

神経系特異蛋白質 PMP-22 の機能解析ならびに臨床的応用

Functional effects and clinical aspects of PMP-22 on the development for neurogenesis.

代表研究者 慶應義塾大学医学部助手 武田 泰生
Research Associate, Keio Univ. School of Medicine
Yasuo Takeda

PMP22 was identified as a 22kD glycoprotein down regulated after nerve damage and found to be identical to PASII reported previously by our group. Duplication, deletion and point mutation of the gene coding for this protein cause various hereditary neuropathies, such as Charcot-Marie-Tooth and Dejerin-Sottas diseases. We prepared polyclonal antibody against the c-terminal region of PMP22. By histological examination, PMP22 was expressed in all of compact myelin sheath in PNS. In the coculture of DRG neuron with Schwann cells, axonal contact induced a remarkable increase of PMP22 expression in the Schwann cell. In order to determine the role of PMP22 on cell growth, we prepared the cell lines stably expressing PMP22 by transfection of rat PMP22 cDNA. High level of PMP22 expression in C6 cells showed a remarkable suppression of cell growth. After 8 hours exposure to bromodeoxy uridine (BrdU), the uptake of BrdU into PMP22 transfectants was decreased in comparison with control cells. Results confirmed the localization of PMP22 in PNS myelin sheath, the induction of PMP22 by axonal contact and suggested the close relationship between cell growth arrest and PMP22 expression.

研究目的

哺乳類の神経系は、多種多様な細胞群が適切な相互間結合を行なうことにより構築される、複雑な細胞社会である。細胞間認識、細胞移動あるいは突起伸展には多くの細胞接着分子が関与することが明らかにされているが、神経細胞の分裂増殖を停止し、分化を誘導する蛋白質に関する報告は稀少である。最近、growth-arrest-specific (GAS) gene に類似した遺伝子配列を持つ蛋白質 [peripheral myelin protein (PMP22)] が哺乳動物の末梢神経系からクローニングされた。この蛋白質は成熟したシュワン細胞に強く発現しており、細胞増殖の停止や突起伸展の阻害などの生理機能に関与している可能性が示唆されている。末梢神経系の発生に伴い分裂増殖したシュワン細胞は、その後、自らの形態を変えながら神経軸索を重層し、そして周期線および周期間線同志の相互接着により強固なコンパクトミエリンを形成する。末梢ミエリンの正常な形成と機能の維持にはミエリン構成蛋白質群の適切な発現とそれら相互間の正確な機能連絡が極めて重要であると考えられている。一方、Charcot-Marie-Tooth (CMT) 病及び Dejerine-Sottas (DS) 病はミエリン形成不全、オニオンバルブの形成、再ミエリン化を主徴とする常染色体優性遺伝性神経疾患であるが、それぞれ CMT type 1A は PMP22、type 1B は P0、type X は connexin 32 等のミエリン構成蛋白質の発現異常に起因していることが報告された。このように临床上でも PMP22 の機能解析が急務となっている。そこで我々は末梢ミエリンの形態形成に関わる分子機構の解明を目的として、本研究では、特に CMT type 1A 原因遺伝子の PMP22 に着目し、抗体を用いた PMP22 の組織内分布、時間的空間的な発現のタイミング、PMP22 強制発現細胞株の樹立及び細胞の分裂増殖における PMP22 過剰発現の影響について検討を行った。

研究経過

まず抗PMP22抗体の作製を行った。ラット及びマウスPMP-22に共通なC末端部分12個のアミノ酸配列に相当するペプチドを合成し、逆相HPLCにて分離精製した。これを抗原として家兔に免疫しポリクローナル抗体を作製した。Wigginsらの方法に従いラット、

マウスおよびヒトの坐骨神経から、また Norton らの方法に従いコイの脳から、それぞれミエリン画分を調製し、SDS-PAGE 及びウエスタンブロッティング後、PMP-22 抗体の免疫染色を行った。その結果、マウス、ラット及びヒト末梢ミエリン画分では分子量約 20-24kD 部分に主要なバンドが検出された。一方、コイの脳には哺乳動物の末梢神経系の P0 様蛋白質が存在することが知られているが、PMP22 抗体に反応するバンドは検出されなかった。成熟ラットの坐骨神経から厚さ $8\mu\text{m}$ の凍結切片を作製し、免疫組織染色を行った結果、PMP22 はミエリン鞘のラメラ層構造部分に強く発現することが認められた (図 1-A)。この分布は主要な末梢ミエリン蛋白質である P0 のそれと同様であった。次に末梢神経系発生過程における PMP22 の発現様式を、新生マウスの脊髄後根神経節細胞とシュワン細胞の共培養系を用いて検討した。まず、出生直後のマウスから脊髄後根神経節細胞ならびにシュワン細胞を採取し、poly-L-lysine をコートしたカバーガラス上でそれぞれ 7 日および 40 日間初代共培養した。3% パラホルム-PBS 溶液で固定した後、PMP-22 抗体を用いて免疫反応を行った。その結果、培養初期に見られる未成熟シュワン細胞では PMP22 の発現は極めて弱い (図 1-C) が、神経軸索伸長に伴い軸索周囲に接着したシュワン細胞では PMP22 の強い発現が認められた (図 1-D)。即ち、この結果は分裂増殖段階にある未分化なシュワン細胞が軸索からの情報で成熟しそして分化誘導を受ける過程で、この蛋白質が特異的に発現することを示唆しており、PMP22 がシュワン細胞の増殖停止並びに分化誘導に関与する可能性を示唆する結果であった。PMP22 の発現が細胞の分裂増殖機構に実際に関与することを直接明らかにする為に PMP22 強制発現細胞を樹立し細胞の増殖に与える影響を検討した。まず発現細胞株の確立を目的に、成熟ラットの坐骨神経から調製した総 RNA を鋳型として逆転写および polymerase chain reaction (PCR) を行い、ラット PMP22 蛋白質領域をコードする cDNA をクローニングした。次に β -アクチンプロモーターにより制御される pBActSTneo 発現ベクターに挿入し、これをリン酸カルシウム

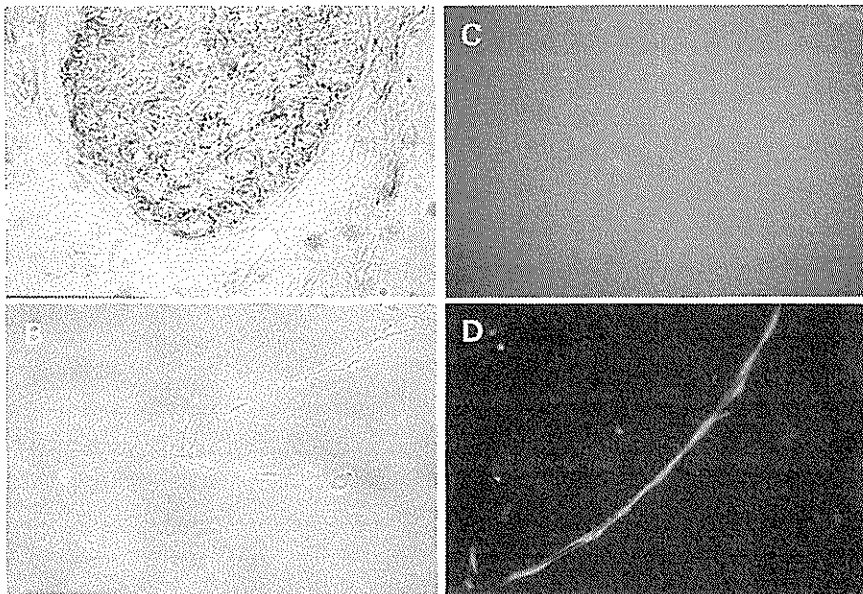


図1. (A)成熟ラット坐骨神経における PMP22 の発現。ラット坐骨神経厚さ $3\mu\text{m}$ の凍結切片を作製し、100 倍希釈した抗 PMP22 抗体を用いて免疫組織染色を行った。P0 蛋白質と同様にコンパクトミエリンに発現している。アクソンには発現は見られない。(B~D) シュワン細胞—神経細胞の共培養における PMP22 抗体を用いた蛍光免疫細胞染色。(B) 7 日間培養後の phase contrast、(C) 7 日間培養後の蛍光免疫染色、(D) 40 日間培養後の蛍光免疫染色。(bar= $100\mu\text{m}$)

共沈法によりラット C6 グリオーマ細胞に導入、強制発現細胞株を樹立した。これらの細胞株を用いて PMP22 発現による細胞増殖への影響を検討した。実験は形質導入していない対照 C6 細胞、ネオマイシン耐性遺伝子のみを導入した C6neo 細胞およびクローン化した 3 種の PMP22 発現細胞 (#10、#26 および #30) の計 5 種の細胞をそれぞれ 10% 牛胎児血清含有 DMEM 培養液 3 ml に 1×10^4 個ずつ播き、経日的に細胞総数を計測した。その結果、C6 および C6neo 細胞が著明な細胞増殖を示したのに対し、PMP22 発現細胞はその発現量に依存して細胞の増殖を低下させた (図2)。細胞分裂能に及ぼす PMP22 発現の影響を更に詳細に検討する為、C6neo 細胞およびクローン #10 細胞への BrdU の取込みを比較した。C6neo 細胞では計測した細胞数の約 75% が BrdU 陽性細胞であったのに対し、クローン #10 細胞では約 50% であった。

研究成果

PMP22が近年注目されるようになったが、欧米においてポピュラーな遺伝性ニューロパチーである Charcot-Marie-Tooth(CMT)病や Dejerine-Sottas(DS)病、またこれらの疾患と同様の神経症状を呈する振戦変異マウスで PMP22 の遺伝子異常の報告が相次いだことによる。しかしこのように遺伝子レベルでの研究が進む一方でこの蛋白質が末梢神経ミエリンの形成および維持にどのように関わっているのかは不明のままであった。PMP22 遺伝子の異常による CMT type 1A は、一家系では遺伝子欠損による蛋白発現量の低下、他家系では遺伝子重複による発現量の増加が認められるものの、両者共にミエリンの形成異常 (脱髄、オニオンバルブ形成、再ミエリン化) が観察されており、ミエリンの形成及び維持には他のミエリン構成蛋白質との量的バランスが重要である可能性が考えられる。実際に P0、PMP22、connexin32 という 3 種類のミエリン構成蛋白質の遺伝子異常に起因する CMT や DS (表1) は、ミエリンの損傷の程度にほとんど差が見られない。P0 と connexin 32 は、明らかに異なった機能を持つ蛋白質である。即ち P0 はその強力な接着能力でコンパクトミエ

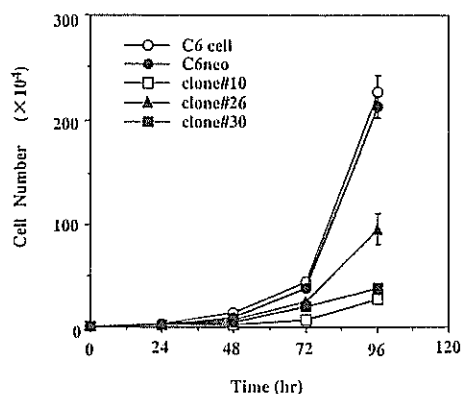


図2. PMP22 発現による細胞増殖抑制効果。各細胞の 1×10^4 個を 6 cm 培養皿に播き、24 時間毎に細胞数を計測した。C6 cell、ラット C6 グリオーマ細胞; C6neo、ネオマイシン耐性遺伝子のみを形質導入した C6 細胞; clone#10、#26 及び clone#30、PMP22 遺伝子導入細胞。

疾患	異常のある蛋白質	変異
Charcot-Marie-Tooth 病 タイプ IA	PMP22	点変異 (homo) 118 T→M 点変異 (homo, hetero) 16 L→P 79 S→C 重複 (homo, hetero)
Charcot-Marie-Tooth 病 タイプ IB	P0	点変異 (hetero) 67 K→E 61 D→E 34 S→欠損
Charcot-Marie-Tooth 病 タイプ X	Connexin 32	点変異 (hetero) 12 C→S 139 V→M 142 R→W 156 L→R 172 P→S 186 E→K フレームシフト 175塩基対 A/T の挿入
Dejerine-Sottas 病	PMP22 P0	点変異 (hetero) 69 M→K 72 S→L 34 S→C 138 G→R

表1. 代表的遺伝性運動感覚性ニューロパチーの種類とその原因蛋白質

リンの構造を形成、維持する機能を持ち、connexin 32は形成したgap junctionを介して、コンパクト化したミエリン鞘膜への物質の移動、栄養の補給をつかさどりミエリンの形態維持に機能していると考えられる。今回の研究結果は、PMP22の発現がシュワン細胞の成熟過程に深く関与しており、増殖停止、分化誘導機能を有することが明らかとなった。事実、CMT病type 1A患者或は振戦異常マウスの坐骨神経では脱髄、ミエリン形成不全が観察されるものの、シュワン細胞の数自体は増加していることが認められており、今回の研究結果と考え併せると、PMP22発現異常によるCMT病type 1Aはシュワン細胞の成熟異常に起因している可能性を示唆する。従って、正常なミエリン形成、維持の為にはPMP22の発現量を一定レベルに保つ必要があり、P0やconnexin 32等のミエリン構成蛋白質との量的・機能的バランスが、ミエリンの形態形成及び機能維持に重要であろうと推測される。

今後の課題と発展

これまでに明らかにされた遺伝性ニューロパチーのうち約80%はPMP22遺伝子の重複による発現量異常に伴う発症であることが認められている。従って1.5倍に増加した発現量を正常な量に補正することが可能であれば約80%の遺伝性ニューロパチーは治療できることになる。現在、遺伝子治療を目的としたレトロウイルスベクターへのアンチセンス遺伝子の導入及び初代培養したシュワン細胞へのウイルス感染機構を利用したPMP22発現量の調節等の実験を行っている。末梢神経系の発生過程においてシュワン細胞の増殖時にPMP22センス或はアンチセンス遺伝子を導入したウイルスを感染させ、それぞれ遺伝子欠損或は重複して変化した発現量を正常に戻す治療を行うことを目的に、感染効率、発現量調節、発現のタイミングの調節等の研究を進める方針である。更に、他のミエリン構成蛋白質であり、かつ、CMT病の原因蛋白質であるP0やconnexin 32との機能的連関を詳細に検討しミエリンの形態形成ならびに維持機構を解明して行きたいと考えている。

発表論文リスト

1. Uyemura, K., Takeda, Y. and Asou, H. (1994) Neural cell adhesion proteins and neurological diseases. *J. Biochem.*, 116: 1187-1192.
2. 武田泰生、植村慶一. (1994) 神経系の形態形成における L1 の機能. (宮坂昌之編. 細胞工学別冊「接着分子ハンドブック」) 179-189.
3. 武田泰生、植村慶一. (1994) P0. (宮坂昌之編. 細胞工学別冊「接着分子ハンドブック」) 192-193.
4. 宮崎唯雄、武田泰生、川野仁、嶋津孝、戸谷重雄、植村慶一. (1994) 末梢神経系における PASII/PMP22 および connexin 32 の分布. *神経化学*, 33: 436-437.
5. Uyemura, K., Asou, H. and Takeda, Y. (1995) Structure and function of peripheral nerve myelin protein. *Prog. Brain Res.*, 105: 311-318.
6. Asou, H., Hamada, K., Miyazaki, T., Sakota, T., Hayashi, K., Takeda, Y., Marret, S., Delpech, B., Itoh, K. and Uyemura, K. (1995) CNS myelinogenesis in vitro: Time course and pattern of rat oligodendrocyte development. *J. Neurosci. Res.*, 40: 519-534.
7. Schreurs, J., Yamamoto, R., Lyons, J., Munemitsu, S., Conroy, L., Clark, R., Takeda, Y., Krause, J.E. and Innis, M. (1995) Functional wild-type and carboxy-terminal-tagged rat substance P receptors expressed in baculovirus-infected insect Sf9 cells. *J. Neurochem.*, 64: 1622-1631.
8. 武田泰生、宮崎唯雄、植村慶一. (1995) 末梢ミエリン構成蛋白質 PASII/PMP22 の機能解析. *神経化学*, 34: .
9. Guard, S., Zarnegar, R., Takeda, Y., Krause, J.E., Watling, K.J. and Quirion, R. (1995) Demonstration of NK2B tachykinin receptors in rat brain using [¹²⁵I]neuropeptide γ . *Euro. J. Pharmacol.* (in press).
10. Miyazaki, T., Takeda, Y., Murakami, Y., Kawano, H., Shimazu, T., Toya, S. and Uyemura, K. (1995) Distribution of PASII/PMP22 and connexin 32 proteins in the peripheral nervous system. *Neurochem. Int.* (in press).