

- 13) Bardor, M., Nguyen, D.H., Diaz, S., & Varki, A. (2005) *J. Biol. Chem.*, 280, 4228-4237.
- 14) Malicdan, M.C., Noguchi, S., Hayashi, Y.K., Nonaka, I., & Nishino, I. (2009) *Nat. Med.*, 15, 690-695.
- 15) Amsili, S., Shlomai, Z., Levitzki, R., Krause, S., Lochmuller, H., Ben-Bassat, H., & Mitrani-Rosenbaum, S. (2007) *Cell Death Differ.*, 14, 1916-1924.

野口 悟

(独立行政法人国立精神・神経医療研究センター
神経研究所 疾病研究第一部)

Sialic acid-deficient myopathy

Satoru Noguchi (Department of Neuromuscular Research, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, 4-1-1, Ogawahigashi-cho, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan)

オリゴデンドロサイトの発生過程と中枢脱 ミエリン疾患における Cdk5 の新しい役割

1. はじめに

哺乳類の中枢神経系を構成するグリア細胞はアストロサイト、上衣細胞、ミクログリア、そしてオリゴデンドロサイトから成る。このうちオリゴデンドロサイトの主な機能は、ニューロンの軸索周囲にミエリン（髄鞘）という分厚い絶縁層を作ることによって神経電気信号の跳躍伝導を可能にし、神経電位を軸索末端側へすばやく伝達すると同時に、軸索を強固に保護することである^{1,2)} (図 1)。そのため、発生期におけるミエリンの発達不全や脊索損傷などによるミエリン層の脱落は、神経伝達速度の低下、さらには知的障害および運動障害などの原因となることが知られている^{1,2)}。このように、グリア細胞はニューロンと互いに密接な関係を保ちながら、複雑で多機能な脳活動を支えている。我々のグループは、未だブラックボックスが多く残されているミエリンの発生メカニズムを探るべく、独自の培養系を構築し、研究を行っている。

2. Cdk5 とオリゴデンドロサイトのミエリン形成過程

1) ミエリン形成の三過程

「グリア細胞のミエリン形成過程は、ニューロンの軸索との密接な相互作用によって進行する」という観点から、我々のグループはその過程をグリア細胞の形態学的相違に基づき、三過程に分類している。stage I；軸索上でグリア

細胞が遊走・増殖する時期、stage II；グリア細胞の突起が伸長し始める分化期、stage III；軸索の周りに幾重もの層を形成していくミエリン成熟期、の三期である (図 1)。このうち、stage I と stage II 前期における中枢グリア細胞は、オリゴデンドロサイト前駆細胞 (oligodendrocyte precursor cell；OPC) とよばれている。

我々は、胎生 15 日目のラット大脳皮質から数回の継代とペトリ皿を用いることにより、精製度と分化能の高い OPC を得る培養系を構築した^{3,4)}。この培養系を用いると、stage I から III への変遷を試験管内で観察することが可能であると同時に、各過程を抽出して解析することができる。また、神経細胞との共培養によって、*in vivo* に近い条件下で、両者の相互作用を検出することができる。

2) サイクリン依存性キナーゼ 5

サイクリン依存性キナーゼ 5 (cyclin-dependent kinase；Cdk5) は、Cdk ファミリーに属するプロリン指向性のセリン・スレオニンキナーゼである。Cdk ファミリーのほとんどのメンバーは、サイクリンと結合して活性化され、増殖している細胞において細胞周期の制御に関与している。このなかで Cdk5 のみ、分裂を終えた神経細胞に高発現している。また、Cdk5 の活性化因子である p35 と p39 は脳に特異的に発現しているため、Cdk5 は主にニューロンで活性を示すと言われ、これまで多くの研究者によってニューロンにおける役割について数多くの報告がなされてきた。Cdk5 欠損マウスでは、発生期におけるニューロンの移動が正常に起こらず、大脳の構造に異常が生じることが知られている⁵⁾。また、Cdk5 がアルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患に関与していることを示唆する報告がなされている^{6,7)}。このような背景のもと、Cdk5 がオリゴデンドロサイトにおいても、何らかの機能を果たしていると考え、その役割を探ることとした。

3) オリゴデンドロサイト前駆細胞の遊走過程と Cdk5

オリゴデンドロサイト前駆細胞の遊走過程は、様々な液性因子によって、時空間的に厳密に制御されている。このうち、platelet-derived growth factor (PDGF) AA は、ニューロンやアストロサイトから分泌され、OPC の PDGF α 受容体に作用して遊走・増殖期を正に司る、主要な液性因子の一つとして知られている^{8,9)}。そこで、Cdk5 が PDGF-AA リガンドによる OPC の遊走促進経路上に介在するかどうかを検討するため、Cdk5 の阻害剤として汎用されている roscovitine 存在下で PDGF による OPC の遊走実験を行った。その結果、roscovitine 存在下で、PDGF による OPC の遊走促進効果が強く抑制されることが判明した (図 2A)。

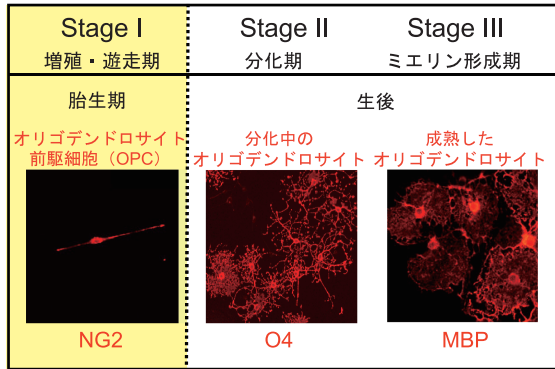


図1 ミエリン発生過程の各ステージにおけるオリゴデンドロサイトの染色写真

ミエリン発生三過程における、初代培養オリゴデンドロサイトの形態。各 stage に特異的なマーカー抗体で染色した写真 (stage I は OPC のマーカーである抗 NG2 抗体, stage II は分化途中の OL のマーカーである抗 O4 抗体, stage III は成熟した OL のマーカーである抗 MBP 抗体を用いて染色した)。stage I の細胞は、大部分が単極性または双極性の形態を示す。分化が進行するにつれて主枝からのびる分岐数が増加する (stage II)。最終的に stage III では、分岐が融合して MBP 陽性のシート状構造をとる。右端の写真は、成熟マウスの神経を輪切りにしたときの電子顕微鏡写真。中央の空洞に見える部分が軸索、その周りに何重にも巻いている層状構造がグリア細胞の髄鞘 (ミエリン) である。

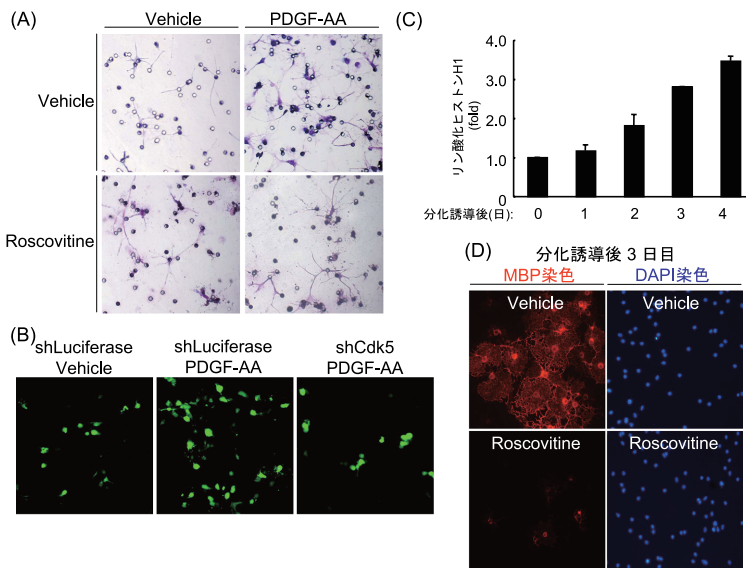


図2 Cdk5 はオリゴデンドロサイトの遊走・分化経路に介在する

(A) Boyden チャンバーを用いた OPC の遊走実験 (方法は参考文献³⁾を参照)。二層からなるチャンバーの下部に PDGF-AA リガンドを、上部に OPC をのせ、遊走後の上部チャンバーをギムザ染色した (遊走した細胞が染色される)。PDGF-AA によって OPC の遊走は促進された。ここに roscovitine 処理を行うと、遊走促進が抑制された (下段)。(B) shCdk5 の効果。OPC にレトロウイルスを感染させ、PDGF-AA の遊走促進効果に対する影響を観察した。shLuciferase では、PDGF による促進効果が見られたが、shCdk5 では PDGF-AA による遊走促進が抑制された。(C) 分化誘導後 0-4 日目のオリゴデンドロサイトの Cdk5 の活性を、ヒストン H1 を基質として測定した。縦軸はリン酸化ヒストン H1 の相対値を示している。分化にしたがい、Cdk5 の活性は上昇した。(D) 分化誘導後 3 日目のオリゴデンドロサイトをミエリン鞘のマーカー抗体である MBP 抗体で染色した (左側)。右は DAPI 染色。3 日目で MBP 陽性細胞が検出された (上段) のに対し、roscovitine で前処理を行った場合、その数が激減した (下段)。

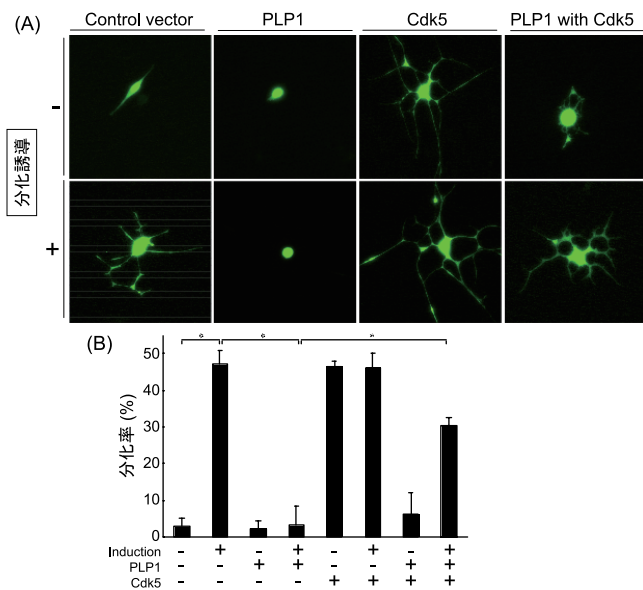


図3 PLP1 によるオリゴデンドロサイトの分化抑制と Cdk5 共発現の影響

(A, B) IRES-ZsGreen ベクターまたは IRES 上流に PLP1 遺伝子を挿入したものをオリゴデンドロサイト前駆細胞株 FBD-102b 細胞に導入し、分化誘導をかけた (形態的分化の指標は参考文献⁴⁾を参照)。その結果、PLP1 は強い分化抑制作用を示した。一方、Cdk5 を共発現させると、それが部分的に解除された。*, $p < 0.01$

また、これとは別に、Cdk5 遺伝子に対する RNA 干渉能を有する配列をコードしたレトロウイルスベクターを作製し、増殖・遊走期にある OPC に感染させ、内在性 Cdk5 の発現をノックダウンした。このウイルスベクターは、RNA 干渉配列と共にサンゴ由来緑色蛍光タンパク質 ZsGreen 配列を有しているため、ウイルス感染した細胞のみが蛍光顕微鏡下で容易に可視化される。結果として、コントロールであるルシフェラーゼに対するヘアピン型 RNA 干渉配列 (short hairpin RNA; shRNA) 発現ベクターを感染させた OPC では、PDGF-AA による遊走促進が通常通り観察されたのに対し、Cdk5 がノックダウンされている OPC では、遊走がほぼ完全に抑制された (図 2B)。また、Cdk5 の活性は、OPC の遊走開始前から上昇しはじめ、遊走終了時点においても高い活性を維持していることが明らかとなった³⁾。さらに、Cdk5 の活性化因子である p39 を同様の手法でノックダウンした結果、遊走促進が一部抑制されることを確認している³⁾。このように、初代培養細胞のオリゴデンドロサイトを用いて、ノックダウン手法や介在する分子の活性測定などの生化学的手法を組み合わせることにより、ニューロンから分泌された PDGF-AA が OPC 膜上の PDGF α 受容体を介し、Fyn キナーゼ→Cdk5→アクチン骨格制御タンパク質 WAVE2 (アクチンの重合を促進し、葉状仮足形成に関与するタンパク質) の 137 番目のセリン (Ser137) のリン酸化を通じて OPC の遊走を促進している、という新規経路が描かれた³⁾。

4) オリゴデンドロサイトへの分化過程と Cdk5

遊走過程と同様に、オリゴデンドロサイトの分化過程に関しても、そのシグナル分子機構というのはよく分かっていない。我々の培養系では、PDGF を除去し、トリヨードサイロニンとサイロキシンを添加することで分化誘導を行っており、分化誘導後 3 日目あたりからマーカー抗体であるミエリン塩基性タンパク質 (myelin basic protein; MBP) によってシート状のミエリンが検出される (図 1)。そのミエリン形成のタイムコースを追うかのように、Cdk5 の発現・活性が分化誘導にしたがって上昇することが明らかになった (図 2C)⁴⁾。そこで、遊走過程のみならず分化の過程においても Cdk5 が深く関わっているのではないかと考え、roscovitine 存在下で分化誘導を行った。その結果、vehicle 群と比較し、roscovitine 処置群で MBP 陽性のオリゴデンドロサイトが激減することが判明した (図 2D)。また、Cdk5 の下流には、細胞接着斑タンパク質の paxillin が介在し、Cdk5 によって 244 番目のセリン (Ser244) が分化依存的にリン酸化されること (分化を促

進する液性因子→Cdk5 の活性上昇→接着斑タンパク質 paxillin のリン酸化) によりオリゴデンドロサイトの分化が進行していることが明らかとなった⁴⁾。

このように、オリゴデンドロサイトの初期発生過程では Cdk5 が中心的な役割を担い、下流分子のリン酸化による細胞骨格構造の変化を介して (遊走経路では Cdk5 による WAVE2 のリン酸化、分化経路では paxillin のリン酸化)、遊走や分化が制御されていることが明らかとなった。遊走期、分化期はともに最終ステージであるミエリン成熟期に先行しているため、そのステージを促進するようなシグナルカスケードを明らかにすることにより、脱ミエリン疾患や外的ミエリン損傷に対する治療の可能性も膨らむであろう。

3. 中枢脱ミエリン疾患と Cdk5

1) ペリツェウス・メルツバッハー病の原因遺伝子; *plp1*

神経を取り巻くミエリンの形成異常による変性疾患には、代表的なものとして、中枢神経系のペリツェウス・メルツバッハー病 (Pelizaeus-Merzbacher; PMD) 及び末梢神経系のシャルコー・マリー・トゥース (Charcot-Marie-Tooth; CMT) 病が知られている。ともに、ミエリン形成遺伝子に変異を生じ、神経を取り巻くミエリンの脱髄が生後徐々に進行する遺伝性脱ミエリン疾患である^{10,11)}。

このうち、PMD は、脱髄の起こる部位により頭部振戦、言語障害、視神経萎縮、運動障害および精神運動発達遅延など様々な神経症状を呈する。その原因は、ミエリンの形成または構成に関与する因子の異常により発症することが知られ、PMD の大部分の患者の原因としてプロテオリピドタンパク質 1 (proteolipid protein 1; PLP1) の遺伝子異常が報告されている。PLP1 の遺伝子異常による PMD は伴性劣性遺伝形式をとり、約 50% が *plp1* 遺伝子の重複、約 15-20% が点変異、数% が遺伝子の欠失によるものと報告されている。PMD は、病気の進行が比較的遅いケースが多く、致死的ではないこともあって、対症療法が主流となっており、根治療法の開発が期待されている。

このような背景のもと、我々のグループは、これまでに PMD や CMT の病態発症メカニズムの解明とミエリン形成不全の進行を抑制する標的分子・化合物のスクリーニングを中心として研究を進めている。

2) Cdk5 は脱ミエリン疾患の標的因子となるか?

先述したように、*plp1* 遺伝子を原因とする PMD の半数を *plp1* 遺伝子の重複が占めることから、PLP1 をオリゴデンドロサイト前駆細胞株 FBD-102b 細胞に過剰発現し *in*

vitro のモデル系として使用できないだろうか、と考えた。図3に示すように、IRES-ZsGreen1ベクターを発現したFBD-102b細胞に分化誘導処理を施すと、誘導前と比較し、分化形態を示す細胞の割合（細胞体からのびる突起の数と長さ、および第二、第三分岐数で判定）が増加した。ここに、IRES上流に*plp1*遺伝子を挿入したものを導入すると、PLP1を過剰発現した細胞で、強い分化阻害作用が観察された（図3A, B）。したがって、PLP1によるミエリン形成不全の原因の一つとしてオリゴデンドロサイトの分化阻害が考えられた。

そこで、我々は先述の「Cdk5経路を細胞内で抑制すると、オリゴデンドロサイトの分化が促進される」結果から、逆に「Cdk5経路を活性化させると、PLP1による分化阻害作用が抑制されるのではないか」と考えた。実際に、野生型のCdk5をPLP1と共にFBD-102b細胞に発現させたところ、部分的ではあるが、PLP1による分化阻害作用が解除されることが判明した（図3A, B）。このことからCdk5経路の活性制御によってミエリン形成不全を改善する可能性が示唆された。

我々はこれまでに、末梢神経系のグリア細胞であるシュワン細胞と神経細胞の共培養系の樹立に成功している。この技術を応用し、単離精製した海馬や大脳皮質の神経細胞と中枢ミエリン形成グリア細胞であるオリゴデンドロサイトとの共培養系の確立を目指し、現在改良を重ねている。この系が確立されれば、末梢のみならず、中枢神経系のミエリン形成過程をより詳細に解析することができ、また*in vivo*に近い条件下でミエリン形成不全を修復・促進する薬物のスクリーニングを実施できると期待している。将来的には、有効と判定された化合物の動物実験、さらには臨床試験へと応用を図りたい。

4. おわりに

これまで、Cdk5は神経特異的に機能すると考えられてきたが、グリア細胞においてもシグナル伝達経路のメインキナーゼとして遊走や分化など様々な局面で働いていることが分かった。さらに、我々の結果から、Cdk5やその経路上にある分子は、稀少疾病に属し特異的根治療法の存在しないPMDの治療標的分子になる可能性が浮上した。この点において今後、*in vivo*実験も含め慎重に検討していくつもりである。

謝辞

この研究の多くは、国立成育医療研究センター研究所で

行われたもので、名取道也所長、斉藤博久副所長、薬剤治療研究部部長田上昭人先生の温かい御指導のもと達成されました。また、Cdk5研究に関して御指導を頂いている首都大学東京教授久永眞市先生、FBD-102b細胞を樹立され、供与頂いた東京理科大学教授友岡康弘先生に深く感謝致します。さらに、神経研究全般に御指導頂いている京都大学准教授加藤裕教先生に心より感謝申し上げます。

- 1) Lee, J.C., Mayer-Proschel, M., & Rao, M.S. (2000) *Glia*, 30, 105-121.
- 2) Barres, B.A. & Raff, M.C. (1999) *J. Cell Biol.*, 147, 1123-1128.
- 3) Miyamoto, Y., Yamauchi, J., & Tanoue, A. (2008) *J. Neurosci.*, 28, 8326-8337.
- 4) Miyamoto, Y., Yamauchi, J., Chan, J.R., Okada, A., Tomooka, Y., Hisanaga, S., & Tanoue, A. (2007) *J. Cell Sci.*, 120, 4355-4366.
- 5) Ohshima, T., Ward, J.M., Huh, C.G., Longenecker, G., Veeranna, Pant, H.C., Brady, R.O., Martin, L.J., & Kulkarni, A.B. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 11173-11178.
- 6) Patrick, G.N., Zukerberg, L., Nikolic, M., de la Monte, S., Dikkes, P., & Tsai, L. (1999) *Nature*, 402, 615-622.
- 7) Nguyen, M.D., Lariviere, R.C., & Julien, J.P. (2001) *Neuron*, 30, 135-147.
- 8) Noble, M., Murray, K., Stroobant, P., Waterfield, M.D., & Riddle, P. (1998) *Nature*, 393, 560-562.
- 9) Richardson, W.D., Pringe, N., Mosley, M.J., Westermarck, B., & Dubois-Dalcq, M. (1998) *Cell*, 53, 309-319.
- 10) Garbern, J., Cambi, F., Shy, M., & Kamholz, J. (1999) *Arch. Neurol.*, 56, 1210-1214.
- 11) Garbern, J. Y. (2007) *Mol. Life Sci.*, 64, 50-65.

宮本 幸, 山内 淳司

(国立成育医療研究センター研究所 薬剤治療研究部)

The new role of Cdk5 in oligodendrocyte development and dysmyelinating disorders of the central nervous system
Yuki Miyamoto and Jiyunji Yamauchi (Department of Pharmacology, National Research Institute of Child Health and Development, 2-10-1 Okura, Setagaya, Tokyo 157-8535, Japan)

トランスポーターの機能解明と疾患治療への応用

1. はじめに

トランスポーターは全身の細胞に発現し、薬物や内因性物質などの様々な物質を能動的に輸送して、生物の恒常性