな活性化²³⁾は見られず, アストロサイトの反応性の違いが見られた. アストロサイトは中枢神経系全域に存在するが, その多様な形態と

機能から、アストロサイト自体の多様性が考えられている。同じ脊髄内においても、白質のアストロサイトと灰白質のアストロサイトの small heat shock protein 類の発現は明らかに異なることから⁴⁷⁾, おそらく周囲の環境によってアストロサイトの活性化の機序も異なる可能性がある。ただ、今回用いた GLAST に関しては、視神経切除後においても GLAST mRNA レベルは変化しないことから、GLAST の発現量自体は必ずしも活性化状態を反映しない可能性も考えられる⁴⁶⁾。このため、視神経におけるアストロサイトの活性化の有無に関しては、今回のように細胞数の変化を指標とするだけでなく、活性化によって発現量自体が変わる GFAP についても今後検討していく必要があると思われる。

ミクログリアのマーカーとして用いた c-fms は、M-CSF の受容体であり、アルツハイマー病⁴⁸⁾, 神経切断などの傷害⁴⁹⁾, 培養ミクログリアへの薬物添加などによって、ミクログリアが活性化すると共に発現が上昇する。したがって、この mRNA の発現量とミクログリアの数によって活性化状態をある程度判断することが可能である。しかし、Fig. 7 で示したように、CSTKO マウスの視神経ではミクログリアの数や c-fms の発現状態にも変化はなく、明らかな活性化は認めなかった。これらの結果から、CSTKO マウスの加齢に伴うイオンチャネルのクラスター消失など一連の進行性の軸索異常に対して、これらグリアの明らかな活性化は関与しないと考えられた。

第1章 第4節 小括

本章では、CSTKO マウスにおける中枢神経系グリア細胞の発達段階、ミエリン形成段階、パラノーダルジャンクション不全段階の変化について検討した結果、以下の知見を得た(本研究成果は、*Proceedings of Japan Academy, Series B, physical and biological science*, **87**, 415-424, 2011³²⁾に報告した)。

1. 成獣期の CSTKO マウスの視神経では、4 週齢、22 週齢の視神経において、ミエリン形成している PLP mRNA 陽性オリゴデンドロサイトの数が有意に増加していた。
2. 成獣期の CSTKO マウスの視神経では、4 週齢の視神経において NG2 陽性の OPC の数が有意に増加していた。
3. 成獣期の CSTKO マウスでは、4 週齢、22 週齢の視神経において GLAST mRNA 陽性アストロサイトの数に変化はみられなかった。
4. 成獣期の CSTKO マウスでは、4 週齢、22 週齢の視神経において、c-fms mRNA 陽性マイクログリアの数に変化はみられなかった。
5. 生後 5 日齢の CSTKO マウスの視神経では、NG2 陽性 OPC 数や全細胞に占める OPC の割合が有意に増加していた。しかし、この時点での増殖細胞数やプログラム細胞死を示す細胞数には違いがなく、細胞数の増加はこれ以前にすでに生じていることがわかった。
6. 発達段階における CSTKO マウスの視神経では、生後 1 日齢において NG2 陽性 OPC の移動先端部分では差が認められないが、それ以外の部分では NG2 陽性 OPC およびその割合が有意に多く、増殖している NG2 陽性 OPC も有意に多かった。生後 3 日齢では、Wd および CSTKO マウス共に生後 1 日齢に比べると視神経の全ての部位で NG2 陽性細胞数が顕著に増加したが、CSTKO マウスでは視神経全域において NG2 陽性 OPC 数およびその割合が有意に多かった。
7. ミエリン形成開始段階の CSTKO マウスの視神経では、コンパクトミエリンを形成している軸索数が有意に減少していた。
8. 以上のことから本研究では、中枢神経系において、硫酸化糖脂質はミエリンパラノーダルジャンクションの形成だけでなく、発達段階早期からオリゴデンドロサイト系譜細胞の増殖とミエリン形成時期の調節に関与していることを明らかにした。

第2章 スルファチド欠損マウスにおける末梢神経系グリア細胞の解析

末梢神経系のミエリンは、シュワン細胞によって形成される。オリゴデンドロサイトが形成する中枢神経系のミエリンとシュワン細胞が形成するミエリンでは、タンパク質組成に大きな違いがあり、さらにミエリン各層の厚さなどにも違いが見られるが、基本的なミエリンの形態は類似している。軸索は Fig. 1 で示した中枢神経系と同様に、ミエリンによってランビエ絞輪、パラノード、ジャクスタパラノード、インターノードという形態的および機能的に異なる4つの領域に分けられる^{1), 2)}。ミエリン側のパラノードでは、コンパクトミエリン部分と異なり細胞質が存在しループ状の構造をとるため、パラノードループと呼ばれている。緒言でも示したように、パラノード部位ではミエリン膜が神経軸索と直接結合しパラノードルジャンクションを形成している。発達段階では、パラノードルジャンクションはミエリン形成の最終段階に形成され、ランビエ絞輪部に近いミエリン膜のループがまず軸索と結合し、順々にランビエ絞輪部に遠いループに向かって軸索と結合していくことが知られている⁵⁰⁾。

中枢神経系と同様に末梢神経系のパラノードにはグリア側では neurofascin 155 (NF155)、軸索側では contactin および Caspr といった細胞接着分子が特異的に局在し、これらの分子の結合によってジャンクションが形成される^{1), 2)}。パラノードルジャンクションは、ランビエ絞輪部で発生する活動電位に対する電気的な絶縁体として働くのに重要であると共に、電位依存性イオンチャネル等の軸索各部位に局在化しているタンパク質の側方拡散を阻害する障壁としてはたらく^{51), 52)}。さらに、パラノードのミエリン側では隣接するパラノードループ同士が E-cadherin や connexin32 などによって形成されるオートジャンクションによって互いに結合して構造を保ち、ギャップ結合を介した輸送にも関与している^{53), 54)}。末梢神経ミエリンのパラノードには、ミエリンタンパク質の一種である myelin-associated glycoprotein (MAG) が局在することが知られていて⁵⁵⁾、ミエリンパラノードを示す良いマーカーとして用いられている。パラノードループで見られる細胞質は、シュワン細胞の細胞体と連続し、ミエリンの軸索側の最内層および最外層の細胞質を直接結んでいる。このため、パラノード領域は軸索との間のジャンクション部位であるのみでなく、シュワン細胞体とミエリン深層あるいはミエリン構造全体との間の物質輸送にも重要な役割を持つと考えられている⁵⁶⁾。また、末梢神経ミエリンには、中枢神経ミエリンと異なりコンパクトミエリンのところどころにシュミット・ランターマン切痕と呼ばれる細胞質を有する部分が存在し、パラノードループと共にミエリン最内層と最外層を結ぶ。シュミット・ランターマン切痕は、特に太い軸索周囲を囲むミエリンで発達している。末梢ミエリンの長さは1から2 mm と長いので、パラノードループと同様に厚く長いミエリン膜全体に物質を輸送するためにはたらくと考えられている。

緒言で示したように、CSTKO マウスは生後5から6週頃より下肢の対麻痺様症状が出現し、進行性に運動失調や震え、痙攣をきたす。このような状態でありながら、1年以上生存する個体もある¹⁰⁾。脱髄を示すような神経症状を呈すにも関わらず、電子顕微鏡を用いた観察ではコンパクトミエリンは正常であり、ランビエ絞輪に接するパラノードルジャンクションの形成不全が認められる¹⁰⁾、また、このようなミエリンの形態異常に伴い、末梢神経系では明らかな伝導速度の低

下を認める¹⁶⁾。

当研究室でのこれまでの研究結果から、CSTKO マウスの末梢神経系の有髄神経線維では、Caspr や NF155 のパラノードへの集積は明らかに異常を示し、パラノードジャンクションの形成不全を呈する^{11), 16)}。これに伴ってランビエ絞輪部周辺に存在する電位依存性チャネルの局在部位が変化するが、中枢神経系のようなイオンチャネルの集積の消失 (Fig. 3) は見られない¹⁷⁾。さらに、発生機序は不明であるが、ランビエ絞輪軸索内に変性したミトコンドリアが蓄積し¹⁷⁾、シュミット・ランターマン切痕数の増加が見られる¹⁷⁾。

これらのことから、末梢神経系においても、軸索の特徴的な機能的構造の形成・維持に対してスルファチドなどの硫酸化糖脂質が重要な役割を果たしていると考えられる。しかし、ミエリンの硫酸化糖脂質が、ランビエ絞輪部周辺の特定領域の軸索膜への機能タンパク質の輸送にどのように関与するのか、分子レベルでの詳細は明らかにされていない。また、前述のように末梢ミエリンでは MAG のようにパラノードループに局在する膜タンパク質が知られているが、ループの細胞質部分の分子構成やそれらの分子の役割はまだ不明な点が多い。さらに、この部位に集積するタンパク質に対する硫酸化糖脂質の役割に関しても不明である。

我々は、これまでにパラノードの生理的機能を明らかにする目的で、この部位に集積する分子の同定を行ってきた。末梢神経パラノードを特異的に染色する抗体を用いて抗原分子を *in silico* で解析していく過程で、翻訳後タンパク質修飾の一つである neddylation に関わる分子が末梢神経ミエリンのパラノード部分に集積する候補分子であることを見出した。neddylation は、基質となるタンパク質に NEDD8 を付加することによって生じる可逆性の翻訳後修飾である。neddylation 反応は、翻訳後タンパク質修飾であるユビキチン化⁵⁷⁾に類似し、これと同様に ATP を必要とする⁵⁸⁾。neddylation は、細胞増殖に関わる他、細胞内のホメオスタシス、翻訳調節やシグナル伝達経路の調節など様々な役割を持つことが示唆されている⁵⁹⁾。これらの多彩な機能は、neddylation される基質タンパク質によって異なり、転写因子、DNA 修復や翻訳、細胞周期の調節因子やクロマチンの調節因子など様々な分子が neddylation による修飾を受けることが株化培養細胞を用いた解析によって明らかにされている⁶⁰⁾。しかし、ユビキチン化に比較し、未だ細胞における生理的および病的意義は明らかにされていない。

DCNL families (defective in cullin neddylation protein 1-like proteins) は、ヒトにおける neddylation の主要な調節分子であることが示唆されており⁶¹⁾、その増加が neddylation の反応を増幅させることが報告されている^{62), 63)}。マウスやラットでは、5 種類の DCN1 タンパクが知られており、DCUN1D1-5 (ヒトでは Dcn1-like proteins 1-5; DCNL 1-5 とよぶ) と命名されている⁶⁴⁾。なかでも DCUN1D2 は、分子量約 30 kDa の分子で C 末端に neddylation される PONY ドメイン (potentiating neddylation domain)、N 末端にユビキチンと結合しうるドメイン構造 UBA (ubiquitin-associated) domain を持つ。

当初、NEDD8 は胎生期の脳で多く発現している分子として同定された⁶⁵⁾。しかし、最近の報告では、neddylation は生後の脳の発達過程でも見られ、neddylation による神経細胞の樹状突起の安定性の調節がシナプスの成熟に重要であることが示されている⁶⁶⁾。しかしながら、末梢神経系における DCUN1D2 や NEDD8 の発現や分布およびその機能は未だ報告されていない。そこで本研

究では，成獣末梢神経におけるこれらの分子のパラノードへの局在を調べ，さらに発達段階における局在変化を解析することによりミエリン形成との関連性を調べた．さらに，これらの分子の局在に対する硫酸化糖脂質の役割を調べるために，CSTKO マウス末梢神経を用いて解析した．

第2章 第1節 実験材料および実験方法

2-1-1 実験動物

CSTKO マウスの診断および飼育に関しては、1-1-1に示した通りである。動物の取扱に関しては、東京薬科大学動物規程に則って行った。また、本実験計画は、東京薬科大学実験動物委員会で承認を受けた。

2-1-2 ラット全脳，坐骨神経ホモジネートの調製

8週齢の雄の Wistar rat を CO₂ で麻酔し，全脳と坐骨神経を摘出しホモジネート調製に使用した。方法については，Yamaguchi らの方法^{67), 68)}に基づいて実施した。全脳ホモジネートは5匹のラットから，坐骨神経ホモジネートは10匹のラットから調製した。全ての手順は氷上もしくは4°Cで実施した。全脳ホモジネートの調製は，摘出した脳の9倍量の homogenization buffer [0.32 M sucrose, 5 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 mM ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N' tetraacetic acid (EGTA), 0.75 μM aprotinin, 1 μM leupeptin, 1 μM pepstatin, and 0.4 mM phenylmethylsulfonyl fluoride]を加え，テフロンガラス製ホモジナイザーで均一になるようにホモジナイズした(800-900 rpm)。高速冷却遠心機(RPR-20; Hitachi Koki, Tokyo, Japan)を用いてホモジネートを4°C, 1000×g で10分間遠心分離することにより核を除き，上清をラット全脳ホモジネートとした。

坐骨神経ホモジネートの調製は，摘出した坐骨神経を液体窒素の入った乳鉢に入れ，凍結状態で粉碎し，9倍量の homogenization buffer を加え，ポリトロン型ホモジナイザー(DIAX900, Heidolph 社)で均一になるようにホモジナイズした。高速冷却遠心機(himac SCR18B, Hitachi 社)を用いてホモジネートを4°C, 500×g で10分間遠心分離することにより核を除き，上清をラット末梢神経ホモジネートとした。ラット末梢神経ホモジネートを，さらに超高速冷却遠心機(himac CP80α, Hitachi 社)を用いて4°C, 100,000×g で35分間遠心分離することにより，上清を末梢神経細胞質画分とした。沈殿をホモジネートに使用した溶液量と同量の homogenization buffer で懸濁することにより末梢神経膜画分とした。

調製したこれらのホモジネートは，Bicinchoninic acid (BCA) Protein Assay Reagent Kit (Pierce 社)を用いて，牛血清アルブミン(bovine serum albumin, BSA)を基準にしてタンパク質量を行い，液体窒素で急速冷凍した後，-80°Cにて使用時まで保存した。

2-1-3 ウェスタンブロット解析

ウェスタンブロット解析は，Yamaguchi らの方法⁶⁷⁾に基づいて実施した。2-1-2で調製したラット全脳および坐骨神経ホモジネートのサンプルは250 μl の[7 M urea, 2 M thiourea, 2 mM tributyl phosphine (TBP), 2% ASB-14 (Calbiochem, Merck, Darmstadt, Germany), 0.5% Triton X-100, 40 mM Tris, 0.5% IPG buffer (Amersham), and 0.001% bromophenol blue]溶液中で室温にて30分間

可溶化した。可溶化サンプルは 10.5% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide ゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によって分離し, polyvinylidene fluoride (PVDF) メンブレン (GE Healthcare UK, Buckinghamshire, UK) に転写した。転写したメンブレンはブロッキング溶液 (5% skim milk, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) で 30 分間室温にて反応させることにより非特異的な吸着を防止した。その後, ブロッキング溶液で希釈した一次抗体を 30 分間室温で反応させ, T-TBS (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) で 2 分×1 回, 5 分×2 回の洗浄を行った。その後, T-TBS で希釈した二次抗体を 30 分間室温にて反応させ, T-TBS で 2 分×1 回, 5 分×2 回の洗浄を行い, ECL system (GE Healthcare UK, Buckinghamshire, UK) によって化学発光させバンドを確認した。

Table 2 使用した抗体

抗体名	会社名	希釈倍率
anti-C-terminus of DCUN1D2 rabbit IgG : GTX119936 [N2C3]	GeneTex	1:200
anti-N-terminus of DCUN1D2 rabbit IgG : ARP68256_P050	AVIVA SYSTEMS BIOLOGY	1:200
Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG	Jackson ImmunoResearch	1:10000

2-1-4 坐骨神経ときほぐし標本の作製

10 週齢の Wd type マウスと CSTKO マウス, 生後 0, 1, 7, 14, 21 日齢, 8 週齢の Wister rat よりジエチルエーテル麻酔下で坐骨神経を摘出した。摘出した坐骨神経は, 27G の注射針を用いて神経線維がばらばらになるようにときほぐし, MAS コートガラス (Matsunami, Osaka, Japan) に貼り付け室温で一晩風乾し, 使用時まで -20°C で保存した。後述する抗 DCUN1D2 C 末端抗体 と抗 MAG 抗体を用いて免疫染色する場合は, 4% paraformaldehyde (PFA) / 0.1 M PB, pH 7.4 で 4°C, 30 分間後固定し, 0.01 M PBS, pH 7.4 で 5 分×2 回の洗浄を行った後に使用した。

2-1-5 免疫染色

2-1-4 で作成した切片を PB-T (5% BSA / 0.1 M PB / 0.3% Triton X-100, pH 7.5) で 1 時間室温にてブロッキング反応した後, 一次抗体を PB-T で希釈し一晩 4°C で反応させた。切片を 0.01 M PBS, pH 7.4 に浸し, 室温で 5 分間×3 回洗浄した。その後, 二次抗体を 0.01 M PBS, pH 7.4 で希釈し 1 時間室温で反応させ, 切片を 0.01 M PBS, pH 7.4 に浸し, 室温で 5 分間×3 回洗浄した。対比染色として diamidino-2-phenylindole (DAPI, Molecular Probes, Eugene, OR) を使用した。封入剤 (VECTASHIELD Mounting Medium) とカバーガラス (MATSUNAMI GLASS IND.,LTD.) を用いて封入し, 風乾した。

Table 3 使用した抗体

抗体名	会社名	希釈倍率
anti-C-terminus of DCUN1D2 rabbit IgG : GTX119936 [N2C3]	GeneTex	1:200
anti-N-terminus of DCUN1D2 rabbit IgG : ARP68256_P050	AVIVA SYSTEMS BIOLOGY	1:200
anti-E-cadherin rat monoclonal	Takara Biotechnology	1:200
anti-pan Na ⁺ channel mouse monoclonal	Sigma	1:1000
anti- MAG mouse monoclonal	Millipore Bioscience Research Reagents	1:200
anti-Glial Fibrillary Acid Protein (GFAP) mouse monoclonal	Sigma	1:200
anti-NEDD8 rabbit IgG	Cell Signaling	1:200
Alexa Fluor® 488-conjugated species-specific secondary antibodies	Molecular Probes/Life Technologies	1:3000
Alexa Fluor® 594-conjugated species-specific secondary antibodies	Molecular Probes/Life Technologies	1:3000

2-1-6 免疫染色切片の定量的解析

染色像は、蛍光顕微鏡 (BZ-X710; Keyence Japan, Osaka, Japan) もしくは共焦点レーザー顕微鏡 (FV100D IX81; Olympus, Tokyo, Japan) を使用し撮影した。画像中にある染色像を計測し、統計解析を行った。データは平均値±標準偏差 (standard deviation, SD) として示し、測定値の統計学的比較には 99.9%の信頼度 ($p < 0.001$) をもって有意とした。

2-1-7 統計解析

実験結果は、平均値±SD で表した。統計学的検定法として、有髄神経線維の太さ 3 種類 ($A\alpha$, $A\beta \cdot A\gamma$, $A\delta$) 間はそれぞれ別の線維であることから比較データ間の対応性がなしと判断した。また、Wd type と CSTKO マウス間も別のマウスであることから比較データ間の対応性がなしと判断し、さらに、これらの計測では、発現のありなしと 2 値化を行っており、サンプル数が 20 以上あることから、群間比較の統計解析には χ^2 test を用いた。測定値の統計学的比較には、検定の多重性を考慮し 99.9%の信頼度 ($P < 0.001$) をもって有意とみなした。これら統計処理には、Microsoft Excel 2003 (Microsoft Corporation) を用いた。

第2章 第2節 結果

2-2-1 ラットおよびマウス神経系における DCUN1D2, NEDD8 の分布

パラノード部分を特異的に染色する抗体を用いて *in silico* 解析により, DCUN1D2 が候補分子として上げられた. このため, まず神経系における DCUN1D2 の発現を明らかにするために, ウエスタンブロット解析を行った. Fig.11A に示すように DCUN1D2 は 30 kDa のバンドとして認識され, ラットの全脳ホモジネートよりも坐骨神経ホモジネートのバンドのほうが濃かった. また, 坐骨神経の細胞質画分と膜画分を比較すると, 細胞質画分により多く含まれていることがわかった. このことから, DCUN1D2 は末梢神経の細胞質画分に多く含まれ, 中枢神経系と末梢神経系で含有量が異なることがわかった.

DCUN1D2 はラットの坐骨神経に豊富に含まれることから, 坐骨神経における局在を解析するために, マウス坐骨神経ときほぐし標本を用いて免疫染色を行った. DCUN1D2 は, 長軸方向に2つの点状に並んだ特徴的な局在を示し, ランビエ絞輪部にも部分的に存在していた (Fig. 11B; 緑色). これらの点状の局在は, ミエリンパラノードに局在する MAG の染色像と一致していた (Fig. 11B; 上段赤色). また, ランビエ絞輪部に存在する電位依存性ナトリウムチャンネル抗体と二重染色を行った結果, ナトリウムチャンネルを挟むようにして DCUN1D2 が局在していることがわかった (Fig. 11B; 下段赤色). これらの結果から, DCUN1D2 が末梢神経系のパラノードに局在していることがわかった.

DCUN1D2 は, neddylation の主要な調節分子であり⁶¹⁾, その増加が neddylation 反応を増幅させる^{62), 63)}. このため, neddylation に関与する NEDD8 が同様に末梢神経パラノードに分布するかどうかを調べるために, マウス坐骨神経ときほぐし標本を用いて免疫染色を行った. その結果, NEDD8 は DCUN1D2 と同様に, 長軸方向に2つの点状に並んだ局在を示した (Fig. 11C; 緑色). また, 部分的にランビエ絞輪にも染色像がみられた. 二重染色の結果から, DCUN1D2 と同様にこれらの点状の染色像は MAG の染色像と一致し (Fig. 11C; 上段赤色), 電位依存性ナトリウムチャンネルを挟むようにして集積していた (Fig. 11C; 下段赤色) ことから, DCUN1D2 と同じく NEDD8 も末梢神経ミエリンのパラノード部分に存在することがわかった. これらのことから, ミエリンのパラノードでは neddylation による修飾が行われている可能性が示唆された.

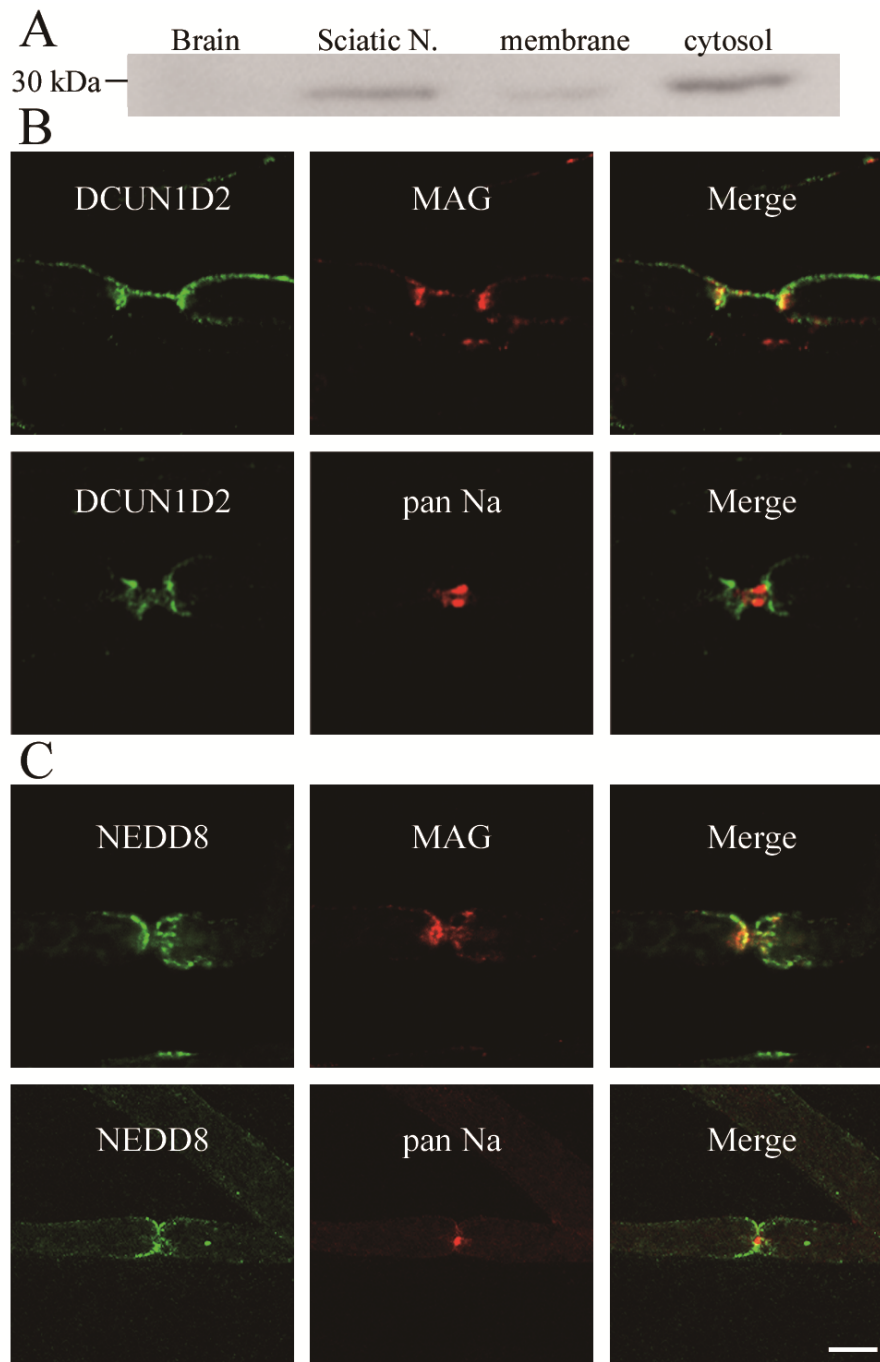


Fig. 11. Localization of DCUN1D2 and NEDD8 at myelin paranodes in the rodent sciatic nerve.

(A) Western blot analyses of rat brain and sciatic nerve homogenates (left) and fractions of sciatic nerves (right) were performed using an anti-DCUN1D2 antibody. The amount of DCUN1D2 was higher in the rat PNS cytosolic fraction. (B) Teased fibers of 10-week-old mouse sciatic nerves were double-immunostained with anti-DCUN1D2 antibody (green) and either anti-MAG antibody (red; top) as a paranodal marker or anti-pan Na⁺ channel antibody (red; bottom) as a nodal marker. DCUN1D2 (green) colocalized with MAG (red; top), suggesting that this protein is concentrated at the paranodal myelin. In addition, DCUN1D2 showed some limited immunoreactivity at the node of Ranvier where Na⁺ channels accumulate (red,

bottom). (C) Teased fibers from 10-week-old mouse sciatic nerves were immunostained with anti-NEDD8 antibody (green) and either anti-MAG antibody (red; top) or anti-pan Na⁺ channel antibody (red; bottom). Localization of NEDD8 (green) was similar to that of DCUN1D2. Scale bar = 10 μm

2-2-2 シュワン細胞における DCUN1D2, NEDD8 の分布

次に、パラノード以外のシュワン細胞内における DCUN1D2 の局在を調べるために免疫染色を行った。シュワン細胞が形成する末梢神経ミエリンには、中枢神経ミエリンと異なりコンパクトミエリンの所々にシュミット・ランターマン切痕が存在する。周囲のコンパクトミエリンと異なり、シュミット・ランターマン切痕には細胞質が存在し、パラノードループと同様に細胞体とミエリン膜間の輸送経路として働くと考えられている。しかし、その形成機序や役割に関してはまだ不明な点が多い。この部位における DCUN1D2 および NEDD8 の局在の有無を明らかにするため、シュミット・ランターマン切痕に集積することが知られている E-Cadherin の抗体と共に二重染色を行い共焦点レーザー顕微鏡で分析した。この結果、DCUN1D2 の染色像が一部 E-Cadherin 染色像と一致していることがわかった (Fig. 12A; 上段)。しかし、NEDD8 は E-Cadherin とは一致しなかった (Fig. 12B; 上段)。

シュワン細胞はミエリンを形成している myelinating Schwann cell と、ミエリンを形成していない nonmyelinating Schwann cell に分けられる。nonmyelinating Schwann cell では GFAP を発現していることから、抗 GFAP 抗体染色によって myelinating Schwann cell と区別することができる⁶⁹⁾。このため、DCUN1D2 と GFAP の抗体を用いた二重染色を行ったところ、どちらの抗体でもびまん性に細胞質が染まり、染色性が一致していた (Fig. 12A; 下段)。また、NEDD8 抗体でも同様の染色性が示された (Fig. 12B; 下段)。

以上の結果から、DCUN1D2 と NEDD8 は myelinating Schwann cell と nonmyelinating Schwann cell に存在しており、前者ではミエリンパラノード部分、後者では細胞質全体に分布することが明らかとなった。また、シュミット・ランターマン切痕では NEDD8 の存在は明らかではなかったが、neddylation を調節する DCUN1D2 はパラノードと同様にシュミット・ランターマン切痕に存在することがわかった。これらのことから末梢神経ミエリンにおいて neddylation された分子が何らかの働きをし得ることが示唆された。

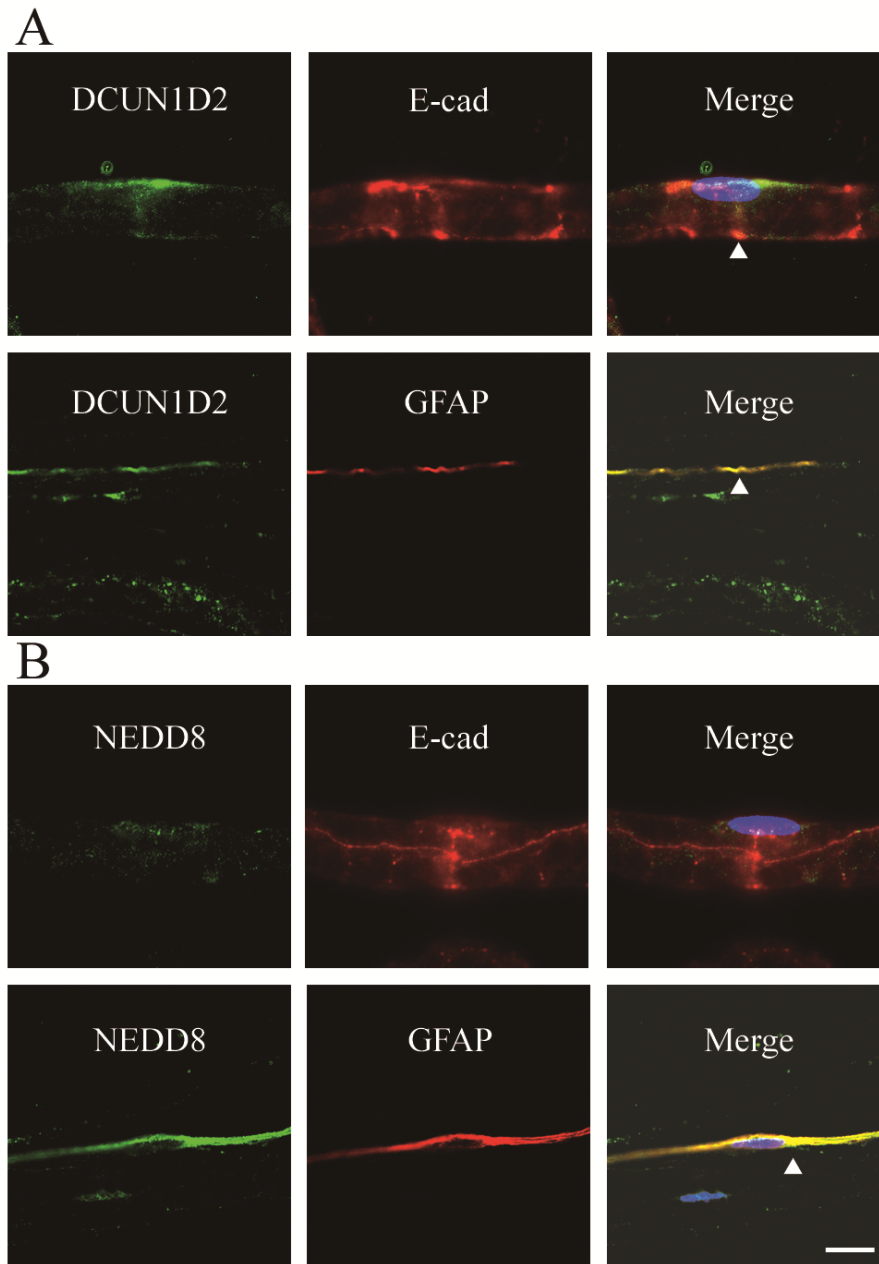


Fig. 12. Localization of DCUN1D2 and NEDD8 in Schmidt–Lanterman incisures and nonmyelinating Schwann cells.

(A) Teased fibers of 10-week-old mouse sciatic nerves were immunostained with anti-DCUN1D2 antibody (green) and either anti-E-cadherin antibody (red; top) or anti-GFAP antibody (red; bottom). DCUN1D2 partially colocalized with E-cadherin-positive Schmidt–Lanterman incisures (arrowhead; top), although their signals were not completely overlapping. DCUN1D2 was also present in GFAP-positive nonmyelinating Schwann cells (arrowhead; bottom) (B) Teased fibers from 10-week-old mouse sciatic nerves were immunostained with anti-NEDD8 antibody (green) and either anti-E-cadherin antibody (red; top) or anti-GFAP antibody (red; bottom). NEDD8 was not found in E-cadherin-positive Schmidt–Lanterman incisures. In contrast, strong immunoreactivity of NEDD8 was present in

nonmyelinating Schwann cells (arrowhead; bottom). Scale bar = 10 μm

2-2-3 神経線維の太さによる DCUN1D2, NEDD8 の分布の違い

末梢神経系には、運動神経線維と感覚神経線維および自律神経線維が存在する。運動神経線維は太く、感覚神経線維は太いものから細いものまで様々な太さの線維で構成されている。また、神経線維の太さとミエリンの厚さには深い関連があり、軸索径と神経線維自体（軸索+ミエリン）の径の比（g ratio）は一般的に約 0.6~0.7 程度でほぼ一定に保たれる。つまり、軸索が太いほどミエリンの厚さは厚くなり、パラノードループの数は増える。そこで、次に DCUN1D2, NEDD8 のパラノードへの局在が、神経線維の太さによって違いがあるか解析した。電位依存性ナトリウムチャンネルがランビエ絞輪部に点状に局在している有髄神経線維の直径を計測し、それぞれの神経線維の太さから A α (6 μ m<), A β あるいは A γ (3.5-6 μ m) もしくは A δ (<3.5 μ m) fiber と分類した。A δ -fiber は、ランビエ絞輪と隣のランビエ絞輪の間（インターノード）の長さが短く^{70, 71}、近くには、電位依存性ナトリウムチャンネルが軸索全体に均一に分布するため線状に染色された無髄神経線維 c fibers が存在する⁷²。神経線維の太さ別に DCUN1D2 の局在を調べたところ、マウス坐骨神経の A δ fiber では太い神経線維と異なり DCUN1D2 や NEDD8 の明らかな染色性は見られなかった (Fig. 13A)。

定量的に統計解析するために、DCUN1D2 抗体によるパラノードの染色パターンを 3 つのグループに分類した。計測したところ、A α -fiber, A β - & A γ -fiber ではほとんどのパラノード部分において両側のパラノードが染色されている (Bilateral) のに対して、A δ -fiber ではほとんどのパラノードで染色が見られない状態 (Null) だった (Fig. 13B)。NEDD8 でも同様の傾向が認められた (Fig. 13C)。これらの結果より、DCUN1D2 や NEDD8 は太い有髄神経線維ほどパラノード部分に豊富に存在することが示された。

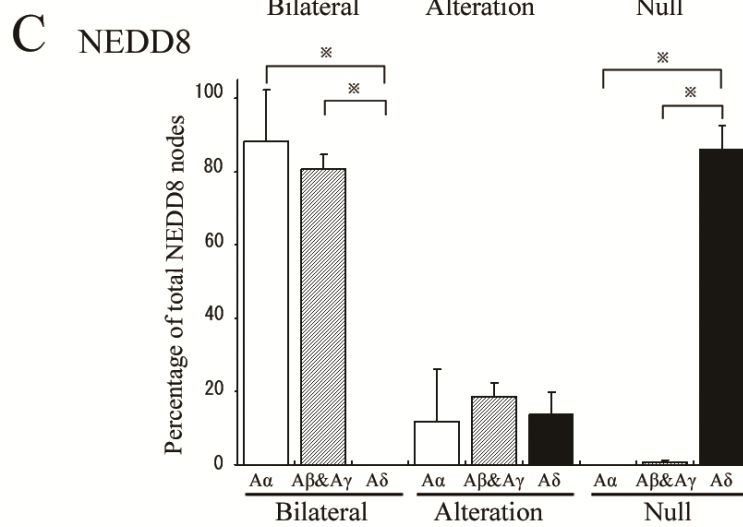
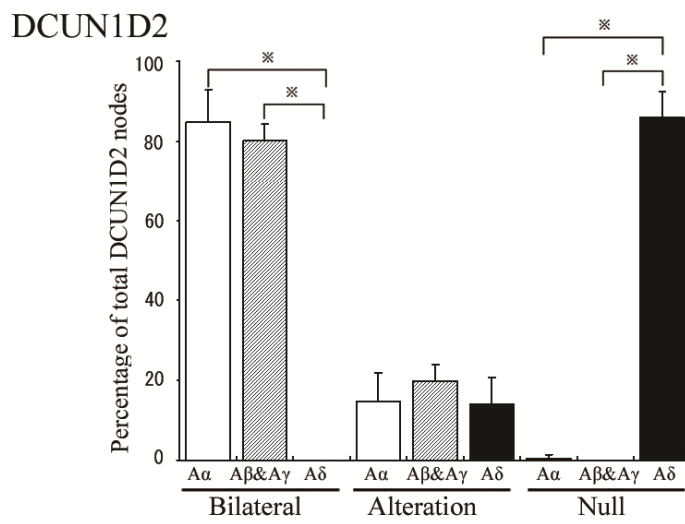
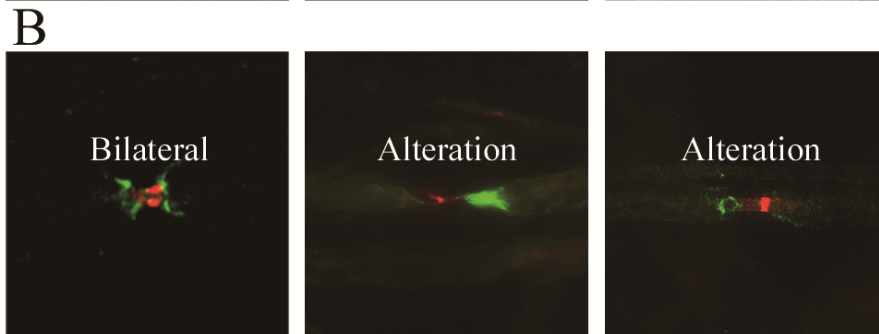
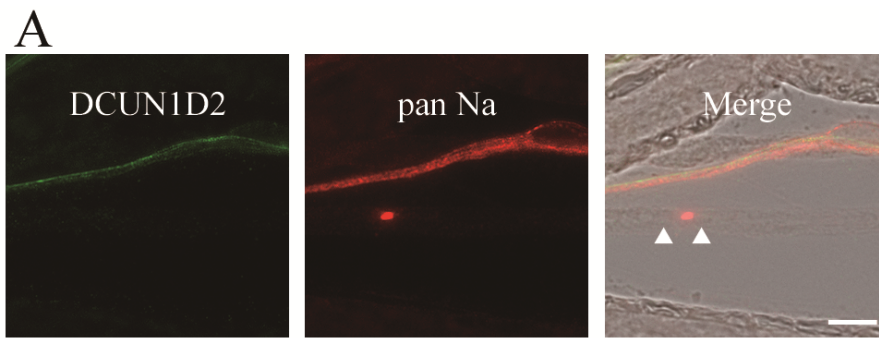


Fig. 13. Difference in DCUN1D2 or NEDD8 accumulation patterns at the paranodal regions of A α -, A β & A γ -, and A δ -fibers in mouse sciatic nerves.

(A) Representative images of double immunostained teased fibers from 10-week-old mice stained with anti-DCUN1D2 (green) and anti-pan Na⁺ channel (in red) antibodies are shown. Myelinated fibers are identified by the presence of nodal Na⁺ channel clusters as shown in the image. These fibers were classified as A α -(6 μ m<), A β & A γ - (3.5-6 μ m), or A δ -fibers (< 3.5 μ m) based on the maximum diameter of the internode. DCUN1D2 signal was not detected at paranodal regions in A δ -fibers (white arrowheads) that were in close proximity to broadly stained Na⁺ channel-positive C-fiber bundles. Scale bar = 10 μ m. (B) The pattern of DCUN1D2 immunoreactivity in the three nerve types was examined in adult wild-type sciatic nerves by double labeling as shown in A. DCUN1D2-positive paranodal regions were classified into 3 groups. In the Bilateral group, the nodes were bilaterally flanked by strongly DCUN1D2-positive paranodes. In the Alteration group, the staining pattern of DCUN1D2 was mislocalized from paranode and diffuse. Representative images of these groups were shown. In the Null group, no apparent DCUN1D2 staining was detected as shown in (A). The total number of counted nodes was; A δ (n = 241; black columns), A α (n = 264; white columns), and A β &A γ (n = 264; grey columns). In most of the A α -, A β &A γ fibers, DCUN1D2 was present in the paranodes. The nodes associated with strongly DCUN1D2-positive paranodes were rarely observed in the A δ nerves. (C) NEDD8 staining patterns in the three nerve types were also examined. The total number of counted nodes was; A δ (n = 182), A α (n = 210) and A β & A γ (n = 449). The color of each column represents the same nerve type as in B. Similar to DCUN1D2, the nodes associated with strongly NEDD8-positive paranodes were rarely observed in the A δ nerves. Each value represents the SD of the data obtained from three animals. A χ^2 test (with 4 degree of freedom) was performed to determine statistical significance. *, P < 0.001.

2-2-4 坐骨神経の発達段階における DCUN1D2 の分布

発達段階におけるシュワン細胞での DCUN1D2 の分布の変化を調べるために、生後発達各段階のラットの坐骨神経を用いて免疫染色を行った。ラットの末梢神経系では、ミエリンは生後に形成され始める。DCUN1D2 は、生後 0 日齢から生後 21 日齢にわたってシュワン細胞の細胞体に存在していた (Fig. 14A, 14B 矢頭)。生後 21 日齢では、シュワン細胞の核周囲の細胞質の他にミエリン両端のパラノード部分にも集積が見られ始め、成獣で観察されたようなパラノードへの局在が認められた (Fig. 14B 矢印)。生後 21 日齢頃の坐骨神経では、ミエリン形成の最終段階を迎えパラノードルジャンクションが成熟する時期にある。このことから、シュワン細胞の DCUN1D2 は、ミエリン形成の最終段階でパラノードルジャンクションが形成される頃にパラノードに集積することが示唆された。

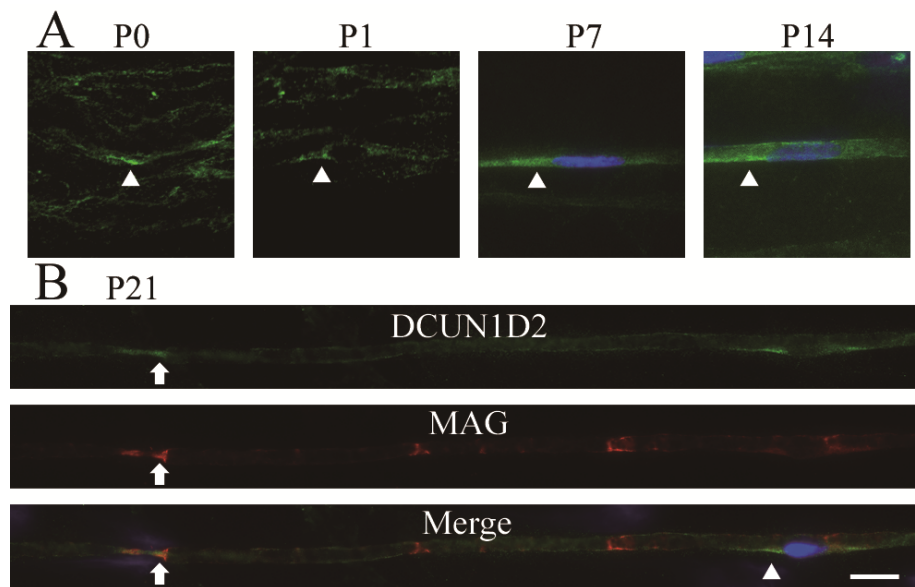


Fig. 14. Developmental changes in DCUN1D2 localization in rat sciatic nerves.

(A) Double immunostaining of teased fibers from rat sciatic nerves obtained from various developmental ages was performed with anti-DCUN1D2 (green) and anti-MAG (red) antibodies. At P0, P1, P7 and P14, DCUN1D2 was diffusely localized within Schwann cell bodies (arrowheads at top; Schwann cell nuclei were visualized by DAPI in P7 and P14 samples). (B) At P21, DCUN1D2 started to accumulate in the paranodal regions (indicated by arrow). Arrowhead indicates perinuclear staining of DCUN1D2 in the cell body of the same Schwann cell. Scale bar = 10 μ m.

2-2-5 CSTKO マウス末梢ミエリンにおける DCUN1D2, NEDD8 の局在変化

前述したように、CSTKO マウスはミエリンの主要な成分であるスルファチドを欠損した結果、パラノードジャンクション形成不全を呈し¹⁰⁾、パラノードに存在する分子の局在変化を示す¹¹⁾。今回新たに見出したパラノード局在分子である DCUN1D2 や NEDD8 の分布がパラノードジャンクションの異常によってどのような影響をうけるか調べるために、Wd type と CSTKO マウスの坐骨神経ときほぐし標本を用いて免疫染色による解析を行った。DCUN1D2 や NEDD8 の Wd type での分布は、2-2-1 の Fig. 11 で示したように電位依存性ナトリウムチャンネルの集積を両側から挟むようにパラノードに局在していた (Bilateral に相当)。対照的に、CSTKO マウスでは、DCUN1D2 がパラノードの片側のみを集積するなど染色像が変化しているもの (Alteration に相当)、あるいは明らかな染色性を示さないもの (Null に相当) が多く見られた (Fig. 15A; a, b, c)。NEDD8 の分布に関しても、同様であった (Fig. 16A; a, b, c)。2-2-3 と同様に、電位依存性ナトリウムチャンネルを指標にして、Wd type と CSTKO マウスの DCUN1D2, NEDD8 の局在パターンを3つのグループに分けて計測し統計解析を行った。正常な Wd type で多く見られるように、パラノードの両側を集積が見られるグループ (Bilateral) は、CSTKO マウスの A α -fiber, A β - & A γ -fiber において有意に減少していた。これに対して、パラノードの片側のみを集積するなど局在変化が見られるグループ (Alteration) や集積が全く見られないグループ (Null) は、CSTKO マウスの A α -fiber や A β - & A γ -fiber において有意に増加がみとめられた。CSTKO マウスの A δ -fiber においても、Wd type に比べて Alteration グループの有意な減少と Null グループの有意な増加が認められた (Fig. 15B)。NEDD8 のパラノード部分における局在に関しても、A δ -fiber では Wd type と有意な差が認められなかったが、それ以外の神経線維では DCUN1D2 と同様な傾向を示した (Fig. 16B)。これらの結果より、パラノードジャンクションの有無や神経線維の太さが neddylation 関連分子の分布に大きく影響することが示された。

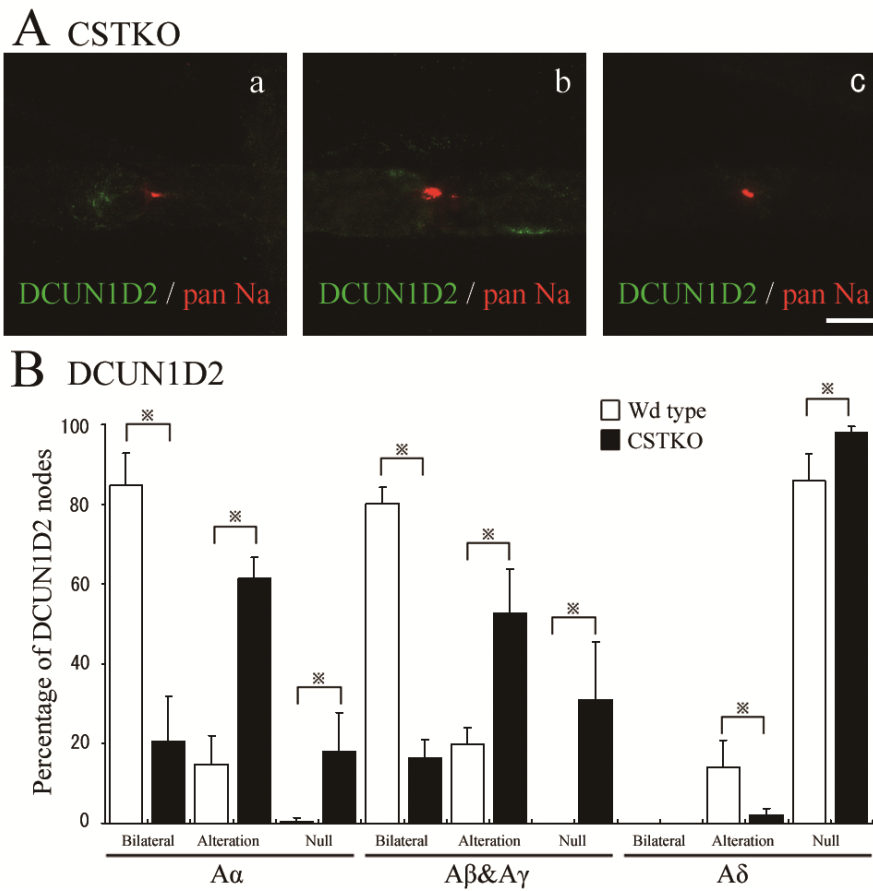


Fig. 15. Altered localization of DCUN1D2 in CSTKO mice.

(A) Representative images of double-immunostained teased fibers of adult CSTKO mice with anti-DCUN1D2 (green) and anti-pan Na⁺ channel (red) antibodies. DCUN1D2 clusters were either mislocalized (a), diffused (b) or not detected (c) in CSTKO sciatic nerves. Scale bar = 10 μ m. (B) The DCUN1D2-positive staining patterns in the three nerve types of adult Wd-type and CSTKO mice were examined. DCUN1D2-positive paranodal regions were classified into 3 groups as described in Fig. 13. The total numbers of counted nodes was: CSTKO (n = 873; A α : 264, A β & A γ : 368, A δ : 241), Wd-type controls (n = 2074; A α : 301, A β & A γ : 511, A δ : 389). The percentage of nodes associated with strongly DCUN1D2-positive paranodes (Bilateral) was significantly decreased in all the nerve types in the CSTKO mice. Each value represents the SD of the data obtained from three animals. The χ^2 test (with 4 degrees of freedom) was performed to determine statistical significance. *, P < 0.001 vs. control.

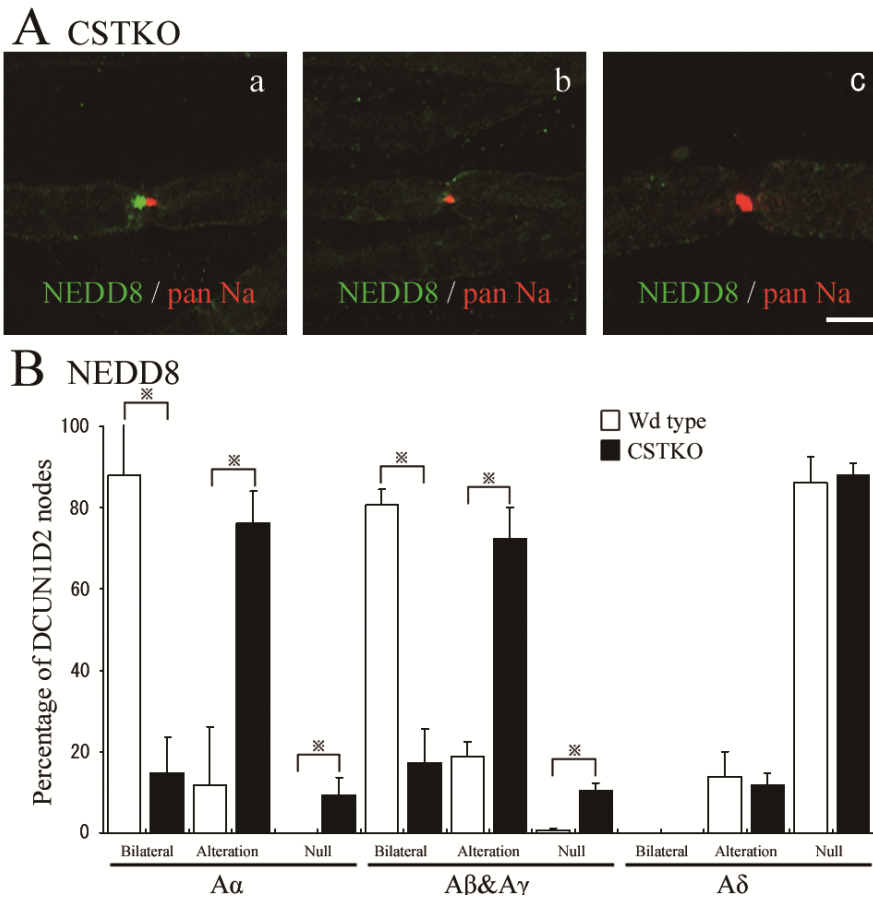


Fig. 16. Altered localization of NEDD8 in CST-deficient mice.

(A) Representative images of double-immunostained teased fibers from adult CSTKO mice with anti-NEDD8 (green) and anti-pan Na⁺ channel (red) antibodies. NEDD8 clusters were either mislocalized (a), diffused (b) or not detected (c) in CSTKO sciatic nerves. Scale bar = 10 μ m. (B) The NEDD8-positive staining patterns in the three nerve types of adult Wd-type and CSTKO mice were examined. NEDD8-positive paranodal regions were classified into 3 groups as described in Fig. 13. The total number of counted nodes was: CSTKO (n = 1445; A α : 540, A β & A γ : 653, A δ : 252), Wd-type controls (n = 841; A α : 210, A β & A γ : 449, A δ : 182). The percentage of nodes associated with strongly NEDD8-positive paranodes (Bilateral) was significantly decreased in CSTKO mice. Each value represents the SD of the data obtained from three animals. The χ^2 test (with 4 degrees of freedom) was performed to determine statistical significance. *, P < 0.001.

第2章 第3節 考察

本章では、neddylation 関連分子である DCUN1D2 と NEDD8 に着目し、末梢神経での局在と、硫酸化糖脂質の欠損した CSTKO マウスにおける局在の変化を解析した。

NEDD8 はマウスの胎生期の脳で多く発現している分子として発見されたが⁶⁵⁾、現在では胎生期に限らずに様々な細胞で翻訳後修飾に関わることが報告されている^{59), 73)}。脳では神経細胞シナプス内での PSD95 の neddylation がシナプスでの樹状突起の形態や保持に必要であることが示されている⁶⁶⁾が詳細なメカニズムはまだ知られていない。neddylation の調節不全は神経変性疾患^{74), 75)}や様々な腫瘍^{76), 77)}でも認められており、病態との関連性も指摘されている。NEDD8 の基質には幾つかの分子が同定されているが、生理的な条件下での neddylation の役割に関しては不明な点が多い。これまでに最も詳細に解析が行われている特徴的な neddylation の基質として cullin family member がある。cullin は ubiquitination に重要な ubiquitin ligase の複合体構成分子の一つとして知られている。cullin が neddylation されると cullin-RING E3 ubiquitin ligase 複合体の活性化がおり、ubiquitination が促進される⁷⁸⁾。DCUN1D2 はこの cullin の neddylation を促進することにより、ubiquitin ligase 複合体の活性調節にはたらく。最近の研究では、neddylation は ubiquitination だけでなく tyrosine kinase signalling, apoptosis, DNA damage signalling や nucleolar stress signalling といった多数のシグナル伝達系を調節することが知られてきている⁵⁹⁾。本研究では、DCUN1D2 と NEDD8 が末梢神経のシュワン細胞の細胞体とパラノードに局在し、その部位で neddylation が行われている可能性を示した。ミエリンパラノードは特徴的な構造を持ち、ミエリンのループとループをつなぐオートジャンクションおよび軸索とミエリンを結合する axo-glial ジャンクションが存在する。また、ミエリンパラノードループには細胞質が存在し、神経細胞とミエリンの相互作用を受けて、ミエリン深層とシュワン細胞体との間の物質輸送経路として働くと考えられている。ミエリンでの neddylation の基質はまだ不明であるが、パラノードやコンパクトミエリンに局在する分子が候補としてあげられる。

NEDD8 の基質との結合は可逆性のため、NEDD8 の結合 (neddylation) と解離 (deneddylation) によって基質の調節が行われる。TGFβRII (TGFβ type II receptor) はこのような neddylation と deneddylation により機能が調節される分子の一つで、neddylation によって TGFβRII が安定化しシグナルの作用時間が延長すると報告されている⁷⁹⁾。一方、deneddylation は TGFβRII の ubiquitination を促進し、リピッドラフトや caveolin を介したエンドサイトーシスによって TGFβRII の分解を促進させる⁷⁹⁾。他に細胞膜上の Epidermal growth factor receptor (EGFR) も neddylation により ubiquitination が増加し、エンドサイトーシスによる内在化が促進される⁸⁰⁾。さらに *in vitro* の実験において、ケモカイン受容体の 1 種である CXCR5 の neddylation による修飾がこの受容体の細胞膜へのターゲティングに関与し、その結果細胞の移動や可動性を上げるとの報告がある⁸¹⁾。これらのことから、パラノードから細胞体への膜タンパクの輸送や細胞体からパラノードへの膜タンパクの輸送も neddylation によって調節される可能性がある。この翻訳後修飾の役割の更なる解明には、末梢神経ミエリンでの neddylation の基質となる分子を同定することが重要である。

最近、重篤な遺伝性の末梢神経障害の発症にミエリンタンパク質の ubiquitination が関与してい

るとの報告がある。このため、ミエリンでの ubiquitination が neddylation による調節をうけるかどうかを確認することは重要である。末梢神経系では、ubiquitination に関係する 20S proteasome に対する抗体はミエリンをびまん性に染色するが、中でも特にパラノードが特徴的に染色される⁸²⁾。この染色パターンは、今回示した neddylation 関連分子の局在と一致する。*trembler J* マウスは Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease type 1A (脱髄型)の動物モデルとして知られており、proteasome の活性低下により ubiquitinated PMP22 (peripheral myelin protein 22)や myelin basic protein (MBP) などのミエリタンパク質の凝集塊が蓄積する⁸²⁾。さらに、*myelin protein zero (MPZ) gene* の H10P の変異による晩期発症の CMT type 1B 患者の末梢神経では、ubiquitinated MPZ の封入体が集積し、脱髄を伴わない軸索変性が認められる⁸³⁾。これらのことから、ミエリタンパクの ubiquitination の過程は、末梢神経障害の発生と関連がある。DCUN1D2 による ubiquitin E3 ligase 複合体の neddylation がこのような病態に関与しているかはまだ不明であるが、末梢神経での病的な状態における neddylation の役割について今後確認することが必要である。

本研究により、CSTKO マウスでは DCUN1D2 と NEDD8 のパラノード部分における染色性が顕著に減少していることを示した。CSTKO マウスはミエリンのスルファチドが欠損した結果、中枢神経と末梢神経ともにパラノードジャンクションに重篤な異常を生じさせる^{10), 11), 17)}。発達段階の免疫染色の解析より、DCUN1D2 と NEDD8 はミエリン形成の最終段階でジャンクションが形成される頃にパラノードへ局在する。このため、CST 欠損マウスで見られるこれらの分布異常は、パラノードジャンクションの欠損によって引き起こされている可能性が考えられる。しかしながら、パラノードジャンクションの有無とは無関係に、スルファチドが持つ他の機能が無くなったことによりこれらの分子の局在変化が生じた可能性については除外できていない。スルファチドはリピッドラフトを介した NF155 のパラノードへの局在に対して重要な役割を持つ⁴⁴⁾。もし、DCUN1D2 や NEDD8 のパラノード部分への輸送にスルファチドが関与するのであれば、Fig. 15 や Fig. 16 で見られたように CSTKO マウスにおいてこれらの分子のパラノードへの局在自体に影響が出たことも説明できる。また、TGFβRII などの受容体の膜へのターゲティングが neddylation や deneddylation で調節されるのと同様に、NF155 の輸送も neddylation によって調節を受けることも考えられる。いずれの場合においても、硫酸化糖脂質が neddylation 関連分子の局在化を介してミエリン機能に関与する可能性も考えられ、今後さらに検討していく必要がある。

発達段階の末梢神経において、TGFβRII の刺激によりシュワン細胞の細胞死や増殖が調節されていることが知られている⁸⁴⁾。今回の免疫染色による発達段階の末梢神経の解析で、生後早期のシュワン細胞にも DCUN1D2 や NEDD8 が存在することから、この時期における TGFβRII などの受容体の neddylation との関わりも興味深い。

以上、本章では neddylation 関連分子である DCUN1D2 と NEDD8 に着目し、これらが nonmyelinating Schwann cell や myelinating Schwann cell の細胞体の他に、末梢神経ミエリンのパラノード部分に局在することを示し、さらにその局在化に硫酸化糖脂質が重要であることを示した。今後、硫酸化糖脂質がどのようにしてこれらの細胞質の機能分子の集積にはたらくのかを明らかにすると共に、neddylation が生理的あるいは病的状態においてミエリンで果たす役割を調べていくことが重要である。

第2章 第4節 小括

本章では、末梢神経シュワン細胞のパラノードにおける DCUN1D2 と NEDD8 の局在とスルファチド欠損による局在変化について検討した結果、以下の知見を得た（本研究成果は、（本研究成果は、*Proceedings of Japan Academy, Series B, physical and biological science*, **92**, 56-68, 2016⁸⁵⁾に報告した）。

1. DCUN1D2 は末梢神経細胞質画分に多く存在する。
2. DCUN1D2 は末梢神経ミエリンのパラノード、シュミット・ランターマン切痕の一部およびシュワン細胞の細胞体に局在する。
3. NEDD8 は末梢神経ミエリンのパラノード部位と細胞体に局在する。
4. DCUN1D2 と NEDD8 は nonmyelinating Schwann cell では細胞体全体にびまん性に存在する。
5. DCUN1D2 と NEDD8 は、神経線維が太いほどパラノード部分での集積が多い。
6. 発達段階では、DCUN1D2 と NEDD8 は生後 0 日齢からシュワン細胞の細胞体に見られ、ミエリン形成後の生後 21 日齢頃にパラノードに集積する。
7. ミエリンの硫酸化糖脂質が欠損し、パラノードルジャンクションが正常に形成されない CSTKO マウスでは、DCUN1D2 と NEDD8 のパラノード部位での集積減少が認められる。
8. 以上のことから本研究では、末梢神経ミエリンパラノード部分に neddylation 関連分子が集積することを新たに明らかにし、neddylation による修飾がこの部分で何らかの役割を果たす可能性を示した。また、末梢神経系において、硫酸化糖脂質がミエリンパラノード部分への neddylation 関連分子の集積に重要であることを明らかにした。

総括

本研究では、ミエリンの主要構成脂質であるスルファチドおよび CST で合成される POA の欠損に伴う中枢神経系および末梢神経系におけるグリアの変化を解析し、以下の新知見を得た。

第 1 章では、CSTKO マウス視神経における軸索周囲の中枢神経系グリア細胞への影響について検討した。その結果、発達段階で視神経内に遊走してきた OPC の増殖が亢進すること、さらにこの OPC の増加が成獣におけるオリゴデンドロサイト数の増加に関与する可能性が示された。ミエリン形成については遅れが認められることから、スルファチドはオリゴデンドロサイト系譜細胞の増殖とミエリン形成時期の決定に関わることを明らかにした。また、パラノーダルジャンクション形成不全状態においては、軸索における電位依存性イオンチャネルの局在変化を生じ、軸索機能に影響を与えるが、視神経ではアストロサイトやミクログリアなど他のグリア細胞への影響は認められないことを明らかにした。

第 2 章では末梢神経系ミエリンのパラノード部位に集積する新たな分子 DCUN1D2, NEDD8 に着目し、硫酸化糖脂質欠損マウスのグリア内におけるこれらの neddylation 関連分子の局在変化を解析した。DCUN1D2 は neddylation の正の調節因子といわれている。本研究の結果から、neddylation の基質修飾因子となる NEDD8 が DCUN1D2 と共に末梢ミエリンのパラノード部位やシュワン細胞の細胞体に存在することから、これらの部位での NEDD8 付加によるタンパク質翻訳後修飾の可能性が示された。発達段階における解析から、これらの分子がミエリン形成の最終段階でパラノードに集積すること、神経線維の太さが太いほどこれらの集積が多いことがわかった。さらに、CSTKO マウスの末梢神経では、DCUN1D2 と NEDD8 の発現の減少と局在変化が認められた。neddylation によるタンパク質の翻訳後修飾は比較的新しい分野で、その分子メカニズムや生理的あるいは病的状態における役割はまだ不明な点が多い。今回、ミエリンにおいて局所的に neddylation が生じる可能性が示されたことから、今後パラノーダルジャンクション形成との関連性や修飾を受ける基質タンパク質などを明らかにすることにより、スルファチドのミエリンにおける機能やジャンクションにおける軸索—グリア相互作用の解明に役立つと考えられた。

以上、本研究から、CSTKO マウスを用いて中枢神経系および末梢神経系の解析を行うことにより、グリアにおける硫酸化糖脂質の重要性を明らかにすることができた。また、末梢神経系における neddylation に関して新たな知見を提示することができた。

謝辞

本研究の実施にあたり，終始御懇意なる御指導，御鞭撻を賜り，また本論文の御校閲を懇切丁寧にして戴きました恩師，東京薬科大学 馬場広子教授に深甚なる感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり終始適切な御指導，御鞭撻を賜りました山口宜秀先生，林明子先生，石橋智子先生に深謝致します。

in situ ハイブリダイゼーション法を行うにあたり，御指導，御鞭撻を賜りました自然科学機構生理学研究所 池田一裕先生，田中謙二先生（現慶應義塾大学）に心から感謝致します。

さらに本論文作製にあたり御助言，御協力戴きました機能形態学教室の皆様方に心から御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Salzer, J., *Neuron*, **40**, 297-318, (2003)
- 2) Poliak, S., Peles, E., *Nat. Rev. Neurosci.*, **4**, 968-980 (2003)
- 3) Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P., Haydon, P. G., *Trends Neurosci.*, **22**, 208-215 (1999)
- 4) Haydon, P. G., *Nat. Rev. Neurosci.*, **2**, 185-193 (2001)
- 5) Bhat, M. A., Rios, J. C., Lu, Y., Garcia-Fresco, G. P., Ching, W., Martine, M. S., Li, J., Einheber, S., Chesler, M., Rosenbluth, J., Salzer, J. L., Bellen, H. J., *Neuron*, **30**, 369-383. (2001)
- 6) Boyle, M. E. T., Berglund, E. O., Murai, K. K., Weber, L., Peles, E., Ranscht, B., *Neuron*, **30**, 385-397. (2001)
- 7) Dupree, J. L., Coetzee, T., Blight, A., Suzuki, K., Popko, B., *J. Neurosci.*, **18**, 1642-1649. (1998)
- 8) Dupree, J. L., Girault, J.-A., Popko, B., *J. Cell Biol.*, **147**, 1145-1151. (1999)
- 9) Poliak, S., Gollan, L., Salomon, D., Berglund, E. O., Ohara, R., Ranscht, B., Peles, E., *J. Neurosci.*, **21**, 7568-7575. (2001)
- 10) Honke, K., Hirahara, Y., Dupree, J. L., Suzuki, K., Popko, B., Fukushima, J., Nagasawa, T., Yoshida, N., Wada, Y., Taniguchi, N., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **99**, 4227-4232. (2002)
- 11) Ishibashi, T., Dupree, J. L., Ikenaka, K., Hirahara, Y., Honke, K., Peles, E., Popko, B., Suzuki, K., Nishino, H., Baba, H., *J. Neurosci.*, **22**, 6507-6514. (2002)
- 12) Norton, W. T., Cammer, W., "Isolation and characterization of myelin. In: Myelin", ed. by Morell, P., Plenum, New York, 1984, pp. 147-195.
- 13) Hirahara, Y., Bansal, R., Honke, K., Ikenaka, K., Wada, Y., *Glia*, **45**, 269-277. (2004)
- 14) Bansal, R., Winkler, S., Bheddah, S., *J. Neurosci.*, **19**, 7913-7924. (1999)
- 15) Barres, B. A., Raff, M. C., *J. Cell Biol.*, **147**, 1123-1128. (1999)
- 16) Hayashi, A., Kaneko, N., Tomihira, C., Baba, H., *Glia*, **61**, 466-474. (2013)
- 17) Hoshi, T., Suzuki, A., Hayashi, S., Tohyama, K., Hayashi, A., Yamaguchi, Y., Takeuchi, K., Baba, H., *Glia*, **55**, 584-594. (2007)
- 18) Grosche, J., *Nat. Neurosci.*, **2**, 139-143. (1999)
- 19) Kreutzberg, G. W., *Trends Neurosci.*, **19**, 312-318. (1996)
- 20) Minagar, A., Shapshak, P., Fujimura, R., Ownby, R., Heyes, M., Eisdorfer, C., *J. Neurol. Sci.*, **202**, 13-23. (2002)
- 21) Prineas, J. W., Kwon, E. E., Goldenberg, P. Z., Cho, E. S., Sharer, L. R., *Lab. Invest.*, **63**, 624-636 (1990)
- 22) Chang, A., Tourtellotte, W. W., Rudick, R., Trapp, B. D., *N. Engl. J. Med.*, **346**, 165-173 (2002)
- 23) Suzuki, A., Hoshi, T., Ishibashi, T., Hayashi, A., Yamaguchi, Y., Baba, H., *Glia*, **46**, 274-283. (2004)
- 24) Kagawa, T., Ikenaka, K., Inoue, Y., Kuriyama, S., Tsujii, T., Nakao, J., Nakajima, K., Aruga, J., Okano, H., Mikoshiba, K., *Neuron*, **13**, 427-442. (1994)
- 25) Tanaka, K., *Neurosci. Lett.*, **159**, 183-186. (1993)

- 26) Kugler, P., Beyer, A., *Histochem. Cell Biol.*, **120**, 199-212. (2003)
- 27) Imai, Y., Kohsaka, S., *Glia*, **40**, 164-174. (2002)
- 28) Shroff, S. M., Pomicter, A. D., Chow, W. N., Fox, M. A., Colello, R. J., Henderson, S. C., Dupree, J. L., *J. Neurosci. Res.*, **87**, 3403–3414. (2009)
- 29) Baba, H., Akita, H., Ishibashi, T., Inoue, Y., Nakahira, K., Ikenaka, K., *J. Neurosci. Res.*, **58**, 752–764. (1999)
- 30) Marcus, J., Dupree, J. L., Popko, B., *Glia*, **30**, 319-328. (2000)
- 31) Simons, M., Trajkovic, K., *J. Cell Sci.*, **119**, 4381–4389. (2006)
- 32) Kajigaya, H., Tanaka, K. F., Hayashi, A., Suzuki, A., Ishibashi, T., Ikenaka, K., Baba, H., *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.*, **87**, 415-424. (2011)
- 33) Bansal, R., Stefansson, K., Pfeiffer, S. E., *J. Neurochem.*, **58**, 2221–2229. (1992)
- 34) Demerens, C., Stankoff, B., Logak, M., Anglade, P., Allinquant, B., Couraud, F., Zalc, B., Lebetzki, C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 9887–9892. (1996)
- 35) Wang, S., Sdrulla, A. D., diSibio, G., Bush, G., Nofziger, D., Hicks, C., Weinmaster, G., Barres, B. A., *Neuron*, **21**, 63–75. (1998)
- 36) Charles, P., Hernandez, M. P., Stankoff, B., Aigrot, M. S., Colin, C., Rougon, G., Zalc, B., Lubetzki, C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 7585–7590. (2000)
- 37) Park, S. -K., Miller, R., Krane, I., Vartanian, T., *J. Cell Biol.*, **154**, 1245–1258. (2001)
- 38) Genoud, S., Lappe-Siefke, C., Goebbels, S., Radtke, F., Aguet, M., Scherer, S. S., Suter, U., Nave, K. A., Mantei, N. *J. Cell Biol.*, **158**, 709–718. (2002)
- 39) Stevens, B., Porta, S., Haak, L. L., Gallo, V., Fields, R. D., *Neuron*, **36**, 855–868. (2002)
- 40) Ishibashi, T., Dakin, K. A., Stevens, B., Lee, P. R., Kozlov, S. V., Stewart, C. L., Fields, R. D., *Neuron*, **49**, 823–832. (2006)
- 41) Li, S., Liquari, P., McKee, K. K., Harrison, D., Patel, R., Lee, S., Yurchenco, P. D., *J. Cell Biol.*, **169**, 179–189. (2005)
- 42) Pesheva, P., Gloor, S., Schachner, M., Probstmeier, R., *J. Neurosci.*, **17**, 4642–4651. (1997)
- 43) Shao, K., Hou, Q., Go, M. L., Duan, W., Cheung, N. S., Feng, S. S., Wong, K. P., Yoram, A., Zhang, W., Huang, Z., Li, Q. T., *Cell. Mol. Life Sci.*, **64**, 506–515. (2007)
- 44) Schafer, D. P., Bansal, R., Hedstrom, K. L., Pfeiffer, S. E., Rasband, M. N., *J. Neurosci.*, **24**, 3176-3185. (2004)
- 45) Dyer, C. A., Benjamins, J. A., *J. Neurosci. Res.*, **30**, 699–711. (1991)
- 46) Choi, I., Chiu, S. Y., *Glia*, **20**, 184-192. (1997)
- 47) Suzuki, A., Yamaguchi, Y., Hoshi, T., Hayashi, A., Baba, H., *J. Neurosci. Res.*, **85**, 1921-1932. (2007)
- 48) Murphy, GM. Jr., Yang, L., Cordell, B., *J. Biol. Chem.*, **273**, 20967-20971. (1998)
- 49) Raivich, G., Haas, S., Werner, A., Klein, M. A., Kloss, C., Kreutzberg, G.W., *J. Comp. Neurol.*, **395**, 342-358. (1998)
- 50) Tao-Cheng, J. H., Rosenbluth, J., *Brain Res.*, **285**, 251-263. (1983)

- 51) Rosenbluth, J., *J. Neurocytol.*, **5**, 731-745. (1976)
- 52) Rosenbluth, J., *J. Neurosci. Res.*, **87**, 3250-3258. (2009)
- 53) Scherer, S. S., Deschênes, S. M., Xu, Y. T., Grinspan, J. B., Fischbeck, K. H., Paul, D. L., *J. Neurosci.*, **15**, 8281-8294. (1995)
- 54) Fannon, A. M., Sherman, D. L., Ilyina-Gragerova, G., Brophy, P. J., Friedrich, V. L. Jr., Colman, D. R., *J. Cell Biol.*, **129**, 189-202. (1995)
- 55) Trapp, B. D., Quarles, R. H., *J. Cell Biol.*, **92**, 877-882. (1982)
- 56) Martini, R., "Neuroglia", eds. Kettenmann, H., Ransom, B. R., Oxford University Press, New York, 2005, pp. 48-59.
- 57) Hochstrasser, M., *Genes Dev.* **12**, 901-907. (1998)
- 58) Schulman, B. A., Harper, J. W., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 319-331. (2009)
- 59) Enchev, R. I., Schulman, B. A., Peter, M., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **16**, 30-44. (2015)
- 60) Jones, J., Wu, K., Yang, Y., Guerrero, C., Nillegoda, N., Pan, Z. Q., Huang, L., *J. Proteome Res.*, **7**, 1274-1287. (2008)
- 61) Kurz, T., Ozlu, N., Rudolf, F., O'Rourke, S. M., Luke, B., Hofmann, K., Hyman, A. A., Bowerman, B., Peter, M., *Nature*, **435**, 1257-1261. (2005)
- 62) Kurz, T., Chou, Y. C., Willems, A. R., Meyer-Schaller, N., Hecht, M. L., Tyers, M., Peter, M., Sicheri, F., *Mol. Cell*, **29**, 23-35. (2008)
- 63) Scott, D. C., Monda, J. K., Grace, C. R., Duda, D. M., Kriwacki, R. W., Kurz, T., Schulman, B. A., *Mol. Cell*, **39**, 784-796. (2010)
- 64) Meyer-Schaller, N., Chou, Y. C., Sumara, I., Martin, D. D., Kurz, T., Katheder, N., Hofmann, K., Berthiaume, L. G., Sicheri, F., Peter, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **106**, 12365-12370. (2009)
- 65) Kumar, S., Tomooka, Y., Noda, M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **185**, 1155-1161. (1992)
- 66) Vogl, A. M., Brockmann, M. M., Giusti, S. A., Maccarrone, G., Vercelli, C. A., Bauder, C. A., Richter, J. S., Roselli, F., Hafner, A. S., Dedic, N., Wotjak, C. T., Vogt-Weisenhorn, D. M., Choquet, D., Turck, C. W., Stein, V., Deussing, J. M., Refojo, D., *Nat. Neurosci.*, **18**, 239-251. (2015)
- 67) Yamaguchi, Y., Miyagi, Y., Baba, H., *J. Neurosci. Res.*, **86**, 755-765. (2008)
- 68) Yamazaki, R., Ishibashi, T., Baba, H., Yamaguchi, Y., *J. Neurosci. Res.*, **92**, 1286-1294. (2014)
- 69) Jessen, K. R., Mirsky, R., *J. Neurocytol.*, **13**, 923-934. (1984)
- 70) Ibrahim, M., Butt, A. M., Berry, M., *J. Neurol. Sci.*, **133**, 119-127. (1995)
- 71) Griffin, J. W., Thompson, W. J., *Glia.*, **56**, 1518-1531. (2008)
- 72) Black, J. A., Kocsis, J. D., Waxman, S. G., *Trends Neurosci.*, **13**, 48-54. (1990)
- 73) Rabut, G., Peter, M., *EMBO Rep.*, **9**, 969-976. (2008)
- 74) Dil, Kuazi, A., Kito, K., Abe, Y., Shin, R. W., Kamitani, T., Ueda, N., *J. Pathol.*, **199**, 259-266. (2003)
- 75) Mori, F., Nishie, M., Piao, Y. S., Kito, K., Kamitani, T., Takahashi, H., Wakabayashi, K., *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **31**, 53-61. (2005)

- 76) Chairatvit, K., Ngamkitidechakul, C., *Mol. Cell Biochem.*, **306**, 163-169. (2007)
- 77) Salon, C., Brambilla, E., Brambilla, C., Lantuejoul, S., Gazzeri, S., Eymin, B., *J. Pathol.*, **213**, 303-310 (2007)
- 78) Petroski, M. D., Deshaies, R. J., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 9-20. (2005)
- 79) Zuo, W., Huang, F., Chiang, Y. J., Li, M., Du, J., Ding, Y., Zhang, T., Lee, H. W., Jeong, L. S., Chen, Y., Deng, H., Feng, X. H., Luo, S., Gao, C., Chen, Y. G., *Mol. Cell*, **49**, 499–510. (2013).
- 80) Oved, S., Mosesson, Y., Zwang, Y., Santonico, E., Shtiegman, K., Marmor, M. D., Kochupurakkal, B. S., Katz, M., Lavi, S., Cesareni, G., Yarden, Y., *J. Biol. Chem.*, **281**, 21640-21651. (2006)
- 81) Renaudin, X., Guervilly, J. H., Aoufouchi, S., Rosselli, F., *J. Cell Sci.*, **127**, 3546-3554. (2014)
- 82) Fortun, J., Li, J., Go, J., Fenstermaker, A., Fletcher, B. S., Notterpek, L., *J. Neurochem.*, **92**, 1531-1541. (2005)
- 83) Li, J., Bai, Y., Ianakova, E., Grandis, M., Uchwat, F., Trostinskaia, A., Krajewski, K. M., Garbern, J., Kupsky, W. J., Shy, M. E., *J. Comp. Neurol.*, **498**, 252-265. (2006)
- 84) D'Antonio, M., Droggiti, A., Feltri, M. L., Roes, J., Wrabetz, L., Mirsky, R., Jessen, K. R., *J. Neurosci.*, **33**, 8417-8427. (2006)
- 85) Kajigaya, H., Ishibashi, T., Hayashi, A., Yamaguchi, Y., Baba, H., *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.*, **92**, 56-68. (2016)