

脱髄疾患モデルを用いた新しい脱髄メカニズムの解明

旭川医科大学 解剖学講座 機能形態学分野

板東 良雄

1. はじめに

多発性硬化症 (Multiple sclerosis, MS) は中枢神経における難治性の慢性炎症性脱髄疾患に分類されるが、その名が示すように空間的および時間的(寛解・再発の繰り返し)に病巣が多発し、髄鞘(ミエリン)の脱落(脱髄)が認められる。また、脱髄した神経は2次的に軸索退縮、軸索変性(神経変性)へと至ると考えられている。脱髄は脊髄損傷やアルツハイマー病などの神経変性疾患でも認められるため、人為的な軸索変性の抑制や再髄鞘化を促す治療法が期待されているが、その効率的な誘導には至っておらず、根治療法は存在しないのが現状である。さらに最近になって、統合失調症、鬱病ならびに自閉症といった精神疾患においても脱髄が関与していることが次々と報告されており、脱髄の病態を人為的に制御する方法の開発は国家的急務であると言っても過言ではない。

一方、我々はマウス MS モデルである実験的脳脊髄炎モデル(EAE)を用いて、脱髄および再髄鞘化の分子機序の解明を目指した研究を展開している。最近、電子顕微鏡の新しい技術を開発することに成功し、髄鞘および軸索が EAE 発症時および再髄鞘化時に極めて劇的に形態変化を起こし、従来までとは異なる脱髄および軸索変性像が認められることを世界に先駆けて見出した。

本研究では、髄鞘および軸索の形態学的変化の特徴と病理学的意義を明らかにすることによって、従来までの概念とは異なった新しい脱髄機序の概念を提供することを目的とした。これらの知見はMSの根治療法に対する新規治療戦略や創薬の上で非常に重要であると考えられた。

2. 方法

(1) 病態モデル(Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: EAE)の作成

C57BL/6 雌マウスに MOG35-55 ペプチドをアジュバンドとともに免疫した。また、百日咳毒素を腹腔内に投与した。臨床症状は麻痺の程度を指標に5段階で評価した。

(2) オスミウムマセレーション法を用いた新しい走査型電子顕微鏡(SEM)技術

本法(OS-SEM 法)は低濃度のオスミウムを組織に浸透させることにより、細胞内の蛋白質を選択的かつ戦略的に除去できる方法であり、髄鞘および軸索といった膜成分で構成される構造の形態学的変化をより詳細に観察することができる。この方法は従来から用いられる透過型電子顕微鏡(TEM)による観察像をよく反映しているが、2重に形成される髄鞘や髄鞘から外れる軸索の詳細な様子が立体的に観察されるだけでなく、軸索内に存在する滑面小胞体などの軸索内の細胞内小器官の構造についても詳細に観察できる点で極めて優れた技術である。この技術を用いて EAE 発症時の髄鞘と軸索の形態学的変化を検討した。

(3) 軸索障害時における軸索内の形態学的特徴の観察

OS-SEM 法により、脱髄および軸索障害時に認められる軸索内小器官(ミトコンドリアおよび滑面小胞体)の構造変化に着目した。

(4) 軸索内小器官の構造変化の特徴と神経機能

上記で得られた知見をもとに、ミトコンドリアのマーカーとして COXIV, 滑面小胞体のマーカーとして calnexin を用いて蛍光2次抗体を用いた多重染色により免疫組織化学法にて軸索内のミトコンドリアおよび滑面小胞体を可視化し、脱髄および再髄鞘化におけるこのような軸索内細胞内小器官の変化が軸索保護に関与するか否かについて検討した。

(5) 劇的な構造変化を起こす原因の同定とその制御法の可否の検討

構造変化を起こす原因として周囲に存在する炎症細胞の有無や軸索の変性などが考えられるため、髄鞘あるいは軸索の形状を MBP（あるいは neurofilament）で可視化し、炎症細胞の同定にはミクログリア (Iba-1) や各種免疫系細胞マーカー (CD4, CD8, CD11c, CD19 など) 等を用いて免疫組織化学法により明らかにした。

(6) 脱髄時における axo-oligodendroglial interaction に関与する接着因子の発現検討

髄鞘の過形成や軸索から離れる際、軸索-髄鞘(オリゴデンドロサイト)間に何らかのシグナル伝達が存在すると考えられる。そこで、軸索-髄鞘間に存在する接着因子群(L1, MAG, caspr, Nogo, connexin29 など)の発現変化を免疫組織化学法により検討した。また、脱髄関連セリンプロテアーゼ Kallikrein 6(KLK6, 本教室のオリジナル分子)の発現および分子局在も併せて検討した。

3. 結果

(1) EAEにおける髄鞘・軸索内構造の変化

EAEを誘導することによって、髄鞘はまずコンパクトなまま軸索からはずれることが脱髄の初期変化として現れることを明らかにした。これまでの脱髄の概念では、髄鞘がルーズになってほどけるような像が想定されていたが、そのような所見は本方法ではほとんど検出できなかった。一方、透過型電子顕微鏡観察用に作成した試料においては従来から報告されているような像が検出できた。一般的に透過型電子顕微鏡観察に供する試料を作成する際、髄鞘構造が崩れることも知られており、脱髄の初期変化を見出すには本手法がより優れていると考えられた。

髄鞘が軸索から乖離した後、髄鞘の過形成を起こすことも明らかとなった。また、このような髄鞘変化を伴う軸索内では滑面小胞体の著しい発達とともにミトコンドリアが多数集積することが明らかとなった。一方、再髄鞘化が認められるクプリソン投与モデルでは異常な髄鞘構造はほとんど認められず、あたかも無髄線維のような軸索が多数認められ、その後の再髄鞘化も確認できた。つまり、再髄鞘化には異常な髄鞘構造が存在しないこと、また軸索内腔の軸索内小器官の構造変化が生じていないことが重要であることが明らかとなった。

(2) 異常な髄鞘構造および軸索内小器官の変化を伴った軸索の運命

上記で認められた異常な髄鞘構造および軸索内小器官の変化を伴った軸索がどのような運命をたどるのかについて免疫組織化学法を用いて検討した。通常、中枢神経系の組織染色は凍結切片が好まれる(パラフィン切片よりも抗体の反応性が良いため)が、凍結切片では5-6μm程度の切片を作成するのが限界であり、脊髄軸索の神経線維の太さを考えると1枚の切片には複数本の線維が入ってしまうため、連続切片を用いたとしても3種類以上の分子種を同時に染色することは困難である。そこで、エポン樹脂包埋した後に超薄連続切片を作成(500nm)し、脱エポン後に免疫染色法を行う手法を開発した。この方法では原理的に6重染色(うち1種は重ね合わせ用)が可能となった。その結果、上記で認められた軸索では、IP3R1陽性の滑面小胞体が軸索内で著しく発達し、そのような部位にはCOXIV陽性のミトコンドリアの集積が認められた。また、MBPの染色により髄鞘構造の変化も認められ、軸索変性のマーカーであるAPPも陽性となった。すなわち、軸索変性を起こしていることが明らかとなった。

(3) EAEにおける非炎症性脱髄病変の検討

異常な髄鞘構造の変化はEAEにおける炎症部位に特異的な現象ではなく、非炎症部位でも認められた。また、このような変化は炎症細胞の全く認められないEAE誘導後3日目という非常に早期から起こっていることが明らかとなった。これまで、EAEにおける脱髄は主に炎症細胞の浸潤による炎症性脱髄のみが着目されていたが、本研究結果から非炎症性脱髄の存在も明らかとなった。すなわち、中枢神経系の細胞が積極的に脱髄を誘発している可能性が示唆された。

(4) EAEにおけるKLK6の関与

当教室ではKallikrein 6(KLK6)という脱髄関連因子に着目した研究も行っている。KLK6はEAEでも誘導され、主にオリゴデンドロサイトに発現するセリンプロテアーゼであり、積極的に脱髄に関与していると想定している。そこで、KLK6 KOマウスを用いて脱髄におけるKLK6の関与について検討した。KLK6 KOマウスでは髄鞘-軸索間の接着構造が保持されており、髄鞘が軸索から乖離する像はほとんど認められなかった。すなわち、KLK6が髄鞘-軸索間の接着構造を切断し、脱髄の初期変化を起こしている可能性が示唆された。また、予備実験において、髄鞘-軸索間の接着因子を切断する活性があることが明らかになった。

4. まとめと考察

脱髄という病態は多くの研究者にとってあまり馴染のないマイナーな病態であるが、多くの神経・精神疾患に関係していることが次々と報告されている。しかしながら、国内での研究者人口もまだ少なく、世界的に見ても非常に優れた成果であってもあまり評価されていないのが現状であり、先日の報告会でも実感した。脱髄の病態解明の重要性や本研究の意義をこれまでに以上にアピールしていかなければならないと痛感している。

助成を頂いてからの1年間で以下のような知見を得ることができ、脱髄の病態解明が革新的に進んだと考えられた。そのほとんどがこれまでの概念を大きく覆すものであることを特記したい。例えば、本研究によって明らかになった脱髄像は従来までの概念とは大きく異なるものであった。また、再髄鞘化を誘導するためには脱髄病変の再構築が重要であることが明らかとなった。つまり、単純に幹細胞を移植するような方法や投薬では効果的な再髄鞘化は期待できないことを意味する結果となった。さらに、再髄鞘化を促進するためには軸索の保護が極めて重要であり、軸索変性を防ぐ戦略も必要であると考えられた。

本研究ではまた、脱髄の分子機序についても以下のように明らかにした。①炎症によりオリゴデンドロサイトから脱髄関連因子であるKLK6が分泌され、軸索髄鞘間の接着分子を切断することにより、脱髄が誘導される、②オリゴデンドロサイトの機能異常によりミエリン化関連因子の発現量が増加し、髄鞘の過形成が促進される (excess myelin folding)、③同時に軸索内におけるエネルギー代謝異常が起こり、ミトコンドリアの集積ならびに滑面小胞体の異常な発達が起こる、④状況が改善されない場合、恒常性の破綻により、軸索変性が生じるといった脱髄から軸索変性に至るまでの一連の新しい脱髄分子機序を世界で初めて明らかにすることができた。今後、多発性硬化症研究のみならず、精神疾患領域など、脱髄の関連する病態研究にも応用する予定である。

5. 謝辞

本研究を推進するにあたり、アステラス病態代謝研究会の関係各位に深謝申し上げます。

6. 発表論文、参考文献

学会発表

1. 板東良雄、野村太一、暮地本宙己、村上公一、田中達英、渡部剛、吉田成孝 「脱髄疾患モデルマウスにおける髄鞘-軸索間の形態変化」 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会（高松） 2013年3月
2. 板東良雄、野村太一、村上公一、田中達英、暮地本宙己、渡部剛、吉田成孝 「脱髄モデルマウスにおける髄鞘と軸索の形態学的解析」 Neuro 2013（第36回日本神経科学大会・第56回日本神経化学学会大会・第23回日本神経回路学会大会 合同大会）（京都） 2013年6月
3. 板東良雄 「脱髄性疾患モデルマウスを用いた脱髄機構の解析」 第14回 ORIGIN 神経科学研究会 夏のワークショップ 2013（下呂） 2013年8月
4. 板東良雄「マウス多発性硬化症モデルにおける Kallikrein 6 を介した脱髄機序の解析」第 59 回日本解剖学会・東北・北海道支部地方会（札幌）2013 年 9 月
5. 板東良雄、暮地本宙己、村上公一、田中達英、渡部剛、吉田成孝 「実験的自己免疫性脳脊髄炎モデルで認められる軸索変性の形態学的解析」 グリア研究会（仙台）2013 年 10 月

論文発表

1. Nomura T, **Bando Y**, Bochimoto H, Koga D, Watanabe T, Yoshida S. Three-dimensional ultra-structures of myelin and the axons in the spinal cord: application of SEM with the osmium maceration method to the central nervous system in two mouse models. Neurosci Res. 2013 Mar;75(3):190-7. **First three authors equally contributed to this work.**