

平成 29 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14349

研究課題名（和文）生体環境の若返りによる傷害中枢神経系の修復促進

研究課題名（英文）Young systemic environment regulates central nervous system remyelination

研究代表者

村松 里衣子 (Rieko, Muramatsu)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：90536880

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：様々な疾患により脳や脊髄が傷つくと、運動機能麻痺、感覚機能麻痺、認知機能障害など、多彩な症状があらわれる。疾患の種類や個人差はあるが、症状はわずかに自然に回復する。ただ、症状の改善は、歳を重ねるとともに難しくなる。症状の改善には、疾患により傷ついた神経回路が修復する必要であり、加齢とともに神経回路は修復しにくくなる。本研究では、加齢に伴う神経回路の修復力低下の分子メカニズムを探求した。

研究成果の概要（英文）：Central nervous system (CNS) injury causes severe neurological dysfunctions, such as motor dysfunction, sensory dysfunction, cognitive dysfunction, and so on. These neurological dysfunctions are partially recovered spontaneously. However, the degree of functional recovery decreases with age. Recovery of neurological function is dependent on the regeneration of neuronal network. Regeneration of neuronal network is considered to be controlled by the factors in the CNS. In this study, we investigated the molecular mechanism of the inhibition of neuronal network regeneration in aged mice.

研究分野：神経科学

キーワード：老化 脳 脊髄 オリゴデンドロサイト 神経

## 1. 研究開始当初の背景

脳と脊髄からなる中枢神経系は、記憶や学習、運動機能、感覚機能、呼吸など、全身の恒常性を保つ役割を持つ。様々な中枢神経系疾患に罹患すると、病巣ができた部位に応じて、様々な症状があらわれる。神経系の機能は、神経細胞間のネットワーク(神経回路)により維持されているが、疾患により神経回路が傷害されることが、症状の発症や悪化に繋がると考えられている。症状を改善させるためには、傷ついた神経回路を修復させることが有望と考えられているが、神経回路の修復のメカニズムには不明な点が多い。特に、神経回路の修復力は、加齢とともに減弱することが知られているが、若齢と老齢における神経回路の修復力の差の原因も、わかっていない。

神経回路の修復の過程のひとつに、髄鞘の修復がある。髄鞘は、軸索の周囲を取り囲む構造物であり、神経活動の跳躍伝導を可能にさせたり、内部の神経細胞への栄養供給を担うなど、神経系の機能維持に重要な役割をになっている。髄鞘の傷害は、脱髄疾患として知られる指定難病の多発性硬化症が最も注目を集めているが、最近では複数の精神疾患でも髄鞘による病因仮説が提唱されている。髄鞘の修復に関しては、中枢神経系の内部に備わる分子が、髄鞘修復にどのように作用するかという視点で、多くの研究が進められている。

## 2. 研究の目的

上述のように、髄鞘の修復を含む中枢神経系の修復研究の多くは、中枢神経系の内部の環境に着目されており、それは正常状態では脳や脊髄は血液脳関門や血液脳性髄関門によって、末梢環境から隔離されていることと一致する。しかし我々のこれまでの研究で、中枢神経系の修復には、末梢の臓器が産生するホルモンが関与することを見出しつつある(論文修正中)。この研究では特に髄鞘の修復をターゲットとして、中枢神経傷害後に脳脊髄に漏れこむ血液の中に、髄鞘の修復を制御する因子が含まれることを示してきた。

一般的な話として、血液中のホルモンの量は加齢とともに変化すると知られる。しかし、加齢による血液中のホルモンの変化と脳脊髄との関連については不明である。そこで本研究では、加齢に伴い血液中に含まれる髄鞘修復制御ホルモンの量に変化があり、中枢神経傷害後に脳脊髄内へ髄鞘修復制御ホルモンが漏れこむが、加齢とともに漏れこむ髄鞘修復制御ホルモン量に差があるために、髄鞘修復に差が生じるという仮説を立てた。髄鞘はオリゴデンドロサイトから形成されるが、その前駆細胞(オリゴデンドロサイト前駆細胞、Oligodendrocyte precursor cells, OPCs)は生涯にわたり、脳脊髄に広く分布している。OPCが髄鞘を形成するには、脳脊髄へプールされているOPCを増殖させて、髄鞘を修復

させる部位へOPCが集積(遊走)し、さらに成熟オリゴデンドロサイトへ分化する必要がある。そこで本研究では、マウスを使用し、若齢血液と老齢血液のOPC発達に対する作用の違いを検討し、その分子メカニズムを追求することを目的とした。

## 3. 研究の方法

若齢マウス(3週齢)と老齢マウス(1.5年齢以上)から採血し、室温で30分静置後、3,000 x g、4分で5分間遠心し、上清(血清)を回収した。血清は使用時まで-80で保管した。

OPCは生後1日齢のマウスから採取した。マウス脳を摘出し、市販のキットを用いて単一細胞へ分散した。細胞は、OPCマーカーのPlatelet derived growth factor receptor (PDGFR) $\alpha$ 抗体を結合させた磁気ビーズ(市販品)と反応させ、PDGFR $\alpha$ 陽性細胞のみを単離した。細胞は予めPoly-L-lysineでコートした培養皿に播種し、OPC medium (Takahashi, et al., Cell Death Dis. 2013)で培養した。

採取した血清を培養OPCに暴露させ、OPCの増殖、遊走、分化への作用を検討した。増殖は、5-Bromo-2'-Deoxyuridine(BrdU)の細胞内への取り込みを測定した。遊走は、Transwell内にOPCを播種し、培養後にTranswell下層へ遊走した細胞を可視化して(DAPIで染色)、細胞数を計測して評価した。分化は、培養後に成熟オリゴデンドロサイトのマーカーであるmyelin basic protein (MBP)とオリゴデンドロサイト系譜細胞のマーカーOlig2を共染色し、Olig2陽性細胞におけるMBPエリアを測定することで評価した。

血清によるOPCへの作用の分子メカニズムを同定するために、薬理的なスクリーニングを実施した。種々の受容体阻害剤(市販品)を培養OPCに処置し、若齢マウス血清と老齢マウス血清によるOPCへの作用に差がみられた現象に対して、実施した。

OPCでの遺伝子発現を制御は、候補分子のsiRNAをOPCに導入して行った。遺伝子発現変動は、real time PCRで確認した。

血清中の分子発現の変化はELISAで検出した。

培養実験で得られた結果が個体レベルでも観察できるかを検証するため、マウスの脊髄に局所的に脱髄を誘導するモデルを使用した。薬剤をマウス脊髄に注入し脱髄を誘導するモデルでは、急性期の脱髄に続き、成体では時間経過とともにない髄鞘が修復する。まず老齢マウスでは髄鞘の修復が遅延しているかを、組織学的に観察した。さらに、培養実験で得られた分子メカニズムが老齢マウスにおける髄鞘修復の遅延に関与するか、薬理的に検討した。

## 4. 研究成果

幼若マウスと老齢マウスの血清をそれぞれOPC培養系に処置したところ、特にOPCの

遊走に関して、老齢マウスでは阻害される傾向を観察した。そこで、老齢マウスで若齢よりも豊富に含まれる分子が、OPC の遊走を阻害すると考え、薬理的なスクリーニングを実施したところ、老齢マウスによる OPC 遊走阻害をキャンセルさせる薬剤が獲得できた。この薬剤は、ある受容体の阻害剤であったため、その受容体の発現を OPC で特異的に抑制させ、さらに老齢マウスの血清を暴露させたところ、OPC 遊走の阻害効果が抑制された。さらに、その受容体発現を抑制させた OPC に対して下流シグナル(既知)を活性化する処置を施すと、遊走阻害効果が復元された。これらの結果は、老齢マウス血液に含まれる分子による OPC 遊走阻害効果に関わる受容体が同定できたことを意味する。

同定した受容体のリガンドは2種類あると報告されている。そこで血清中のリガンド2種類の含有量が、加齢とともに変化するか、ELISA で検討した。すると、1種類のリガンドについては、若齢マウスの血液よりも老齢マウスの血液で豊富であることがわかった。

続いて老齢マウスにおける髄鞘の修復が、若齢よりも生じにくいかを検討した。マウス脊髄での脱髄巣における、MBP 陰性領域の変化を経時的に検討したところ、老齢マウスにおける MBP 陰性エリアの減少率は、若齢マウスよりも低く、このことから老齢マウスでは髄鞘修復が阻害されていることが示唆された。また、OPC の遊走が阻害されているかを検討するために、脱髄巣周囲での細胞集積も観察したが、老齢マウスでは OPC の集積が阻害されることもわかった。そこで、培養実験で獲得した OPC 遊走阻害効果をキャンセルさせる薬剤を、老齢マウスに処置し、髄鞘の修復および OPC の集積への影響を観察した。その結果、老齢マウスにおける脱髄後の OPC の集積が促され、髄鞘修復も促進した。これらの結果から、老齢マウスの血液に含まれる分子が、OPC の遊走の阻害効果をもつこと、その分子の作用を減弱させることで、OPC の集積が高まり髄鞘の組織治癒を促すことができるとわかった。

得られた分子メカニズムについて、老齢マウス内に見出した分子が、OPC 特異的に作用するかを検証するため、中枢神経系における見出した分子の受容体の発現様式を検討した。その結果、目的の受容体の発現は OPC に限るわけではないことがわかった。この観察結果から、老齢マウスへの薬理的な処置による髄鞘修復効果は、薬剤が OPC 以外の細胞に作用し、その細胞が二次的に OPC の発達に影響するという可能性が考えられた。そのようなメカニズムが存在するのか、あるいは同定分子が OPC に直接作用することで髄鞘修復が促されるかを追求するため、現在、OPC 特異的に受容体を欠失するマウスを作成している。老齢での本マウスの髄鞘修復効果を検討することで、OPC における目的受容体の役割を解明することができると考えている。ま

た、リガンド側の関与もさらなる追求が必要である。同定したリガンドの全身での発現パターンを解析したところ、特定の臓器で豊富に発現するものであることがわかった。加齢によりなぜその臓器で発現が高まるかも調査し、老化環境でいかにして脳脊髄の修復が制御されるか、特に全身の臓器連関の視点での解明していきたい。

#### 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0件)

[学会発表](計4件)

村松 里衣子、ある女性研究者の状況、京大大学生命科学研究科第一回男女共同参画セミナー、招待講演、2016年3月4日、京都府京都市

村松 里衣子、中枢神経系の修復を目指して、第89回日本薬理学会、教育セミナー、2016年3月11日、神奈川県横浜市

濱口 真慈、村松 里衣子、山下 俊英、成体マウス血清に含まれる髄鞘修復因子の同定、第129回日本薬理学会近畿部会、口頭発表、2016年6月24日、広島県広島市

Ozaki T, Muramatsu R, Fujinaka T, Yoshimine T, Yamashita T. The P2X4 receptor is required for neuroprotection via ischemic preconditioning, International Stroke Conference 2017, oral presentation, 2017年2月24日、アメリカ、ヒューストン

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：

取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大阪大学大学院医学系研究科  
分子神経科学・准教授  
村松 里衣子 (Muramatsu Rieko)  
研究者番号：90536880

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )