

受賞者

山内 淳司

国立成育医療センター研究所薬剤治療研究部分子薬理研究室

## 研究テーマ

感覚運動性ニューロパチーの新規医薬資源のスクリーニングに関する研究

### 1. はじめに

中枢神経系と末梢神経系の2種類の系からなる神経組織は、典型的には神経細胞とグリア細胞から構成される。しかし、2つの系の間には多くの共通点はあるものの、多くの相違点も存在する。グリア細胞は、中枢神経系では、神経伝導の絶縁体として働くミエリンを形成するオリゴデンドロサイトと、主に神経細胞への栄養供給を補助するアストロサイトなどが知られている。これに対して、末梢神経系においては、シュワン細胞が主要なグリア細胞であり、オリゴデンドロサイトとアストロサイトの機能を併せ持つ。申請者らは、末梢神経系の発生過程の分子機構を調べるために、試験管内でその過程を再現することを試み、シュワン細胞とDorsal Root Ganglion (DRG) 神経を別々に精製し、初代共培養系を構築することに成功した。本研究は、シュワン細胞-DRG神経細胞共培養系を応用することにより、運動感覚性ニューロパチーの病態発症を再現できる培養系を確立し、治療薬のない運動感覚性ニューロパチーの治療改善生理活性物質を単離し、新しい治療方法を確立することを目的としている。

### 2. 方法

病態発症共培養系を確立することを目的として、病態モデルマウス(遺伝性の末梢神経変性症の50%を占めるIA型CMT病原因遺伝子PMP22の点変異を有する自然発症型のモデルマウスであるトランベラー(Tr)やトランベラーJ(TrJ)を中心にいくつかの変性症モデルマウスを対象としている。)からシュワン細胞とDRG神経細胞を精製し、共培養を行う。この試験管内実験系は動物個体を用いる薬物投与実験とは異なり、開放系であるために各種のスクリーニングに適している。それは、より生体に近いかたちとして、座骨神経由来の繊維芽細胞を培養シャーレの底に一層生やすことにより、上層のシュワン細胞と神経細胞の安定した共培養が得られるという技術である。ここで観察される脱ミエリン現象は不完全なミエリンやミエリン層が薄いものが多く、それによってシュワン細胞が死滅に至るわけではなく、最終的な評価段階まで共培養を問題なく継続することができる。また、この病態ミエリンは電子顕微鏡レベルで生体内とほぼ同一であることを確認している。この実験系を用いて、当研究室で所有している生理活性物質ライブラリーから脱ミエリン現象を抑制する治療薬候補分子を単離する。現在、ひとつの課題として、より大規模なスクリーニングを行うために一回の実験に用いる細胞数を減らす必要がある。また、もうひとつの今後の課題としては、実験結果の評価を迅速かつ大量にしなければならないため、ハイスループットの技術を導入しなければならない。それは、ミエリンマーカー蛋白の発現をドットプロット法で調べるか、または、高感度蛍光物質を架橋させたモノクローナル抗体で直接的に多検体ミエリン染色を行うなどの方法がある。

最終的には、先に得られた治療薬候補分子に関しては、病態モデルマウスの座骨神経へのインジェクションを行い、生体内で脱ミエリン現象が抑制されるかを判定する。以上、生体内での効果を慎重

に検討してスクリーニングされたものは非常に有効な治療薬候補として期待できる。

### 3. 結果

末梢神経脱ミエリンCMT病の症状を示すマウス初代培養細胞を用い、上述した試験管内での病態発症培養系が可能であることを見出した。なかでも、若年期から重症になりやすいIA型のCMT病(4回膜貫通型蛋白PMP22の変異)モデルマウスのシュワン細胞を用いた系が可能であることが判明した。座骨神経繊維芽細胞を培養シャーレの底に一層生やすことにより共培養が安定したとは言え、確実に毎回再現性がとれるわけではないのが現時点の問題点であるはある。しかし、できる限り実験例数を増やすことによりスクリーニング系としては成り立ってきている。そこで、この共培養系を用い低分子化合物ライブラリーからミエリン脱落症状を改善するものをスクリーニングしたところ、いくつかの改善物質が得られた。まず、もっとも効果があった物質は、いくつかのアルカロイド系化合物が強弱の差こそあれ抑制効果を示した。その中でも特に、インドロカルバゾール骨格を有するアルカロイドであるK252aが強い脱ミエリン現象の抑制効果を持つことが判明した。この骨格を有する化合物は、広範囲なキナーゼ阻害作用を示すことが分かっているが、K252aの標的となるキナーゼ群は一般的に受容体チロシンキナーゼ、特に神経栄養因子受容体であることが報告されている。

次に、何故これらアルカロイド系化合物がこのような効果を持つのかということ調べた。方法としては、その標的となり得る分子をRNA干渉法によってノックダウンし、アルカロイド系化合物による脱ミエリン現象の抑制効果を再現できるかを検討した。その結果、通常のみエリン発生に関与するシグナル伝達経路に関与する分子がその標的である可能性が高いことが分かってきた。しかし、それは、まだ予備実験段階であるため、考察の項において詳細に述べる。

### 4. 考察

はじめに、最近我々が見出したミエリン発生のメカニズムに関して述べる。ミエリン形成過程は3つの過程、すなわち、(1)神経軸索上でのシュワン細胞遊走期、(2)前ミエリン形成期、(3)ミエリン形成期、に分けられる。しかし、現在までこれらの過程を制御する細胞外液性因子は不明であった。申請者らは、はじめに、DRG神経で2種類の神経栄養因子(神経栄養因子3(NT3)と脳由来神経栄養因子(BDNF))がそれぞれ発生時間軸依存的に異なった時期に発現し放出され、シュワン細胞によるミエリン形成に対して逆の作用をもつ(文献1-3)。

次に、過程(1)のシュワン細胞の遊走を制御するシグナル伝達機構を詳細に調べた(文1-3)。その結果、NT3はシュワン細胞上のNT3特異的チロシンキナーゼ型受容体TrkCを介して、Rhoファミリー低分子量GTP結合蛋白質Rac1及びCdc42とその下流のJunキナーゼを活性化し、細胞遊走を促進することが明らかになった。また、DRG神経由来のニューレグリンもこの過程を促進することが判明した(文献4、5)。一方、BDNFは低親和性神経栄養因子受容体p75NTRを介し、非受容体型Srcチロシンキナーゼを活性化し、Rac1とCdc42と逆の機能をもつとされるRhoAとそのエフェクターであるRhoキナーゼを経て細胞遊走を阻害することが分かった。どちらの場合も、神経栄養因子がシュワン細胞上の受容体に結合し、チロシンキナーゼ活性→低分子量GTP結合蛋白質→セリンスレオニンキナーゼという類似性の高い分子群からなる経路を介するが、おそらく生理的作用が拮抗する異なった分子を介して細胞遊走を正負に制御していることが示唆された。また、同時にこれらのシグナル伝達経路は、過程(2)や過程(3)

においても、拮抗的な経路を形成し、重要な役割をしていることが分かってきた。

ここで、アルカロイド系化合物が何故脱ミエリン現象を抑制できるかに関して述べる。脱ミエリン現象を抑制する手段としては、強制的に通常のみエリン形成過程を進行させるか、生理的なみエリン形成抑制シグナルを解除させるかのどちらかが有効であると考えられる。現在、我々のスクリーニング結果から、アルカロイド系化合物は後者に関与していることが判明した。つまり、NT3とその受容体TrkC以下のRac1とcdc42経路のどこかが、その作用ポイントであることが分かってきた。さらに、ごく最近K252aなどのアルカロイド系化合物は、シュワン細胞で重要な役割をもつErbB3チロシンキナーゼ型受容体も阻害することが判明した。従って、ErbB2とその下流のシグナル伝達経路も、それらの分子標的である可能性が示唆された。この場合も、生理的なみエリン形成抑制シグナルを解除させる効果があるようだ(参考文献4、5)。

今後、アルカロイド系化合物の分子標的を正確に同定し、今まで存在しなかったIA型CMT病特異的治療薬の開発に貢献したい。以上、病態代謝研究会研究補助金により、これらの研究を遂行できたこと、及び未だ難病指定を受けていない神経変症に関する参考文献以外の萌芽的な研究が行えたことに関しまして、財団法人病態代謝研究会に深く感謝致します。

## 5. 参考文献

1) Yamauchi, J., Chan, J. R., Miyamoto, Y., Tsujimoto, G., and Shooter, E. M. (2005) The neurotrophin-3 receptor TrkC directly phosphorylates and activates the nucleotide exchange factor Dbs to enhance Schwann cell migration. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 102, 5198-5203

2) Yamauchi, J., Miyamoto, Y., Tanoue, A., Shooter, E. M., and Chan, J. R. (2005) Ras activation of a Rac1 exchange factor, Tiam1, mediates neurotrophin-3-induced Schwann cell migration. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 102, 14889-14894

3) Jonah R. Chan, Christine Jolicoeur, Junji Yamauchi, Jimmy Elliott, James P. Fawcett, 4) Benjamin K. Ng, and Michael Cayouette (2006) The polarity protein Par-3 directly interacts with the p75 neurotrophin receptor to regulate myelination. **Science** 314, 832-836

4) Yuki Miyamoto, Junji Yamauchi, Atsushi Sanbe, and Akito Tanoue (2007) Dock6, a Dock-C subfamily guanine-nucleotide exchanger, has the dual specificity for Rac1 and Cdc42 and regulates neurite outgrowth. **Exp. Cell Res.** 313, 791-804

5) Junji Yamauchi, Yuki Miyamoto, Jonah R. Chan, and Akito Tanoue (2008) ErbB2 directly activates the exchange factor Dock7 to promote Schwann cell migration. **J. Cell Biol.** 181, 351-365