

## 中枢性脱髄障害の神経組織修復に関する研究

研究代表者 村松 里衣子 大阪大学 大学院医学系研究科 分子神経科学 助教

### 研究要旨

本研究の目標は、中枢性脱髄疾患に対して神経組織を修復させる分子標的を探索することである。炎症や外傷により、脳脊髄の髄鞘が脱落すると、障害をうけた部位に応じて様々な神経症状があらわれる。症状の回復には、髄鞘を修復が求められるが、我々はプロスタサイクリンという物質の働きを高めることで、髄鞘の修復が促されることを見出した。マウスの脊髄に限局した脱髄病巣を作成し、患部にプロスタサイクリンの類似体を処置すると、髄鞘の修復が促進した。同マウスでは運動機能を担う神経回路の髄鞘が脱落するため、四肢の運動機能に障害があらわれる。プロスタサイクリンの類似体をマウスへ施すことで、運動機能障害も改善した。本研究から、中枢性脱髄障害に対する新しい治療標的分子として、プロスタサイクリンが有望である可能性が示唆された。

### A．研究目的

本研究の目標は、中枢性脱髄疾患に対する新規治療標的分子を発掘し、臨床応用への展開への足がかりを構築することである。炎症・外傷・代謝異常・感染症・血管障害などにより、有髄神経の髄鞘が障害される。髄鞘は、神経活動電位の伝導速度の維持や、髄鞘内部の軸索の恒常性の維持に寄与するため、髄鞘の傷害は様々な神経機能障害をもたらすと考えられている。髄鞘は、オリゴデンドロサイトから構成される。成体の脳脊髄には、オリゴデンドロサイトの前駆細胞 (oligodendrocyte precursor cell, OPC) が広く配置しており、脱髄後の髄鞘修復は、OPCが脱髄領域へ遊走した後に成熟オリゴデンドロサイトへと分化することで完成する。従って、OPCの遊走を促すメカニズムを解明し、その作用を高めることで、中枢性脱髄疾患に対して治療効果が発揮されると考えられる。しかし、OPCの遊走機構については、不明な点が多かった。

我々はこれまでに、脱髄領域において旺盛な血管の増生を観察しており、ここで新たに形成した血管に由来するプロスタサイクリンという生理活性物質が、傷ついた神経軸索を修復させることを報告している (Muramatsu et al., *Nature Med.* 2012)。プロスタサイクリンの受容体は、循環系ではIP受容体と知られているが、我々は中枢神経系の神経細胞にもIP受容体が発現しており、プロスタサイクリンはIP受容体に働きかけることで神経回路の修復を導くことがわかった。この研究を進めて行く中で、中枢神経系におけるIP受容体の発現解析を行ったところ、OPCにもIP受容体が発現していることがわかった。このことから、プロスタサイクリンはOPCにも作用し、中枢性脱髄疾患における組織修復に対して治療効果を発揮すると考えた。

### B．研究方法

具体的な実施項目は下記の通りである。

#### 1．プロスタサイクリンによるOPCの遊走に対す

効果を検証した。

- 2．中枢性脱髄モデルを作成し、プロスタサイクリン類似体処置による髄鞘修復効果を検討した。
- 3．中枢性脱髄モデルを作成し、プロスタサイクリン類似体処置による神経機能障害に対する治療効果を検討した。

具体的な方法は以下の通りである。

- マウス：C57BL/6j mice (age: postnatal 1 day, 7-10 weeks)を用いた。
- 細胞遊走の検討：マウス全脳からA2B5陽性のOPCを単離し、トランスウェルに播種した。培養液にプロスタサイクリンの類似体を添加し、培養した。その後、transwellの下層へ遊走した細胞数を計測した。
- 中枢性脱髄モデルの作成：C57BL/6jマウスに対して、リゾフォスファチジルコリン溶液を髄腔内に局所投与して、限局性の脱髄を誘導した。プロスタサイクリンの類似体をintrathecallyに投与した。その後、behavioral data recording と組織解析を行った。
- 多発性硬化症患者の剖検組織の解析：多発性硬化症の剖検脳の組織切片におけるIP受容体の発現を免疫組織化学染色により検討した。

(倫理面への配慮)

施行した動物実験については、当該実験のための設備・体制は完備されていた。動物の取り扱いについては、文部科学省および所属機関の指針に基づいて、所属機関の承認を得たうえで行われた。

### C．研究結果

プロスタサイクリンがOPCの遊走性を高めるか検証した。はじめに、培養OPCにIP受容体が発現するか検討し、免疫染色法およびウエスタンブロットを用いてIP受容体蛋白質が発現することを確認

した (Figure 1A,B)。続いて、プロスタサイクリンによるOPCの遊走促進効果を検証した。OPCをtranswellに播種し、イロプロストあるいはシカプロスト(どちらもプロスタサイクリンの類似体)を処置したところ、細胞遊走が促進した (Figure 1C, D)。それぞれの条件で細胞を培養した時に、細胞の増殖に差が見られなかった (Figure 1E, F)。このことから、プロスタサイクリンが細胞の増殖を促した結果、遊走した細胞数が増加したわけではなく、プロスタサイクリンにより細胞の遊走性が亢進したことを示された。

IP受容体はGs蛋白質結合型の受容体であり、プロスタサイクリンがIP受容体に結合すると細胞内でアデニル酸シクラーゼが活性化しcAMP量が増大することが知られている。プロスタサイクリンによる細胞遊走性の亢進に、cAMP量の増加が関与するか検証した。OPCを播種したtranswellへcAMPの阻害剤であるRp-cAMPsを処置し、その後プロスタサイクリン類似体を添加した。プロスタサイクリン類似体による細胞遊走性の亢進は、cAMP阻害により抑制され、このことからプロスタサイクリンによる細胞遊走性の亢進にもcAMPシグナルが関与することが示された (Figure 2A, B)。なお、同様の条件で培養しても細胞数に差は認められなかった (Figure 2C,D)。

プロスタサイクリンによるOPCの遊走効果がin vivoでも観察されるか、リゾフォスファチジルコリンによる脱髄モデルマウスを用いて検証した。脊髄組織におけるOPCの遊走性亢進を評価するため、PDGFR $\alpha$ 陽性細胞におけるIP受容体の発現を確認後 (Figure 3A)、患部へ集積したPDGFR $\alpha$ 陽性細胞数を計測した (Figure 3B)。LPCを脊髄へ投与すると、術後7日には、脱髄領域へ自然にOPCが集積する。LPCを投与し脱髄が完全に誘導された術後3日に、患部へプロスタサイクリン類似体を処置したところ、術後7日におけるOPCの集積が促進した (Figure 3C, D)。一方、術後3日にIP受容体拮抗剤(CAY10441)を患部に処置したマウスでは、術後7日におけるOPCの集積は阻害された (Figure 3C,D)。LPC投与後14日目、LPCを投与した領域ではミエリン塩基性タンパク質 (myelin basic protein, MBP) の発現が観察されるが、これは髄鞘が修復したことを示唆する。LPC投与後3日後、プロスタサイクリン類似体を処置した個体におけるMBP陽性領域はコントロール群と比較して広がった (Figure 3D,E)。このことから、髄鞘の修復が促進したことが示唆された。一方、CAY10441を処置した個体では、コントロール群と比較しMBP陽性領域が狭く、このことから髄鞘の自然修復が抑制されたことが示された。

LPCを脊髄背側へ投与すると、脊髄背側を走行する神経回路の神経活動伝達が障害される。本領域には、四肢の運動機能を司る皮質脊髄路が走行しており、LPCを投与すると四肢の麻痺症状があらわれる。この症状は、時間が経つにつれて自然に改善するが、プロスタサイクリン類似体を処置すると症状の回復が促進した (Figure 4A,B)。IP受容体阻害剤を処置したマウスでは、症状の改善が抑制された。これらのことから、LPC投与後の運動機能の改善にも、プロスタサイクリンが関与すること、またプロスタサイクリンの働きを高めることで、脱髄にともなう神経症状に対して治療効果が得られることが示唆された。

## D . 考察

これまでの研究により、中枢性脱髄障害後の髄鞘の自然修復のメカニズムの一端が明らかとなった。すなわち、脱髄部位におけるプロスタサイクリンの発現が、OPCを遊走させることで髄鞘の修復に寄与することが示された。中枢神経疾患による神経症状に対して、現時点で有効な治療法が存在しない。本知見は、髄鞘の脱落が関連する種々の中枢神経疾患に対して、治療効果を発揮するものと予想されるため医学的に貢献するものと位置づけることができる。また、要介護状態からの回復を可能にする点においても、医学経済面で貢献するものと期待される。

## E . 結論

本研究によって、中枢性脱髄障害後の髄鞘の自然修復に、プロスタサイクリンが関与すること、またプロスタサイクリンの作用を高めることで、髄鞘の修復が促進することが明らかになった。今後、プロスタサイクリンが中枢性脱髄障害にいかんにはたらきかけるか、詳細な解析を進めることで、治療薬剤としての可能性を高めることに繋がると期待される。

## F . 健康危険情報 なし

## G . 研究発表

### 1. 論文発表

Takahashi, C., Muramatsu, R., Fujimura, H., Mochizuki, H. and Yamashita, T. (2013) Prostacyclin promotes oligodendrocyte precursor recruitment and remyelination after spinal cord demyelination. *Cell Death Dis.* 4, e795.

### 2. 学会発表

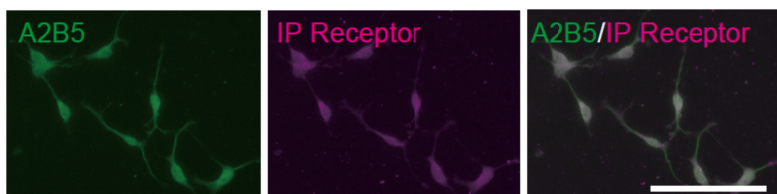
1. 村松里衣子, 山下俊英 中枢神経疾患における組織傷害と修復を制御する生体応答、新潟MSフォーラム 特別講演、新潟(2013.7.18)
2. 村松里衣子 新生血管による中枢神経回路の修復、第6回Symphony 招待講演、東京(2013.9.22)
3. 村松里衣子, 高橋知里, 山下俊英プロスタサイクリンによる成体マウスの 髄鞘修復の促進、グリア研究会 口演、仙台(2013.10.26)
4. 村松里衣子, 山下俊英 中枢神経系の恒常性の破綻・維持を制御する分子細胞メカニズム、京都産業大学セミナー 招待講演、京都(2013.12.26)
5. 村松里衣子 中枢神経組織の傷害と修復を司る分子メカニズム、大阪大学医学系研究フォーラム 第2回若手研究フォーラム、大阪(2014.2.25)
6. 村松里衣子, 山下俊英 Neurovascular wiring: A novel strategy for axonal regeneration in the central nervous system, 第87回日本薬理学会講演、仙台(2014.3.19)

7. 村松里衣子、高橋知里、山下俊英 脱髄モデルマウスに対するプロスタサイクリンの治療効果の検討、第87回日本薬理学会年会、仙台(2014.3.19)

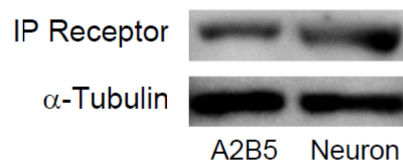
H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

# Figure 1

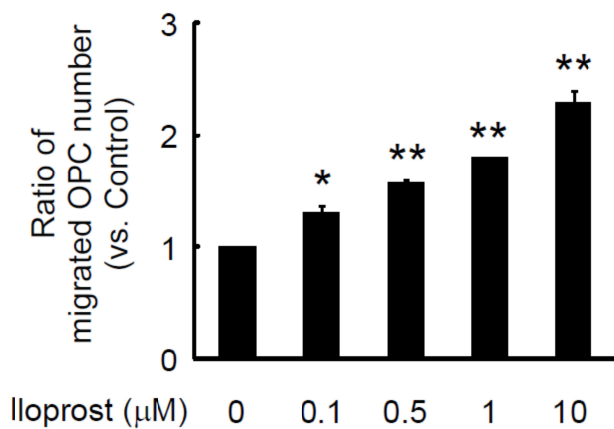
A



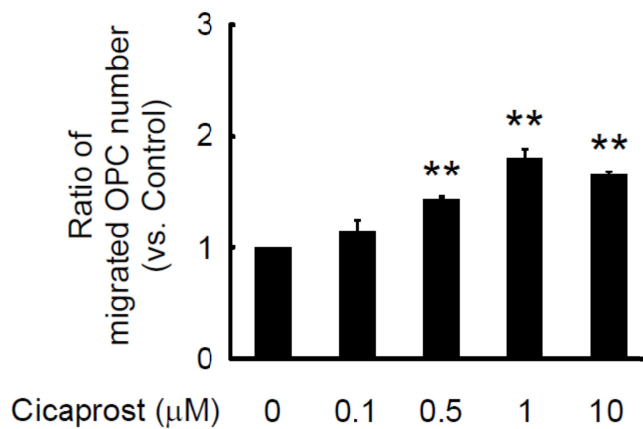
B



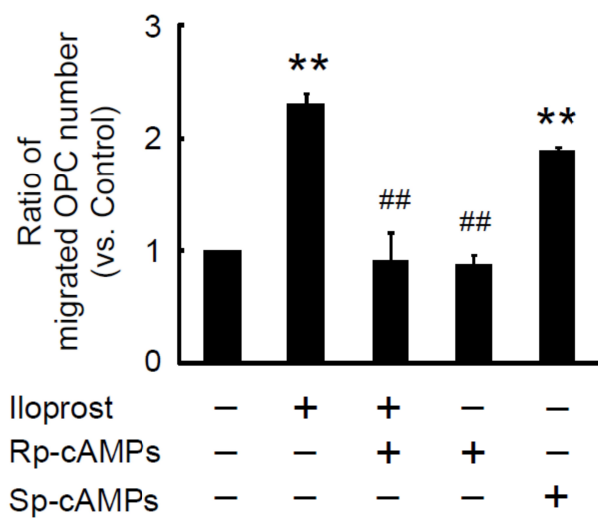
C



D



E



F

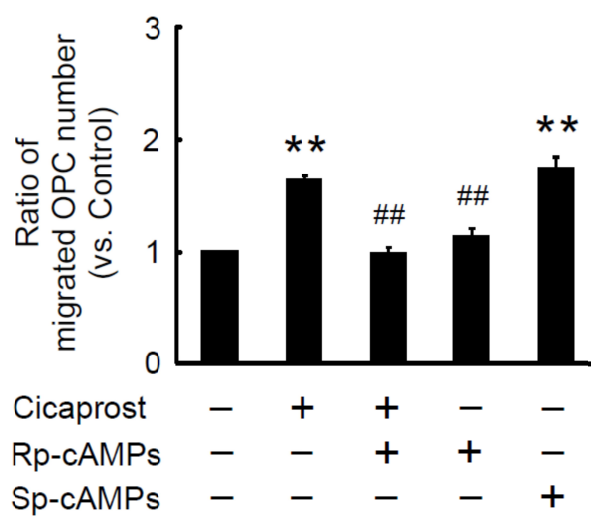
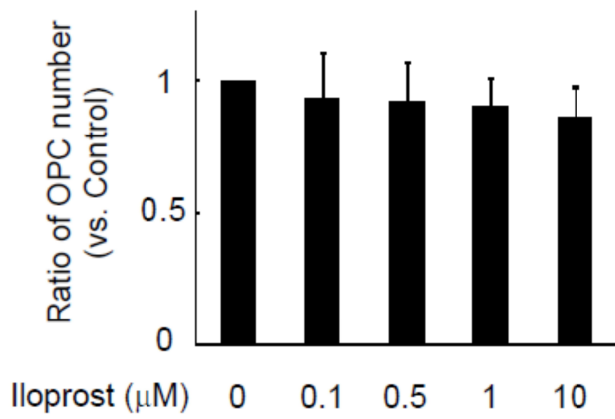
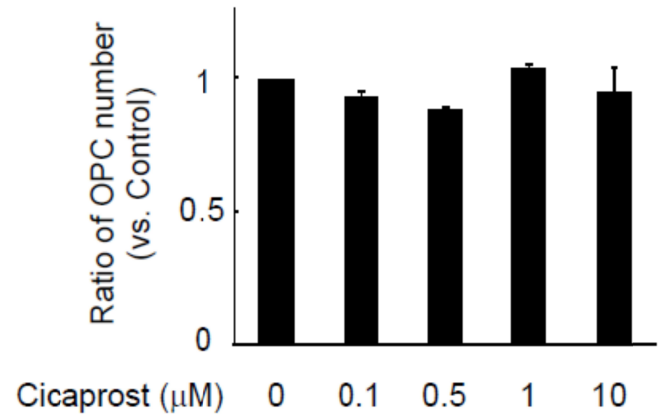


Figure 2

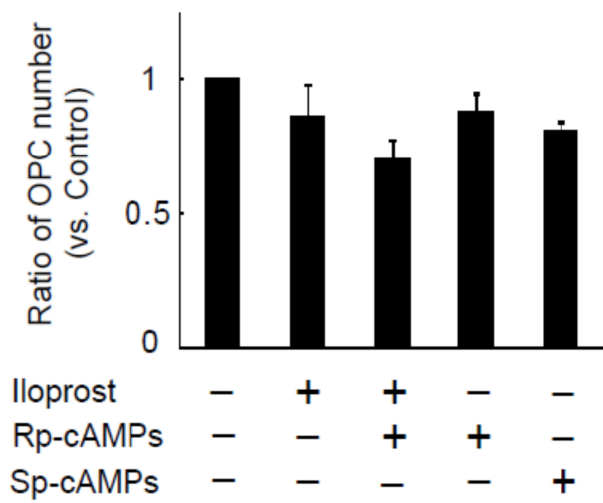
A



B



C



D

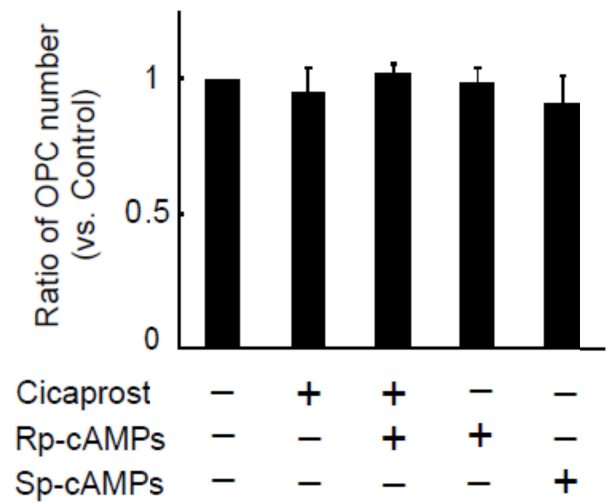


Figure 3

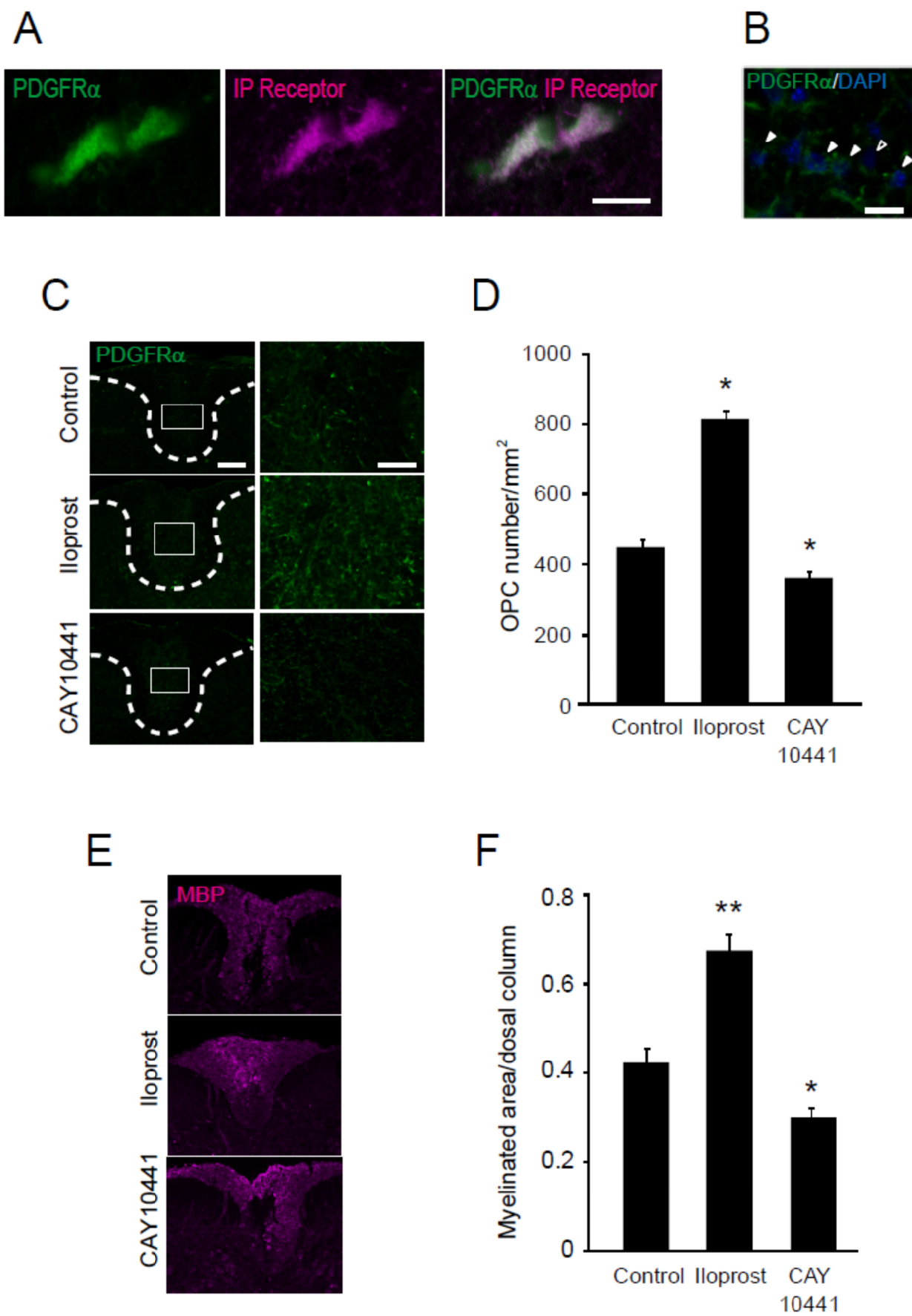


Figure 4

