

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22494

研究課題名(和文)オリゴデンドロサイト前駆細胞の特異的制御が及ぼす認知症発症機構への影響

研究課題名(英文)A role for oligodendrocyte precursor cells in the regulation of cognitive functions

研究代表者

白川 久志(Shirakawa, Hisashi)

京都大学・薬学研究科・准教授

研究者番号：50402798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：白質傷害すなわち脱髄/髄鞘機能不全は、多発性硬化症等の中枢脱髄性疾患のみならず、認知症等の他の中枢神経疾患においても治療介入すべき重要な病変として注目されつつある。髄鞘を形成するオリゴデンドロサイトの前駆細胞であるOPCの数の増加や細胞活性化は、これらの中枢神経疾患の病態改善に資すると考えられてきたが、本研究結果により、脳血管障害の虚血部位周辺に多数のTrpm3陽性OPCが未分化状態で存在すること、多発性硬化症モデルの発症急性期におけるOPCの選択的除去が臨床スコアの悪化を抑制することが示され、OPCが予想に反して、時期特異的に中枢神経疾患の病態悪化に寄与している可能性もあることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

髄鞘(ミエリン鞘)は、神経線維の周囲を取り囲む絶縁体であり、線維の保護だけでなく、情報伝達を飛躍的に効率化する役割も担っています。近年、この髄鞘の機能が、多発性硬化症などの中枢脱髄性疾患のみならず、認知症など他の中枢神経疾患でも起きていることが判明しつつあります。髄鞘はオリゴデンドロサイトにより作られ、それはオリゴデンドロサイト前駆細胞(OPC)から分化・成熟することから、OPC数の増加や活性化はこれら疾患の改善につながると信じられてきましたが、本研究により、必ずしもそうではないことがわかりました。今後は各病態特異的にOPCの挙動を適正化することが、新たな疾患治療戦略となるのかもしれませんが。

研究成果の概要(英文)：Emerging evidence suggests that white matter injury, namely demyelination / myelin sheath dysfunction is an important pathological change for therapeutic intervention not only in central demyelinating diseases such as multiple sclerosis, but also in other central nervous system diseases such as dementia. Since oligodendrocytes, which form the myelin sheath, are generated from the differentiation and maturation of oligodendrocyte precursor cells (OPCs), the increase in OPC number and activation has been generally thought to contribute to the improvement of the pathophysiology of the above neurological diseases. This study demonstrates that there are a large number of Trpm3-positive OPCs in the vicinity of the site of cerebrovascular injury in an undifferentiated state, and that selective removal of OPCs in the acute onset phase of mouse multiple sclerosis model EAE model suppressed the clinical scores. This indicates that OPCs have dual aspect: neuroprotective and neurodestructive.

研究分野：中枢神経薬理

キーワード：オリゴデンドロサイト前駆細胞 認知機能障害 多発性硬化症 脳血管疾患 白質傷害 CNS炎症 グリア細胞 TRPM3

1. 研究開始当初の背景

認知症で最も多数を占めるのはアルツハイマー型認知症であるが、次いで多いとされる認知症の病型は脳血管性認知症である。近年、両者の合併症例は予測値よりもずっと高頻度であること、アルツハイマー型認知症の病態発症には血管病変が必須であることが指摘され、両疾患の共通病態の理解が不可欠となりつつある。

脳血管性認知症は、脳内の血管障害に基づく脳梗塞や脳内出血に起因する。脳梗塞は、何らかの機序で発生した血栓が脳血管の一部に詰まることで血液が流れなくなった結果、その先の脳部位が傷害を受ける病型であり、一方脳内出血とは、脳血管の一部が何らかの理由により破れることで出血した結果、その周囲の脳細胞が傷害を受ける病型である。これらの病態において、神経細胞変性が広範囲に惹起されることから、その機序が特に重点的に研究されてきたが、その周囲に存在する脳細胞である「グリア細胞」の病態への関与は不明な点が多く残されてきた。

近年、認知症を含む中枢神経疾患において、白質傷害、すなわち脱髄、神経軸索を覆う髄鞘の機能不全が報告されつつある。多発性硬化症などの有名な中枢神経系の炎症性脱髄疾患のみならず、アルツハイマー型認知症や脳血管性認知症においても、髄鞘の機能不全が病態に関与し、その機能回復が認知機能障害の改善に資する可能性が示され、髄鞘(ミエリン鞘)を形成するグリア細胞である「オリゴデンドロサイト」に注目が集まりつつある。オリゴデンドロサイトは、オリゴデンドロサイト前駆細胞(**oligodendrocyte precursor cell: OPC**)から分化・成熟することから、**OPC**の活性化や数の増加はこれらの病態の改善につながると信じられてきたが、近年、炎症条件下における未分化 **OPC** が血液脳関門の破綻を促進したり、炎症性サイトカインを放出してしまうことが報告され、これらの病態時において、**OPC** が常に病態改善作用のみを発揮するかについては、疑問が残っていた。

2. 研究の目的

そこで本研究では、認知機能障害を呈する病態として、脳血管性認知症や多発性硬化症に着目して、マウス **in vivo** および **in vitro** 病態モデルを作製して病態解析を行い、これらの病態における **OPC** の真の役割を解明することを目的として研究を開始した。なお、個別の研究目的に関しては、病態別に研究成果の欄に2章に分けてそれぞれ記述する。研究方法は両成果の共通の手法として以下の3に記載する

3. 研究の方法

(1) ラットエンドセリン1 (**endothelin1; ET-1**) 誘発脳虚血モデルの作成と評価

定位フレームに設置した麻酔下のSDラット(8週齢)に、**ET-1** 溶液(200 pmol/L)を0.5 L/minの流速で1 µL、内包の後方に注入した。虚血傷害が惹起されたラットの脳は7日後に採取し、脳切片をLuxol fast blueで染色して可視化した。

蛍光 **in situ** ハイブリダイゼーション(**FISH**)および免疫組織化学は常法により行った。簡単に記述すると、ピオチンおよびジゴキシゲニン標識 **crNA** リボプローブを調製し、生後4日または12週齢のラット脳の冠状切片と、ピオチン/ジゴキシゲニン標識 **crNA** プローブの混合物をハイブリダイズさせた。洗浄後、ピオチンをペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンと**FITC** で検出し、**H₂O₂** で残留ペルオキシダーゼを不活性化した後、ペルオキシダーゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体を用いて、常法により検出した。**Trpm3** の**FISH** 後、抗**NG2** 抗体と**Alexa Flour 564** 標識二次抗体で**NG2** (**OPC** マーカー)を検出した。**Trpm3** のアルカリホスファターゼベースの **in situ** ハイブリダイゼーションには、アルカリホスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体およびニトロブルーテトラゾリウム/5-プロモ-4-クロロ-3'-インドリルリン酸を用い、蛍光顕微鏡で観察した。

(2) 培養オリゴデンドロサイト前駆細胞を用いた **in vitro** 実験

生後0-2日齢のWistar/STラット新生仔の大脳皮質を摘出・単離し、1-3週間培養後、振とう法により単離・再播種することにより調製した。細胞生存率の測定には**MTT**法、細胞増殖の測定には**BrdU** 取り込み法、遊走評価にはセルスクレイパーを用いて創傷を形成させる**scratch-wound**法を用いた。分化は免疫染色および**RT-PCR**法による分化マーカーのタンパク質または**mRNA**発現変動解析により評価した。免疫染色は蛍光標識抗体を用いて行い、ウエスタンブロット、**RT-PCR**、定量的**RT-PCR**、**ELISA**はキット等を用いて常法により行った。細胞内**Ca²⁺**濃度測定は、ガラス上に播種した細胞を5 µMの細胞内**Ca²⁺**指示薬である**fura-2AM**を**Krebs-Ringer solution**に溶かした溶液に30-40分、37°Cで浸した。蛍光画像は5秒毎に励起光340または380 nm、蛍光510 nmで、**AQUACOSMOS/ORCA-AG imaging system**(浜松ホトニクス)を用いて撮影した。実験は室温で行った。励起/蛍光=340 nm/510 nmの蛍光強度(**F340**)を励起/蛍光=380 nm/510 nm(**F380**)で割る事で比を算出し、これを細胞内**Ca²⁺**濃度の指標とした。細胞の生存を確認するためにはイオノマイシンを用いた。**OPC**の酸素欠乏には、パーソナル**CO₂**マルチガスインキュベーター(**APM-30D; ASTEC**)を用い、37°C

の低酸素状態（酸素 2%、二酸化炭素 5%、空気 93%）に 12 時間、対照群は正常酸素状態（二酸化炭素 5%、空気 95%）に 12 時間、それぞれ維持した後 **total RNA** を抽出し、変動の小さかった **Actb** を内部対照遺伝子として評価した

(3)実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)モデルと遺伝子改変マウスを用いた OPC の選択的除去

多発性硬化症 (**multiple sclerosis; MS**)の動物モデルとしては **EAE** モデルを選択した。実験には **C57BL/6** 系雌性の野生型/遺伝子改変マウス(7-9 週齢)を用いた。**MOG35-55** ペプチド(100 μg)および免疫賦活剤を含むエマルジョンをマウスの背側部に皮下投与することにより、**MS** 病態を模した **EAE** を惹起した。臨床スコアは病態の悪化に応じて **0-6** の 7 段階で評価し、摘出した **L3-L5** の脊髄を用いて常法により定量的 **RT-PCR**、**ELISA**、組織学的評価を行った。

OPC の細胞選択的除去は、**CreERT-loxP** システムを用いて **PDGFR α** 陽性細胞を除去する方法により行った。**OPC** の細胞特異的のマーカースとして知られる受容体チロシンキナーゼである **PDGFR α** のプロモーターの下流に **Cre-ERT** が組み込まれたトランスジェニックマウスと **ROSA26** 部位に **loxP** 配列で挟まれた **STOP** 配列とその下流にジフテリア毒素受容体(**DTR**)遺伝子が組み込まれたトランスジェニックマウスを交配させ、産仔にタモキシフェンを投与すると、**PDGFR α** 発現細胞特異的に、**CreERT** の活性化とジフテリア毒素受容体 **DTR** の発現が誘導される。そのマウスにジフテリア毒素を投与すると **PDGFR α** 陽性細胞、すなわち **OPC** がアポトーシスにより除去される。対照群としては、**CreERT** 陰性のマウスを用い、同様に薬物を投与した。ジフテリア毒素は、**EAE** 発症の翌日から投与した。

4. 研究成果

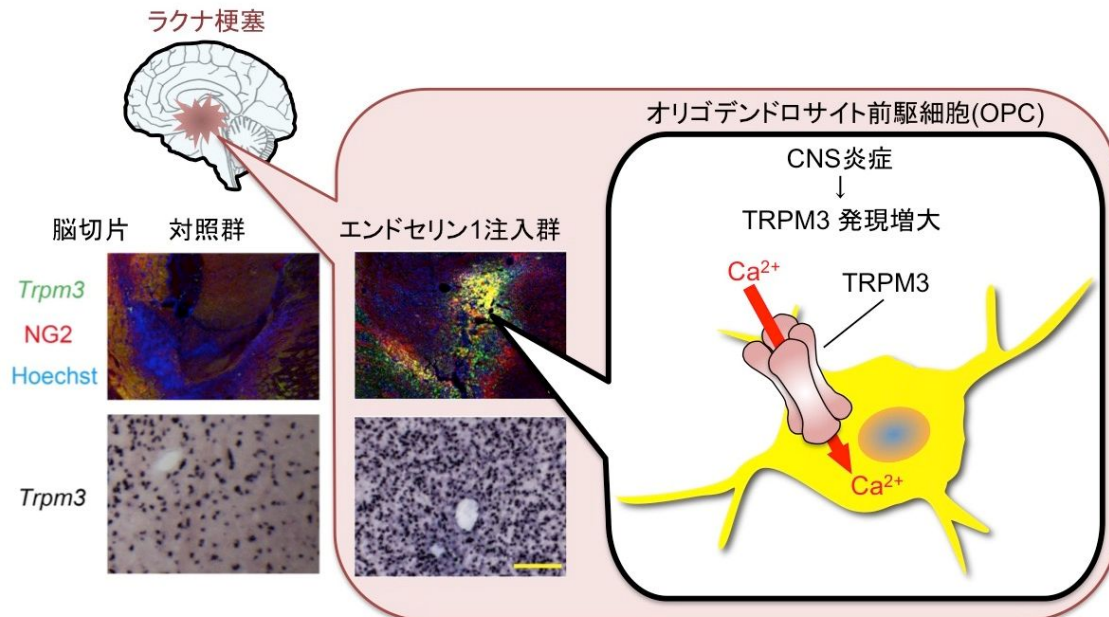
(1) **ET-1** 誘発虚血ラットの脱髄病変における **TRPM3** 陽性 **OPC** の意義

OPC は、成熟したオリゴデンドロサイトに分化し、軸索の周りにミエリン鞘を形成するグリア細胞であり、多くの中樞神経系疾患でその増殖・移動・分化が変化することが報告されている。**OPC** は、脳損傷後の病変部において急速に増殖し、分化して再髄鞘形成に寄与するが、炎症環境下では完全な再髄鞘形成が阻害されることが多い。このような **OPC** の生理的・病的な挙動を制御する機構を解明することは、脳損傷の治療において重要であると考えられてきた。

細胞内 **Ca $^{2+}$** シグナルは **OPC** の機能を調節すると報告されている。**AMPA** 受容体を介した **Ca $^{2+}$** 流入は **OPC** の遊走と生存を増加させ、**L**型電位依存性 **Ca $^{2+}$** チャンネルの一部は再髄鞘形成や増殖および生存に関与しているため、本研究では **Ca $^{2+}$** 透過型チャンネルの **TRP** チャンネルに着目した。成熟オリゴデンドロサイトは **TRPM3** を発現していると報告されていたため、**OPC** においても同様であるかどうかを調べるために、**in situ hybridization** および免疫組織化学を行った。その結果、生後 4 日齢(**P4**)および成体ラットの大脳皮質および脳梁(白質)において **Trpm3** および **OPC** マーカーである **Pdgfra** を検出し、**TRPM3** が生体内のほとんどの **OPC** で発現していることが更なる検討で明らかとなった。

次に、**TRPM3** がラット初代培養 **OPC** に機能的に発現しているかどうかを検討したところ、**RT-PCR** 法によりラット培養 **OPC** における **TRPM3 mRNA** を検出し、**fura 2-AM** を用いた蛍光 **Ca $^{2+}$** イメージングアッセイにより、**TRPM3** が培養ラット **OPC** に機能的に発現し、細胞外 **Ca $^{2+}$** の流入に重要な役割を担っていることを明らかになった。しかしながら、**RT-PCR** による成熟マーカーの検討により、**TRPM3** 活性化は **OPC** の分化に影響を与えないこと、**scratch-wound assay** により、**TRPM3** 活性化が **OPC** の遊走にも関与していないことが明らかとなった。

最後に、**OPC** の病態生理学的な役割について **in vivo** モデルにおいて検討した。**ET-1** を内包に注入すると重度の脱髄が起こり、7 日目に脱髄部位に近い **OPC** の増殖が増加することを既に報告したラット **ET-1** 誘発脳虚血・脱髄モデルを用いて検討したところ、ほとんどの **Trpm3** シグナルは **NG2** シグナル(**OPC** マーカー)と共局在していた。内包の脱髄後に **Trpm3** 陽性 **OPC** の数が有意に増加した。アルカリホスファターゼを用いた **in situ hybridization** でも **Trpm3** の検出を行ったところ、**ET-1** 注入群では、**Trpm3** のシグナル数が増加した。一方、**ET-1** 注入群の海馬では、**Trpm3** シグナルの数は変化していなかった。**Trpm3** の発現上昇のメカニズムを探るために、虚血時にレベルが上昇する炎症性サイトカインがラット初代培養 **OPC** の **Trpm3** 発現に影響を与えるかどうかを検討したところ、**Trpm3** の発現は **TNF α** (30 ng/mL) 投与により有意に増加したが、**IL1 β** (30 ng/mL) 投与や低酸素状態 (2% **O $_2$**) では **Trpm3** の発現には変化がなかった。**TNF α** による **Trpm3** 発現の変化が小さいことを考慮すると、**ET-1** 注射マウスの病変部における **TRPM3** の発現上昇は、主に **Trpm3** 陽性 **OPCs** の増加に関連している可能性がある。これらのデータは、**TRPM3** が虚血中の炎症性病変における **OPC** の特異的な挙動の制御に関与していることを示唆している。



TRPM3 (Transient receptor potential melastatin 3) は、脳内で高発現している Ca^{2+} 透過性チャネルで、神経ステロイドである硫酸プレグネノロン (**pregnenolone sulfate; PS**) や体温によって活性化される。培養ラットオリゴデンドロサイト前駆細胞 (**OPC**) にも **TRPM3** は発現しており、**PS** によって活性化され、 Ca^{2+} 流入をもたらすことが明らかとなった。また、ラットエンドセリン 1 誘発脳虚血モデルの脱髄病変では、グリア細胞の一種であり、髄鞘を形成するオリゴデンドロサイトに分化する **OPC** において **TRPM3** の発現が上昇していた。このことは、炎症性病態における **OPC** の特異的な挙動の制御に **TRPM3** が関与していることを示唆している。スケールバーは $200 \mu\text{m}$ を示す。

参照：Ohashi et al., *Biol. Pharm. Bull.* **44**, 181–187 (2021)

(2)多発性硬化症モデルにおける **OPC** の二面的な病態生理学的役割

中枢神経系の慢性炎症性脱髄性疾患である多発性硬化症においては、一般的に髄鞘（ミエリン鞘）が損なわれると、成体の **OPC** が増殖し、損傷部位に移動し、オリゴデンドロサイトに分化して、新しい髄鞘を生成する。そのような髄鞘の回復ができないと、軸索の完全性が損なわれ、変性しやすくなり、種々の神経症状の発生に至ると考えられている。多発性硬化症患者の病変組織において、未分化の **OPC** が多数観察されることから、脱髄や軸索変性の要因として、成体 **OPC** の分化不全が一因であると考えられてきた。しかしながら近年、炎症条件下における未分化 **OPC** が **BBB** の破綻を促進したり、炎症性サイトカインを放出してしまう可能性が報告され、多発性硬化症の脱髄病変における **OPC** の真の役割は完全には理解されていないのが現状であった。そこで本研究では、多発性硬化症のマウス **EAE** モデルにおいて、遺伝子工学的手法により **OPC** を除去することで、発症期における **OPC** の役割を解析した。

はじめに、炎症性脱髄疾患である多発性硬化症における **OPC** の役割の解明を目的とし、確立した **PDGFR α** 陽性 **OPC** 特異的除去法を用い、多発性硬化症モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (**EAE**) マウスにおける臨床スコアを評価することで **OPC** 特異的除去の影響を検討した。**EAE** 発症 1 日後から 8 日後までジフテリア毒素を投与して **OPC** を除去し、対照群と比較すると、**OPC** 除去群では臨床スコアが有意に抑制された。また、**OPC** 除去群の脊髄では、臨床スコア低下と相関して、脱髄の抑制や末梢免疫細胞浸潤の抑制、末梢免疫細胞の浸潤や再活性化に関わるサイトカインの発現低下が認められた。これらの結果から、**EAE** 急性期の **OPC** は、意外なことに、**EAE** の病態悪化に寄与する可能性が示唆された。

次に多発性硬化症モデルマウス脊髄からの各グリア細胞の個別分取および **RNA** シーケンスを行った。成体マウス脊髄からのグリア細胞 (**OPC**、ミクログリア、アストロサイト) 分取法を用いて、対照群マウス、**EAE** 発症前、急性期、慢性期においてグリア細胞を分取し、**RNA** シーケンスを行った。その結果、対照群と比較して **EAE** マウスの **OPC** では、多数の炎症関連因子が発現上昇しており、**OPC** 特異的に上昇するものも複数認められた。この結果からも、**OPC** が炎症惹起に関与する可能性が示され、**EAE** マウスにおける **OPC** の炎症促進的な一面が明らかとなった。引き続き、詳細なメカニズムについて解析を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ohashi Kana, Shibasaki Koji, Nakazawa Hayaki, Kunimasa Ryotaro, Nagayasu Kazuki, Shirakawa Hisashi, Kaneko Shuji	4. 巻 44
2. 論文標題 Transient Receptor Potential Melastatin 3 Is Functionally Expressed in Oligodendrocyte Precursor Cells and Is Upregulated in Ischemic Demyelinated Lesions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 181 ~ 187
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b20-00510	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中澤 駿基、大橋 佳奈、永安 一樹、白川 久志、金子 周司
2. 発表標題 中枢神経系の炎症条件下におけるオリゴデンドロサイト前駆細胞の機能変化
3. 学会等名 第70回 日本薬学会関西支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 白川 久志、金子 周司
2. 発表標題 中枢性疾患の非自律性神経機能障害におけるグリア細胞TRPチャネル
3. 学会等名 第93回 日本生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 白川 久志、金子 周司
2. 発表標題 多発性硬化症の臨床と非リンパ系細胞に着目した病態解析
3. 学会等名 第139回 日本薬理学会近畿部会・次世代薬理学セミナー2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大橋佳奈、松尾凧紗、永安一樹、白川久志、金子周司
2. 発表標題 マウス多発性硬化症モデル重症度に対するオリゴデンドロサイト前駆細胞の寄与
3. 学会等名 第31回 神経行動薬理若手研究者の集い
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大橋佳奈、松尾凧紗、永安一樹、白川久志、金子周司
2. 発表標題 Contribution of oligodendrocyte precursor cells to disease severity in a mouse model of multiple sclerosis
3. 学会等名 第97回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	大橋 佳奈 (Ohashi Kana)	京都大学・薬学研究科 (14301)	
研究協力者	中澤 駿基 (Nakazawa Hayaki)	京都大学・薬学研究科 (14301)	
研究協力者	松尾 凧紗 (Matsuo Nagisa)	京都大学・薬学研究科 (14301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	金子 周司 (Kaneko Shuji) (60177516)	京都大学・薬学研究科・教授 (14301)	
連携研究者	永安 一樹 (Nagayasu Kazuki) (00717902)	京都大学・薬学研究科・助教 (14301)	
連携研究者	柴崎 貢志 (Shibasaki Koji) (20399554)	長崎県立大学・看護栄養学部・教授 (27301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関