

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：32202

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2022

課題番号：20K22690

研究課題名（和文）脳内クレアチン代謝を標的とした多発性硬化症に対する新規治療法の開発

研究課題名（英文）Novel therapies for multiple sclerosis by targeting creatine metabolism in the brain

研究代表者

山崎 礼二（Yamazaki, Reiji）

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：00870718

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：多発性硬化症は、運動麻痺や感覚障害が引き起こされる中枢神経系の脱髄性疾患である。本研究では、クプリゾン誘発性脱髄モデルマウスにクレアチンを経口摂取させ、組織学的な解析を行った。その結果、成熟オリゴデンドロサイトの数がクレアチン摂取によって優位に増加し、脱髄が軽減されることを明らかにした。以上の結果より、クレアチンが新しい脱髄予防薬となる可能性が示唆された。また、従来の脱髄モデルマウスでは運動機能と組織再生の両面を評価することは困難であったが、研究代表者が開発した内包脱髄モデルマウスを用いることで、組織学的な解析だけでなく、運動機能回復の両面から評価が可能になることを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在使用されている多発性硬化症の治療薬は免疫抑制を期待しており、直接オリゴデンドロサイトに作用する治療薬開発が望まれている。本研究では、中枢神経系において髄鞘形成細胞であるオリゴデンドロサイトが高いクレアチン合成能を持つことに着目し、治療法開発に応用できると考えた。また、クレアチンは経口摂取が可能だけでなく、副作用も少ないことが予想される。そのため、クレアチンが新しい多発性硬化症の治療薬となることが期待される。また、従来の脱髄モデルでは脱髄後の機能回復を再現性よく評価することは困難であったが、内包脱髄モデルを使用することによって、これまで以上に有効な薬剤評価が可能になることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Multiple sclerosis (MS) is a demyelinating disease of the central nervous system (CNS) characterised by impaired remyelination, axonal degeneration and progressive loss of motor function. In this study, creatine was administered orally to a mouse model of cuprizone-induced demyelination. The results showed that the number of mature oligodendrocytes was significantly increased by creatine treatment. We also found that demyelination was reduced in creatine-treated mice. These results suggest that creatine may be a new drug candidate for MS. In addition, we demonstrated that the focal internal capsule demyelination mouse model can be used not only for histological analysis but also for motor assessment after drug treatment.

研究分野：神経化学

キーワード：オリゴデンドロサイト ミエリン 脱髄 多発性硬化症 クレアチン 再ミエリン化

## 1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症 (MS) は中枢神経系の脱髄による運動麻痺や感覚障害を主症状とする。その患者数は本邦でも年々増加しており、全世界で 250 万人にも上る。MS では再発と寛解を繰り返す中で進行型へと移行し、最終的には自身で歩行することも困難となる。進行型 MS ではミエリン形成細胞であるオリゴデンドロサイトの機能低下に伴う再ミエリン化障害や、脱髄後の二次性軸索変性による後遺症が問題となるため、細胞保護・再ミエリン化の促進に着目した治療法開発は、最重要課題の 1 つである。

クレアチンは ATP 欠乏時に ATP を供給し、エネルギー産生や細胞生存に極めて重要である。これまでにクレアチン合成酵素であるグアジニノ酢酸メチル基転移酵素 (GAMT) が、再ミエリン化の過程で急激に発現増加することが報告されている<sup>1)</sup>。オリゴデンドロサイトは短期間で多量の脂質やタンパク質を突起の先端に輸送し、軸索周囲に多数のミエリンを形成するため、ミエリンの形成や再生過程では大量の ATP を必要とする。そのため、再ミエリン化に必要な ATP を供給することが重要と考え、クレアチン代謝に着目した。クレアチンのトランスポーターである Creatine transporter (CRT) は血液脳関門に発現しているため、中枢移行性が高く、経口摂取でも効果が期待できると考えられる。また、クレアチン投与は脳梗塞後の神経細胞死を抑制することが報告されている。しかし、クレアチンによる脱髄予防効果や脳内でのクレアチン作用機構は不明である。

## 2. 研究の目的

- (1) 本研究では脱髄モデルマウスにクレアチンを投与することでオリゴデンドロサイトの細胞死および脱髄を抑制できるかを検証し、その作用機序を明らかにすることを目的とした。そこで、脱髄モデルマウスにクレアチンを経口摂取させることで脱髄を検証し、クレアチン摂取に伴う変化を解析した。
- (2) これまで MS 研究には脱髄モデルマウスが頻繁に使用されてきたが、従来の脱髄モデルでは、脱髄に伴う運動機能障害後の回復過程を再現性良く評価することは困難であることが指摘されてきた。そこで、研究代表者は四肢の運動を制御する皮質脊髄路の主要経路である内包白質を局所的に脱髄させることで運動機能障害が見られ、組織再生に伴い運動機能が回復する新たな脱髄マウスモデル (内包脱髄モデル) を開発した<sup>2)</sup>。本研究では、研究代表者が独自に開発した内包脱髄モデルマウスによって有効な薬剤評価が可能であるかを評価し、新たな薬剤評価系を確立させることも目的とした。

## 3. 研究の方法

- (1) 代表的な脱髄モデルマウスには銅のキレート材であるクプリゾンを含む特殊飼料を数週間経口投与することによって脳梁部を脱髄させるクプリゾン誘導性脱髄モデルマウスが挙げられる<sup>3)</sup>。クプリゾン誘導性脱髄モデルマウスは成熟オリゴデンドロサイトのアポトーシスが誘導され、脳内の脱髄を誘発させることが知られている。また、本研究で使用するクレアチンは、血液脳関門にクレアチントランスポーターが発現していることから、中枢移行性が高いという利点を持つ。そこで、クプリゾンにクレアチンを含有させた特殊飼料を作製し、クプリゾンとクレアチンを経口によって同時摂取させることにした。まず、8 週齢の C57BL/6 マウスに 0.2%クプリゾン含有飼料 (CPZ) または 0.2%クプリゾン/2%クレアチン含有飼料 (CPZ/CR) を 5 週間経口摂取させ、脱髄モデルマウスを作製した。次に、各群のマウスの脳凍結切片を作製し、組織学的な解析を行った。
- (2) (1) と同様に CPZ 摂取マウスと CPZ/CR 摂取マウスを作製後、電子顕微鏡観察用にサンプリングを行った。電子顕微鏡観察用のサンプリングをする際には、研究代表者が開発したニューラルレッドによる標識法<sup>4, 5)</sup> を用いて脱髄部位を標識したのち、2.5%グルタルアルデヒド/4%PFA で灌流固定し、組織片の摘出を行った。摘出した組織片をエポン樹脂包埋したのち、透過型電子顕微鏡 (TEM) により観察した。
- (3) クレアチン摂取による脱髄予防効果の作用機序を明らかにするために、CPZ 摂取マウスまたは CPZ/CR 摂取マウスの脱髄部位から RNA を抽出し、マイクロアレイによる網羅的な遺伝子解析を行った。
- (4) 内包脱髄モデルによって、有効な薬剤評価が可能かどうかを調べるために、成熟マウスの内包に脱髄誘導剤であるリゾレシチンを投与し、内包脱髄モデルマウスを作製した。その後、現在再ミエリン化促進薬として最もエビデンスの高いクレマスチンをポジティブコントロールとして、脱髄誘導後に薬剤の投与を開始し、運動機能解析と組織学的な解析を行った。

## 4. 研究成果

- (1) クレアチンの脱髄予防効果を検証するために、CPZ または CPZ/CR を摂取させたマウス脳梁の組織学的解析を行った。まず、初めに CPZ または CPZ/CR 摂取によって脳梁部が脱髄されているかを調べるために FluoroMyelin 染色を行った。その結果、脱髄が確認された。次に、

ミエリンのマーカーとして、主要なミエリンタンパク質である myelin basic protein (MBP), 脱髄部位に集積するマクロファージ/ミクログリアのマーカーである ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1), オリゴデンドロサイト系譜細胞のマーカーである Olig2, 成熟オリゴデンドロサイトのマーカーである adenomatous polyposis coli (APC/CC1) 抗体を用いて蛍光免疫組織染色法により脱髄部位の解析を行った。その結果、CPZ/CR 投与群では主要なミエリンタンパク質である MBP の染色蛍光強度が高く、クレアチン摂取によって成熟オリゴデンドロサイトの数が脱髄部位内で優位に増加することが明らかになった。

- (2) CPZ または CPZ/CR を摂取させたマウス脳梁を電子顕微鏡により解析を行ったところ、CPZ/CR 摂取群では脱髄内で優位に有髄軸索が多いことが明らかになった。この結果から、クレアチン摂取により脱髄が軽減されていることが示された。また、ミエリンの厚さの指標として頻りに使用されている G-ratio(軸索と軸索を含んだミエリンの直径比率)を算出したところ、CPZ/CR 投与群では優位に G-ratio が低下していることが明らかになった。以上の結果から、クレアチンを経口摂取させることによって、ミエリンの厚さが優位に厚く、脱髄を軽減させることが示された。
- (3) CPZ 摂取マウスまたは CPZ/CR 摂取マウスの脱髄部位を用いたマイクロアレイ解析の結果から、多くの遺伝子発現が変動することを明らかにした。その中にはオリゴデンドロサイト特異的な遺伝子も含まれていることから、クレアチンが多発性硬化症の新たな治療候補化合物であることが示唆された。
- (4) 内包脱髄モデルマウスにクレマスチンを投与させることで再ミエリン化の促進に伴う運動機能回復を評価することが出来た。また、クレマスチン投与後の組織学的な解析から、内包内でクレマスチン投与群ではオリゴデンドロサイトの分化が促進され、軸索障害が軽減されていること、有髄軸索が優位に増加し、G-ratio が優位に低下していることからミエリンの厚さが回復していることを明らかにした。これらの結果から、内包脱髄モデルは組織解析だけでなく、運動機能も同一個体で評価可能であることを明らかにした<sup>6)</sup>。

#### <引用文献>

1. Chamberlain KA, Chapey KS, Nanesco SE, Huang JK, Creatine Enhances Mitochondrial-Mediated Oligodendrocyte Survival After Demyelinating Injury. *J Neurosci.* 2017; 37(6):1479-1492.
2. **Yamazaki R**, Ohno N, Huang JK, Acute motor deficit and subsequent remyelination-associated recovery following internal capsule demyelination in mice. *J Neurochem.* 2021; 156(6):917-928.
3. Matsushima GK and Morell P., The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system. *Brain Pathol.* 2001; 11(1):107-116.
4. Baydyuk M, Cha DS, Hu J, **Yamazaki R**, Miller EM, Smith VN, Kelly KA, Huang JK. Tracking the evolution of CNS remyelinating lesion in mice with neutral red dye. *Proc Natl Acad Sci USA* 2019;116(28): 14290-14299.
5. **Yamazaki R**, Osanai Y, Kouki T, Shinohara Y, Huang JK, Ohno N. Macroscopic detection of demyelinated lesions in mouse PNS with neutral red dye. *Scientific Reports* 2021;11(1): 16906. doi: 10.1038/s41598-021-96395-4.
6. **Yamazaki R**, Osanai Y, Kouki T, Huang JK, Ohno N. Pharmacological treatment promoting remyelination enhances motor function after internal capsule demyelination in mice. *Neurochemistry International* 2023; 164:105505. doi: 10.1016/j.neuint.2023.105505.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamazaki Reiji, Osanai Yasuyuki, Kouki Tom, Huang Jeffrey K., Ohno Nobuhiko	4. 巻 164
2. 論文標題 Pharmacological treatment promoting remyelination enhances motor function after internal capsule demyelination in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 105505 ~ 105505
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.2023.105505	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Battulga Batpurev, Shiizaki Kazuhiro, Miura Yutaka, Osanai Yasuyuki, Yamazaki Reiji, Shinohara Yoshiaki, Kubota Yoshiyuki, Hara Toru, Kuro-o Makoto, Ohno Nobuhiko	4. 巻 13
2. 論文標題 Correlative light and electron microscopic observation of calcium phosphate particles in a mouse kidney formed under a high-phosphate diet	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-28103-3	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Osanai Yasuyuki, Yamazaki Reiji, Shinohara Yoshiaki, Ohno Nobuhiko	4. 巻 10
2. 論文標題 Heterogeneity and regulation of oligodendrocyte morphology	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2022.1030486	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Osanai Yasuyuki, Battulga Batpurev, Yamazaki Reiji, Kouki Tom, Yatabe Megumi, Mizukami Hiroaki, Kobayashi Kenta, Shinohara Yoshiaki, Yoshimura Yumiko, Ohno Nobuhiko	4. 巻 47
2. 論文標題 Dark Rearing in the Visual Critical Period Causes Structural Changes in Myelinated Axons in the Adult Mouse Visual Pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurochemical Research	6. 最初と最後の頁 2815 ~ 2825
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11064-022-03689-8	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Yamazaki Reiji, Osanai Yasuyuki, Kouki Tom, Shinohara Yoshiaki, Huang Jeffrey K., Ohno Nobuhiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Macroscopic detection of demyelinated lesions in mouse PNS with neutral red dye	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-96395-4	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 該当する

1. 著者名 Inagaki Takeshi, Fujiwara Ken, Shinohara Yoshiaki, Azuma Morio, Yamazaki Reiji, Mashima Kiyomi, Sakamoto Atsushi, Yashiro Takashi, Ohno Nobuhiko	4. 巻 Published online
2. 論文標題 Perivascular macrophages produce type I collagen around cerebral small vessels under prolonged hypertension in rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Histochemistry and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00418-020-01948-9	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

[学会発表] 計11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山崎礼二、長内康幸、幸喜富、大野伸彦
2. 発表標題 Clemastine improves motor dysfunction caused by internal capsule demyelination in mice.
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山崎礼二、長内康幸、幸喜富、篠原 良章、大野伸彦
2. 発表標題 内包脱髄モデルマウスによる再髄鞘化促進薬の新たな評価法
3. 学会等名 第65回日本神経化学会, 第45回日本神経科学会, 第32回日本神経回路学会合同大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山崎礼二、長内康幸、幸喜富、篠原 良章、大野伸彦
2. 発表標題 Novel detection method of demyelinated lesions in mouse PNS with neutral red dye
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山崎礼二、長内康幸、幸喜富、篠原 良章、大野伸彦
2. 発表標題 ニューラルレッド色素によるマウス末梢神経系脱髄部位の肉眼的検出
3. 学会等名 第 64 回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長内 康幸, バツツルガ バツプレブ, 山崎 礼二, 山本 真理子, 幸喜 富, 矢田部 恵, 水上 浩明, 上野 将紀, 小林 憲太, 吉村 由美子, 篠原 良章, 大野 伸彦
2. 発表標題 単眼の視覚欠如と両眼の視覚欠如が髄鞘形成に与える影響の解析
3. 学会等名 第 64 回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山崎礼二、ジェフリーハング、大野伸彦
2. 発表標題 多発性硬化症に対する新たな薬剤評価法の開発
3. 学会等名 第53回日本臨床分子形態学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 稲垣 健志, 山崎 礼二, 長内 康幸, 篠原 良章, 坂本 敦司, 大野 伸彦
2. 発表標題 脳細動脈硬化における血管線維化と脳血管周囲マクロファージの関連
3. 学会等名 第53回日本臨床分子形態学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山崎礼二、長内康幸、幸喜富、篠原 良章、大野伸彦
2. 発表標題 ニューラルレッドを用いたマウス末梢神経系脱髄病変の新たな検出方法
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山崎礼二、長内康幸、幸喜富、篠原 良章、大野伸彦
2. 発表標題 末梢神経系脱髄に対する新たな病変部位標識法の開発
3. 学会等名 第61回日本組織細胞化学学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山崎礼二、ジェフリー・ハング、大野伸彦
2. 発表標題 マウス内包脱髄後の急性運動機能障害と再髄鞘化に伴う機能回復
3. 学会等名 第126回日本解剖学会、第98回日本生理学会合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山崎礼二、ジェフリー・ハング、大野伸彦
2. 発表標題 新規内包脱髄マウスモデルの開発
3. 学会等名 日本解剖学会第108回関東支部学術集会
4. 発表年 2020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
---------	---------