

研 究 報 告 書

「病態における中枢神経系と心血管系の臓器間連関の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 6 月

研 究 者: 村松 里衣子

1. 研究のねらい

炎症や外傷により中枢神経組織が傷つくと、全身に様々な症状が現れる。症状を改善させるためには、傷害による細胞死を免れた神経細胞が、神経回路を再建する必要があると考えられている。かつては、自然に修復することはないと考えられていた中枢神経系の神経回路も、疾患の種類や個人差こそあるものの、わずかではあるが自然に修復することがわかってきた。神経回路が修復すれば、全身に現れる様々な症状の改善にもつながるため、神経回路の修復を促すメカニズムの解明は待ち望まれている。しかし、これまでの神経回路の修復研究は、発生期や末梢神経系と比較してなぜ大人の中枢神経系は修復しにくいのか、という点に着目し、修復を阻害する機序を探索した報告がほとんどであった。一方、神経回路の修復を促進させるメカニズムについてはほぼわかっていなかった。

研究者らはこれまでに、神経回路の修復に先立ち、病巣では旺盛な血管新生が生じること、新生血管が分泌する因子が神経回路、特に軸索の修復を促すことを見出してきた(Muramatsu, et al., Nature Medicine, 2012)。血管由来の分子の作用を高めることで、軸索の修復が促されることもわかったが、その作用だけでは、十分な症状改善効果を得ることができなかった。その理由として、脳や脊髄の多くの神経回路が有髄神経であり、髄鞘の修復を促すことが、神経症状の改善に必須であるためと考えた。そこで髄鞘修復と血管との関連を調べていくと、血管が傷ついた部位で髄鞘が自然に修復する様子が報告されていた(Ruckh et al., Cell Stem Cell, 2012)。また、傷害後に形成する新生血管は、その構造上、血管内の血液が血管外部に漏れやすい構造と知られている。血液には、全身の臓器から分泌される様々なホルモンが豊富に含まれており、また一部のホルモンに対する受容体は、脳内の神経系細胞に発現していることも報告されている。これらのことから、血液には髄鞘の修復を促す分子が含まれており、中枢神経傷害後に傷ついた血管から血液が漏れ出すことで、脳の髄鞘の修復が促されると推察した。

本研究では、血液に含まれる髄鞘修復因子を同定し、その作用を増強させることで髄鞘修復とそれに伴う神経症状の改善が促されるか、マウスの脱髄モデルを用いて検討した。また得られた分子メカニズムが、ヒトでも保存されているかヒト培養細胞を用いた検討も実施し、中枢神経系の恒常性を回復させる分子標的治療薬の開発へつなげることを目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

髄鞘のもととなる細胞は、オリゴデンドロサイト前駆細胞(Oligodendrocyte precursor cell, OPC)であり、OPC は成体の脳や脊髄に広く配置している。発生期の髄鞘形成に関しては、OPC が増殖し、その後に成熟オリゴデンドロサイトへ分化することで髄鞘が完成すると考えられており、成体における髄鞘の修復に関しても同様の過程が必要と考えられている。そこ

で本研究では、髄鞘修復の開始に必須である OPC の増殖に着目し、血液による OPC 増殖効果とその効果を促す分子メカニズムの探索を行った。その結果これまでに膵臓や脂肪細胞などが分泌するそれぞれ別々の因子によって、OPC の増殖や髄鞘修復が促されることがわかってきた。

(2) 詳細

研究テーマA「膵臓由来の Fibroblast growth factor (FGF) 21 による髄鞘修復効果の発見」

本研究ではまず、血液の漏れが髄鞘修復を促進するか検討するため、血管傷害を併発する脱髄マウスと血管傷害がない脱髄マウスを用いて、どちらのモデルで髄鞘の自然修復が盛んかを比較した。その結果、血管傷害を伴う脱髄マウスの方が、髄鞘の修復が顕著であった。そこで、漏れ出る血液が直接髄鞘を形成する細胞に働きかけた結果、髄鞘修復が促されと考え、成体マウスの血液を培養 OPC に暴露し、OPC の増殖を評価する in vitro の実験系を構築した。その結果、成体マウスの血清を暴露した OPC は、Bromodeoxyuridine (BrdU) の取り込みが増しており、このことから成体マウスの血清中に OPC の増殖を促す作用があることがわかった。薬理的スクリーニングによる解析から、血液に含まれる FGF21 が OPC の増殖を促すことがわかった。そこで、in vivo で FGF21 による髄鞘修復効果を解析するために、まず、FGF21 の生体内での発現様式を検討した。すると、FGF21 は膵臓での豊富に産生しており、中でも膵島の α 細胞が FGF21 を発現していた(図1)。このこと

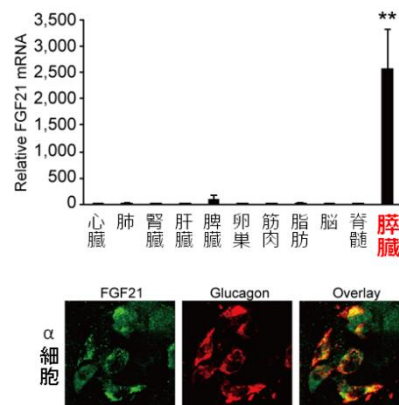


図1 FGF21 の発現
(上)各臓器における FGF21 mRNA の発現量。タンパク量も同様の傾向であった。
(下)膵島の α 細胞で FGF21 の発現が観察された。

から、膵臓で産生される FGF21 が血中に分泌されることが推察された。続いて、FGF21 のノックアウトマウスを用いて、脱髄後の髄鞘の自然修復が阻害されるかを検討した。マウスの脊髄の背側へ薬剤を局所注入して脱髄を誘導し、患部における髄鞘関連タンパク質の発現を可視化して観察したところ、FGF21 ノックアウトマウスではコントロール群より髄鞘関連タンパク質の発現が抑えられていて、このことから FGF21 が髄鞘の自然修復を促進する作用があることが示唆された。また、用いた脱髄モデルマウスは運動機能が障害されているが、髄鞘の修復にともない運動機能も自然回復する。FGF21 ノックアウトマウスでは、運動機能の自然回復も阻害され、このことから、FGF21 が組織修復だけではなく症状の改善にも寄与することが示された。なお、傷害していない FGF21 ノックアウトマウスでは、髄鞘の形成も正常時の OPC の増殖もコントロールと比較し差がなく、一方 OPC における FGF21 の

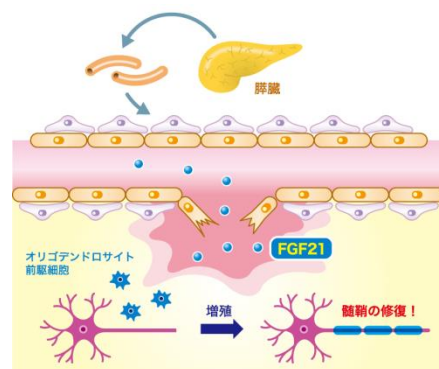


図2 膵臓が産生する FGF21 は、中枢神経傷害後に血管から漏れ出し、脳内へ漏出する。脳内に漏れ込んだ FGF21 が OPC の増殖を促し、髄鞘の修復を導く。

受容体発現は、傷害を施されたマウスで発現が高まってたため、傷害時における OPC での FGF21 受容体発現の増大が、キーであることもわかった。最後に、マウスの細胞で認められた FGF21 の髄鞘修復効果が、ヒト細胞でも保存されているかを検討した。多発性硬化症患者の剖検脳で OPC に FGF21 の受容体が発現していることを見出し、またヒト培養 OPC に対してヒト FGF21 を添加すると OPC の増殖が促されることも発見した。これらのことから、FGF21 はヒトの髄鞘修復に対しても効果を発揮する可能性があることがわかった。以上の結果は、責任著者として J. Clin. Invest. 誌へ論文発表した(図2)。

研究テーマB「レプチンによる OPC 増殖および髄鞘修復効果の解析」

末梢の臓器が産生すると知られる分子の中には、その分子やその受容体を欠損した個体では、発生期の髄鞘形成が不良であるというものがあった。

脂肪細胞から分泌されるレプチンも、その欠損マウスでは脳の髄鞘形成が不良であると知られていたが、レプチンによる OPC への直接作用や、成体における髄鞘修復におけるレプチンの関与などは不明であった。本研究では、中枢神経傷害後のレプチンによる髄鞘修復効果についても検討した。

まず、OPC がレプチンに対して感受性をもつかを検討するため、マウス培養 OPC およびマウス脳切片内の OPC でレプチン受容体発現を検出した。続いて、マウス培養 OPC に対して、レプチンを添加し、OPC への BrdU の取り込みを評価した。その結果、レプチン添加により OPC の増殖が促された。OPC の増殖には Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) の活性化が関与すると示唆されているが、レプチンも OPC で ERK を活性化させ、また ERK の活性化を阻害させることでレプチンによる OPC 増殖促進効果は阻害された。続いてレプ

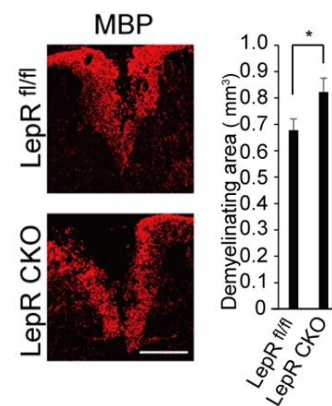


図3 OPC 特異的にレプチン受容体欠損したマウスでの髄鞘修復阻害効果。マウスの脊髓切片に免疫染色を施し、myelin basic protein (MBP)を可視化した。

チンによる in vivo での OPC 増殖促進効果、髄鞘修復効果を検討するため、本研究でもまず、レプチンの生体内での発現様式について検討した。その結果、レプチンは脳内でも発現が認められるが、相対的に脂肪細胞での発現が顕著であることを確認した。そこで OPC 特異的にレプチンを欠損させたマウスを作成し、そのマウスの脊髓背側へ脱髄を誘導し、レプチン受容体シグナルが OPC で失われた時の OPC 増殖効果や髄鞘修復効果が阻害されるか、検討した。OPC の増殖については、マウスの脊髓切片を作成し、BrdU と OPC マーカーの platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) α の共陽性細胞数を計測して、評価した。その結果、OPC 特異的にレプチン受容体を欠損させたマウスでは、患部における髄鞘修復が阻害された(図3)。また、レプチンによる治療効果を検討するため、野生型マウスへ脱髄を施し、患部にレプチンを処置して髄鞘修復効果を検討した。その結果、レプチンを処置したマウスでは、OPC の増殖や髄鞘修復が促進された。これらの結果から、脂肪細胞から分泌するレプチンも、OPC の増殖や髄鞘修復を促す作用があることが示された。

3. 今後の展開

本研究により、末梢の臓器から分泌される液性因子に中枢神経系の修復を促す作用があることが示された。また、その分子を人為的に患部へ施すことによって、組織修復や関連する神経症状を改善させる作用もあることがわかってきた。本研究で得られたコンセプトは、中枢神経組織の修復を促す薬剤開発へ、新しい方向性を示すものである。本研究で得られた知見や関連研究を進め、創薬シーズの獲得を目指し、将来的には中枢神経系の修復薬の創出へ繋げていきたい。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

研究目的について、当初の予定では血中の OPC 増殖因子を1つ同定することであったが予定よりも順調に進み、複数の因子を同定することができた。また、研究の進め方としても、技術補佐員の雇用や備品の新規購入等により、研究を加速させることができた。研究成果の一部はプレスリリースをしたが、予想以上に多くのメディアに取り上げていただき、研究成果の魅力を広く社会に発信することができた。また、得られた成果は、中枢神経疾患に対する治療薬のシーズになる可能性を有するものであるため、創薬という観点から医療経済学的な波及効果も高い。創薬への展開を強化するため、製薬会社から要請があった実験を追加予算で実施することができ、産学連携という観点でも非常に有意義に活動することができた。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

本研究課題では、膵臓で生産されるFGF21ならびに脂肪系細胞から生産されるレプチンが脳や脊髄の髄鞘を修復する作用を有することを明らかにした。脳や脊髄の神経回路の修復メカニズムは、これまで脳内の分子の役割を解明するものが多かったが、村松研究者は病巣では血液が神経組織内に漏れ込みやすい点に着目し、末梢の臓器から分泌されるホルモンが神経回路の修復を促すというコンセプトを報告した。中枢神経系の髄鞘修復に関して臓器連関の観点から新しい概念を提唱するものであり、新規性の高い素晴らしい研究成果と考える。この研究成果が認められ、日本神経科学会での招待講演やシンガポールでのシンポジウムに招待されるなど、研究者としての飛躍につながった。

予算の増額を受けてすすめた実験に関しても、産学連携という点で重要な内容を含んでいるが、それらに関しても順調に成果を挙げている。さきがけ研究で得られた成果を展開させて、これからも一層飛躍していくことが期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Kuroda, M., Muramatsu, R.(co-corresponding author), Maedera, N., Koyama, Y., Hamaguchi, M., Fujimura, H., Yoshida, M., Konishi, M., Itoh, N., Mochizuki, H. and Yamashita, T. (2017)

Peripherally derived FGF21 promotes remyelination in the central nervous system. <i>J. Clin. Invest.</i> , 127, 3496–3509.
2. Matoba, K., <u>Muramatsu, R.(co-corresponding author)</u> and Yamashita, T. (2017) Leptin sustains spontaneous remyelination in the adult central nervous system. <i>Sci. Rep.</i> , 7, 40397.
3. Kuroda, M., <u>Muramatsu, R.(co-corresponding author)</u> and Yamashita, T. (2017) Cardiomyocyte-released factors stimulate oligodendrocyte precursor cells proliferation. <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> , 482, 1160–1164.
4. <u>Muramatsu, R.(co-corresponding author)</u> , Kuroda, M., Matoba, K., Lin, H., Takahashi, C., Koyama, Y., Yamashita, T. (2015) Prostacyclin prevents pericyte loss and demyelination induced by lysophosphatidylcholine in the central nervous system. <i>J. Biol. Chem.</i> , 290, 11515–11525.
5. Miyake, S., <u>Muramatsu, R.(co-corresponding author)</u> , Hamaguchi, M. and Yamashita, T. (2015) Prolyl hydroxylase regulates axonal rewiring and motor recovery after traumatic brain injury. <i>Cell Death Dis.</i> , 6, e1638

(2)特許出願

研究期間累積件数：1件（公開前の出願件名については件数のみ記載）

(3)その他の成果（主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等）

学会発表（招待講演のみ）

1. 村松里衣子、山下俊英（2017）中枢神経回路の修復における末梢臓器由来のホルモンの役割、ConBio2017 講演、神戸（2017.12.8）
2. Muramatsu, R., Yamashita, T. (2017) Neuronal network regeneration in the adult central nervous system、Satellite Interstellar Initiative at A*STAR、主催、講演、シンガポール(2017.12.4–5)
3. 村松里衣子、山下俊英（2017）中枢神経系の恒常性維持機構と血管－神経相互作用、第7階細胞再生医療研究会、講演、神戸（2017.8.19）
4. Muramatsu, R., Yamashita, T. (2017) Peripheral environment is involved in central nervous system regeneration. 第40回日本神経科学大会シンポジウム、千葉（2017.7.22）
5. 村松里衣子、山下俊英（2017）Peripheral environment regulates remyelination in the adult CNS. Neuroscience Network in Kobe Symposium 神戸（2017.2.17）

受賞

1. 大阪大学総長による表彰（2015 年）
2. 大阪大学総長奨励賞（2015 年）
3. 第三回「明日の象徴」研究者部門(2014 年)
4. 文部科学大臣若手科学者賞（2014 年）
5. 循環器学研究振興基金褒章内田賞（2014 年）

著作物

1. Hamaguchi, M., Muramatsu, R. (co-corresponding author), Matoba, K., Maedera, N. and Yamashita, T. (2017) Lysophosphatidylcholine-induced demyelination model of mouse Protocol Exchange (2017) doi:10.1038/protex.2017.121
2. Matoba, K., Muramatsu, R. (co-corresponding author) and Yamashita, T. (2017) The role of leptin in the central nervous system remyelination. Receptors & Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.14800/rci.1583>
3. Muramatsu, R. (co-corresponding author) and Yamashita, T. (2014) Pericyte function in the physiological central nervous system. Neurosci. Res. 81-82, 38-41.
4. Muramatsu, R. (co-corresponding author) and Yamashita, T. (2014) Concept and molecular basis of axonal regeneration after central nervous system injury. Neurosci Res. 78, 45-49.
5. 村松里衣子、山下俊英：中枢神経炎症からの再生メカニズム、Annual Review 神経 2014、中外医学社、2014

プレス発表等

1. 産経新聞 平成 29 年 8 月 22 日、朝刊28面「膵臓の分泌物 神経修復」
2. 毎日新聞 平成 29 年 8 月 22 日、朝刊24面「神経修復物質を発見」
3. 時事ドットコム 平成 29 年 8 月 23 日、「神経回路の修復物質発見＝難病治療薬に応用期待」
4. 中日新聞ネット版 平成 29 年 8 月 22 日、「傷ついた神経、分泌物質で修復 難病治療に期待」
5. 日刊工業新聞 平成 29 年 8 月 24 日、「阪大、神経回路の修復物質を発見」