

称号及び氏名	博士(獣医学) 井澤 武史
学位授与の日付	平成22年3月31日
論文名	Pathological studies on the cell characteristics and roles of glial cells in myelin mutant rats (ミエリン疾患ミュータントラットにおけるグリア細胞の特性と役割に関する病理学的研究)
論文審査委員	主査 山手 丈至 副査 竹内 正吉 副査 中村 洋一 副査 桑村 充

論文要旨

緒言

中枢神経系のミエリン疾患は、神経軸索を取り巻く絶縁体であるミエリンが障害される病態であり、罹患部位に応じて様々な神経症状を来す難治性疾患である。ミエリン疾患は組織発生のミエリン形成異常(ミエリン低形成)と組織形成後のミエリン障害(脱髄)に大別され、ヒトではそれぞれ Pelizaeus-Merzbacher 病、多発性硬化症が知られている。ミエリン疾患の病因は、遺伝性、免疫介在性、栄養性など多種多様であり、同一疾患でも臨床病型の個人差が大きいため、その病理発生には不明点が多い。したがって、ミエリン疾患の病態解析には疾患モデル動物が不可欠である。マウスやラットでは、ミエリン構成蛋白やミエリンの形成・維持に関わる遺伝子に変異を有するミエリン疾患ミュータント動物が発見・確立されており、ミエリンの形成・維持に関わる分子機構を解明する上で有用なモデル動物である。

中枢神経系の恒常性は、グリア細胞の相互作用により維持されている。オリゴデンドロサイトは中枢神経系のミエリン形成細胞であり、ミエリン疾患において最も重要な標的細胞である。アストロサイトは支持細胞であり、ミエリン疾患では、オリゴデンドロサイトの再生・保護に関わる一方で、慢性期にはグリオシスによりミエリン再生を阻

害する。ミクログリアは免疫担当細胞であり、ミエリン疾患では傷害組織の除去によりミエリン再生を促す一方で、サイトカインや活性酸素種の産生によりミエリン傷害にも関わる。ミエリン疾患では、オリゴデンドロサイトだけでなく、アストロサイトやミクログリアも病態の進展に関わることから、その病理発生を解明するためには、各種グリア細胞の動態を明らかにする必要がある。

myelin vacuolation (*mv*) ラットは、後駆振戦および中枢神経系のミエリン低形成・ミエリン空胞化を特徴とする常染色体劣性ミュータントで、その病態は *attractin* (*Atrn*) 遺伝子のヌル欠損に起因する。*ATR*N は全身諸臓器に発現が認められ、免疫機構、毛色発現、エネルギー代謝および摂食行動など、種々の生理学的機能を持つことが解明されている。現在、マウス、ラットおよびハムスターにおいて *Atrn* 変異動物が報告されており、すべてのミュータント動物で毛色異常とミエリン空胞化が認められる。中枢神経系では、*ATR*N 分子がミエリンの形成・維持に重要な役割を演じることがわかっているが、その詳細なメカニズムは未だ不明である。

demyelination (*dmy*) ラットは、ミエリン形成後期から発症する後肢の運動失調および中枢神経系の急激なミエリン崩壊(脱髄)を特徴とする常染色体劣性ミュータントで、原因遺伝子はラット第 17 染色体上にマッピングされている。ヒトおよびマウスの相同領域にミエリン疾患と関連する遺伝子が報告されていないことから、*dmy* 遺伝子は新規ミエリン疾患遺伝子と考えられているが、その病理発生については不明点が多い。

本研究では、ミエリン疾患の形成過程における *mv* ラットのグリア細胞動態を解析するとともに、ミエリン形成初期の中枢神経系における *ATR*N の発現細胞を調べ、*Atrn* 欠損により生じるミエリン病変の病理発生を解明することを目的とした。また、多発性硬化症では病変部のグリア細胞に鉄の異常蓄積が認められ、その病理発生に鉄代謝が重要と考えられている。そこで、異なるミエリン疾患ミュータント *mv* および *dmy* ラットにおける鉄調節因子の発現・分布を調べ、得られたデータを比較検討することにより、ミエリン疾患に関わる鉄代謝の役割を調べた。

第 1 章 *mv* ラットのグリア細胞動態

第 1 節：グリア細胞の動態解析

正常ラットの脊髄では、ミエリン形成は生後に始まり、4 週齢前後にピークとなり、8 週齢でほぼ成熟する。そこで、2, 4, 6, 8 週齢の *mv* ホモ型および対照(ヘテロ型および野生型)ラットの脊髄を用いて、生後ミエリン形成期における *mv* ラットのグリア細胞動態を調べた。エポソ包埋トルイジンブルー染色切片を用いた形態観察の結果、*mv* ラットの白質では、2 週齢からミエリン低形成とミエリン空胞化が経時的に進行し、6 週齢以降で最も顕著であった。灰白質では、6 週齢からミエリン空胞化が頻繁に認められた。各種グリア細胞のマーカーを用いた免疫染色の結果、*mv* および対照ラット間において 2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNP) 陽性オリゴデンドロサ

イトの細胞密度に有意差は認められなかった。ミエリン病変の進行に伴って、*mv*ラットの白質および灰白質で進行性アストログリオシスがみられた。CD11b の免疫染色の結果、6 週齢以降の *mv*ラットの灰白質において、多数の活性化ミクログリアが認められた。この活性化ミクログリアは灰白質に限局しており、MHC class II (RT-1B) を強発現していた。

第 2 節：アトラクチン発現細胞の同定

続いて、正常ラット脊髄における *Atrn* 発現細胞を同定するために、*Atrn* mRNA に対する cRNA プローブを作製し、*in situ* hybridization と免疫染色の二重染色を行った。2, 4 週齢の正常ラットの脊髄では、白質および灰白質において多数の *Atrn* 陽性細胞が認められ、白質では主に CNP 陽性オリゴデンドロサイトが *Atrn* を発現し、灰白質では一部のアストロサイトやニューロンにも *Atrn* 発現が認められた。

以上の結果から、*Atrn* 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に関わり、*mv*ラットのミエリン病変は *Atrn* 欠損オリゴデンドロサイトの機能異常に起因する可能性を示した。

第 2 章 ミクログリア活性化と灰白質のミエリン病変

第 1 節：ミクログリア関連サイトカインの発現解析

*mv*ラットではミクログリア活性化が灰白質に強く認められ、灰白質病変との関わりが注目された。そこで、活性化ミクログリアの意義を調べるために、RT-PCR 法を用いてミクログリア関連サイトカインの遺伝子発現量を調べた。*mv*ラットの灰白質では、ミクログリア活性化と一致して、TGF- β 1 mRNA の有意な上昇が認められた。TNF- α 、IL-1 β および IL-6 mRNA の発現量に著変はみられなかった。Western blot の結果、*mv*ラットの脊髄では iNOS 蛋白の発現量が有意に増加しており、さらに白質および灰白質において iNOS 免疫染色性の増強が認められ、陽性細胞は形態学的に活性化アストロサイトであった。

第 2 節：ミエリン構成蛋白の発現解析

次に、灰白質のミエリン病変を詳細に調べるために、ミエリン構成蛋白の免疫染色を行った。*mv*ラットの白質では、ミエリンの形態異常に一致して、proteolipid protein (PLP)、myelin basic protein (MBP) および myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) の免疫染色性が顕著に低下していた。灰白質では、PLP および MOG 陽性のミエリンが顕著に減少していた。リアルタイム PCR の結果、*mv*ラットの白質および灰白質において、PLP mRNA の発現量が有意に減少していた。*in situ* hybridization を

用いて白質および灰白質のオリゴデンドロサイトの細胞動態を調べたところ、*mv*と対照ラット間において、PLP 陽性オリゴデンドロサイトの細胞密度に有意差がみられなかった。

以上の結果から、*mv*ラットのミエリン病変は、オリゴデンドロサイトのミエリン蛋白の産生異常あるいは分化異常が関わることを示した。また、灰白質でミクログリア活性化の調節因子である TGF- β 1 mRNA の発現上昇が認められたことから、TGF- β 1 は *mv*ラットのミクログリア活性化のメカニズムを調べる上で重要な因子であることを明らかにした。

第3章 ミエリン疾患モデルラットにおける鉄代謝変化

脱髄モデルである *dmy*ラットおよびミエリン低形成モデルである *mv*ラットを用いて、異なるモデルラット間における鉄代謝の変化を比較検討した。*dmy*ラットでは、生後4週齢まで正常なミエリン形成が認められ、6週齢からミエリン空胞化が増加し、8週齢で重篤なミエリン崩壊を起こす。そこで4, 6, 7週齢の *dmy*および対照ラット、4, 6週齢の *mv*および対照ラットを用いて、鉄調節因子の遺伝子発現をリアルタイムPCR法により調べた。*dmy*ラットでは、ミエリン病変の進展に一致して、heme oxygenase-1およびferritin L/H subunitのmRNA発現量が上昇した。*mv*ラットでは、transferrin mRNAの発現量低下が認められたものの、heme oxygenase-1およびferritin mRNAの発現量に変化が認められなかった。Perls法により組織鉄を染色したところ、*dmy*ラットではミエリン病変に一致して、アストロサイトとオリゴデンドロサイトに鉄の蓄積が認められた。免疫染色の結果、*dmy*ラットではオリゴデンドロサイトにおいてheme oxygenase-1の発現上昇が、アストロサイトと一部のオリゴデンドロサイトにおいてferritinの発現上昇が観察された。一方、*mv*ラットでは、鉄および鉄調節因子の染色性に著変は認められなかった。

以上の結果から、*dmy*ラットではミエリン病変の進展に一致して、グリア細胞に鉄蓄積が認められ、抗酸化酵素であるheme oxygenase-1が発現上昇していたことから、*dmy*ラットのミエリン崩壊の病理発生に鉄蓄積と酸化ストレスが関わることを示した。一方、ミエリン低形成ミュータントである *mv*ラットの病理発生には、鉄代謝異常の関与が低いことを示した。

総括

1. *mv*ラットでは生後ミエリン形成期において、脊髄白質および灰白質にミエリン低形成とミエリン空胞化が進行し、それに伴うアストロサイト・ミクログリアの活性化が認められることを明らかにした。

2. *mv* ラットではミエリンの形態異常およびミエリン構成蛋白の発現低下にもかかわらず、オリゴデンドロサイトの細胞数が正常に保たれていたことから、*mv* ラットのミエリン病変は、オリゴデンドロサイトによるミエリン構成蛋白の産生異常あるいは分化異常が関与することを明らかにした。
3. *mv* ラットでは、ミエリン病変に対するミクログリアの反応が白質と灰白質で大きく異なっており、中枢神経系のミエリンの形成・維持に関わるミクログリアの役割が部位によって異なる可能性を示した。
4. 脱髄ミュータントである *dmy* ラットでは、ミエリン病変の進展に一致してオリゴデンドロサイトとアストロサイトに鉄蓄積、鉄調節因子の発現上昇が認められ、その病理発生に鉄代謝異常および酸化ストレスが関与することを明らかにした。一方、ミエリン低形成ミュータントである *mv* ラットでは、鉄代謝異常の関与が低いことを示した。
5. 本研究に用いた両ミエリン疾患ミュータントラットは、ミエリンの形成・維持に関わるグリア細胞の役割を調べる上で有用なモデル動物であることを示した。また、異なるミエリン疾患モデル動物間の共通点・相違点を調べることで、複雑なミエリン疾患の病理発生の一端を明らかにできると考えられた。

審査結果の要旨

中枢神経系のミエリン疾患は、重篤な神経症状を来す難治性疾患であり、その病態解明にはマウスやラットなどのモデル動物が不可欠である。その中でもミエリン疾患ミュータント動物は、ミエリンの形成・維持に関わる遺伝子に変異を有するため、ミエリン形成・維持の分子機構を解明する上で非常に有用なモデル動物である。

Myelin vacuolation (*mv*) ラットは、中枢神経系のミエリン低形成を特徴とする常染色体劣性ミュータントで、その病態は *attractin (Atrn)* 遺伝子のヌル欠損に起因する。**Demyelination (*dmy*)** ラットは、中枢神経系の急激な脱髄を特徴とする常染色体劣性ミュータントで、新規ミエリン疾患モデルラットである。本研究では、これらのミエリン疾患ミュータントラットを用いて、各種グリア細胞の動態を調べるとともに、近年、ミエリンの形成・維持に重要な因子として注目されている鉄の代謝変化について解析を行った。得られた成績の概要は以下の通りである。

第1章第1節では、生後ミエリン形成期における *mv* ラットのグリア細胞動態を調べた。その結果、*mv* ラットの白質では、2週齢からミエリン低形成が経時的に進行したが、ミエリン形成細胞であるオリゴデンドロサイトの細胞密度に著変は認められなかった。ミエリン病変の進行に伴って、白質および灰白質で進行性アストログリオシスが、灰白質に活性化ミクログリアの存在が認められた。以上の結果から、*mv* ラットのミエリン病変は、オリゴデンドロサイトの機能異常に起因する可能性を示した。

第1章第2節では、正常ラット脊髄を用いて、*in situ* hybridization と免疫染色の二重染色により、*Atrn* mRNA 発現細胞の同定を行った。正常ラット脊髄では、多数の *Atrn* 陽性細胞が認められ、白質では主にオリゴデンドロサイトが *Atrn* を発現していた。以上の結果から、*Atrn* がミエリン形成細胞であるオリゴデンドロサイトの機能に関わる可能性を示した。

第2章第1節では、*mv* ラットの灰白質における活性化ミクログリアの意義を調べるために、ミクログリア関連サイトカインの発現変化を調べた。灰白質では、ミクログリアの活性化と一致して、TGF- β 1 mRNA の有意な上昇が認められた。一方、活性化ミクログリアでは iNOS の発現は認められなかったが、白質および灰白質の活性化アストロサイトにおいて、iNOS の発現上昇が認められた。以上の結果から、TGF- β 1 が *mv* ラットのミクログリア活性化のメカニズムを調べる上で重要な因子であることを明らかにした。

第2章第2節では、*mv* ラットの灰白質ミエリン病変を詳細に調べるために、ミエリン構成蛋白の免疫染色およびリアルタイム PCR を行った。その結果、ミエリンの形態異常に一致して、白質および灰白質においてミエリン蛋白の発現低下が認められた。また白質と同様に、灰白質においてもオリゴデンドロサイトの細胞密度に著変がみられなかった。以上の結果から、*mv* ラットのミエリン病変は、オリゴデンドロサイトのミエリン蛋白の産生異常あるいは分化異常に関わることを示した。

第3章では、*dmy* および *mv* ラットのミエリン疾患に関わる鉄代謝の役割を検討した。その結果、*dmy* ラットではミエリン病変の進展に一致して、アストロサイトおよびオリゴデンドロサイトにおける鉄の過剰蓄積と、抗酸化酵素 heme oxygenase-1 および鉄貯蔵蛋白 ferritin の発現上昇が認められた。一方、*mv* ラットでは、これらの変化は認められなかった。以上の結果から、脱髄ミュータントである *dmy* ラットの病理発生に鉄蓄積および酸化ストレスに関わることを示した。一方、ミエリン低形成ミュータントである *mv* ラットの病理発生には、鉄代謝異常の関与が低いことを示した。

以上の研究成果は、ミエリン疾患のミュータント動物である *mv* および *dmy* ラットの病態を各種グリア細胞の役割を中心に病理学的に明らかにし、これらラットがヒトの類似疾患のモデル動物として有用であることを示すものである。この成果は、医学・獣医学、さらには実験動物学の新たな展開に資するものであり、最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。