

論文の内容の要旨

論文題目

シュワン細胞分化を制御する細胞内シグナルに関する研究

指導教官 中村 耕三 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 12 年 4 月 入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 緒方 徹

シュワン細胞は末梢神経軸索の周囲に髄鞘を形成する細胞であり、軸索の伝導機能を維持するだけでなく末梢神経損傷の際は軸索を誘導する働きも知られている。神経堤から発生するシュワン細胞は未分化シュワン細胞、前ミエリン形成シュワン細胞を経て髄鞘（ミエリン）を形成するにいたるが、その分化のメカニズムは必ずしも明らかではない。

これまでの報告から細胞内の cAMP 上昇が分化を誘導すること、そしてさまざまなサイトカインがその分化過程を修飾することが知られている。しかしながら、リガンドから細胞膜上の受容体に刺激が入った後の細胞内シグナルの過程に関しては不明な点が多く残されている。そこで我々はシュワン細胞の分化メカニズムを細胞内シグナルのレベルで理解するために本研究を行った。

実験は主にアデノウィルスベクターで遺伝子導入を行い、細胞内のシグナル経路を個別に活性化あるいは不活性化する方法を用いた。そして各シグナルのシュワン細胞分化に及ぼす影響を、分化マーカーを用いた RT-PCR 法、*in vitro* で髄鞘形成の観察が可能な共存培養系、そして同種間末梢神経移植によって評価した。

第一章ではリセプター型チロシンキナーゼに分類される受容体に結合する neuregulin, PDGF, IGF-I のシュワン細胞分化に対する影響を検討した。これらのサイトカインはいずれも細胞内の Ras-Raf-MEK-ERK の経路と PI3 キナーゼ-AKT の経路を活性化することが知られているが、分化マーカーの変化に対する影響は各々で異なっていた。すなわち ERK

系を強く活性化する *neuregulin*, PDGF は分化マーカーである MAG、P0 の発現を抑制し、逆に ERK 系をわずかしき活性化しない IGF-I では相対的に PI3 キナーゼ-AKT 系の活性が強く MAG、P0 の発現は促進された。この知見から我々は ERK 系がシュワン細胞分化に対して抑制的に働き、PI3 キナーゼ-AKT 系が分化促進に働くとの仮説を立てた。

この仮説を検証するため、まずドミナントネガティブ型 Ras(Ras^{DN})遺伝子と恒常活性型 MEK(MEK^{CA})遺伝子をおのおののアデノウィルスベクターによってシュワン細胞に発現させ、前者により ERK 系を遮断、後者によりこれを活性化させた。すると予想通り ERK 系を遮断されたシュワン細胞は *neuregulin* 刺激によっても MAG の発現を維持していた。一方この経路が恒常的に活性化したシュワン細胞では MAG の発現は完全に抑制された。このように ERK 系の分化抑制機能が明らかになった後、同様の方法で PI3 キナーゼ-AKT 系の分化促進作用を検証した。この経路を遮断するためにドミナントネガティブ p85 遺伝子(p85^{DN})を、活性化するために p110 過剰発現、あるいは活性型 AKT 遺伝子をそれぞれ導入した。そして p85^{DN} 遺伝子により MAG 発現が消失すること、逆に AKT 系活性化により MAG 発現が上昇することが明らかとなった。さらに AKT の下流で働く GSK3 β シグナルを活性化するためにリチウムを投与した。すると上流のシグナルを不活性型 p85 によって遮断した状態でもリチウムを加えることによって MAG の発現が誘導されたことから PI3 キナーゼ-AKT 系の下流で GSK3 β が働いていることが示唆された。

活性型 AKT 遺伝子導入による分化促進効果が最終分化である髄鞘形成にまで効果をもっているかを検討するために後根神経節より得た神経細胞とシュワン細胞との共存培養系を確立し *in vitro* での髄鞘形成を観察した。遺伝子導入によって AKT 系を活性化されたシュワン細胞を用いた共存培養ではコントロールの 3 倍の髄鞘形成が観察された。さらにラットの同種間坐骨神経移植モデルにて移植片に *ex vivo* で活性型 AKT 遺伝子を導入したところ移植後 5 週後で髄線維数の有意な増加が観察された。これらの結果よりシュワン細胞の PI3 キナーゼ-AKT 系の活性化は髄鞘形成過程全体の促進につながることが示された。

第二章では TGF β シグナルによるシュワン細胞の分化抑制を検討した。TGF β は炎症などに伴って発現し創傷治癒・瘢痕形成過程に働くと考えられており、シュワン細胞に対しても増殖促進作用と分化抑制作用を持つことが知られているが、その詳細及び生体内における意義は明らかではない。我々は TGF β のシグナルが Smad 系を介して伝わることを第一章と同様の方法にて検討した。シュワン細胞に Smad 系でシグナルを伝える Smad3 あるいは Smad 以外のシグナルを伝える活性型 MKK6 (MKK6^{CA}) の遺伝子をアデノウィルスで導入したところ、Smad3 導入細胞においてのみ MAG の発現抑制が見られた。さらに TGF β シグナルを強く抑制することが知られている抑制型 Smad の Smad7 を導入すると TGF β 存在下でも MAG が発現した。これらの結果より TGF β による MAG 発現抑制は Smad シグナルを介していることが確認された。さらに Smad7 を遺伝子導入されたシュワン細胞は TGF β の存在下においても髄鞘を形成することが共存培養系にて確かめられた。これらの結

果は神経組織の損傷部などで TGF β が髄鞘形成を障害する場面において、Smad7 の遺伝子導入が髄鞘形成を促進させる可能性を示唆する。

今回検討した PI3-AKT 系による分化促進と、Smad 系, ERK 系による分化抑制作用はいずれもシュワン細胞による髄鞘形成の制御する上で重要なものと位置付けられる（下図参照）。シュワン細胞はすでに中枢、末梢神経領域での細胞治療に利用されることが検討されている細胞であり、今後の応用技術のためにもこうした細胞の分化メカニズムの詳細な理解が欠かせないと思われる。

今回検討し明らかになったシュワン細胞分化のシグナル系路

