

# 大豆イソフラボンによる末梢神経脱ミエリン病の改善効果に関する研究

山内淳司\*

国立成育医療センター研究所 薬剤治療研究部

## The Protective Effect of Genistain in Charcot-Marie-Tooth Disease

Junji YAMAUCHI

Department of Pharmacology, National Research Institute for Child Health and Development,  
Tokyo 157-8535

### ABSTRACT

Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease is the most common inherited neuropathy (1/2,500 people) of the peripheral nervous system (PNS) and is genetically and clinically heterogenous. CMT disease is characterized by progressive sensory neuron loss, and weakness beginning first in the legs and latter in the hands. Based on nerve electrophysiology, most patients with CMT are categorized into two major types: CMT disease type 1 (CMT1) and CMT disease type 2 (CMT2). Recent molecular genetic investigations have established that clinical and neurophysiological features of the different CMT subtypes are largely associated with defects of different types of genes. In CMT1, nerve conduction velocity is less than 38 m/s. The genes involved in CMT1 participate in Schwann cell development and maintenance of myelin structure. CMT2 has preserved nerve condensation velocity but decreased action potentials, showing frequent loss of nerve fibers. The genes responsible for CMT2 appear to constitute molecular connections necessary for axonal stability. Although many CMT disease-responsible genes and mutations have been identified, it still remains to be understood what compound protects against nerve fiber loss and how it helps to reverse it. We recently established the *in-vitro* demyelinating model of CMT1 subtype A, the most frequent CMT1. We herein identify that genistain, a soybean product, greatly helps to improve the *in-vitro* model. Furthermore, we find that this effect is mediated by the neurotrophin-neurotrophin receptor system and the downstream signaling pathway. As far as we could ascertain, this is the first report that a soybean product can protect against CMT1. *Soy Protein Research, Japan* **13**, 125-127, 2010.

---

\*〒157-8535 世田谷区大蔵2-10-1

Key words : Charcot-Marie-Tooth disease, peripheral neuropathy, genistein, protein kinase

中枢神経系と末梢神経系の2種類の系からなる神経組織は、典型的には神経細胞とグリア細胞から構成される。しかし、2つの系の間には多くの共通点はあるものの、多くの相違点も存在する。グリア細胞は、中枢神経系では、神経伝導の絶縁体として働くミエリンを形成するオリゴデンドロサイトと、主に神経細胞への栄養供給を補助するアストロサイトなどが知られている。これに対して、末梢神経系においては、シュワン細胞が主要なグリア細胞であり、オリゴデンドロサイトとアストロサイトの機能を併せ持つ。申請者らは、末梢神経系の発生過程の分子機構を調べるために、試験管内でその過程を再現することを試み、シュワン細胞とDorsal Root Ganglion (DRG) 神経を別々に精製し、初代共培養系を構築することに成功した。本研究は、シュワン細胞-DRG神経細胞共培養系を応用することにより、運動感覚性ニューロパチーの病態発症を再現できる培養系を確立し、治療薬のない運動感覚性ニューロパチーの治療改善生理活性物質を単離し、新しい治療方法を確立することを目的としている。

## 方 法

病態発症共培養系を確立することを目的として、病態モデルマウス（遺伝性の末梢神経変性症の50%を占めるIA型CMT病原遺伝子PMP22の点変異を有する自然発症型のモデルマウスであるトランペラー (Tr) やトランペラーJ (TrJ) を中心にいくつかの変性症モデルマウスを対象としている。）からシュワン細胞とDRG神経細胞を精製し、共培養を行う。この試験管内実験系は動物個体を用いる薬物投与実験とは異なり、開放系であるために各種のスクリーニングに適している。それは、より生体に近いかたちとして、座骨神経由来の繊維芽細胞を培養シャーレの底に一層生やすことにより、上層のシュワン細胞と神経細胞の安定した共培養が得られるという技術である。ここで観察される脱ミエリン現象は不完全なミエリンやミエリン層が薄いものが多く、それによってシュワン細胞が死滅に至るわけではないため、最終的な評価段階まで共培養を問題なく継続することができる。また、この病態ミエリンは電子顕微鏡レベルで生体内とほぼ同一であることを確認している。この実験系を用いて、当研究室で所有している生理活性物質ライブラリーから脱

ミエリン現象を抑制する治療候補分子を単離する。現在、ひとつの課題として、より大規模なスクリーニングを行うために一回の実験に用いる細胞数を減らす必要がある。また、もうひとつの今後の課題としては、実験結果の評価を迅速かつ大量にしなければならないため、ハイスループットの技術を導入しなければならない。それは、ミエリンマーカーたん白質の発現をドットプロット法で調べるか、または、高感度蛍光物質を架橋させたモノクローナル抗体で直接的に多検体ミエリン染色を行うなどの方法がある。

## 結 果

末梢神経脱ミエリンCMT病の症状を示すマウス初代培養細胞を用い、上述した試験管内での病態発症培養系が可能であることを見出した。なかでも、若年期から重症になりやすいIA型のCMT病（4回膜貫通型たん白質PMP22の変異）モデルマウスのシュワン細胞を用いた系が可能であることが判明した。座骨神経繊維芽細胞を培養シャーレの底に一層生やすことにより共培養が安定したとは言え、確実に毎回再現性がとれるわけではないのが現時点の問題点であるはある。しかし、できる限り実験例数を増やすことによりスクリーニング系としては成り立ってきている。そこで、この共培養系を用い低分子化合物ライブラリーからミエリン脱落症状を改善するものをスクリーニングしたところ、いくつかの改善物質が得られた。なかでも、大豆由来化合物ゲニステインが強い脱ミエリン現象の抑制効果を持つことが判明した。この骨格を有する化合物は、広範囲なキナーゼ阻害作用を示すことが分かっているが、標的となるキナーゼ群は一般的に受容体チロシンキナーゼや細胞質チロシンキナーゼであることが報告されている。

## 考 察

はじめに、最近我々が見出したミエリン発生のメカニズムに関して述べる。ミエリン形成過程は3つの過程、すなわち、(1)神経軸索上でのシュワン細胞遊走期、(2)前ミエリン形成期、(3)ミエリン形成期、に分けられる。しかし、現在までこれらの過程を制御する細胞外液性因子は不明であった。申請者らは、はじめに、

DRG神経で2種類の神経栄養因子(神経栄養因子3(NT3)と脳由来神経栄養因子(BDNF))がそれぞれ発生時間軸依存的に異なった時期に発現し放出され、シュワン細胞によるミエリン形成に対して逆の作用をもつ<sup>1,2)</sup>。

次に、過程(1)のシュワン細胞の遊走を制御するシグナル伝達機構を詳細に調べた<sup>1,2)</sup>。その結果、NT3はシュワン細胞上のNT3特異的チロシンキナーゼ型受容体TrkCを介して、Rhoファミリー低分子量GTP結合たん白質Rac1およびCdc42とその下流のJunキナーゼを活性化し、細胞遊走を促進することが明らかになった。また、DRG神経由来のニューレグリンもこの過程を促進することが判明した<sup>2,3)</sup>。一方、BDNFは低親和性神経栄養因子受容体p75NTRを介し、非受容体型Srcチロシンキナーゼを活性化し、Rac1とCdc42と逆の機能をもつとされるRhoAとそのエフェクターであるRhoキナーゼを経て細胞遊走を阻害することが分かった。どちら場合も、神経栄養因子がシュワン細胞上の受容体に結合し、チロシンキナーゼ活性→低分子量GTP結合たん白質→セリンスレオニンキナーゼという類似性の高い分子群からなる経路を介するが、おそらく生理的作用が拮抗する異なった分子を介して細胞遊走を正負に制御していることが示唆された。また、同時にこれらのシグナル伝達経路は、過程(2)や過程(3)において

も、拮抗的な経路を形成し、重要な役割をしていることが分かってきた。

ここで、ゲニステインが何故脱ミエリン現象を抑制できるかに関して考察する。脱ミエリン現象を抑制する手段としては、強制的に通常のみエリン形成過程を進行させるか、生理的なみエリン形成抑制シグナルを解除させるかのどちらかが有効であると考えられる。現在、我々のスクリーニング結果から、ゲニステインは後者に関与していることが判明した。つまり、NT3とその受容体TrkC以下のRac1とCdc42経路のどこかが、その作用ポイントであることが分かってきた。さらに、ごく最近ゲニステインは、シュワン細胞で重要な役割をもつErbB3複合体チロシンキナーゼ型受容体も阻害することが判明した。従って、ErbB2とその下流のシグナル伝達経路も、それらの分子標的である可能性が示唆された。この場合も、生理的なみエリン形成抑制シグナルを解除させる効果があるようだ<sup>1-3)</sup>。

今後、ゲニステインの分子標的を正確に同定し、今まで存在しなかったIA型CMT病特異的治療薬の開発に貢献したい。以上、不二たん白質研究振興財団研究補助金により、これらの研究を遂行できたこと、および未だ難病指定を受けていない神経変症に関する参考文献以外の萌芽的な研究が行えたことに関しまして、財団法人病態代謝研究会に深く感謝致します。

## 要 約

2,500人に1人の割合で発症すると報告されている進行性の末梢神経変性症であるCharcot-Marie-Tooth (CMT) 型脱髄(脱ミエリン)疾患は、現在、有効な治療薬がない疾患のひとつである。本研究では、申請者らが独自に構築した試験管内末梢神経共培養系を応用して、生理活性物質ライブラリーからスクリーニングを行い、ゲニステインを見出した。今後、さらに、疾患モデル動物を用いてゲニステインの評価を行う。

## 文 献

- 1) Yamauchi J, Chan JR, Miyamoto Y, Tsujimoto G and Shooter EM (2005): The neurotrophin-3 receptor TrkC directly phosphorylates and activates the nucleotide exchange factor Dbs to enhance Schwann cell migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 5198-5203.
- 2) Yamauchi J, Miyamoto Y, Chan JR and Tanoue A (2008): ErbB2 directly activates the exchange factor Dock7 to promote Schwann cell migration. *J. Cell Biol*, **181**, 351-365.
- 3) Yamauchi J, Miyamoto Y, Torii T, Mizutani R, Nakamura K, Sanbe A, Koide H, Kusakawa S and Tanoue A (2009): Valproic acid-inducible Arl4D and cytohesin-2/ARNO, acting through the downstream Arf6, regulate neurite outgrowth in N1E-115 cells. *Exp. Cell Res*, **315**, 2043-2052.