

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03554

研究課題名(和文) 脳神経回路の修復機構の統合的理解

研究課題名(英文) Integration of systemic regulation toward neuronal regeneration

研究代表者

村松 里衣子 (Muramatsu, Rieko)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・部長

研究者番号：90536880

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：脳疾患に罹患すると様々な症状があらわれる。症状は重篤であり、自然に回復することも難しい。症状の自然回復が困難な理由のひとつに、病態で傷ついた神経組織が自然に修復しないことが挙げられる。特に、症状の改善につながると期待される神経回路の修復は難しく、そのメカニズムの解明に立脚した治療薬の開発が待ち望まれている。本研究では、神経回路の修復のメカニズムについての解明を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経回路の修復のメカニズムは未だ不明な点が多いが、本研究を通じて、神経回路の修復機構の一端を解明した。特に、様々な疾患で共有して認められるミエリンの脱落に対して、修復を促進させる機序を見出した。さらに、その機序は発生期のミエリン修復に対しても有効であることを、国際共同研究により報告した。得られた知見は、発生期および成体における神経回路の修復の共通点を示すものであり、生涯にわたる脳機能の改善のメカニズムの理解にも展開する可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：Central nervous system (CNS) disease causes various symptoms, which are severe and complicated with spontaneous recovery. One of the reasons for the difficulty of ameliorating neuronal dysfunction is that the CNS environment prevents the repair of neural tissue after damage. In particular, the damage to the neuronal networks is recognized that the cause of neuronal dysfunction. Regeneration of neuronal networks is considered to promote recovery from neurological dysfunction. In this study, we investigated the mechanism that regulates CNS regeneration.

研究分野：神経科学

キーワード：軸索 瘢痕

1. 研究開始当初の背景

脳神経疾患により重篤な神経症状があらわれる。症状の回復には、傷ついた組織の修復が必要であり、中でも神経機能を担う回路の修復は、機能回復へ直結すると期待され、そのメカニズムの解明が待ち望まれている。神経回路は神経細胞の突起によるネットワークに加え、神経軸索を取り巻く髄鞘により構成されている。髄鞘は、神経活動の伝達を高速化する働きをもち、さらに周囲細胞への栄養供給をする機能も有することから、中枢神経系の恒常性の維持に重要な組織であると認識されている。実際に、多岐にわたる脳疾患で髄鞘の脱落が検出され、脳機能の悪化との関連が指摘されていることから、髄鞘修復の促進は様々な脳疾患の症状改善につながると期待される。しかし、髄鞘の修復メカニズムには不明な点が多い。

2. 研究の目的

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り構成される。オリゴデンドロサイトの前駆細胞(Oligodendrocyte precursor cells, OPCs)は生涯にわたり、脳と脊髄内に広範に配置している。髄鞘の修復には、傷害の刺激を受けた OPC が増殖を促進させ、成熟細胞へと分化する必要がある。神経細胞のネットワークと同様に、成体の脳内にはオリゴデンドロサイトの発達を促進させる要素は乏しく、髄鞘の修復も困難であること認識されている。しかし、傷害の直後の病巣では髄鞘が自然に修復する現象が報告され、このことから傷害環境には髄鞘の修復を促す機序が備わると推察した。研究代表者らはこれまでに、髄鞘の修復機構について、特に病巣の血管系の破綻との関連に着目した研究を実施しており、OPC の増殖に関しては、病巣の血液に含まれる分子が促進的に働くことを報告している(Kuroda et al, *J Clin Invest*, 2017)。増殖した OPC は成熟細胞へ分化することで、髄鞘の修復をもたらす。そこで本研究では、OPC の分化の機序を解明することを目的として、血液による OPC の分化への作用の評価と、分化促進のメカニズム解明を行った。

3. 研究の方法

成体マウスの血液がマウス OPC の分化を促進するか検討するため、成体マウスから無菌的に血清を採取した。マウス OPC の培養は、幼若マウス脳から作成した混合グリア培養から細胞接着の差を利用して OPC を回収し、未分化性を維持する条件下で培養を行った。培養後、分化マーカー Myelin basic protein (MBP) を免疫染色により可視化し、In Cell Analyzer を用いて MBP 陽性エリアを検出、その領域を計測することで分化度を評価した。成体マウス血清による OPC 分化効果のメカニズム解明のため、培養 OPC をあらかじめ各種シグナル伝達阻害剤を処置し、その後血清を加えて培養を行い、MBP 陽性面積を計測することで、血清に含まれる OPC の分化を促進する機序のスクリーニングを行った。ヒットした阻害剤の効果を検証するため、阻害剤の標的となる分子の発現を siRNA を OPC に導入することで抑制させ、血清暴露による分化促進効果に対する評価を行った。また、一部の標的分子に対しては、recombinant protein の添加実験による分化促進効果の検証を行った。

培養実験の結果を受け、候補分子の生体内での発現様式を検討した。成体マウスの全臓器を摘出し、各臓器からタンパク質を抽出し、ELISA 法を用いて各組織内で目的とする分子の含有量を計測した。また、脳と末梢臓器における候補分子の含有量を検討するため、成体マウス脳から採取した脳脊髄液と血清における候補分子の濃度も、ELISA 法で検出した。

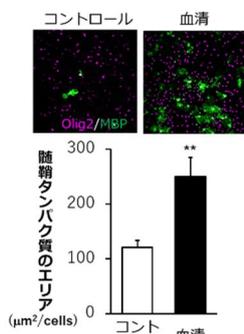
中枢神経系の脱髄における修復効果を検討するため、薬剤誘導性の脱髄モデルを用いた。マウス下部胸髄背側に、Lysophosphatidylcholine (LPC) 水溶液を充填させたガラスキャピラリーの先端を差し込み、局所的に脱髄を誘導した。同マウスに対して、候補分子に対する中和抗体あるいは血小板除去作用を持つ抗体を投与した。オリゴデンドロサイト特異的な遺伝子組み換えマウスの作成には、PLP-Cre^{ERT} マウスと候補分子の受容体に対する flox マウスを掛け合わせ、タモキシフェンによる誘導を行った。髄鞘の修復の組織学的解析には、各処置を施したマウスの脊髄組織を摘出し、薄層切片を作成して、免疫染色により髄鞘を可視化した評価を行った。形態学的な解析には、同処置を施したマウスの組織を用いて、電子顕微鏡での解析を行った。髄鞘の修復の定量評価のため g-ratio の算出を行った。

マウスで得られた結果がヒトでも保存されている可能性を追及するため、多発性硬化症患者由来の脳切片で候補分子の受容体発現を免疫染色報により検出した。見出した機序がヒト OPC の分化促進作用を発揮するか検討するため、培養ヒト OPC (市販品) に対してヒト型の候補分子を暴露し、分化マーカーの発現を検出した。

4. 研究成果

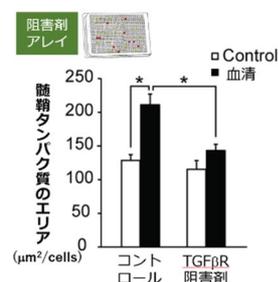
成体マウス血清を培養 OPC に暴露し、培養後の MBP 陽性エリアを計測したところ、血清暴露群では有意に MBP 陽性面積が増大した(図1左)。このことから、成体マウスの血液には OPC の分化を促進させる作用を持つ分子が含まれると推察された。そこで、成体マウス血液による OPC 分化促進効果に関わる分子を探索するため、各種シグナル伝達阻害剤を用いたスクリーニングを行った。その結果、TGFβ 受容体阻害剤をあらかじめ処置した OPC 培養系では、成体マウス血清による分化促進効果が減弱した(図1右)。なお、mouse recombinant TGFβ 単独処置においても MBP 陽面積の拡大が検出されたことから、成体マウスの血液中の TGFβ が OPC 分化のキー分子であることが示唆された。

血液により OPC 分化が促進



マウス OPC に成体マウス由来の血清を暴露、培養後の MBP 陽性エリアを計測

TGFβ 阻害により分化が阻害

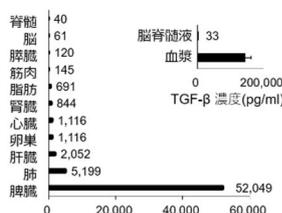


阻害剤アレイをもちいた薬理的スクリーニング
血清による MBP 陽性領域の拡大を TGFβ 阻害剤が阻害

図1. 成体マウス血液による TGFβ 受容体を介した OPC 分化促進効果

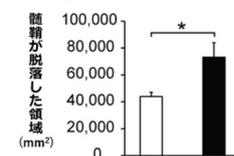
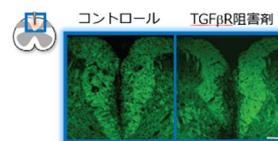
個体レベルでの髄鞘修復における TGFβ の寄与を検討するため、まず成体マウスの体内での TGFβ の発現様式を検討した。初めに、脳と能以外の臓器のいずれで TGFβ の含有量が豊富か検討するため、成体マウスの脳脊髄液と血漿を採取し、それぞれの TGFβ 濃度を計測した(図2左上)。すると血漿での TGFβ 含有量が豊富であると検出されたため、続いて脳以外のいかなる臓器で TGFβ が豊富に備わるか検討した。検討した範囲では脾臓での TGFβ 含有量が多かった(図2左)。

脾臓が TGFβ の主要産生臓器



マウスの各臓器、脳脊髄液と血漿の TGFβ タンパク量 (ELISA)

TGFβ 阻害により髄鞘修復が阻害



LPC 注入後、TGFβ 阻害剤を継続投与 (i.t.)

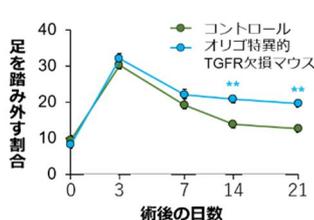
図2. TGFβ の発現様式と TGFβ 受容体を介した髄鞘修復効果

髄鞘修復への内在性の TGFβ の寄与を検討するため、マウス脊髄背側に LPC を局所注入し脱髄を誘導した。LPC により脱髄が誘導されても、時間がたつにつれて、自然に髄鞘が修復することが知られる。内在性の TGFβ の働きを阻害することで、髄鞘の自然修復が妨げられるか検討した。TGFβ の機能阻害抗体を投与した脱髄モデルマウスでは、対象群と比較して脱髄エリアが広いまま維持された(図2右)。このことから、マウスの体内の TGFβ が髄鞘の自然修復を支えていることが示唆された。また、同条件により脱髄を誘導したマウスでは、後肢の機能に障害があらわれ、髄鞘の修復と同じ経過で運動機能も改善することが知られる。TGFβ 機能阻害抗体を投与したマウスでは、LPC 注入による運動機能障害に対する回復効果も、阻害された。このことから TGFβ は神経機能障害の自然回復にも寄与すると示唆された。

血中 TGFβ による髄鞘修復効果が、TGFβ がオリゴデンドロサイトに直接作用した結果であるかを検討するため、オリゴデンドロサイト特異的な TGFβ 受容体欠損マウスを作成し、脱髄誘導後の髄鞘修復および運動機能の回復に対する効果を検討した。すると LPC 注入より誘導された脱髄からの修復効果は、オリゴデンドロサイト特異的な TGFβ 受容体欠損マウスでは対象群と比較し弱かった。また行動試験の結果も同様に、オリゴデンドロサイト特異的な TGFβ 受容体欠損マウスではコントロール群と同様に脱髄誘導により神経機能障害が認められるが、その後の回復効果はコントロール群と比較し軽微であった(図3左)。

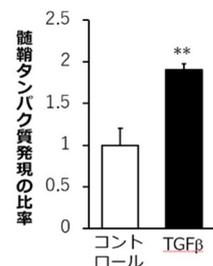
内在性の TGFβ が髄鞘の自然修復に寄与することが見出されたため、さらに加えることで治療効果が見出されるか検討した。脱髄疾患で

運動機能の改善も抑制



PLP-Cre^{ERT}/TGFβR flox マウス ladder walk test
運動機能の自然回復が阻害

ヒト OPC の分化も促進



ヒト培養 OPC をヒト TGFβ で刺激
MBP mRNA 量を計測

図3. オリゴデンドロサイトにおける TGFβ 受容体の関与とヒト細胞の応答性

ある多発性硬化症の実験動物モデル（自己脳脊髄炎）マウスに対して、脳脊髄炎誘導後に神経症状が悪化しピークを迎えてから、recombinant TGFβを投与した。その結果、脳脊髄炎による神経症状が有意に改善した。さらに同処置を施したマウスの組織解析の結果から、脳脊髄炎マウスで通常認められる脱髄が TGFβ投与群では少なくなっており、TGFβの投与が髄鞘の修復を促したと推察された。

マウスで検出された TGFβによる髄鞘修復効果が、ヒトでも同様の作用を示すか検討するため、ヒト細胞での受容体発現の検討とヒト培養細胞での応答性を検討した。受容体発現について、多発性硬化症患者由来の脳切片を用いて免疫染色によりオリゴデンドロサイトマーカー陽性細胞での TGFβ受容体の発現を検出したことから、ヒトにおいても TGFβがオリゴデンドロサイトに作用する可能性が示唆された。オリゴデンドロサイトの応答性に関しては、ヒト培養オリゴデンドロサイトに対してヒト型 recombinant TGFβを処置し、培養後に分化マーカー遺伝子の発現を評価した。その結果、TGFβを処置分化マーカーの発現の亢進が認められたことから、ヒトでの髄鞘修復にも TGFβが促進効果がある可能性が示された（図 4）。

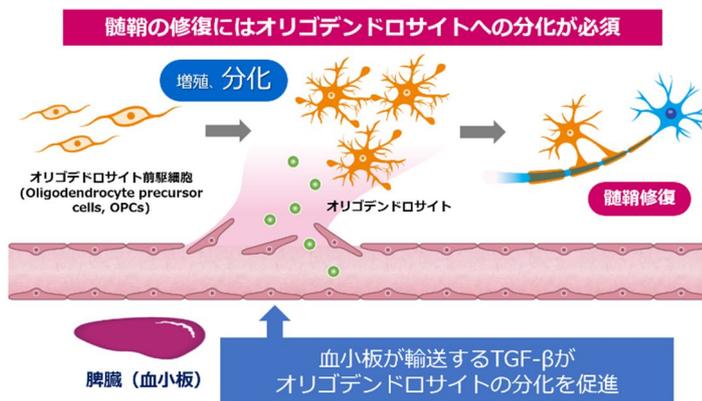


図 4 . まとめ。脾臓が蓄えている TGFβが髄鞘修復を促進。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ito Masumi, Muramatsu Rieko, Kato Yuki, Sharma Bikram, Uyeda Akiko, Tanabe Shogo, Fujimura Harutoshi, Kidoya Hiroyasu, Takakura Nobuyuki, Kawahara Yukio, Takao Masaki, Mochizuki Hideki, Fukamizu Akiyoshi, Yamashita Toshihide	4. 巻 1
2. 論文標題 Age-dependent decline in remyelination capacity is mediated by apelin/APJ signaling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Aging	6. 最初と最後の頁 284 ~ 294
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s43587-021-00041-7	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 該当する

1. 著者名 Hamaguchi M, Muramatsu R, Fujimura H, Mochizuki H, Kataoka H, Yamashita T	4. 巻 8
2. 論文標題 Circulating transforming growth factor- 1 facilitates remyelination in the adult central nervous system	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e41869
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.41869	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ozaki T, Muramatsu R, Nakamura H, Kinoshita M, Kishima H, Yamashita T.	4. 巻 72
2. 論文標題 Proteomic analysis of protein changes in plasma by balloon test occlusion.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Clin Neurosci.	6. 最初と最後の頁 397-401
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jocn.2019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村松里衣子
2. 発表標題 Circulating hormones promote tissue repair in the central nervous system
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------