

## 論文内容の要旨

論文題目 Inositol 1,4,5-trisphosphate signaling mediates  
postnatal Schwann cell development

和訳 イノシトール 1,4,5 三リン酸シグナルを介した  
シュワン細胞の生後発達機構

指導教員 飯野正光教授

東京大学医学系研究科

平成 19 年 4 月入学

医学博士課程

機能生物学専攻

稻生 大輔

末梢神経における運動や感覚の素早い情報処理には、ミエリン鞘が形成された軸索における高速な伝導が重要な役割を果たしている。末梢神経のミエリン鞘はグリア細胞の一種であるシュワン細胞が何重にも軸索を取り巻くことで形成されるが、ミエリン鞘が取り巻かれた軸索部位においては電流の漏出が劇的に減少するため、ランビエ絞輪と呼ばれるミエリン鞘間の狭い隙間に限局した軸索の発火が達成される。軸索の発火はランビエ絞輪間を跳躍して伝導するた

め、ミエリン鞘が形成された軸索においては、ミエリン鞘が形成されていない軸索に比べて、10倍以上もの速さで情報を伝達することができる。

これまでの研究からミエリン鞘の形成には軸索-シュワン細胞間情報伝達が必須であることが提唱されている。それらのうち、神経活動依存性の神経-グリア細胞間情報伝達物質の1つとしてよく知られているATPについては、末梢神経のミエリン鞘形成における生理機能は未だ十分明らかとなっていない。ATPは末梢神経が発火した後に軸索から放出され、シュワン細胞におけるイノシトール1,4,5三リン酸(IP<sub>3</sub>)の産生を介した細胞内Ca<sup>2+</sup>上昇を引き起こすことが知られている。特に、末梢神経におけるミエリン鞘形成と神経の活動は、両者ともに生後まもなくに劇的に増加することから、その関連が注目されている。そこで、本研究では、シュワン細胞においてATPにより惹起されるIP<sub>3</sub>シグナルが生体内におけるミエリン鞘形成に果たす役割を解明することを目的とした。

生体内のシュワン細胞の機能を解析する方法として、これまで遺伝子改変動物が主として用いられてきた。本研究ではより簡便にシュワン細胞の機能解析を推し進めるための方法として、電気穿孔法による外来遺伝子の導入法を独自に開発した。電気穿孔法をラットの坐骨神経に適用することで、シュワン細胞

選択的かつ持続的な遺伝子発現を達成できた。特に、蛍光蛋白質を発現させることで、ミエリン鞘形成と関連のあるパラメータである細胞の長さや太さを光学顕微鏡で解析することができた。

生後のミエリン鞘形成期のシュワン細胞がどの受容体を介して ATP による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇を示すかを明らかにするため、急性単離したラットの坐骨神経を用いて  $\text{Ca}^{2+}$  イメージを行なった。シュワン細胞は ATP と UTP に対して同程度の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇を示すことから、P2Y2 受容体または P2Y4 受容体の関与が推測された。そこで RT-PCR 法を用いて両受容体の坐骨神経における発現を解析したところ、P2Y2R の顕著な発現が確認された。そこで、電気穿孔法を用いて shRNA 遺伝子導入し、シュワン細胞の P2Y2 受容体をノックダウンしたところ、ATP 投与時の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇が抑制された。IP<sub>3</sub> を分解する酵素である IP<sub>3</sub> 5-ホスファターゼ遺伝子の導入を行なったところ、同様に ATP 投与時の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇が抑制された。すなわち、ミエリン鞘形成期シュワン細胞は P2Y2 受容体-IP<sub>3</sub> の産生を介して、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇を惹起することが分かった。

上記の 2 種類のシグナル伝達阻害を慢性的に阻害し、シュワン細胞の発達との関連を解析した。ミエリン鞘形成は生後 2 週間以内に劇的に進行することが

知られているので、生後 3 日目のラットに遺伝子導入を行ない、14 日目にラットを固定しシュワン細胞の形態を解析した。形態の解析は目的遺伝子とともに共発現させた蛍光蛋白質の蛍光を観察することで達成した。すると、P2Y2 受容体をノックダウンした群、IP<sub>3</sub> 5-ホスファターゼを発現させた群ともにシュワン細胞の長さや太さがコントロール群と比較して有意に減少していた。すなわち、P2Y2 受容体-IP<sub>3</sub> の産生を介した細胞内 Ca<sup>2+</sup> 上昇を慢性的に阻害すると、シュワン細胞の発達が抑制されることが分かった。

続いて、下流のシグナル伝達を調べた。まず、既知のミエリン鞘形成促進因子である脳由来神経栄養因子 (BDNF) の関与を調べた。BDNF は Ca<sup>2+</sup> シグナルにより発現制御を受けることが様々な細胞で知られているためである。まず、シュワン細胞に BDNF を過剰発現させたところ、太さの増加が観察された。一方、shRNA を用いてシュワン細胞に発現する BDNF をノックダウンしたところ、長さや太さが減少した。すなわち、シュワン細胞における BDNF の発現量とシュワン細胞の発達に正の相関があることが分かった。続いて、ATP によりシュワン細胞の BDNF の発現が変化するかを解析した。坐骨神経に ATP を投与したところ、BDNF の mRNA の増加が観察された。すなわち、シュワン細胞において ATP による Ca<sup>2+</sup> シグナルによる発現制御機構が存在することが示唆された。よって、IP<sub>3</sub> シグナル阻害に

より BDNF の発現量が減少していることが推測される。そこで、IP<sub>3</sub> 5-ホスファターゼと同時に BDNF を発現させ、形態を解析した。すると、IP<sub>3</sub> 5-ホスファターゼと BDNF を同時に発現した群では、シュワン細胞の長さや太さが、IP<sub>3</sub> 5-ホスファターゼを単独に発現した群と比べて、有意に上昇していた。すなわち、BDNF が IP<sub>3</sub> シグナルの下流の制御因子である可能性が示唆された。

さらに、ErbB シグナルと IP<sub>3</sub> シグナル、さらには BDNF の関連を調べた。ErbB シグナルはミエリン鞘の長さや太さの増加を制御するシグナル伝達として知られているためである。ErbB シグナルを阻害する分子としてドミナントネガティブ型の ErbB (DN-ErbB) を発現させたところ、シュワン細胞の長さや太さが有意に減少した。次に IP<sub>3</sub> 5-ホスファターゼと DN-ErbB 同時発現させたところ、さらなる抑制効果が観察されなかった。また、DN-ErbB と BDNF を同時発現させたが、IP<sub>3</sub> 5-ホスファターゼと BDNF を同時発現させた場合と異なり、DN-ErbB による抑制効果は回復しなかった。これらの結果は、ErbB シグナルが BDNF の下流において機能している可能性を示唆する。

これらの一連の実験から、生体内の坐骨神経において、神経活動依存性の神経-グリア細胞間情報伝達物質である ATP がシュワン細胞の P2Y<sub>2</sub> 受容体を活性化

し、 $IP_3$ - $Ca^{2+}$ -BDNF を介してシュワン細胞の生後発達を促進することが明らかとなった。そして、BDNF の下流においてミエリン鞘形成のキーシグナルである ErbB シグナルが関与する可能性が示唆された。神経活動がミエリン鞘形成に関与するか否かは未だに議論がなされている課題であり、本研究により神経活動に依存したミエリン鞘形成促進機構の一端が明らかとなったと考えられる。