

脳脊髄の組織修復を維持する分子メカニズムの解明

国立精神・神経医療研究センター神経研究所
神経薬理研究部
村松 里衣子

炎症や外傷により脳や脊髄の組織が傷つくと、傷ついた部位に応じて知覚、記憶、学習などの高次脳機能に障害があらわれたり、呼吸や心拍、運動機能や感覚などにも様々な機能不全が生じる。症状を緩和させる方法として、傷害による細胞死を免れた神経系細胞を修復させることが有望と考えられており、傷ついた神経回路の修復を促すことで症状の改善が導かれることが期待されている (Muramatsu R and Yamashita T, *Neurosci. Res.* 2014;78, 45-49)。個体発生時の神経回路の盛んな形成と比較し、成体では神経回路の修復は難しい。修復しにくくなる機序には、全身性と脳内の分子メカニズムの寄与が推察されているが、例えば神経回路の機能的な再建に重要な髄鞘の修復に関しては、幼若マウスと高齢マウスを外科的に結合させて循環系を共有する手法を用いた検討から、高齢マウスの循環系環境に幼若マウスの環境を暴露されても髄鞘の修復力は若齢マウスと比較し弱いと指摘されている (Ruckh JM et al, *Cell Stem Cell.* 2012;10 (1) :96-103)。このことから、加齢にともなう髄鞘の修復力低下を制御する機序は、脳内に備わることが推察される。

髄鞘は、グリア細胞の一種であるオリゴデンドロサイトによって構成される。オリゴデンドロサイトはその前駆細胞 (Oligodendrocyte precursor cells, OPCs) の分化した状態であり、OPCもオリゴデンドロサイトも脳や脊髄に広範に

分布しており、生涯を通じて脳や脊髄に備わると、老齢マウスや高齢のヒト検体を用いた解析で報告されている。また、高齢者では、たとえ健常であっても髄鞘の形態学的な不良の所見がしばしば認められる。髄鞘の形態学的な不良の原因には複数の概念が提示されており、例えば慢性炎症による髄鞘の脱落など外因的な機序などがあげられる。ただ、個体発生における髄鞘形成に関しては、内因性の機序も重要と考えられているため、高齢個体における髄鞘形成不良には、オリゴ

デンドロサイト側の内在性の原因もある可能性がある。高齢個体におけるOPCおよびオリゴデンドロサイトについては、その発達様式についての観察研究がヒトでもかなり進められている。OPCから髄鞘化までのプロセスには、OPCが増殖して自己複製をし、オリゴデンドロサイトへ分化し、さらに細胞が成熟することが求められる。OPCの増殖自体は高齢者であっても生じている様子が観察されているが、髄鞘化が不良で、このことからOPCの増殖以降の髄鞘化の過程、特にOPCからオリゴデンドロサイトへの分化力が低下していると推察されている。加齢に伴うOPCの分化力低下の詳細なメカニズムは不明であるが、オリゴデンドロサイト側のヒストンの脱メチル化を阻害することで加齢による髄鞘修復力の不良が改善すると報告されている (Shen et al., *Nat Neurosci.* 2008;11 (9) :1024-34)。また、一般的な話として、細胞の老化に伴い様々な遺伝子発現が変化すると知られる。そこで本研究では、OPCの分化を促進するメカニズムが加齢とともに劣化し、それによらない髄鞘の修復力が減弱すると推察した。

まず、老齢マウスと幼若マウスのOPC性質の差を調べるため、それぞれのマウスの大脳皮質からオリゴデンドロサイトを単離してRNA sequenceを行い、いずれかの群で発現が豊富な遺伝子を抽出した。OPCはオリゴデンドロサイトに分化後、成熟して、髄鞘関連タンパク質を発現するようになる。この髄鞘関連タンパク質の発現も加齢とともに減弱するため、RNA sequenceで差が認められた遺伝子と、髄鞘関連タンパク質をコードする遺伝子 (*mbp*, *plp*, *mog*) で、発現が相関するものを探索した。その結果、幼若マウス脳由来のオリゴデンドロサイトと老齢マウス脳由来のオリゴデンドロサイトが群間で遺伝子発現に差があり、かつ髄鞘関連タンパク質をコードする遺伝子と発現相関する遺伝子が、複数見出された。ここで見出された遺伝子が、ただの新規の成熟髄鞘マーカーではなく、髄鞘修復を促進させる作用をもつものか検討するため、*in vitro*で検証した。哺乳1日齢の



本研究の流れ
老化とともに低下するオリゴデンドロサイトの分化力を担う分子を同定し、その分子へ介入することで髄鞘修復が促進するか検討した。

マウス大脳皮質からOPCを採取して培養し、候補となる遺伝子に対するsiRNAを導入し、OPCからオリゴデンドロサイトへ分化しやすい条件で培養し (Kuroda et al., *J Clin Invest.* 2017;127 (9) :3496-3509)、培養後の分化度を免疫染色法を用いて評価した。候補となる遺伝子が複数存在したため、分化の評価を効率よく行うため、免疫染色法で可視化した髄鞘の定量を自動的に行う解析系をIn Cell Analyzerを用いて構築した。本解析法を用いて、Olig2陽性のオリゴデンドロサイト系譜の細胞あたりの髄鞘関連タンパク質 (Myelin basic protein, MBP) の発現領域を計測したところ、複数の候補遺伝子において、その発現を抑制させた細胞では分化が抑制された。なお、発生期の髄鞘形成には、OPCが目的の部位へ移動して分化することが知られ、また一部のOPCは発生過程で脱落すると指摘されている。候補遺伝子の発現を抑制させたOPCの生存ならびに細胞移動に対する作用も、それぞれMTT (3-[4,5-di-methylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assayおよびTranswellを用いたmigration assayを実施した。マウス初代OPC培養系を用いた検討の結果、コントロール群と比較し有意な差は認められたことから、老齢マウス脳と幼若マウス脳のオリゴデンドロサイトの細胞内の性質の差が、髄鞘の分化力の差と関連する可能性が示された。

In vitroで得られた分子メカニズムについて、一部の候補遺伝子についてはin vivoでの検証へ進めた。まず候補遺伝子の発現解析について、幼若マウスと高齢マウスの脳切片内を用いて、OPCマーカー (platelet-derived growth factor receptor [PDGF] alpha) 陽性細胞で検出した。すると、RNA sequenceでの結果と同様に、幼若マウスOPCと高齢マウスOPCと共染色された候補遺伝子からコードされたタンパク質の染色性には差があった。また、候補遺伝子の脳内での発現様式について検討した。神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、血管内皮細胞をそれぞれの細胞表面マーカーを認識する抗体が結合した磁気ビーズを用いて単離し、real time PCRにより遺伝子発現量を相対解析した。すると、検討した遺伝子の一部はオリゴデンドロサイト系譜の細胞で豊富に発現していたが、多くの候補遺伝子はその発現がOPCやオリゴデンドロサイトで豊富というわけではなく、神経細胞やアストロサイトなどにも発現していることがわかった。そこで、OPC特異的に候補遺伝子の発現が変化した状態では、髄鞘の修復が阻害されるかを検討するため、候補遺伝子のうち、若齢マウスOPCで発現が高いものについて、PDGFRalpha-CreERTマウスと候補遺伝子のfloxedマウスを掛け合わせたマウスを作出し、タモキシフェンで候補遺伝子の発現を抑制させた状態で、まず髄鞘の発達における候補遺伝子の役割を解析した。脳梁の髄鞘は生後3週齢にかけて旺盛に形成されるが、候補遺伝子の発現を抑制させたマウスでは脳梁で発現する髄鞘関連タンパク質の量がコントロール群より有意に少なかった。一方、脳梁におけるOPCおよびオリゴデンドロサイトの数には群間で差がなかったことから、OPCの増殖や細胞生存、オリゴデンドロサイトの生存に対して候補遺伝子は影響しないことが示唆された。マウスでは髄鞘の発達が不良であると、運動機能に障害があらわれ、また髄鞘の発達は運動技術の獲得にも必要と知られている (McKenzie IA, et al., *Science* 2014;346 (6207) :318-22)。OPC特異的に候補遺伝子の発現を抑制させたマウスの運動機能を、rotarod testで評価したところ、rod上を歩行し続ける時間がコントロール群よりも短かった。また、この群間の差は、観察期間中 (3カ月) は継続しており、OPC特異的に候補遺伝子の発現を抑制させたマウスでは運動機能の技術向上が生じないことがわかった。この行動変化の結果と一致するように、OPC特異的に候補遺伝子の発現を抑制させたマウスでは、生後8週齢の段階でも脳梁での髄鞘関連タンパク質の発現量がコントロール群より少なかった。これらのことから、候補遺伝子は髄鞘発達的一端を担う分子機序に貢献するものであり、また候補遺伝子が欠失し髄鞘の発達が不良になっても、他の髄鞘発達の機序により補われないことが示唆された。

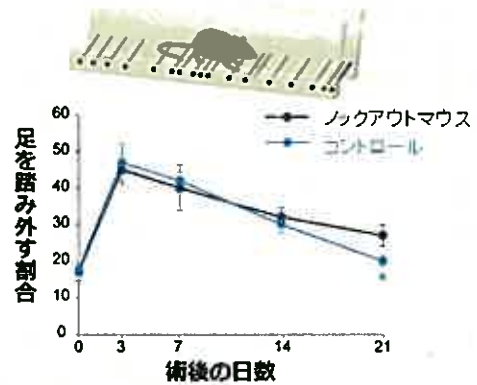
続いて、髄鞘の修復における候補遺伝子の作用について検証した。高齢マウスでは健常状態でも髄鞘の形成不良が観察され、脱髄を誘導する処置を施すと顕著な神経機能障害が生じる。高齢マウスに脱髄を施したのちの髄鞘修復は不良のため、候補遺伝子の作用を増強させることで髄鞘修復が促されるかを検討した。候補遺伝子の一つに、受容体をコードするものがあり、その受容体に対する活性化剤が試薬として市販されている。脱髄を施した高齢マウスに対して、本薬剤を持続的に髄腔内へ投与した。その後、病巣周囲の組織を回収し髄鞘関連タンパク質の発現量を比較したところ、コントロール群と比較して薬剤投与群では髄鞘関連タンパク質の発現量が高かった。このことから、候補遺伝子がコードする受容体の下流シグナル伝達を増強させることが、高齢マウスにおけるin vivoでの髄鞘修復を促進させることが示唆された。続いて、同様の処置を施したマウスでの行動解析を行った。運動機能を担う有髄神経回路がマウスでは脊髄背側に走行しているため、脊髄背側で脱髄が誘導されたマウスでは四肢の運動機能障害があらわれる。マウスを横にした梯子の上を歩かせ、足を踏み外したステップ数を測定することで歩行機能を評価するladder walk testを行い、まず高齢マウスへ脊髄背側に脱髄を施すことで歩行機能が障害される様子を観察した。成体の脱髄モデルマウスでは、時間がたつにつれて運動機能が改善し、それは髄鞘の修復の改善とリンクする (Hamaguchi M, et al, *Protocol Exchange*, doi:10.1038/protex.2017.121)。高齢の脱髄マウスでは、運動機能の自然回復は顕著ではなかったが、候補遺伝子がコードする受容体を活性化させる薬剤を施すと、高齢マウスでも運動機能の改善が導かれた。このことから、候補遺伝子の作用を増強

させることで、行動試験レベルでも治療効果が検出できることがわかった。

これまでに観察された高齢マウスにおける髄鞘の修復効果および症状改善効果が、成体の髄鞘修復にも共通するか、脊髄の脱髄モデルおよび病態モデルを用いた検証を行った。まず成体での脱髄については、先の高齢マウスと同様に、脊髄背側への脱髄の誘導およびその個体の行動変化の解析をladder walk testで行った。OPC特異的に候補遺伝子の発現を抑制させたマウスを用いた解析を行ったところ、脱髄により運動機能の悪化はコントロールと同様に生じるものの、症状の改善効果はコントロールよりも悪い様子が観察された。また、行動試験後に組織解析を実施したところ、コントロール群と比較して、OPC特異的な候補遺伝子発現抑制マウスでは、脱髄領域が広い状態であることがわかり、組織学的な修復も妨げられていることが示された。続いて病態モデルについては、脱髄を主徴とする指定難病、多発性硬化症の病態モデルである脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) マウスを用いて治療効果の検証を行った。MOG35-55ペプチド感作によりEAEを誘導し、症状の推移をEAEスコアで評価した。EAE誘導2週間後に、EAEスコアが3 (歩行異常) を超えた個体に対して、候補遺伝子がコードする受容体を活性化させる薬剤を持続的に脳室内投与したところ、コントロール群と比較し症状が有意に完全した。また、同処置を施したマウスについて組織解析も行ったところ、コントロール群と比較し薬剤処置群では脱髄領域が狭かった。EAEには自己免疫系の異常な活性化がかかわるため、免疫系の浸潤に差があるかも検討した。EAEマウスの脊髄組織でのCD4陽性T細胞、CD11b陽性マクロファージ・ミクログリアの数を計測したところ、薬剤投与の有無により差は認められなかった。また、同マウスの脾臓およびリンパ節の細胞数についても、薬剤投与の有無により差はなく、同細胞をin vitroで培養しMOGで再刺激した際のInterferon-gammaやInterferon-17 (いずれもEAEの炎症応答に重要) も、薬剤投与の有無のより差は認められなかった。これらのことから薬剤投与によるEAEにおける髄鞘の修復や症状の緩和は、免疫系とは独立したものであるか可能性が示唆された。

以上の結果から、高齢マウスと若齢マウスの髄鞘の修復の差は、OPCの細胞の性質の差に由来することが示唆され、またその差を担う分子の一部は、正常な髄鞘の発達にも寄与すること、そして成体の病態で傷ついた髄鞘の修復にも貢献することが示唆された。今後の方向性としては、まずマウスで得られた知見がヒトでも保存されているか検討するため、ヒト培養OPCを用いて、見出した機序を活性化させることでOPCの分化が促進するか検討する。また、ヒト剖検脳で候補遺伝子が発現しているかも検討し、ヒト疾患への応用の可能性を追求する。髄鞘の傷害は、多発性硬化症に限らず、様々な神経疾患の病因論の一つとしても支持されている。今後、種々の疾患のモデル動物に対する治療効果を、組織学的に解析するとともに、脳がかかわる機能を改善させる効果があるかも検証することで、臨床的な有用性についてもさらに解析を進めていきたい。得られる知見をもとに脳神経疾患に対する新しい治療標的分子を提案し、その知見をもとにした薬剤開発へつなげていくことで、神経疾患の克服へ貢献していきたい。

Ladder walk test (運動機能評価)



候補遺伝子による運動機能への作用

脊髄へ脱髄を施したマウスの運動機能の経時変化。候補遺伝子の発現を抑制させたマウスではコントロール群と比べて運動機能の改善が悪い。