

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

Myelin-associated glycoprotein (MAG)プロモーター解析による  
シュワン細胞分化機構の研究

指導教官 中村 耕三 教授

東京大学大学医学系研究科

平成 15 年 4月 入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 星川 慎弥

シュワン細胞は末梢神経軸索の周囲にミエリンを形成する細胞であり、軸索の伝導機能を維持するのみならず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。神経提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おり、シュワン細胞の増殖・分化の研究は cAMP とサイトカイン刺激を中心に行われてきている。

これらサイトカインからのシグナルの下流では転写因子による転写制御が行われていると考えられる。シュワン細胞で重要な働きをしている転写因子は、Sox-10, Oct-6, Krox-20 が知られている。それぞれノックアウトマウスが作出されており、Sox-10 K. O. では早期の末梢グリア細胞が消失、Oct-6 K. O. ではミエリン形成が極度に遅延、Krox-20 K. O. ではミエリンが全く形成されない、といずれもミエリン形成の障害がある。これらの中で Sox-10 はシュワン細胞の分化マーカーであるP0を転写の標的としているが、他の分化マーカーに関して発現の上昇を制御する特異的転写因子は明らかになっていない。

本研究では、未分化シュワン細胞から前ミエリンシュワン細胞へのステップで発現レベルが大きく上昇する分化マーカーであり、ミエリンの構成蛋白である

Myelin-associated glycoprotein (MAG) に着目し、その遺伝子のプロモーター解析を行うことにより、MAGを上昇させシュワン細胞を分化に導く転写制御因子の同定、さらにその因子がシュワン細胞分化機構に及ぼす影響の解明を目的とした。

ラットゲノム遺伝子より Myelin-associated glycoprotein (MAG) 遺伝子プロモーター領域をクローニングし、ルシフェラーゼレポーターベクターに組み込んだ。シュワン細胞へ導入し、デリション解析を行うことにより、同遺伝子のシスエレメントを同定した。MAG 遺伝子転写開始点上流、-136位より-117位の20塩基配列

(5'-acaagggccccctttgtgccc-3') がMAG プロモーターにおけるシスエレメントであることが判明した。同部の塩基配列は種間 (ヒト、ラット、マウス) で完全に保存されており、既知の転写因子の結合コンセンサスは含んでいなかった。同部にシュワン細胞核抽出蛋白が結合することをEMSAにより証明した。

判明したシスエレメントをベイト配列に用い、酵母ワンハイブリッドスクリーニングにより、シスエレメントに結合し転写活性を高める新規蛋白、RING finger protein 10 (RNF10) を同定した。RNF10は2000年にコードする遺伝子が新規にクローニングされた蛋白で、機能の報告は、血管平滑筋の分化・増殖を制御する転写因子 Mesenchyme Homeobox 2 (Meox2) に結合し、転写活性を増強するというもの一報のみである。

*in vitro* 翻訳により RNF10蛋白を合成し、シスエレメントを含む2本鎖 DNA プローブとともに EMSA を行った。その結果、DNA-蛋白複合体のバンドが観察され、RNF10蛋白とシスエレメントの結合が証明された。

次に、RNF10のシュワン細胞における機能を検討した。RNF10を発現ベクターを用いてシュワン細胞で強制発現させたところ、MAGプロモーターのルシフェラーゼ活性は上昇した。ルシフェラーゼレポーター単独の導入では活性の上昇が見られなかったROS細胞 (Rat Osteoblast cell line) においても、RNF10を同時発現させることによりシュワン細胞において見られたものほどではないが、活性の上昇が見られた。このことから、RNF10はMAGプロモーターのシスエレメントに作用し転写活性を上昇させているものと考えられた。HAタグで標識したRNF10をシュワン細胞内で発現させ免疫染色すると、RNF10は核内に分布しており、核内で転写調節に関与していることが示唆された。

RNAi技術を用いて、シュワン細胞でRNF10をノックダウンすると、ルシフェラーゼ活性の低下がみられ、またMAGの発現はメッセンジャーレベルでも、蛋白レベルでも低下していることが確認され、RNF10はMAGの発現に必須であることが示された。しかしながら、RNF10のシュワン細胞での強制発現系においてMAG メッセンジャーおよび蛋白の上昇は見られず、RNF10は単独で十分にMAGの転写活性を高めているわけではなく、他の因子の関与が示唆された。このことは前述のROS細胞におけるルシフェラーゼアッセイの結果とも符合するものと考えられる。

細胞増殖アッセイによりRNF10ノックダウンシュワン細胞の増殖能を検討したところ、コントロールの細胞に較べて、増殖能が亢進していた。シュワン細胞はミエリン

形成初期に細胞周期から逸脱し増殖を停止するが、そのメカニズムはほとんどわかっていない。しかし、MAGの発現と共に細胞増殖が停止することから、MAGの発現を制御するRNF10が細胞増殖に何らかの役割を持っている可能性があり、今後の検討課題である。

ここまで、RNF10はシュワン細胞におけるMAG発現に重要な因子であることを明らかにしてきたが、シュワン細胞分化の最終形態であるミエリン形成能に対するRNF10の影響を検討するため、*in vitro*ミエリン形成アッセイを行った。ラット後根神経節より採取したニューロンとシュワン細胞を2-3週間共存培養することで、ミエリンの形成を観察できる。レトロウイルスにより RNF10 siRNA を安定発現させたシュワン細胞を用いて共存培養を行った。コントロールには GFP siRNA の安定発現細胞を用いた。RNF10 遺伝子が抑制されたシュワン細胞はミエリンを形成せず、RNF10 がMAGの発現調節だけではなく、シュワン細胞の分化・ミエリン形成に重要な役割をしていることが示唆された。

今後は、ノックアウトマウス作成などによる、*in vivo*での検証も必要であると考えられる。

本研究により新たに同定された RING finger protein 10 (RNF10) は MAG 遺伝子の転写調節および、シュワン細胞分化・ミエリン形成制御に重要な働きをしているものと考えられる。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。