

機関番号：24403

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20580341

研究課題名（和文） ミエリン形成・維持に関わるグリア細胞の新規機能の解明

研究課題名（英文） Pathological studies on new functions of glial cells for the development and maintenance of myelin

研究代表者

桑村 充 (KUWAMURA MITSURU)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：20244668

研究成果の概要（和文）：

ミエリン崩壊を特徴とする dmy ラットでは、7 週齢よりオリゴデンドロサイト（OL）数が激減し、ミトコンドリア（Mt）マーカーに強く陽性となる OL が認められた。Mt 内のマグネシウム流入に関与する Mrs2 遺伝子に変異がみつかった。

dmy ラットでは、鉄蓄積と heme oxygenase-1 の発現上昇、フェリチンの増加がみられた。

mv ラットでは、ミエリン蛋白の発現は、白質および灰白質の両方で減少していたが、OL 数は著変がなかった。

研究成果の概要（英文）：

The dmy rat is an autosomal recessive mutant that exhibits severe myelin destruction. The number of oligodendrocytes decreases rapidly from 7 weeks of age in the dmy rat. Hypertrophic oligodendrocytes were frequently observed, and the cytoplasm was found to be intensely positive for mitochondrial markers.

We found that a G-to-A transition, 177 bp downstream of exon 3 of the Mrs2 (MRS2 magnesium homeostasis factor (*Saccharomyces cerevisiae*)) gene.

We demonstrated an abnormal iron deposition, and significant upregulation of antioxidant enzyme heme oxygenase-1 (HO-1) and iron storage protein ferritin in the dmy rat.

Immunohistochemical and Western blot analyses demonstrated a considerable reduction in the expression of major CNS myelin proteins both in the white and gray matter of mv rats. However, there was no significant difference between control and mv rats in the cell number of PLP mRNA-positive oligodendrocytes either in the white or gray matter.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学，応用獣医学

キーワード：脱髄，ミエリン，ミクログリア，オリゴデンドログリア，サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、多くの神経疾患モデル動物の病態を解析し、特に、中枢神経系のミエリンに異常を来すミュータント動物である *mv* ラットおよび *dmy* ラットに関しては、どちらのミュータントラットにおいても、これまで報告されていない病態および分布を示すミクログリア・オリゴデンドロサイトの形態変化が認められ、病理発生にグリア細胞が直接的・間接的に役割を演じていることが示唆されていた。ミエリンの形成・維持に関わるグリア細胞の役割を明らかにするためには、グリア細胞の機能変化に注目し、グリア細胞が発現する各種サイトカイン・分化因子の発現パターンを網羅的に解析する必要があると考えられた。

2. 研究の目的

ミエリン異常ミュータント動物を用いて、リアルタイムPCR, *in situ* hybridisation法, マイクロアレイ法によってグリア細胞と関連するサイトカイン, 分化因子を解析し, 病理発生メカニズムを明らかにすることである。

dmy ラット原因遺伝子は未だ不明であったが, それまでの遺伝的解析により, *dmy* ラットの原因遺伝子がこれまでに報告されていない新規の遺伝子であることが明らかであった。また, *dmy* ラットの臨床症状の発現・進行, 病理学的な特徴を考慮すると, 非常にユニークなミエリンの病態が示唆されており, その病理発生にはミエリン形成・維持における新たな分子が役割を演じていると予想された。

ミエリンの形成・維持異常におけるオリゴデンドロサイトの分化・動態を明らかにする目的で, オリゴデンドロサイトの前駆細胞および成熟オリゴデンドロサイトの形態変化および神経細胞・アストロサイトとの位置関係を共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。さらに, 各種サイトカイン発現細胞を *in situ* hybridisation法にて同定し, オリゴデンドロサイト系細胞との多重染色法により, グリア細胞とサイトカイン発現動態を解析した。

mv ラットおよび *dmy* ラットの病変進行過程で観察されるミクログリアおよびオリゴデンドロサイトの形態異常の意義を明らかにするために, グリア細胞関連のサイトカイン動態を解析した。解析にはリアルタイムPCR法を用いた。

3. 研究の方法

動物: 研究代表者の施設 (大阪府立大学大

学院) あるいは京都大学大学院・動物実験施設にて維持されている *mv* ラットあるいは *dmy* ラットのヘテロラット (*mv/+*あるいは *dmy/+*) を交配し, 得られたホモ型 (*mv/mv* あるいは *dmy/dmy*) ラットを実験に用いた。コントロールラットとして, 同腹のヘテロ型 (*mv/+*あるいは *dmy/+*) あるいは野生型ラットを用いた。発症前の病態を理解するために, 動物の尾よりDNAを抽出し, 原因遺伝子あるいは原因遺伝子近傍の遺伝子マーカーを用いて遺伝子診断を行い, 動物の遺伝型を診断した。

グリア細胞相互作用理解のための組織構築の解析

ミクログリアおよびアストロサイトの形態異常の立体構築および他の神経構成細胞との位置関係を明らかにし, 細胞間の相互作用を明らかにする目的で, 蛍光色素 (HNPP色素) を用いた *in situ* hybridisation法・免疫組織化学と共焦点レーザー顕微鏡を組み合わせた三次元解析を行った。

グリア細胞関連サイトカインの動態解析

mv ラットおよび *dmy* ラットの病変進行過程で観察されるミクログリアおよびオリゴデンドロサイトの形態異常の意義を明らかにするために, グリア細胞関連のサイトカイン動態を解析した。病変形成初期からミエリン崩壊期に至る1, 2, 4, 6, 8, 10週齢の *mv* ラットおよび *dmy* ラットの脊髄 (胸髄) をサンプリングし, Total RNAを抽出した。まず, マイクロアレイ法により発現増減が認められる遺伝子群をスクリーニングした。次に, ミエリン崩壊過程に伴うオリゴデンドロサイト関連サイトカイン (FGF-2, PDGF-2, TGF- β ・1など) の動態を, リアルタイムPCRを用いて検討し, ミエリン崩壊過程のサイトカインネットワークを明らかにした。

オリゴデンドロサイトの分化・成熟解析

オリゴデンドロサイトの分化・動態を明らかにする目的で, Proteolipid Protein (PLP) およびPlatelet derived growth factor alpha receptor (PDGF- α ・R) に対するプローブを用いた *in situ* hybridisation法を行い, それぞれ成熟オリゴデンドロサイト, オリゴデンドロサイト前駆細胞を同定した。サンプルには4%パラホルムアルデヒドを灌流固定した凍結切片を用い, DIG標識のRNAプローブを使用して目的の細胞を同定した。脊髄の背索・側索・腹索の各部位における陽性細胞数を, 画像解析装置 (WinRoof 三谷商事) にて測定し, これら

の陽性細胞数の経時的変化および分布を明らかにし、内因性オリゴデンドロサイトおよび前駆細胞の役割、ミエリン形成の状況を把握した。

4. 研究成果

平成 20 年度：

中枢神経系のミエリン低形成とミエリンの解離を特徴とし、膜蛋白アトラクチンをヌル欠損するmvラットを用いて、アトラクチンの中枢神経系の役割を明らかにする基礎データを得ることを目的として、mvラットにおけるミエリン関連遺伝子および蛋白の発現動態を調べた。2, 4, 6, 10週齢のmvホモ型および対照ラットの脊髄（腰部）を用いて、proteolipid protein (PLP)およびmyelin basic protein (MBP)の免疫染色を実施した。全ての週齢において、PLPおよびMBPの免疫染色性が低下していた。PLP mRNAおよび蛋白の発現量は、4週齢から有意に低下していた。MBP mRNA発現量は4, 6週齢で低下傾向を示し、MBP蛋白発現量は10週齢で有意に低下した。CNP mRNA発現量は、4, 6週で低下傾向にあり、CNP蛋白発現量は4週齢で有意に低下した。これらミエリン遺伝子および蛋白の発現量の低下は、mvラットにおけるオリゴデンドロサイトの機能異常を示唆し、発症メカニズムとして重要と考えられた。また、新規ミエリン異常キーマutant VFラットの病態解析に着手した。このキーマutantでは、脊髄白質においてミエリン低形成および軸索周囲における空胞形成が観察された。空胞形成は4週齢において顕著であり、その後10週から20週齢では徐々に空胞病変が軽減した。病変部のオリゴデンドロサイト数は、4週齢から増加し、10週および20週齢では対照ラットに比べて有意に増数していた。このキーマutantラットでは、何らかのオリゴデンドロサイトの機能異常があり、代償性の過形成が生じている可能性が示唆された。

平成 21 年度：

アトラクチン欠損ラットと脱髄モデルであるdmyラットのみエリン病変形成における鉄代謝の変化を比較検討した。dmyラットではミエリン病変の進展に一致して、グリア細胞に鉄蓄積が認められ、抗酸化酵素であるheme oxygenase-1が発現上昇していることが示唆された。dmyラットのみエリン崩壊の病理発生に鉄蓄積と酸化ストレスが関与することが示された。新たなミエリン異常キーマutantであるVFラットの予備的

な病態解析を行った。2, 4, 10, 20週齢の発症（ホモ型）ラットおよび非発症（ヘテロ型）ラットの脳、脊髄を採材し、観察した。また、脊髄白質を中心に透過型電子顕微鏡下で観察した。病変部位におけるグリア細胞の動態を解析するため、抗Iba-1（ミクログリア）、GFAP（アストロサイト）、NG2（オリゴデンドロサイト前駆細胞）抗体を用いた免疫組織化学およびPLPに対するRNAプローブを用いたin situ hybridization（オリゴデンドロサイト）を行った。VFラットは生後10日頃から振戦症状を示し、4~8週齢で重篤となり、その後徐々に軽減した。ホモ型ラットの脳、脊髄において軸索周囲に異常な空胞が認められ、4週齢で最も顕著となり、その後減少した。また、ホモ型ラットのみエリン厚は対照に比べ薄く、ミエリン低形成が示された。病変部において活性化したミクログリア、アストロサイトが観察された。病変部におけるオリゴデンドロサイトの細胞密度は、対照ラットと比較して4週齢から増加傾向を示し、10, 20週齢においては有意に増加した。発症ラットのオリゴデンドロサイトの細胞突起は、対照ラットに比べて短く、未分化な形態を示すものが多く、オリゴデンドロサイトの成熟異常によるミエリン形成不全が示唆された。

平成 22 年度：

新たなミエリンキーマutantモデル動物となる可能性があるVFラットの病態解析と原因遺伝子解析を行った。VFラットは、生後10日前後から全身の振戦症状を示すキーマutantラットである。振戦症状は4~8週齢において最も顕著となるが、その後軽減する。病理組織学的には、脊髄白質を中心とした中枢神経系における神経軸索周囲の異常な空胞形成とミエリン低形成を特徴とする。また、この振戦形質は劣性遺伝し、原因遺伝子*vf*はラット第8染色体上に位置することが判明しているが、同定されていない。2, 4, 10, 20週齢のホモ型ラットおよび対照（ヘテロ型・野生型）ラットの脳・脊髄を採材し、HE染色およびエポソ厚切りトルイジン青染色を行い、形態学的な変化を経時的に観察した。マイクロアレイ、RT-PCR法、シーケンス解析により遺伝子変異を検討した。さらに、脊髄から抽出したmRNAを用いて、real-time PCR法により各週齢での原因遺伝子のmRNA発現量を比較した。

ホモ型ラットの脊髄白質において、ミエリン低形成と軸索周囲の異常な空胞形成が観察された。4週齢のヘテロ型ラットでは、空胞病変は認められなかったが、野生型ラットと比較して軸索密度の低下と小径軸索

の増加が観察された。これらの結果から、原因遺伝子はミエリン形成のみならず、軸索の発達や維持にも関与する可能性が考えられた。

また、遺伝子解析の結果、ラット第8染色体に位置する遺伝子のうち、ホモ型ラットにおいて顕著な発現低下がみられた有力な候補遺伝子を発見した。ホモ型ラットの脊髄では、白質・灰白質においてこの原因遺伝子の mRNA 発現の低下が認められた。この候補遺伝子およびそのタンパクの発現細胞については現在検討中である。

VF ラットは振戦症状および空胞病変が改善するというユニークな病態を示し、その病理発生の解析は、ミエリンの再生メカニズムを解明する上で有用であると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

① Kuwamura M, Inumaki K, Tanaka M, Shirai M, Izawa T, Yamate J, Franklin RJ, Kuramoto T, Serikawa T.
Oligodendroglial pathology in the development of myelin breakdown in the dmy mutant rat.
Brain Res. 査読有 1389: 161-168, 2011

② Kuramoto T, Kuwamura M, Tokuda S, Izawa T, Nakane Y, Kitada K, Akao M, Guénet JL, Serikawa T.
A mutation in the gene encoding mitochondrial Mg²⁺ channel MRS2 results in demyelination in the rat.
PLoS Genet. 査読有 7(1):e1001262, 2011

③ Izawa T, Yamate J, Franklin RJ, Kuwamura M.
Abnormal iron accumulation is involved in the pathogenesis of the demyelinating dmy rat but not in the hypomyelinating mv rat.
Brain Res. 査読有 1349: 105-114, 2010

④ Izawa T, Yamate J, Franklin RJ, Kuwamura M.
Abnormal myelinogenesis both in the white and gray matter of the attractin-deficient mv rat.
Brain Res. 査読有 1312: 145-155, 2010

⑤ Kuwamura M, Murai F, Nishioka S, Aoki M, Ohashi F, Yamate J, Kotani T, Summers BA.

Late onset cerebellar cortical degeneration in a koala.
Aust Vet J. 査読有 87: 342-344, 2009

⑥ Izawa T, Takenaka S, Ihara H, Kotani T, Yamate J, Franklin RJ, Kuwamura M.
Cellular responses in the spinal cord during development of hypomyelination in the mv rat.
Brain Res. 査読有 1195: 120-129, 2008

[学会発表] (計 4 件)

① Kuramoto T, Kuwamura M, Tokuda S, Izawa T, Nakane Y, Kitada K, Akao M, Guénet JL, Serikawa T.
A mutation in the gene encoding mitochondrial Mg²⁺ channel MRS2 results in demyelination in rats.
24th International Mammalian Genome 2010 年 10 月
Conference, Crete, Greece

② 庫本高志, 桑村 充, 徳田智子, 井澤武史, 中根良文, 北田一博, Jean-Louis Guenet, 芹川忠夫
ラット demyelination (dmy) 変異のポジショナルクロニング
第 57 回 日本実験動物学会総会
2010 年 5 月 京都大学 (京都市)

③ 相馬克実, 桑村 充, 井澤武史, 山手丈至, 芹川忠夫,
ミエリン異常ミュータントラット VF の病態解析
第 148 回 日本獣医学会 2009 年 9 月
鳥取大学 (鳥取市)

④ Izawa T, Takenaka S, Kotani T, Yamate J, Kuwamura M
Altered myelinogenesis and glial responses in the attractin-deficient mv rat.
26th Annual meeting of European Society of Veterinary Pathology
2008 年 9 月 19 日, Dubrovnik, Croatia

[その他]

ホームページ等

<http://www.vet.osakafu-u.ac.jp/path/path.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑村 充 (KUWAMURA MITSURU)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：20244668

(2) 研究分担者

山手丈至 (YAMATE JYOJI)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：50150115

(3) 連携研究者

なし