

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 准教授

研究要旨

本研究の目標は、中枢性脱髄疾患における神経組織の脱落を抑制す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、障害を受けた部位に応じて様々な神経症状があらわれる。症状の進行を防ぐには、髄鞘の脱落を保護することが有望視されている。我々は「プロスタサイクリン」という生理活性物質の働きを高めた際に、中枢性脱髄モデルマウスにおける運動機能の麻痺が抑制されることを見出した。マウスの脊髄に脱髄病巣を作成し、患部にプロスタサイクリンの類似体を処置すると、髄鞘の脱落が抑制された。本研究により、中枢性脱髄刺激後の脱髄の進行を抑制するという観点から、中枢性脱髄障害に対する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脳と脊髄からなる中枢神経系が傷害されると、傷ついた部位に応じて様々な症状があらわれる。症状の程度や経過には疾患・個体により差はあるが、一般的に症状は重篤であり、自然治癒も期待できないと考えられている。そのため、症状の進行を阻む薬剤の開発は、患者や患者に寄り添う家族、医療従事者から強く待ち望まれている。また、症状が進行するにつれ寝たきりが増加するため、労働力の損失や医療費の拡大等も懸念されており、医療経済学的な観点からも、症状の進行を抑制する治療薬の開発は重要である。

中枢性脱髄疾患の症状の進行を抑制するには、脱髄を抑制すること、すなわち髄鞘の保護が有望視されている。髄鞘は、オリゴデンドロサイト細胞に担われる構造物であり、中枢性脱髄疾患では、直接的・間接的な刺激によってオリゴデンドロサイトが傷害される。我々はこれまでに「プロスタサイクリン」という生理活性物質が、中枢性脱髄傷害に対して保護効果を発揮する傾向を見出してきた。本年度は、中枢性脱髄傷害を受けた後、プロスタサイクリンがいかにして脱髄を抑制するか、特に、種々の中枢神経疾患に共通してみられる血液脳関門・血液脳脊髄関門の破綻に着目した。血液脳関門・血液脳脊髄関門は血管の強固なバリア機能であり、この機能のため、通常は血管内の物質が血管外に漏出することができない。しかし、様々な中枢神経疾患では、病巣で血管のバリア機能の障害が認められる。バリア機能が障害されると、浮腫や炎症反応が誘導されるため、中枢神経疾患における血液脳関門・血液脳脊髄関門の障害は、神経組織の傷害を促進させてしまうものと考えられている。血液脳関門・血液脳脊髄関門におけるバリア機能の本体は、血管内皮細胞同士の密な接着であるが、その機能の維持には、血管内皮細胞を取り囲むペリサイトが関与することが知られる。ここでは、脳脊髄疾患患者の患部に蓄積する

脂質であり、中枢性脱髄効果を持つことが知られるリゾフォスファチジルコリンを用いた脱髄モデルに対するプロスタサイクリンの効果について、ペリサイトの関与を中心に検討した。

B．研究方法

具体的な実施項目は下記の通りである。

- 1．リゾフォスファチジルコリンによる血液脳関門のバリア機能低下に対するプロスタサイクリン類似体による保護効果を*in vitro*で検証した。
- 2．リゾフォスファチジルコリンをマウス脊髄内に局所的に注入し、プロスタサイクリン類似体を処置した際に、リゾフォスファチジルコリンによるペリサイト傷害が保護されるか、解析した。
- 3．リゾフォスファチジルコリンをマウス脊髄内に局所的に注入し、プロスタサイクリン類似体を処置した際に、リゾフォスファチジルコリン誘導性の脱髄が保護されるか、検討した。
- 4．リゾフォスファチジルコリンをマウス脊髄内に局所的に注入し、プロスタサイクリン類似体を処置した際に、リゾフォスファチジルコリン誘導性の運動機能障害が阻害されるか検討した。

具体的な方法は以下の通りである。

- 実験動物：C57BL/6j mice (age: postnatal 1 day, 7-10 weeks)およびWistar ST rat (age: postnatal 1 day, 3 weeks)を用いた。
- バリア機能の検討：マウスの血液脳関門の*in vitro*モデル(BBBキット)を、Pharmaco-cell社から購入した。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、wellの上下間の電気抵抗を測定することで、バリア機能を評価した。

- 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的に注入して、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intrathecalに投与した。持続的に薬剤を処置するため、薬剤を浸透圧ポンプに充填して、ポンプに接続したカテーテルを患部に沿えた。その後、行動解析と組織解析を行った。

(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

リゾフォスファチジルコリンが血液脳関門のバリア機能を傷害するか、検討した。BBBキットの培養液中にリゾフォスファチジルコリンを添加し、添加後のwellの上下間の電気抵抗値を計測した。リゾフォスファチジルコリン(以後図中ではLPCと標記)添加後の電気抵抗値の経時変化について、リゾフォスファチジルコリンの濃度依存性ととも検討したところ、リゾフォスファチジルコリン添加により電気抵抗値の低下が観察された(Figure 1A)。このことから、リゾフォスファチジルコリンには血液脳関門・脳脊髄関門のバリア機能を傷害する可能性が示唆された。リゾフォスファチジルコリン添加によりBBBキット内のどの細胞に影響があるかを検討するため、well内の細胞の核を4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) により染色し、リゾフォスファチジルコリンの有無によるDAPI陽性細胞数の変化を観察した。その結果、単位面積当たりの血管内皮細胞とアストロサイトの数は、リゾフォスファチジルコリン存在下および非存在下で差がなかった(Figure 1B, D, E)。一方、リゾフォスファチジルコリン存在下で培養することで、単位面積当たりのペリサイトの数が有意に低下した(Figure 1B, C)。これらの結果から、リゾフォスファチジルコリンがペリサイトの細胞死を誘導した結果、血液脳関門・脳脊髄関門のバリア機能を低下させる可能性を推察した。

リゾフォスファチジルコリン誘導性の血液脳関門のバリア機能低下に対して、プロスタサイクリンが保護効果を発揮するか検討するため、ペリサイトがプロスタサイクリンに応答する可能性を検証した。ラット脳からペリサイトを単離し、ペリサイトマーカーであるCD13あるいは同じくペリサイトマーカーのPDGFR β 陽性細胞におけるプロスタサイクリン受容体(I type prostaglandin receptor, IP receptor)の発現を免疫染色法にて観察した(Figure 2A)。リゾフォスファチジルコリンのペリサイト傷害のメカニズムを解析するため、ラット培養ペリサイトにリゾフォスファチジルコリンを処置し、cleaved caspase-3の発現を免疫染色法で検討した。その結果、リゾフォスファチジルコリン処置によりcleaved caspase-3陽性細胞率が増加しており(Figure 2B)、このことから、リゾフォスファチジルコリンはペリサイトに対してcaspase-3依存的な細胞死を誘導することが示唆された。リゾフォスファチジルコリンによるペリサイト細胞死に対してプロスタサイクリンが保護的に働くかを検討するため、リゾフォスファチジルコリンを処置し

たペリサイトにプロスタサイクリンの類似体であるイロプロストを添加し、培養後のcleaved caspase-3陽性細胞率を計測した。その結果、イロプロストとリゾフォスファチジルコリンを共処置した群では、リゾフォスファチジルコリン単独処置群と比べて、cleaved caspase-3陽性細胞率が低かった(Figure 2B)。このことから、プロスタサイクリンがリゾフォスファチジルコリン誘導性のペリサイト細胞死を阻害することが示唆された。プロスタサイクリンによるペリサイトの細胞死の阻害が、血液脳関門・血液脳脊髄関門におけるバリア機能の低下の抑制につながるかを検証するため、BBBキットの培養液中にリゾフォスファチジルコリンを添加した際にみられるバリア機能の低下に対して、イロプロストを共処置した際にバリア機能の低下が阻害されるか、検討した。各種薬剤を添加後の電気抵抗値の経時変化を観察したところ、リゾフォスファチジルコリン単独処置群と比較して、イロプロストを共処置した群では電気抵抗値が高い状態のまま維持された(Figure 2C)。一方、イロプロスト単独処置群では、コントロール群と比較して有意な差が認められなかった。これらのことから、プロスタサイクリンは、正常状態のバリア機能を強化するものではなく、リゾフォスファチジルコリン添加によるバリア機能の低下に対して保護的に働くものであることがわかった。また、血管のバリア機能の本体である、血管内皮細胞のみの培養に対しては、リゾフォスファチジルコリン、リゾフォスファチジルコリンならびにイロプロスト、イロプロスト単独ともに、コントロール群と比較して電気抵抗値に差が認められなかった(Figure 2D)。このことから、リゾフォスファチジルコリンやイロプロストによる血管のバリア機能の変化は、それぞれの薬剤が血管内皮細胞に作用した結果ではないことが示唆された。

プロスタサイクリンによる血液脳関門・血液脳脊髄関門の保護効果が*in vivo*でも観察されるか、まず、成体マウスの脊髄背側にリゾフォスファチジルコリンを局所的に注入したマウスにおけるペリサイト傷害について、解析した。血液脳関門・血液脳脊髄関門におけるバリア機能の評価をする際には、ペリサイトの血管被覆率が用いられている。リゾフォスファチジルコリン注入部位周囲において、lectin陽性血管の周囲を覆うCD13あるいはPDF GR β 陽性ペリサイトの被覆率を計測したところ、コントロール群と比較して有意に被覆率が低下していた(Figure 3A - C)。このことから、リゾフォスファチジルコリンが*in vivo*でもペリサイトを傷害することが示唆された。続いて、リゾフォスファチジルコリンによるペリサイト傷害に対して、プロスタサイクリンが保護効果を発揮するか検討するため、マウス脊髄背側にリゾフォスファチジルコリンを注入した後に髄腔内に持続的にイロプロストを処置し、術後1日における組織内のペリサイトの被覆率を計測した。その結果、イロプロスト処置群では、リゾフォスファチジルコリン注入後のペリサイトの被覆率低下が有意に抑制されていた(Figure 3A - C)。一方、各群におけるLectin陽性血管に長さには差はなく(Figure 3D)、ペリサイトの被覆率の変化は血管の長さ変化によって生じるものではないことが示された。さらに、イロプロスト処置によるペリサイト傷害の保護についても、*in vitro*の実験で得られた結果と同じく、caspa

se-3依存性かを確認するため、cleaved caspase-3抗体とCD13抗体の共染色を実施した。その結果、リゾフォスファチジルコリン注入群においてCD13陽性細胞でcleaved caspase-3陽性細胞率が増加しており、その割合と比較して、イロプロスト共処置群ではcleaved caspase-3陽性細胞率が低かった (Figure 3E, F)。これらの結果は、*in vivo*におけるリゾフォスファチジルコリンによるペリサイトの脱落もcaspase-3依存性であり、プロスタサイクリンはcaspase-3依存性なペリサイト傷害を抑制する働きがあることを意味している。

血液脳関門・血液脳脊髄関門の傷害は、二次的に神経組織傷害を誘導すると知られる。これまでの結果から、リゾフォスファチジルコリンには血液脳関門・血液脳脊髄関門を傷害する働きがあることが分かった。一方、リゾフォスファチジルコリンは脱髄を誘導することも古くから知られる。そこで、リゾフォスファチジルコリンにより誘導される脱髄は、血液脳関門・血液脳脊髄関門の傷害により悪化するものと考え、血液脳関門・血液脳脊髄関門の傷害をプロスタサイクリンで抑制した際の脱髄の進行が抑制するか、検討した。マウスの脊髄背側にリゾフォスファチジルコリンを局所的に注入し、さらに患部にイロプロストを持続的処置した。術後1日の組織を用いてクリューバー・バレラ染色を行い、髄鞘を可視化した。すると、リゾフォスファチジルコリン注入群では注入部位周囲で顕著な髄鞘の脱落が認められたが、イロプロスト共処置群における脱髄は軽微であった (Figure 4A, B)。この結果から、プロスタサイクリンが脱髄の進行を阻害する可能性が示された。マウスの脊髄背側には四肢の運動機能を担う神経回路が走行しており、脊髄背側に脱髄を誘導すると、四肢の麻痺を主徴とした症状があらわれる。リゾフォスファチジルコリン、リゾフォスファチジルコリンならびにイロプロストを処置したマウスにおける運動機能についても、Behavioral data recording法およびBasso Mouse Scale for Locomotion (BMS score)法を用いて経時的な観察を行った。その結果、リゾフォスファチジルコリンによって生じる運動機能障害と比較し、リゾフォスファチジルコリンならびにイロプロストを処置したマウスにおける症状は軽かった (Figure 4C, D)。このことから、脱髄の進行に関連する神経機能障害の悪化に対して、プロスタサイクリンは抑制効果をもつことが示唆された。

中枢性脱髄により神経組織が障害されると、ミクログリアやマクロファージなどの炎症性細胞が傷ついた組織を貪食する。傷害組織の貪食は、神経組織の修復の足がかりとなると考えられているため、フォスファチジルコリンやイロプロストが貪食能の変化に影響する可能性を検討した。マウスミクログリアおよびマクロファージの初代培養系を用いて、フォスファチジルコリンならびにイロプロストを添加し、貪食能を評価した。しかし、各群間に有意な差は認められなかった (Figure 4E, F)。以上のことから、プロスタサイクリンによる脱髄の抑制には、貪食細胞による貪食能の変化に依存しないことが示唆された。

D. 考察

今年度の研究により、中枢性脱髄障害後の脱髄の

進行のメカニズムの一端が明らかになった。特にプロスタサイクリンがペリサイトの細胞死を抑制することが、二次的な脱髄の進行を防ぐ可能性が示された。今後、プロスタサイクリンによるペリサイトの細胞死保護効果が、他の中枢神経系細胞と比較した時に有意なものであるか、またイロプロスト以外のプロスタサイクリン関連薬剤も同様にペリサイト保護効果を発揮するか、詳細に解析していくことで、プロスタサイクリンの作用機序を解明することが可能になる。血液脳関門・血液脳脊髄関門の生涯は、種々の中枢神経系疾患に共通して認められる現象であるが、血液脳関門・血液脳脊髄関門の破綻という現象と病態との関連には不明な点が多く、また血液脳関門・脳脊髄関門の破綻を抑制することで二次的に神経組織を保護する知見は新しい。本研究は、中枢性脱髄疾患のみならず、広く中枢神経系疾患の治療に繋がらうものである。

E. 結論

本研究により、プロスタサイクリンが中枢性脱髄の進行を抑制すること、またそれは特にペリサイトの細胞死を抑制することで血管のバリア機能を維持した結果である可能性が示唆された。本研究に関する論文を執筆し投稿したところ、プロスタサイクリンによる細胞保護効果におけるペリサイトの優位性に関する詳細な解析を追加で検討するよう求められた。追加実験のデータを含めて論文発表するとともに、本研究で得られた知見を基にした中枢性脱髄疾患の新規治療薬の開発への可能性について検討していきたい。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表 なし

2. 学会発表

1. 村松里衣子、山下俊英 (2014) 中枢神経傷害の治療標的分子 プロスタサイクリン、大阪大学蛋白質研究所セミナー第5回神経科学と構造生物学の融合研究会 招待講演、大阪 (2014.12.4)
2. 村松里衣子、山下俊英(2014) プロスタサイクリンを軸とした中枢神経障害の治療戦略、大阪大学神経難病フォーラム、講演、大阪(2014.8.9)

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

Figure 1

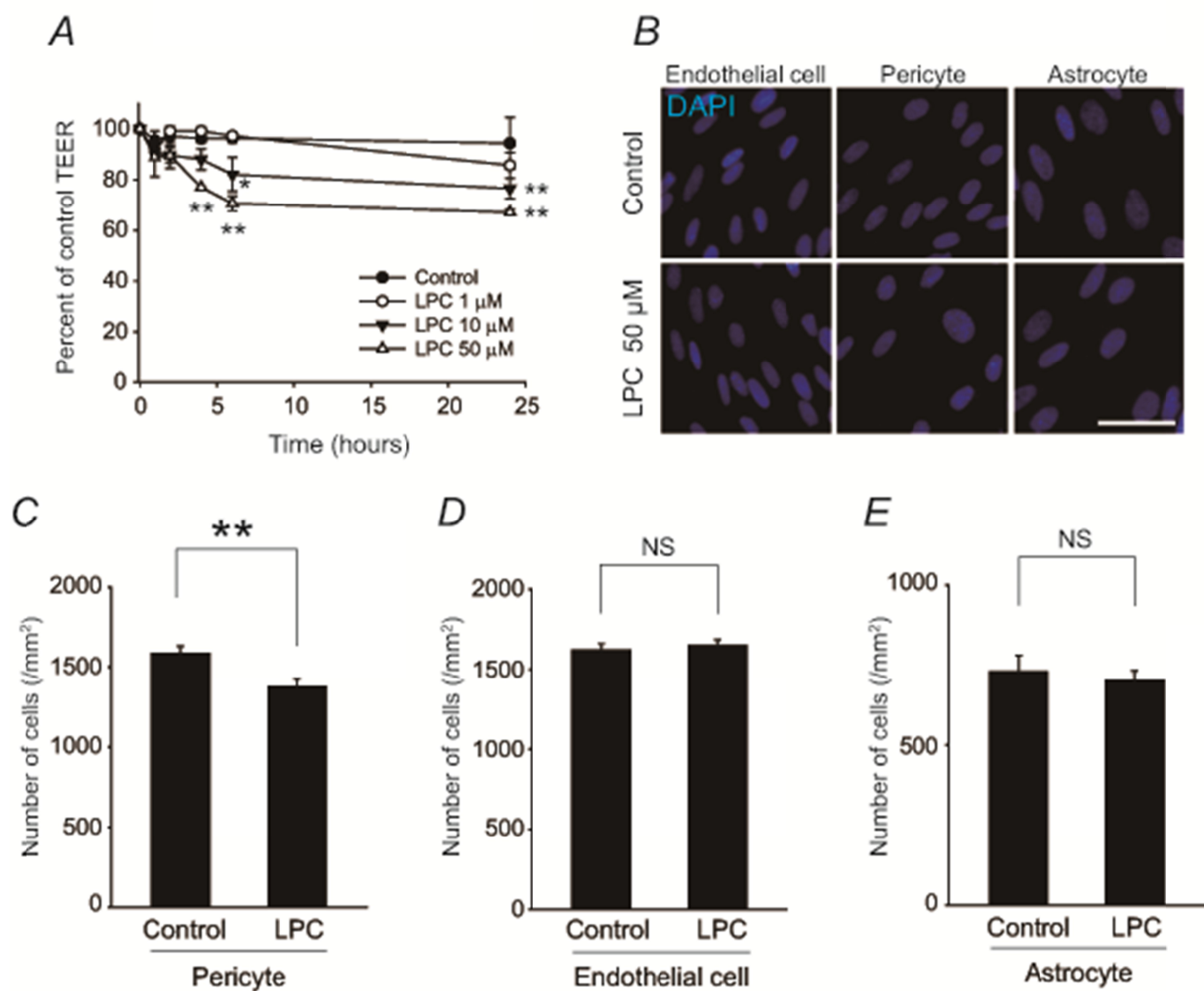


Figure 2

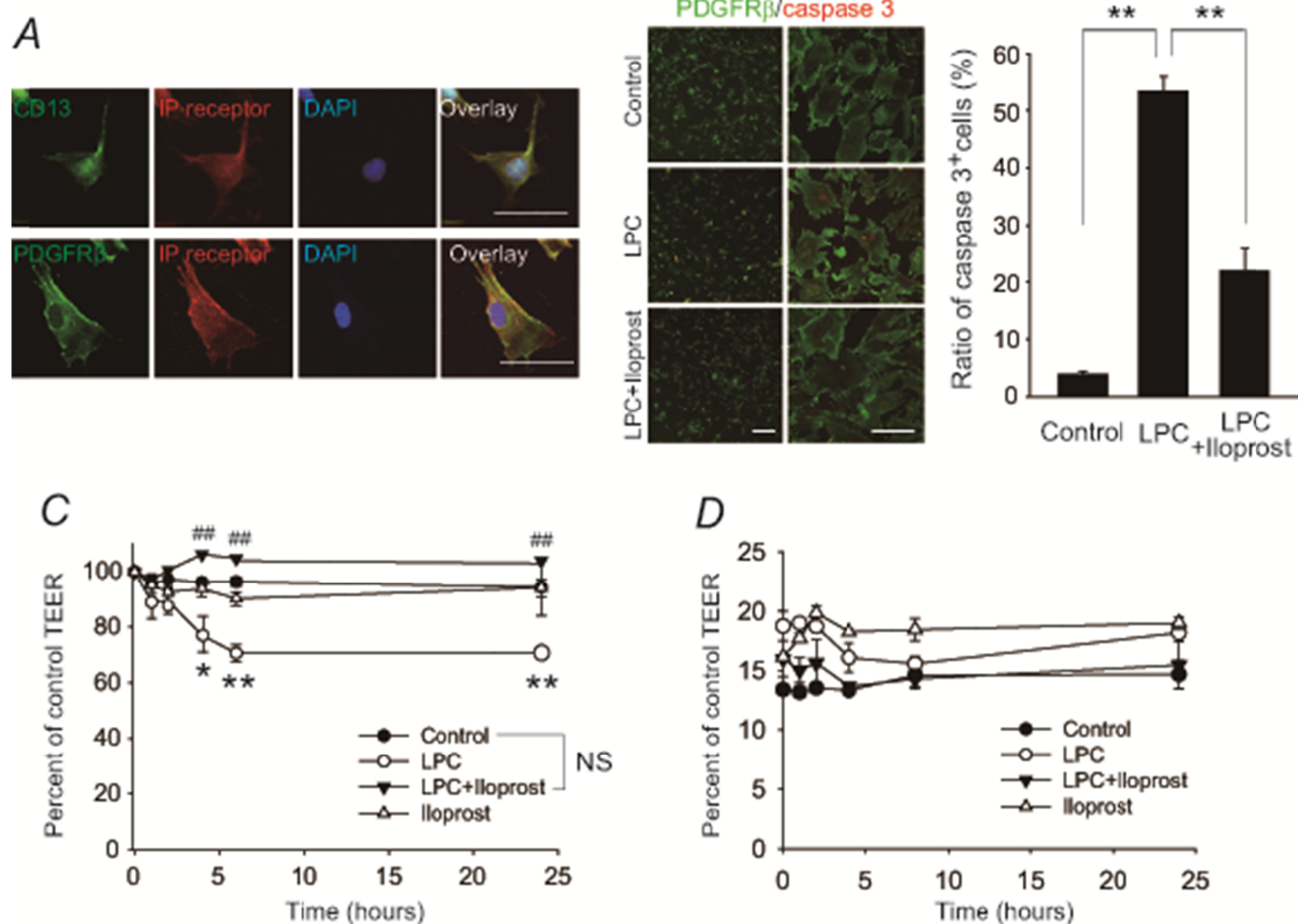


Figure 3

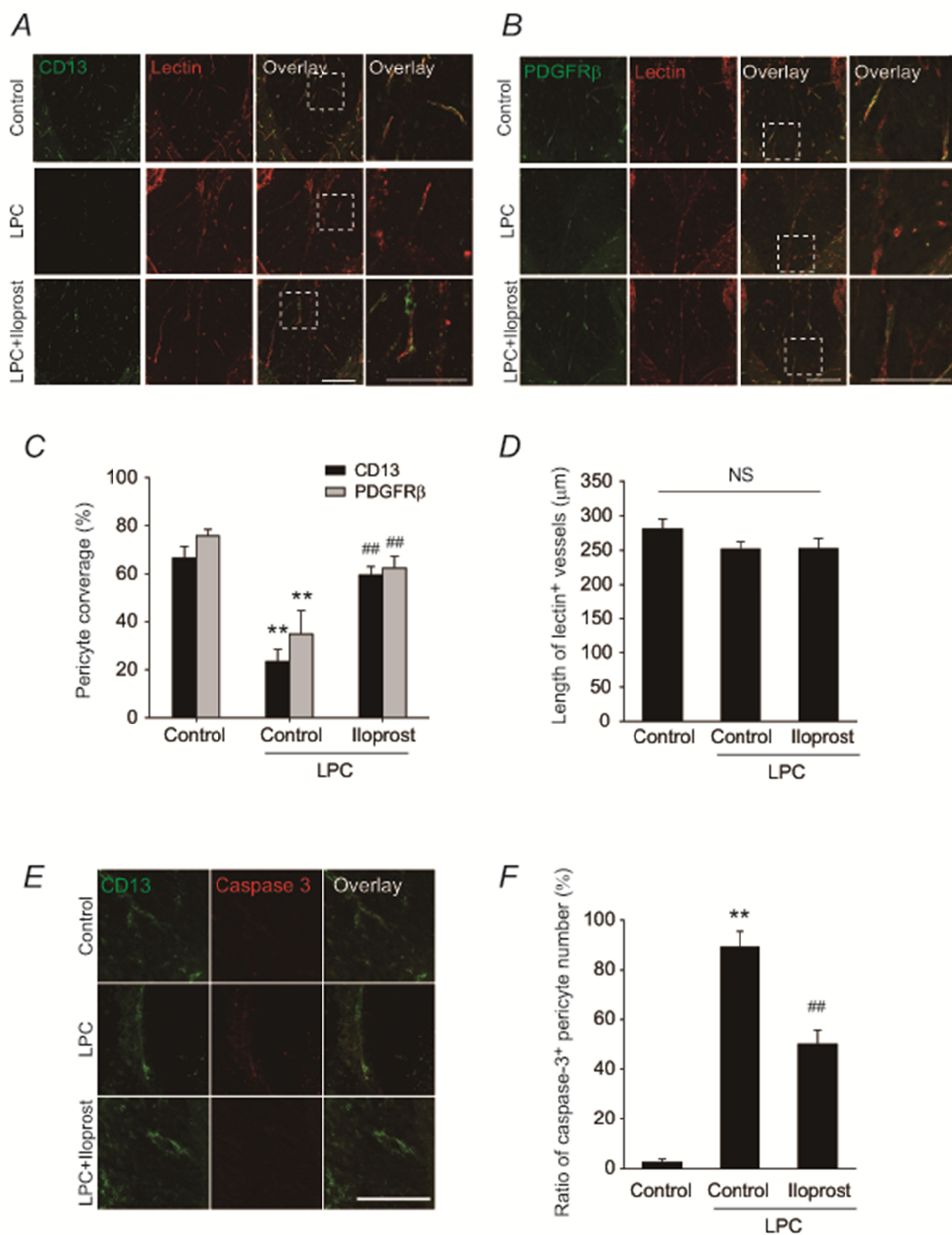


Figure 4

