

氏名（本籍）	かじがや ひとし 梶ヶ谷 仁志（東京都）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	論博第 341 号
学位授与の日付	平成 28 年 3 月 18 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	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
論文審査委員	（主査） 教授 馬場 広子 教授 田野中 浩一 教授 高木 教夫 教授 市田 公美

論文内容の要旨

高等動物の神経軸索の多くは、中枢神経系ではオリゴデンドロサイト（OL）、末梢神経系ではシュワン細胞が形成するミエリンによって覆われている (Fig. 1A). 有髄神経軸索は、ミエリンによってランビエ絞輪、隣接するパラノード、ジャクスタパラノード、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). 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挟まれたパラノードでは、ミエリン膜と軸索膜が直接結合してパラノードランジャンクション **paranodal junction (PJ)** を形成している. PJ が欠損したマウスでは、軸索上のイオンチャネルや各ドメインにおける分子の局在化にも異常を生じることから、神経機能に対する PJ の関わりが強く示唆される.

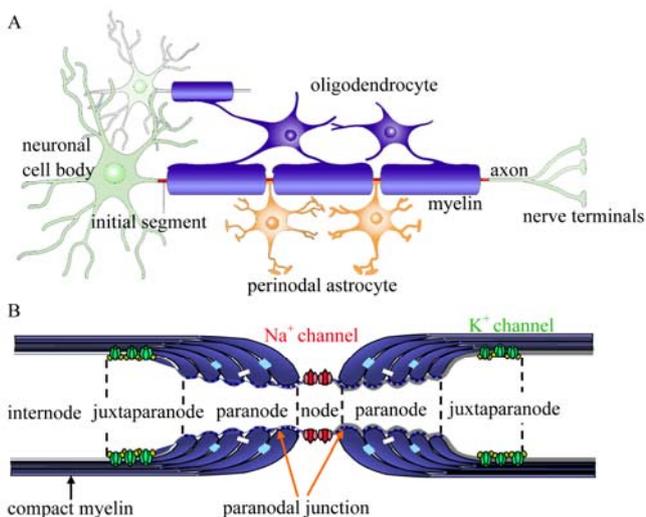


Fig. 1. Structure of myelinated axons.

(A) Myelinated axons in the central nervous system (From Poliak, S., Peles, E., 2003). (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^+ channel are concentrated at the juxtapanodal region, which is a flanking region of the paranode. At the paranode, paranodal axo-glia junction acts as a barrier to prevent lateral movement of these channels.

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. 特に、脂質のうち糖脂質の割合が約 30%を占め、他の細胞膜（糖脂質数%）と比して圧倒的に高い. 特に、ガラクトセレブロシドとこれに **cerebroside sulfotransferase (CST)** によって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. **CSTKO** マウスは、硫酸化糖脂質を欠き、生後数週間は症状も現れず野生型マウス (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。CSTKO マウスの解析から、硫酸化糖脂質がミエリン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、詳細は明らかではない。さらに、末梢神経系でも、CSTKO マウスでは PJ 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。このため、CSTKO マウスは、中枢および末梢神経系においてミエリンの発達、成熟段階や PJ 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 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における軸索周囲のグリア細胞の変化を調べた。さらに第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に局在する neddylation 関連分子 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。

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

CST はスルファチドを合成する酵素であり、OL 前駆細胞 oligodendrocyte precursor cell (OPC) に存在する硫酸化糖脂質 *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) の産生にも関わる。視神経は、網膜神経節細胞の軸索とアストロサイト、OL、ミクログリアの3種のグリアのみで構成されることから、中枢神経系における軸索とグリア細胞の関連性を *in vivo* で解析するのに適している。そこで、視神経におけるグリアの変化を調べることにより中枢神経系での硫酸化糖脂質の役割を調べた。

中枢神経系では一部の OPC は成獣まで残り、脱髄などの病的な状態に反応して増殖・移動し、ミエリンを再生する。そこで、成熟 OL と OPC の各々のマーカーとして PLP および NG2 を用い、4週齢および22週齢の CSTKO マウス視神経を *in situ* ハイブリダイゼーション法あるいは免疫染色法により解析した (Fig. 2)。その結果、PLP mRNA あるいは NG2 陽性 OL 系譜細胞数は、どちら

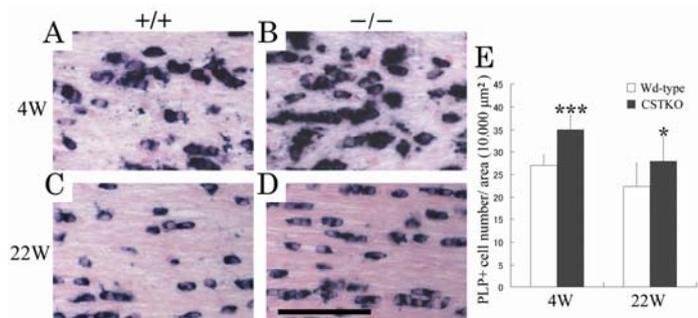


Fig. 2. PLP-positive cells in adult optic nerves of Wd-type and CST-deficient mice.

(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. control.

も Wd type マウスと比較して明らかに増加していた。4週齢と比較して22週齢では PJ 欠損による軸索変化が進行し、神経症状が見られる時期であるが、アストロサイトおよびミクログリアに明らかな変化はなかった。このため、CSTKO マウス視神経におけるグリアの異常は OL 系譜細胞に局限していることが示された。OL 数の増加の原因を調べるため、ミエリン形成開始時期である生後5日齢の視神経を解析した結果、OPC 数および全細胞に占める OPC の割合はすでにこの時期

で増加していた。

発達過程においては、出生直後から OPC が大脳底部から視神経内に移動し、移動し終えて分裂した OPC は最終分化してミエリンを形成する。また、過剰な OL は細胞死する。そこで、硫酸化糖脂質欠損に伴う OL および OPC 数の増加が、移動、増殖や細胞死のどの段階の異常によるかを知るために、生後 1 日齢と生後 3 日齢の視神経を解析した。その結果、遊走の先頭部分での OPC 数は Wd type と CSTKO マウスで違いはないが、他の部位では NG2 陽性 OPC 数および増殖 OPC 数の増加が認められた (Fig. 3)。細胞死数には変化がなかった。これらのことから、スルファチドや POA が欠損した視神経では、生後早期の OPC の移動や細胞死には影響がない一方、増殖が促進し、OL 系譜細胞数が増加することがわかった。また、CSTKO マウスでは、ミエリン形成前に OPC 数が増加しているにも関わらず、生後 10 日齢ではミエリン数は少なく、ミエリン形成開始時期が遅れていた。

以上の結果から、硫酸化糖脂質は OL 系譜細胞の増殖およびミエリン形成時期の細胞数の調節に関わることが明らかとなった。

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

CSTKO マウスでは PJ の形成不全を呈することから、有髄神経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への機能タンパク質の輸送など PJ 形成自体にどのように働くのか、分子レベルでの詳細は明らかにされていない。我々は、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* 解析し、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 NEDD8 を基質となるタンパク質に結合することによって生じる可逆性の翻訳後修飾で、様々な細胞機能に関わる。しかし、神経系における役割はま

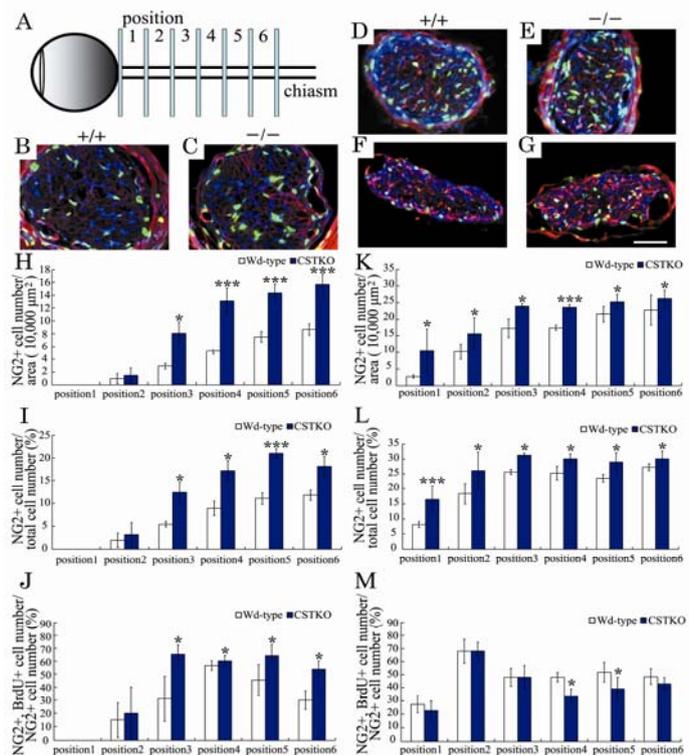


Fig. 3. Regional differences in OPC numbers during early development of optic nerves in Wd-type and CSTKO mice.

Transverse serial cryosections (10 μ m) 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 μ m each, for a total of 1.5 mm). (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) and three individual animals (K–M) of each genotype. *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$ vs. control.

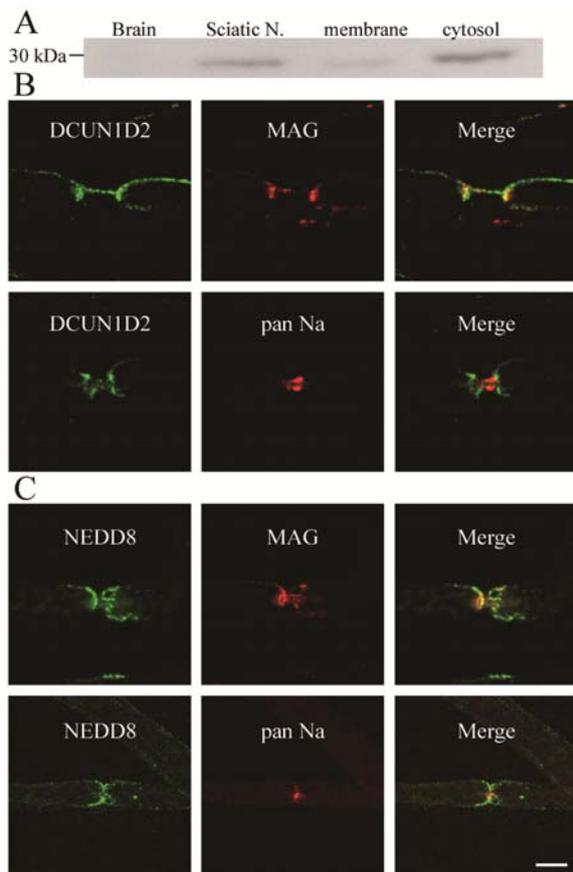


Fig. 4. Localization of DCUN1D2 and NEDD8 at myelin paranodes in the sciatic nerve.

(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 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 μ m

く存在することがわかった (Fig. 4A). また、組織染色の結果から、末梢神経ミエリンのパラノード (Fig. 4B)、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していた。NEDD8も切痕以外の部位でDCUN1D2と同様に局在することがわかった (Fig. 4C)。発達段階における解析結果から、DCUN1D2とNEDD8はミエリン形成の最終段階となる生後21日齢よりパラノードに集積し始めた。また、PJが十分に形成されないCSTKOマウスでは共に局在が変化することから (Fig. 5)、この部位への集積に硫酸化糖脂質やPJが関係することが明らかとなった。また、DCUN1D2とNEDD8は、有髄神経線維径が太いほどパラノードへの集積が明らかで、最も径の小さいA δ 線維では明らかな集積は見られなかった (Fig. 5)。

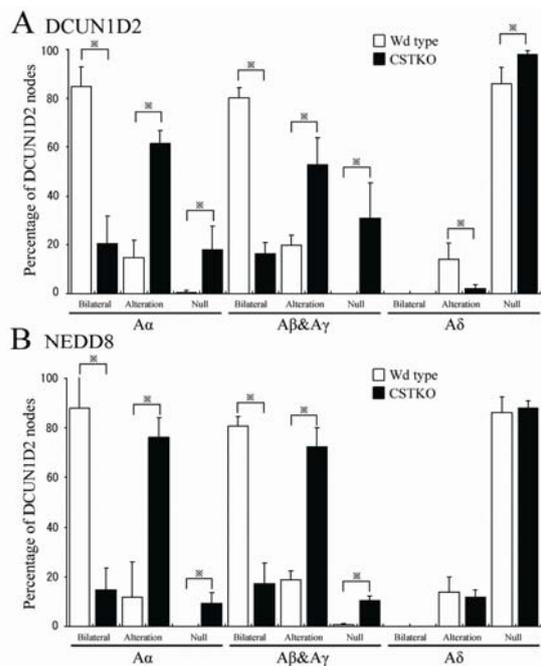


Fig. 5. Altered localization of DCUN1D2 and NEDD8 in CSTKO mice.

(A) 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. 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. (B) NEDD8-positive paranodal regions were classified into 3 groups as described in (A). 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.

だ不明な点が多い。そこで、neddylation調節分子DCUN1D2とNEDD8の神経系における分布およびCSTKOマウスにおける硫酸化糖脂質欠損の影響を解析した。ウエスタンブロット解析により、DCUN1D2は末梢神経細胞質画分に多

以上の結果から neddylation 関連分子である DCUN1D2 と NEDD8 がシュワン細胞の細胞体の他に、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。

以上、本研究によって、すでに報告された PJ 形成以外の硫酸化糖脂質の新たな役割を明らかにした。また、パラノードにおける neddylation 関連分子の変化よりこの部位における硫酸化糖脂質の重要性を明らかにした。得られた知見は、今後グリアによる軸索機能調節機序あるいはミエリン形成や再生機序を研究する上で役立つと考えられる。

【研究結果の掲載紙】

- 1) *Proceedings of Japan Academy, Series B, physical and biological science*, **87**, 415-424. (2011)
- 2) *Proceedings of Japan Academy, Series B, physical and biological science*, **92**, 56-68. (2016)

論文審査の結果の要旨

スルファチドなどの硫酸化糖脂質は、中枢および末梢神経系の髄鞘を構成する主要糖脂質の一種であり、ランビエ絞輪両端にある髄鞘-軸索間結合（**paranodal junction; PJ**）の形成に関わることが知られている。しかし、中枢神経系の髄鞘形成グリアであるオリゴデンドロサイト（**OL**）では、髄鞘が形成される前から硫酸化糖脂質合成酵素（**cerebroside sulfotransferase; CST**）が発現しこれらの合成が行われていることから、**PJ** 形成以外の役割が推測される。本研究では、中枢および末梢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て、**CST** 欠損マウスの解析を行った。

第一章では、**CST** 欠損マウス視神経を解析し、中枢神経系での硫酸化糖脂質の役割を調べた。その結果、成獣の **CST** 欠損マウス視神経では、**PJ** 欠損の他に **OL** およびその前駆細胞数が明らかに増加していた。さらに、生後初期発達段階の視神経の解析から、脳から視神経に移動した **CST** 欠損 **OL** 前駆細胞は、野生型に比べて増殖細胞の割合が高く、これがその後の **OL** 数の増加を生じる可能性を示した。また、電子顕微鏡解析により髄鞘形成の遅れが観察された。以上の結果から、硫酸化糖脂質は **PJ** 形成だけでなく **OL** 系譜細胞の増殖や髄鞘形成時期に関わることを明らかにした。

第二章では、**CST** 欠損マウスの末梢神経系の解析を通して硫酸化糖脂質の役割を調べた。シュワン細胞が形成する末梢髄鞘では、細胞質が残るパラノード（絞輪に接する部分）およびシュミット・ランターマン切痕を介して細胞体と髄鞘深部の間の物質輸送が行われると共に、軸索との間の相互作用が行われると考えられる。しかし、これらの分子基盤はまだ不明な点が多い。梶ヶ谷氏はタンパク質翻訳後修飾の一種である **neddylation** に関連した分子が、運動神経や太い感覚神経軸索を覆う髄鞘のパラノードや一部の切痕に集積していることを見出し、この集積に硫酸化糖脂質が関わることを明らかにした。

以上、梶ヶ谷氏の論文は、これまでに報告されていた **PJ** 形成以外の硫酸化糖脂質の新たな役割を示した。これらの知見は、今後グリアによる軸索機能調節機序や脱髄後の髄鞘再成機序等を研究する上で役立つと考えられる。したがって、本論文は、博士（薬学）学位申請論文として相応しいものと判断する。