

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 29 日現在

機関番号：83902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461660

研究課題名(和文) 脳内炎症と低酸素が惹起する脳室周囲白質軟化症におけるエピゲノム変化の分子病態解析

研究課題名(英文) Epigenetic effects on the onset of Periventricular Leucomalacia

研究代表者

細川 昌則 (Hosokawa, Masanori)

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・病理学部・所長兼部長

研究者番号：00127135

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：成熟児の出産では、新生児仮死などにより、しばしば低酸素性虚血性脳症(HIE)が生じ、様々な脳障害をきたす。早産児では、分娩時の低酸素性虚血は、脳室周囲の白質の変性、脱落を特徴とする脳室周囲白質軟化症(PVL)をきたす。未熟脳の脳血管系の脆弱性とグリア細胞の未熟性がその原因と考える一方、胎内環境の関わりが言われている。

本研究では、グリア細胞の分化の制御機構について研究を進めたが、先天性脂質代謝異常症の1つニーマンピック病C型の研究過程で、細胞内コレステロール輸送が、オリゴデンドロサイトの前駆細胞からの分化、ミエリン化を制御していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Neonatal hypoxic-ischemia is a condition that result in severe neurologic deficits in children. Periventricular leukomalacia (PVL), a brain hypoxic-ischemia affecting premature infants is commonly associated with cerebral palsy. A brain of premature infants is particularly susceptible to cerebral white matter injury that disrupts the normal progression of developmental myelination. In this study, we investigated pathogenesis of PVL using induced culture cells and animal models. While we are performing experiments, we found that (1) monoacylglycerol lipase (MAGL), an important factor in neuroinflammation, regulates phagocytosis, but not LPS-mediated cytokine induction in microglia. (2) Cholesterol trafficking in immature oligodendrocytes play an important role in maturation of the cells and myelination. These findings will provide a possible preventive approach for white matter injury in PVL.

研究分野：実験病理学

キーワード：脳室周囲白質軟化症 白質障害 実験モデル オリゴデンドロサイト系譜細胞 ミエリン形成不全

1. 研究開始当初の背景

わが国では、早期産児・極低出生体重児の割合が増加しており、32 週未満で出生した早期産児では、脳室周囲白質軟化症 (PVL: Periventricular Leukomalacia) の発症が社会的にも問題となってきた。PVL は、脳性麻痺や知的障害などの神経学的後遺症を残すため、その治療・予防法開発は急務の研究課題である。これまで、PVL の主要な危険因子として、母体感染によって惹起される胎児脳内の炎症反応と低酸素/脳虚血による酸化ストレスが知られ、低酸素/脳虚血、またはリポ多糖 (LPS) の負荷によるPVL の疾患モデル動物が作製されてきたが、それぞれ単独では発症率が低く、また、高濃度のLPS や強い低酸素負荷では、母体、胎仔の死亡率が高いなどの問題点が指摘されていた。一方、周産期の全身管理の進歩により、肉眼的な嚢胞を形成する重度のPVL は減少し、顕微鏡的な壊死にとどまる症例、あるいは壊死を伴わないびまん性白質グリオシスの形をとる症例が増加している。これらの場合、重症PVL 患者でみられるオリゴデンドログリア前駆細胞 (OPC) の細胞死は目立たず、むしろOPCの分化異常による髄鞘形成不全が観察される。また、PVL 病変の主座は、神経幹細胞 (NSC) が存在する側脳室領域の近傍であることから、PVL を惹起する胎児期の脳内炎症と低酸素/脳虚血は、OPC のみならずNSC にも異常をもたらすことが予想される。実際、子宮内感染は、PVL に加え、統合失調症や自閉症など、NSC の異常が関わる精神疾患の危険因子としても知られている。

最近、胎児期や発達期におけるOPCやNSCのエピゲノム制御の異常が、様々な精神・神経疾患の発症に深く関わるということが明らかとなってきた。同様のメカニズムがPVL の病態にも関わるか否かを明らかにすることが、PVL の治療法開発に向けたブレイクスルーとなることが期待される。

2. 研究の目的

本研究では、『脳内炎症環境と低酸素/脳虚血への曝露が、脳室周囲白質軟化症 (PVL) およびそれに伴う運動・精神発達遅滞の原因となる、オリゴデンドロサイト前駆細胞(OPC) と神経幹細胞(NSC) のエピゲノム制御の変化をもたらす』との仮説を、分子レベルからヒト組織レベルで検証することを目的とした。具体的には、PVLモデル系として、初代培養細胞モデル系、実験動物モデル系を用い、(1) 脳内炎症環境と低酸素/脳虚血負荷がOPC とNSC の分化・増殖能に与える影響、(2) それらの変化をもたらす分子メカニズム (特にエピゲノム制御の変化)、(3) エピゲノム制御によるPVL の治療応用の可能性、の3点

について多角的な解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

当初は、炎症環境と低酸素負荷がOPCとNSCの増殖能と分化能に与える影響を、主に細胞ならびに組織レベルで解析し、得られた結果がOPC とNSC のエピゲノム制御の変化によるものかどうか明らかにするため、OPC やNSC の分化関連遺伝子のDNA メチル化やヒストン修飾の変化について解析すること。さらに、PVL 治療の新たな可能性を探るため、薬剤やsiRNA によるエピゲノム制御の正常化によって、PVLモデル動物の神経症状を改善できるか検討することを計画した。

(1) 開始当初は、実験PVLモデル系の確立に努めた。

脳の発達の各時期に、オリゴデンドロサイト(OL)系譜細胞を選択的に脱落させることができるマウスを作製した。

ラット新生仔から単離したミクログリアを培養し、培養系に向炎症状態を誘導するLPS と低酸素負荷状態を誘導するLTAを添加して、PVLモデル培養細胞実験系を立ち上げた。

従来から一般に用いられている、ラットの胎児期にLPSを投与し、出生後に頸動脈結紮、低酸素負荷を行うPVLモデル動物を用いた。

ライソゾーム病の1つであるニーマンピック病C型は、神経細胞やグリア細胞内にコレステロールの蓄積を認める。ニーマンピック病C型においても、白質病変が生じていることを認めたことから、遺伝子改変で作製されたニーマンピック病C型のモデルマウス、ならびに、培養細胞系で遺伝子発現を阻害したニーマンピックC型モデル細胞系を作製した。

ラット新生仔にPVLを誘発させた実験モデル動物の脳組織を解析する際、凍結切片を用いた免疫組織化学的方法では、白質の構造変化に人為的な変化が重なり、組織病変の評価が難しくなる。これを回避するために、脳組織の透明化法を導入し、数100 μ mの厚い切片に免疫組織学的方法を用い、レーザー顕微鏡で観察する方法を導入した。

(2) 以上の実験モデル系を用い、特に白質の変化、OL系譜細胞の分化、培養OPC、ミクログリアを観察の対象とし、それぞれのタンパク質量、遺伝子発現量、酵素活性、培養細胞と組織の免疫組織学的検討を進めた。

4. 研究成果

本研究では、結果として2つの研究成果を得た。

(1) ラットの胎児期にLPSを投与し、出生後に

頸動脈結紮、低酸素負荷を行うPVLモデル動物を用いて、脳内の炎症性サイトカイン、免疫グロブリンスーパーファミリー、ジアシルグリセロール代謝酵素の変化を検討した。特にFc レセプター、モノアシルグリセロールリパーゼ(MAGL)の発現量が増加することを観察した。

この結果を基に、ラット新生仔由来初代培養ミクログリアをLPSとLTAで処理することで、初代培養細胞PVLモデル系を作製した。PVLモデル系ではMAGL活性が増加するが、炎症性サイトカインの産生には関与しないことを明らかにし、学術誌に論文発表した。

(研究成果の項参照)

さらに、PVLモデル動物を用いた実験系の解析をすすめ、患側半球では、MAGLの活性が一過性に増加したが、健側においても、予想に反して活性が増加し、しかも増加した活性が持続する現象を見つけた。この興味深い現象のメカニズムの検討を開始した。

(2) 別に進めてきた、ニーマンピックC型の病態解析の研究において、ライソゾームを介した細胞内コレステロール異常により、OL系譜細胞の分化の異常とそれに伴う髄鞘形成不全が、従来の病態に加え、非常に重要であることを明らかにしてきた。モデルマウス系ならびにモデル細胞培養系を用いた研究をさらに進め、OL細胞内のコレステロール輸送が障害されると、OL系譜細胞の分化に関連するmiRNAの発現が低下し、OL系譜細胞の分化が抑制される事、miRNAを強制発現させることで、阻害されたOL系譜細胞の分化誘導が元に戻ることを発見した。

今回の研究では、当初の計画通りには研究を遂行できなかったが、2つの新しい知見を得た。現象的にはエピゲノム変化を推測させる部分もあったが、直接実証するには至らなかった。ただし、2つの知見は、PVLの発症を軽減させる方法として、具体的な作用点を示唆するものであり、予防法、治療法に結びついていくものと考えている。

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1件)

Kouchi Z.、Monoacylglycerol lipase promotes Fc receptor-mediated phagocytosis in microglia but does not regulate LPS-induced upregulation of inflammatory cytokines、Biochem. Biophys. Res. Commun.、査読有、464、2015、603-610
DOI ; 10.1016/j.bbrc.2015.07.019

[学会発表](計11件)

岸 宗一郎 他、リソソーム機能不全を病因とする Niemann-Pick 病 C 型で見られる髄鞘形成不全の分子病態、第 38 回日本生物学的精神医学会・第 59 回日本神経化学会大会合同年会、2016.9.10、福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

岸 宗一郎 他、Impaired late endosomal lysosomal lipid trafficking attenuates oligodendrocyte differentiation and myelination in Niemann-Pick type C、第 58 回日本神経化学会大会、2016.9.15、大宮ソニックシティ(埼玉県・さいたま市)

岸 宗一郎 他、ニーマンピック病 C 型におけるオリゴデンドロサイト分化関連マイクロ RNA の解析、第 57 回日本神経化学会、2014.9.14、奈良県文化会館(奈良県・奈良市)

河内 全 他、モノアシルグリセロールリパーゼが制御するミクログリアの機能解析、第 86 回日本生化学会大会、2013.9.12、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

河内 全 他、ミクログリアの炎症反応におけるモノアシルグリセロールリパーゼの生理機能、第 56 回日本神経化学会、2013.6.20、国立京都国際会館(京都府・京都市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細川 昌則 (HOSOKAWA, Masanori)
愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・病理学部・部長
研究者番号：00127135

(2) 研究分担者

榎戸 靖 (ENOKIDO, Yasushi)
愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・病理学部・室長
研究者番号：90263326

島田 厚良 (SHIMADA, Atsuyoshi)
愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・病理学部・室長
研究者番号：50311444

千葉 陽一 (CHIBA, Youichi)
愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・病理学部・研究員
研究者番号：30372113
(平成 25 年度まで)

河内 全 (KOUCHI, Zen)
愛知県心身障害者コロニー発達障害研究
所・病理学部・研究員
研究者番号： 70322485

岸 宗一郎 (KISHI, Soichiro)
愛知県心身障害者コロニー発達障害研
究所・病理学部・リサーチレジデント
研究者番号： 60595833
(平成26年度より)