

中枢神経における Erk2 シグナルの役割に関する研究

所属 医学系研究科外科学専攻整形外科学

指導教員 田中栄 教授

岡崎 廉太郎

目次		頁
第一章	要旨	3
第二章	略語	4
第三章	序文	6
第四章	実験材料及び方法	8
第五章	結果	22
第六章	考察	32
第七章	結語	38
第八章	謝辞	39
第九章	参考文献	40

第一章 要旨

多発性硬化症などの脱髄疾患は、炎症、脱髄、グリオシス、軸索変性を特徴とする。脱髄巣ではオリゴデンドロサイト細胞死と炎症が観察され、炎症の制御は脱髄疾患治療の重要なターゲットであり、これまでに生化学的、組織学的な研究がおこなわれてきた。今回我々は、マウス脱髄疾患モデルを用い、細胞内シグナル Erk2 が中枢神経炎症制御において果たす役割を解析した。カプリゾンの経口投与による可逆的な脱髄モデルを選択し、Nestin-Cre によって神経幹細胞由来の細胞で Erk2 発現が欠失したコンディショナルノックアウトマウスを用い、行動学的、生化学的、組織学的に解析を行った。その結果、Erk2 欠損マウスではカプリゾン投与による炎症性脱髄病態が軽減しており、そのメカニズムとしてアストロサイトでの Erk2 活性化が炎症反応の増大に寄与していると考えられた。今後、炎症を伴う中枢神経疾患に対する分子標的治療のターゲットとして、アストロサイトの Erk2 活性化に係るシグナルは有望な候補の一つであると考えられる。

第二章 略語

BBB: blood-brain barrier

BSA: bovine serum albumin

Ccl: C-C motif chemokine ligand

CNS: central nervous system

Cxcl: C-X-C motif chemokine ligand

D-MEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

Erk: Extracellular signal-regulated kinase

FBS: fetal bovine serum

GFAP: glial fibrillary acidic protein

Iba1: ionized calcium binding adaptor molecule 1

IP-10/Cxcl-10: interferon gamma-induced protein 10

LFB: luxol fast blue

LPS: lipopolysaccharide

MAG: myelin associated glycoprotein

MAPK: mitogen-activated protein kinase

MBP: myelin basic protein

MCP-1/Ccl2: monocyte chemotactic protein-1

Mek: MAPK/Erk kinase

MIP-1 α /Ccl3: macrophage inflammatory protein 1 alpha

MS: multiple sclerosis

NF- κ B: nuclear factor kappa B

PCR: polymerase chain reaction

PFA: paraformaldehyde

RANTES/Ccl5: regulated and normal T cell expressed and secreted

TNF α : tumor necrosis factor alpha

第三章 序文

中枢神経脱髄疾患のひとつである多発性硬化症は、炎症、脱髄、グリオーシス、軸索変性を特徴とする。脱髄巣ではオリゴデンドロサイト細胞死と炎症が観察され、炎症はオリゴデンドロサイト細胞死の誘因のひとつであると考えられている^[1]。したがって、炎症の制御は脱髄疾患治療の重要なターゲットであり、これまでに生化学的、組織学的な研究がおこなわれてきた。中枢神経炎症の組織学的な所見には、リンパ球やマクロファージの浸潤、局所のミクログリアやアストロサイトの活性化が含まれる^[2]。

アストロサイトは、中枢神経で最も多いグリア細胞で、脳の恒常性維持に多様な機能を持つ^[3]。一方、病的状態においてアストロサイトは活性化され、細胞突起の増加、GFAP の発現増加、Nestin の再発現を特徴とするアストログリオーシスを形成する^[4]。同時に様々な炎症関連分子や成長因子の産生を亢進することで周囲に影響を及ぼす^[5]。脱髄においてもアストログリオーシスは炎症反応に含まれ、その機能は様々な細胞内シグナルによって制御されている^[6,7]。

細胞内シグナルの一つである Extracellular signal-regulated kinase (Erk) は細胞の分化、増殖、生存に関与し、すべての細胞に普遍的に存在している^[8]。Erk には 84% 相同の 2 つの isoform、Erk1 (44 kD) と Erk2 (42 kD) があり^[9]、Erk1 の機能の多くは Erk2 によって代償されるが、Erk2 KO は胎生致死であることにより Erk2 は固有の機能

を有していると考えられている^[10]。

中枢神経の炎症における Erk シグナルの関与については、in vivo 実験系でいくつかの報告がある。アストロサイト培養に high-mobility group box 1 (HMGB1) 蛋白を投与して惹起される炎症は Erk シグナルを介している^[5]、あるいはスライス培養に NMDA を投与する脳虚血モデルで、炎症関連分子 (MCP-1/Ccl-2) 産生にアストロサイト Erk 活性化が重要とすると報告されている^[11]。つまり、アストロサイトの炎症関連分子発現に Erk シグナルが関与していることが示唆されている。

一方、Erk2 固有の機能に関して、Sato は Erk2 欠損が学習や長期記憶を障害すると報告し^[10]、また Imamura は Erk2 欠損が発生期における Ventricular Zone の神経幹細胞の増殖を抑制すると報告している^[12]。しかし、脱髄組織における反応性アストロサイトで Erk、とりわけ Erk2 がどのように働いているかについては不明である。

今回我々は、マウス脱髄疾患モデルを用い、細胞内シグナル Erk2 が中枢神経炎症制御において果たす役割を解析した。モデルとして銅キレート剤であるカプリゾンの経口投与により可逆的な脱髄モデルを選択した^[13]。さらに Nestin-Cre によって神経幹細胞由来の細胞で Erk2 発現が欠失したコンディショナルノックアウトマウス (Erk2 cKO) を用い^[10]、行動学的、生化学的、組織学的に解析を行うことで、アストロサイトの Erk2 が炎症と脱髄の過程で担う機能を明らかにした。

第四章 実験材料及び方法

実験材料

1. 動物

8 週齢の C57BL/6J 雌マウスと Wistar 妊娠ラットはオリエンタル酵母工業株式会社より購入した。Erk2^{flox} マウスは東京都老人総合研究所の遠藤昌吾先生より提供された。また、コンディショナルノックアウトマウス作製に際し使用した、Nestin プロモーター制御下に Cre リコンビナーゼを発現する Nestin-Cre トランスジェニックマウスは、京都大学ウィルス研究所の影山龍一郎先生より提供された^[14](図 3A)。Cre 発現レポーター解析に用いた CAG-floxed Neo-EGFP マウスは、理化学研究所バイオリソースセンターより提供された(図 3D)。いずれのマウスも C57BL/6 back ground で維持し、両系統を交配させることで Erk2 コンディショナルノックアウトマウス(Erk2 cKO)を作出した。マウス遺伝子型の同定は、尾からゲノム DNA を抽出し REDExtract-N-Amp™ Tissue PCR Kit(Sigma 社)を使用して、以下のプライマーを用いて PCR により行った。

Erk2 flox マウスの genotyping

mE2-F2 (5' AAGGCTCACAGTGACAGTGACACC 3')

mE2-R1 (5' AGAGTTTCATTATGGAGTCCTCGC 3')

Erk2 cKO マウスの genotyping

mE2-F2 (5' AAGGCTCACAGTGACAGTGACACC 3')

mE2-R1 (5' AGAGTTTCATTATGGAGTCCTCGC 3')

mE2-F3 (5' GATCTGATGCTTGCCAAAGCC 3')

すべての動物実験は「動物の保護及び管理に関する法律」、「動物実験の飼養及び保管などに関する基準(総理府告示)」、「東京大学医学部動物実験指針」および「国立障害者リハビリテーションセンター動物実験指針」に従って行った。

2. 抗体ならびに試薬類

D-MEM, Penicillin, Streptomycin は和光純薬工業株式会社より、ウシ胎児血清 (fetal bovine serum: FBS)は MP biomedical 社より購入した。Lipopolysaccharides (Escherichia coli O127:B8 株)、U0126 (Mek 阻害薬)、カプリゾン (bis-cyclohexanone-oxaldihydrazone)は Sigma-Aldrich 社より購入した。SB203580 (p38 MAPK 阻害薬)、SN50 (NF- κ B 阻害薬)は Carbiochem 社より購入した。

rabbit 抗 Erk1/2 抗体、rabbit 抗 phospho-Erk1/2 抗体、rabbit 抗 phospho p38 MAPK 抗体(#9215)、rabbit 抗 phospho-JNK 抗体(#9251)、rabbit 抗 I κ B α 抗体 (#4812)、rabbit 抗 phospho-Akt (Ser473) 抗体、rabbit 抗 phospho-STAT3 (#9131) 抗体は Cell Signaling 社より購入した。mouse 抗 phospho-Erk1/2 抗体(sc7383)は Santa-Cruz 社より購入した。rabbit 抗 Iba-1 抗体は和光純薬工業株式会社より購入し

た。rabbit 抗 GFAP 抗体(AB5804)は Millipore 社より購入した。mouse 抗 GFAP 抗体 (MAB360)は Carbiochem 社より購入した。TO-PRO-3、ProLong® Gold は Invitrogen 社より購入した。

実験方法

1. カプリゾン投与

脱髄疾患の動物モデルとしては、銅キレート剤のカプリゾンモデルや、Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE)実験的自己免疫性脳脊髄炎モデルが主に用いられている(表1)。EAE モデルの機序は、中枢神経蛋白 Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein に対する免疫応答、即ち末梢で活性化された中枢神経蛋白反応性 T 細胞が中枢神経に侵入し、局所で活性化されて脱髄や神経障害をきたすと考えられている。EAE の機序は多発性硬化症と多くの病態を共有すると考えられている。一方、カプリゾン投与モデルの機序は、ミトコンドリア障害によるオリゴデンドロサイト細胞死と、それに続く炎症細胞浸潤と活性化による脱髄を起こすと考えられている^[15,16]。その特徴として、脳血管関門の破綻がなく T 細胞の関与がないことや^[17]、EAE より脱髄の再現性が高いことなどがあげられ、カプリゾン含有飼料の 6 週間経口投与は中枢神経の脱髄と再髄鞘化モデルとして確立されている^[13,18]。

表 1 主な脱髄モデルの比較

<u>Cuprizone モデル</u>		<u>EAE モデル</u>
0.2% Cuprizone 経口投与	投与方法	MOG、アジュバント 皮内注射
オリゴデンドロサイト障害 に続く炎症細胞浸潤	機序	MOG への免疫 T細胞浸潤
なし	脳血管関門破綻	あり
なし	T 細胞の関与	あり
脳梁部で高率に脱髄を 認める	脱髄再現性	空間的再現性は低い

EAE: Experimental Autoimmune Encephalomyelitis
実験的自己免疫性脳脊髄炎

MOG: Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein

今回、8週から10週齢の野生型マウス、Erk2^{flox/flox}マウス、あるいはErk2 cKOマウスに、0.2% (wt/wt) カプリゾン含有飼料を最大6週間投与した。6週投与後は通常飼料に戻して投与した。

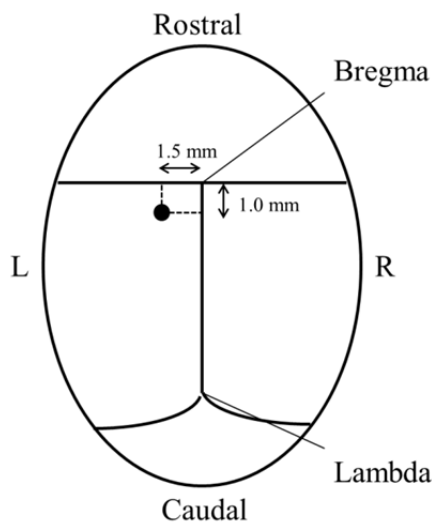
2. Mek 阻害薬脳室内投与

カプリゾンモデルでは脳血管関門の破綻がないため、脳室内カテーテルと浸透圧ポンプを用いて脳室内にMek阻害薬U0126を持続投与した。

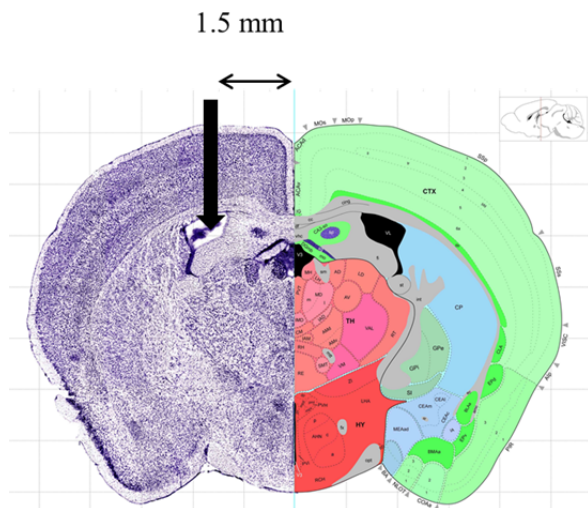
8週齢、雌の野生型マウスを用いた。麻酔下に頭蓋骨を展開し、針先を左側脳室内に留置するため、Bregmaから左外側1.5 mmかつ尾側1.0 mmを穿孔し、ALZET Brain Infusion Kit 3 (ALZET社)を刺入し、頭蓋骨に接着剤で固定した。これをALZET Osmotic Pump #2004 (ALZET社)にカテーテルで接続し、Pumpは背部皮下に留置した。浸透圧ポンプの流量は0.25 μ l/hr、6.0 μ l/day、最大4週間の投与を行った。実験はVehicle、U0126 50 μ M または200 μ Mの3群で行い、行動学的解析(Rota-rodテスト)と、脳梁部の炎症関連分子発現(RT-PCR法)で評価した。



ALZET Osmotic Pump #2004 と ALZET Brain Infusion Kit 3



頭蓋骨穿孔部位 (シエーマ)



頭蓋骨穿孔部位 (Allen Brain Atlas)

3. 薄切切片の作成

麻酔後のマウスを PBS で灌流後、4%パラホルムアルデヒド (PFA) で灌流固定し脳を摘出した。マウス用ブレインマトリックス (RBM-2000C) をガイドに用いて Bregma P0-2 mm を含む 5 mm 厚の前頭断サンプル、あるいは正中から 5mm 厚の矢状断サンプル

を得た。これらを4%PFAで24時間固定後、10%シヨ糖液に24時間、30%シヨ糖液に組織が沈むまで4℃で保存した。次いで、凍結切片作成用包埋剤 OCT compound (SAKURA FINETEK, Torrance, CA, USA)で包埋、試料凍結器(東京理化器械社)を用いて60秒程度で急速凍結し-80℃のフリーザー内で保存した。凍結標本をクライオスタット Leica CM3050S (Leica Microsystems)で薄切し14μm厚の凍結切片を作成した。

4. 免疫組織染色

作成した凍結切片を用いて免疫組織染色を行った。2% Donkey Serum 含有 TBS/T (Tween 0.01%)で1時間ブロッキングした後、1次抗体を400倍希釈で使用し、室温で24時間反応させた。二次抗体は AlexaFluor488 または 568 結合抗マウス IgG 抗体、AlexaFluor488 または AlexaFluor 568 結合抗マウス IgG 抗体 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を1/200倍で用い、室温で1時間反応させた。核染色は TO-PRO 3 (Invitrogen)を1/100倍で用い、室温で15分反応させた。ProLong Gold 退色防止剤 (Invitrogen)を用いてマウントした。

染色した標本の観察には、共焦点レーザー顕微鏡 (Confocal Laser Scanning Microscopy, LSM5 PASCAL EXCITER, Carl Zeiss, Germany)を用いた。画像はZスタックコントロールで1μm厚を10枚取込み、プログレッション再構成を行った。

免疫組織染色の画像解析は、WinROOFソフトウェア(三谷商事社)を用い、二値化後、脳梁の面積とGFAP、Iba1 陽性領域を計測した。Bregma P1.0 mm の前頭断スライスで、正中から左右 500 μm の範囲の脳梁部で、脳梁面積を測定した(図 4E)。

5. 髄鞘染色

Luxol Fast Blue 染色で凍結切片の髄鞘染色を行い、染色性の低下、即ち髄鞘の減少で脱髄の評価を行った。切片を乾燥後、70%と 95% エタノールで脱水し、Defat 液で処理後、LFB 染色液(トルイジンブルー)で 60°C16 時間染色。0.05%炭酸リチウムと 70%エタノールで分別後水洗した。分別は脳梁部の LFB 染色が適切な強度になるまで 2~3 回繰り返した。分別後、脱水、透徹、そして封入を行った。脳梁部の脱髄病変の進行度の評価は 0 (正常)から 3 (完全な脱髄)までの 4 段階で評価した [19,20]。

6. 初代培養、調整メディウム

6-1. アストロサイト単離培養の作成

培養は全て 37 °C、5.0 % CO₂ 条件で行った。胎生 19 日の Wistar ラット、あるいは出生 2 日の Erk2 cKO マウスと Erk2^{flx/flx} マウス、それぞれの大脳半球からディスペラーゼ処理で得られた細胞を、10% FBS 入り D-MEM を用いて PDL コート 75 cm² フラ

スコ (BD ファルコン社) で培養 (P0 培養)。培養開始翌日、以降 3 日おきにメEDIUM 交換を行い、およそ 7 日後細胞がコンフルエントになった段階で、振盪器を用いて 200 rpm、37 °C の条件で 2 時間振盪し、ミクログリアなどの浮遊細胞やオリゴデンドロサイトなどの弱接着細胞を除去した (shake off method)。0.05 % トリプシン EDTA で処理して得られた細胞 (P0 ストック) はセルバンカー細胞保存液 (三菱化学メディエンス社) を用いて - 80°C で 24 時間保存後、- 140 °C で長期保存した。Passage 1 培養 (P1 培養) は P0 ストックを 10 % FBS DMEM を用いて PDL コート 25 cm² フラスコで培養し、P0 培養と同様にコンフルエントになった段階で shake off method を行った。トリプシン処理で得られた細胞を 6well、12well、24 well PDL コートプレートに播き (P2 培養) コンフルエントになった状態で実験を行った。この段階で、ニューロン、オリゴデンドロサイト、ミクログリアはほとんどが除去され、98 % GFAP 陽性のアストロサイト単離培養が得られた。

6-2. ミクログリア単離培養とミクログリア調整メEDIUMの作成

まず、胎生 19 日の Wistar ラットの 大脳半球から、5-1 アストロサイト単離培養と同様に、P0 培養(前述)を作成した。1 週間後、P0 培養 75 cm² フラスコを振盪器で 200 rpm、37 °C、30 分振盪し、上清を 10 cm PDL コートディッシュに播く。15 分間培養した後、アメーバ様ミクログリア (ameboid microglia) の細胞接着を確認、弱接着細胞を

洗浄除去することでマイクログリア単離培養を得た^[21]。

次いで、得られたマイクログリア単離培養を、LPS 0.1 µg/ml を含む無血清 D-MEM で 3 時間培養後、LPS を除いた無血清 D-MEM でさらに 21 時間培養。得られたメディアウムを 3000 rpm で 10 分間遠心し細胞成分を除き、LPS 刺激マイクログリア調整メディアウム得た^[22]。得られた調整メディアウムは-20 °Cで保存した。

6-3. アストロサイトへの調整メディアウム投与

5-1 で得られた Wistar ラット、Erk2 cKO マウス、そして Erk2^{flox/flox} マウスのアストロサイト単離培養を shake off method で継代し、P2 培養を実験に用いた。蛋白定量解析の際は 3.5 cm PDL コートディッシュに 24×10^4 細胞/dish で、免疫組織染色と mRNA 定量解析の際は PDL コート 24 well プレートに 4×10^4 細胞/dish の密度で播いた。

調整メディアウムを投与する前に、アストロサイト培養を無血清 D-MEM で 3 時間培養し、アストロサイトを血清飢餓 (starvation) 状態とした。蛋白サンプルは調整メディアウムで 30 分、1 時間、3 時間、6 時間培養、mRNA サンプルは調整メディアウムで 3 時間培養した後に採取した。

7. Western Blotting 法

蛋白抽出の手技はすべて氷上で行った。麻酔後のマウスを 4°C の PBS で灌流固定

し脳を摘出、Bregma 0-2 mm を含む 5 mm 厚の前頭断とし、さらに顕微鏡下に大脳皮質をとり除き脳梁部を中心とした組織を得た。これを T-PER Mix (protease inhibitor, 1 mM Na₃VO₄, and 2 mM NaF, and pH 7.4, 2mM EDTA を含む) (Roche, Indianapolis, IN, USA) 液中で直径 2mm のジルコニアビーズと共にビーズ式細胞破碎機(和研薬社)でホモジネートし、15,000 rpm で、15 分遠心して蛋白を抽出した。他方 in vitro 実験系では、細胞を氷冷した PBS で 3 度洗浄し、M-PER Mix (Roche, Indianapolis, IN, USA) 液でセルスクレイパーを用いて蛋白を回収した。回収液を 4℃ で 1 時間攪拌後、15,000 rpm で 20 分間遠心し上清を回収することで蛋白抽出を行った。蛋白量は Protein Assay Kit II (BIO RAD 社) を用いて定量を行った。得られた可溶画分は 4x サンプルバッファ(和光純薬工業株式会社)と混和し - 20 °C で保存した。

等量の蛋白を目的蛋白の分子量に応じて 5-20% ないし 15% の SDS ポリアクリルアミドゲル (e-PAGEL E-T520L, E-T15S, ATTO 社) で電気泳動し、泳動終了後のゲル上の蛋白を PVDF メンブレン (Immobilon-P, Millipore 社) に転写した。抗体の非特異的結合を防ぐため 5% スキムミルクを加えた TBS/T 溶液で 1 時間ブロッキングしたのち、目的とする蛋白の一次抗体と反応させた。化学発光検出の場合、二次抗体には HRP-conjugated goat anti-mouse IgG または goat anti-rabbit IgG (ともに Promega 社) を用い、ECL Plus Western Blotting Detection System (GE healthcare 社) により特異的なバンドを検出した。近赤外蛍光検出の場合、二次抗体に Goat

aMouse IRDye680RD、Goat aRabbit IRDye680RD、Goat Anti-Mouse IRDye 800CW、あるいは Goat Anti-Rabbit IRDye 800CW（いずれも LI-COR 社）を用いて特異的バンドを検出した。特異的バンドは、Odyssey® Fc Imaging System を用い、化学発光と、波長 700nm、800nm の近赤外蛍光を検出し、Image Studio ver. 2.0 ソフトウェアで定量を行った。内部標準として β -Actin を用いた。

一度用いたメンブレンで再度別の蛋白の検出を行う場合には、50°C の Stripping buffer（62.5 mM Tris-HCl, 2%SDS, 100 mM 2-mercaptoethanol）中で 30 分間振とうさせることでメンブレンから抗体を解離させた後にブロッキング処理（一次抗体）の手順から再度同手技を繰り返した。

8. 定量 RT-PCR 法

脳梁部組織を蛋白サンプルと同様に得たのち、RNA Later 液で 4 °C 保存。保存サンプルから ISOGEN（和光純薬工業株式会社）を用いて RNA を回収した。培養細胞からは、Buffer RLT 液で細胞を溶解し - 30 °C で保存した。いずれのサンプルも RNeasy Mini Kit (QIAGEN) で RNA 抽出精製した。mRNA は Takara RNA PCR Kit (AMV) ver. 3.0 (Takara) を用いて逆転写し、single stranded cDNA に変換した。Real-Time PCR は 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) を用いて、SYBR Green I Dye アッセイにより行った。Internal control（内部標準）として rodent

GAPDH を使用した。各サンプルの測定値は 3 well での計測値の平均値とした。用いたプライマーは以下のとおりである。

TNF α (mouse): sense; 5'-ACGGCATGGATCTCAAAGAC-3'
anti-sense; 5'-GTGGGTGAGGAGCACGTAGT-3'

IL1- β (mouse): sense; 5'-CAGGCAGGCAGTATCACTCA-3'
anti-sense; 5'-ATGAGTCACAGAGGATGGGC-3'

Ccl-2 (mouse): sense; 5'-CCCAATGAGTAGGCTGGAGA-3'
anti-sense; 5'-TCTGGACCCATTCCTTCTTG-3'

Ccl-3 (mouse): sense; 5'-ATGAAGGTCTCCACCACTGC-3'
anti-sense; 5'-GATGAATTGGCGTGGAATCT-3'

Ccl-5 (mouse): sense; 5'-GTGCCACGTCAAGGAGTAT-3'
anti-sense; 5'-CACTTCTTCTCTGGGTTGGC-3'

Cxcl10 (mouse): sense; 5'-AAGTGCTGCCGTCATTTTCT-3'
anti-sense; 5'-CAATGATCTCAACACGTGGG-3'

MBP (mouse): sense; 5'-ACTCACACACGAGAACTACCCA-3'
anti-sense; 5'-TGGTGTTCGAGGTGTCACAA-3'

MAG (mouse): sense; 5'-GGTACATGGCGTCTGGTATTTCA-3'
anti-sense; 5'-CCACTTGTGTGCGGGACTT-3'

TNF α (rat): sense; 5'-ACGGCATGGATCTCAAAGAC-3'
anti-sense; 5'-GTGGGTGAGGAGCACGTAGT-3'

IL1- β (rat): sense; 5'-AAAAATGCCTCGTGCTGTCT-3'
anti-sense; 5'-GGGATTTTGTTCGTTGCTTGT-3'

Ccl-2 (rat): sense; 5'-ATGCAGTTAATGCCCCACTC-3'
anti-sense; 5'-TTCCTTATTGGGGTCAGCAC-3'

Ccl-3 (rat): sense; 5'-CTTCTCCTATGGACGGCAAA-3'
anti-sense; 5'-CGGTTTCTCTTGGTCAGGAA-3'

Ccl-5 (rat): sense; 5'-ATATGGCTCGGACACCACTC-3'
anti-sense; 5'-TGACAAAGACGACTGCAAGG-3'

Cxcl-10 (rat): sense; 5'-CTTCCATGAACAGACGCTGA-3'
anti-sense; 5'-TCTTGATGGCCTCAGATTCC-3'

GAPDH (rodent): sense; 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3'
anti-sense; 5'-GGATGCAGGGATGATGTTCT-3'

9. 行動学的解析

脱髄による四肢協調運動の機能を評価するためロータロッド MK-670 (Muromachi Kikai, 東京)を用いた解析を行った。カプリゾン投与開始 2 ~3 週前から週 2 回、1 回あたり 10 回のトレーニングを行い、投与開始後も同様の頻度で計測を行った。ロータロッドの設定は、回転数 0.5 rpm から 180 秒で 50 rpm への加速モードを使用し、落下までの時間を測定した。10 回の計測で上位 5 回の平均をその個体の測定値とした。

10. BrdU 発現の解析

5-1 で得られた Erk2 cKO マウス、そして Erk2^{flox/flox} マウスのアストロサイト単離培養を shake off method で継代し、P2 培養を実験に用いた。無血清 D-MEM で 3 時間 starvation した後に、調整メEDIUMで 18 時間培養、その後 10 μ M BrdU を含む調整メEDIUMで 6 時間培養し固定した。抗 BrdU 抗体、rabbit 抗 GFAP 抗体、DAPI で免疫染色を行い、GFAP 陽性細胞中の BrdU 陽性細胞数を計測した。

11. 統計的解析

各実験は 3 回以上繰り返す、同様な結果が得られることを確認した。結果は平均 \pm 標準偏差 (SD) として表記した。有意差の検定には Student's t 検定、two-way repeated ANOVA の後に Bonferroni あるいは Student's t 検定を用いた。

第五章 結果

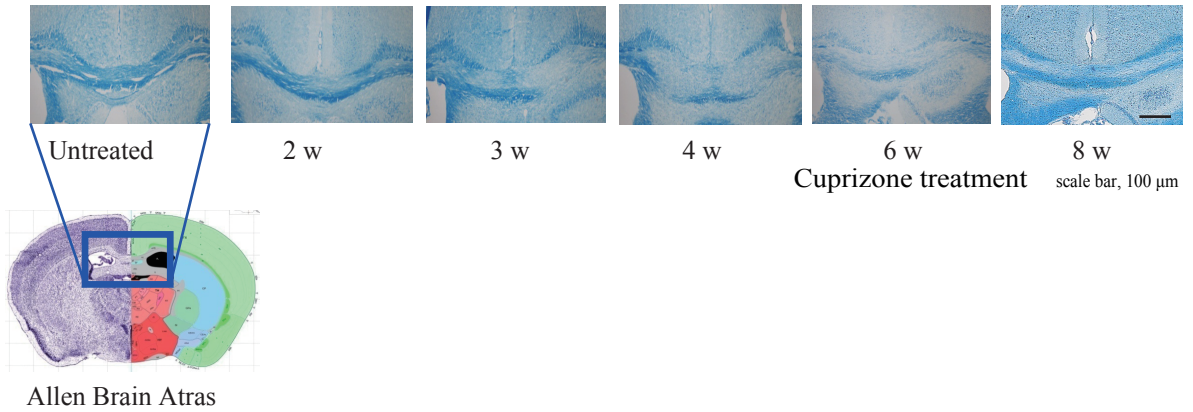
(1) 脱髄に伴う Erk 活性化はアストロサイトに局在していた

カプリゾンモデルは MS 疾患モデルとして広く用いられており、経口投与後 4 週から 5 週にかけて脱髄が誘導され、中でも脳梁部において高い再現性を持って脱髄が観察されると報告されている^[23]。我々の実験系においても、脱髄の程度を脳梁部組織サンプルの LFB 染色で確認したところ、脱髄は 3 週から顕在化し、4-6 週で最も広範囲の脱髄が観察された(図 1A)。次いで、脳梁部から得られた蛋白サンプルの WB 解析では、Erk1/2 のリン酸化はカプリゾン投与後 1 日から 4 週にかけて変動することが観察され(図 1B)、定量評価すると投与前と比較して投与後 1 週から 4 週まで有意に亢進していた(図 1C)。また、免疫組織学的にはカプリゾン投与後 1 週から 4 週まで、脳梁部の抗リン酸化 Erk1/2 抗体による染色性が増強しており、この結果は WB 解析と一致していた(図 1D:脳梁部 0, 2, 3w)。

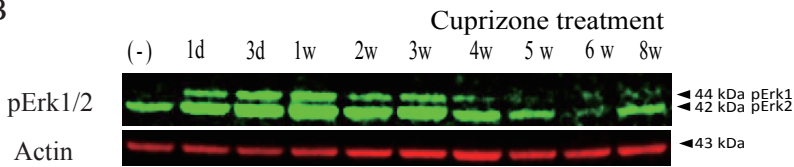
一方で、投与後 4 週の脳梁部脱髄巣ではミクログリア(Iba1 陽性)の浸潤、反応性アストロサイト(GFAP 陽性)の増加といったグリオシスの所見が観察された。(図 1E)。そこで、脱髄巣でのリン酸化 Erk の局在を免疫組織学的に確認すると、リン酸化 Erk 陽性細胞の多くがアストロサイトであった。一方、リン酸化 Erk 陽性となる成熟オリゴデンドロサイトやミクログリアは僅かであった(図 1 F)。GFAP 陽性アストロサイトにおける

図 1-1

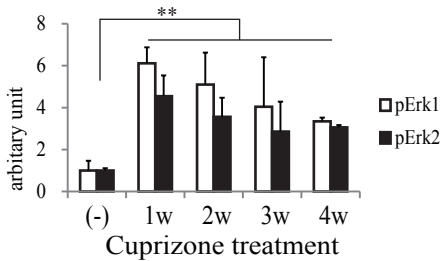
A



B



C



D

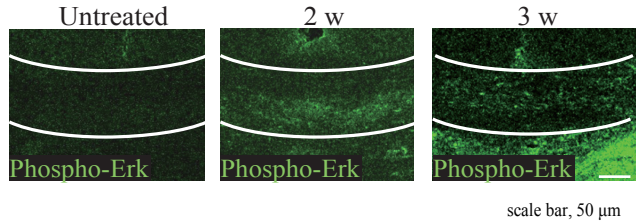


図 1-1 カプリゾン投与後、脳梁部の脱髄と、脳梁部の Erk1/2 リン酸化が亢進する

A. Luxol Fast Blue 髄鞘染色で、カプリゾン投与前と投与後 8 週までの脳梁部の脱髄を評価した。脳梁部の脱髄は 3 週目から顕在化し、8 週まで続いた。

B. WB 法によるリン酸化 Erk1/2 発現。野生型マウス脳梁部、カプリゾン投与後 8 週までの経時的変化。Erk1/2 リン酸化はカプリゾン投与後 1 日から 4 週にかけて変動している。

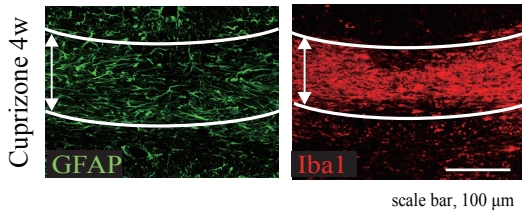
C. WB 法による、カプリゾン投与前と投与後 4 週までの Erk1/2 リン酸化の定量。投与前と比較して投与後 1 週から 4 週まで有意に亢進していた。N=3、Student t 検定、

** ; $p < 0.01$ 。D. 脳梁部におけるリン酸化 Erk1/2 の免疫組織染色。脳梁部のリン酸化 Erk1/2 染色性はカプリゾン投与後 2 週、3 週で増強していた。

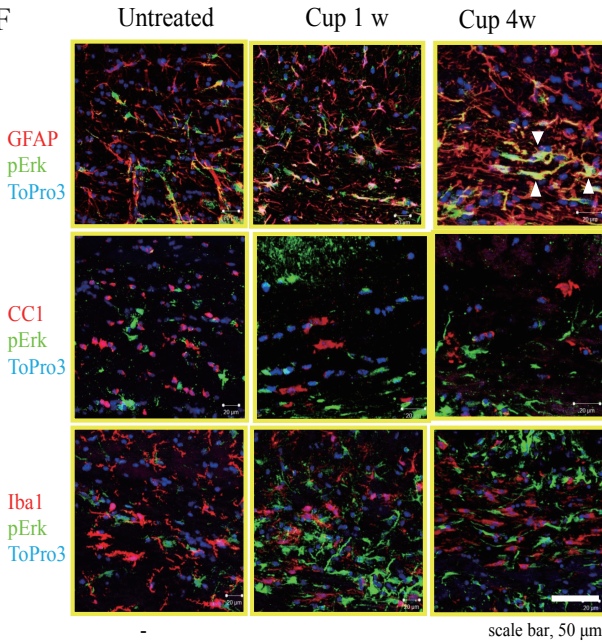
A, D 前頭断像、Bregma P 1.0 mm

図 1-2

E



F



G

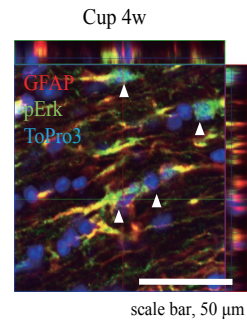


図 1-2 脳梁部脱髄巣のグリオオーシスと、リン酸化 Erk1/2 のアストロサイト局在

E. 脳梁部の GFAP と Iba1 免疫組織染色。カプリゾン投与後 4 週で脳梁部のグリオオーシスを認めた。

F. 脳梁部の免疫組織染色。GFAP、CC1、Iba1 とリン酸化 Erk1/2 の共染色。核染色は TO-PRO3 で行った。カプリゾン投与後 1 週目と 4 週目に GFAP 陽性アストロサイトで Erk1/2 のリン酸化を認めた。矢頭；GFAP 陽性リン酸化 Erk1/2 陽性細胞。

G. GFAP 陽性リン酸化 Erk1/2 陽性細胞の強拡大像。リン酸化 Erk を核、細胞質に認めた。

E-G. 野生型マウス、Bregma P 1.0 mm、前頭断像、脳梁部。

Erk1/2 リン酸化は核内と細胞体共に局在していた(図 1G 強拡)。以上の結果より、カプリゾンモデルでは脳梁の脱髄と共に Erk のリン酸化が誘導され、グリオシスをきたした脱髄巢の Erk 活性はアストロサイトに優位であった。

(2) Mek 阻害薬脳室内投与により、運動機能低下が回避され、脳梁部の炎症関連分子発現が減少した。

次に、脱髄における Erk1/2 の役割を検討するために、カプリゾンモデルに Mek 阻害薬を投与した。カプリゾンモデルでは脳血流閉塞が維持されるため、脳室内カテーテルと浸透圧ポンプ (ALZET) を用いて脳室内投与を行った。まず、脱髄によって障害される四肢協調運動機能を Rota-rod を用いて評価した^[24]。カプリゾン投与前 2~3 週間トレーニングを行い、学習曲線がプラトーに達したことを確認したのち、カプリゾン投与と阻害薬(または Vehicle)投与を同時に開始した。その結果、まず、脳室内カテーテル留置の処置を加えない群と、脳室内カテーテル留置群 (Vehicle 群) に Rota-rod スコアの有意差はなかった。次いで Vehicle 群と Mek 阻害薬投与群を比較した。カプリゾン投与後、Vehicle 群では落下までの時間が漸減し投与 10 日以降で有意に減少した。一方、阻害薬投与群ではカプリゾン投与後落下までの時間は減少せず、さらに Vehicle 群と比較して低濃度群で 2 週から 3 週にかけて、高濃度群では投与後 10 日以降 4 週まで有意な差を認めた(図 2A)。Rota-rod の落下時間は四肢協調運動の指

図 2

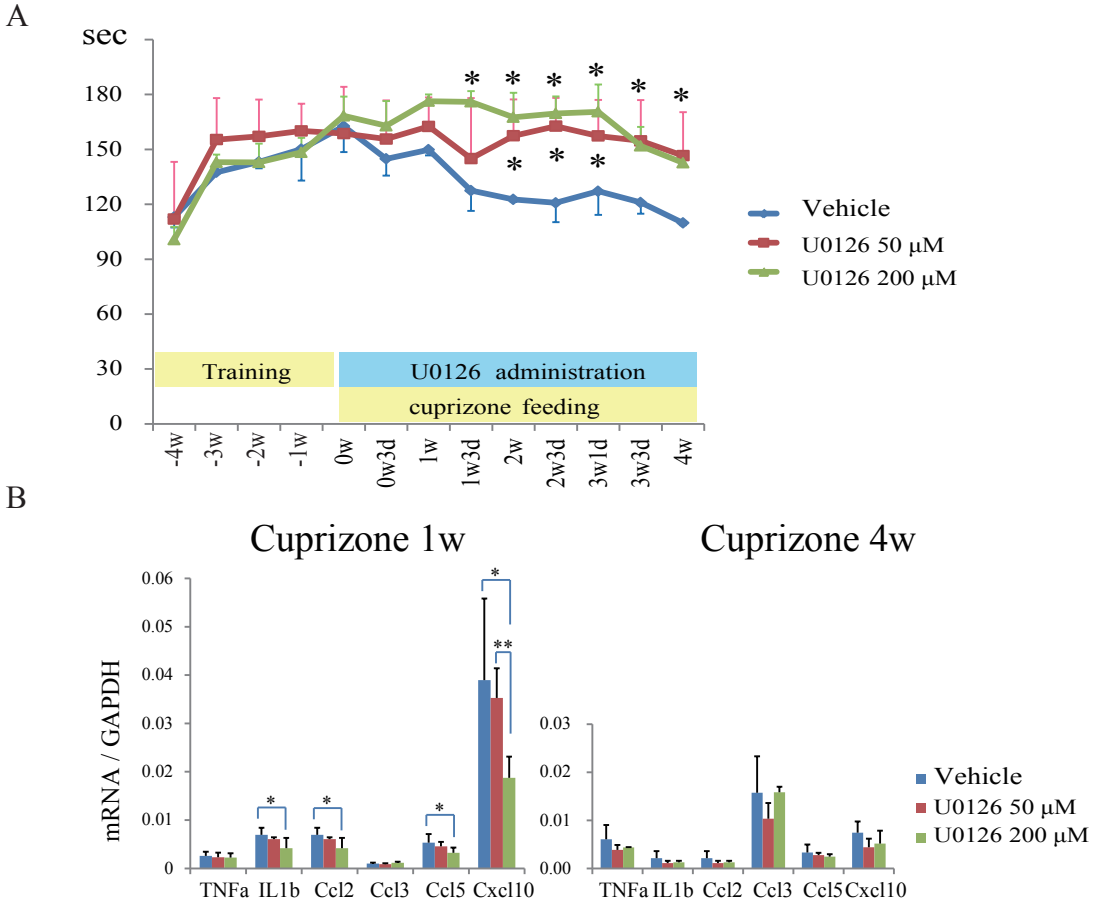


図 2 Mek 阻害薬の脳室内投与による四肢協調運動障害と炎症の軽減

A. Vehicle 群と Mek 阻害薬投与群（低濃度, 50 μ M; 高濃度, 200 μ M）の Rota-rod スコア、4 週までの推移。Vehicle 群では落下までの時間が漸減し投与 10 日以降で有意に減少したが、阻害薬投与群では減少せず、さらに Vehicle 群と比較して阻害薬脳室内投与群で有意な差を認めた N=3, two-way repeated ANOVA の後に Bonferroni 法で検定した。* ; p<0.05。

B. 定量 PCR 法による、脳梁部の炎症関連分子発現。カプリゾン投与後 1、4 週目における脳梁部の炎症関連分子（TNF α 、IL-1 β 、Ccl2、Ccl3、Ccl5、Cxcl10）発現量を定量し、Vehicle 群と Mek 阻害薬投与群で比較した。阻害薬高濃度投与群で投与後 1 週の炎症関連分子発現は、IL1- β 、Ccl-2、Ccl-5、Cxcl-10 が減少していたが、投与後 4 週ではいずれの分子も有意な差を認めなかった。N=3、Student' s t 検定、* ; p<0.05、** ; p<0.01。

標となることから、カプリゾンによって誘導される協調運動障害が、阻害薬により軽減すると考えられた。

カプリゾンによって生じる脱髄の背景には、炎症が関与していると報告されている^[19,25]。そこで、3 群間の炎症について、脳梁から得られたサンプルの定量 RT-PCR 解析を行った。その結果、阻害薬高濃度投与群で投与後 1 週の炎症関連分子発現は、IL1- β 、Ccl-2、Ccl-5、Cxcl-10 が減少していたが、投与後 4 週ではいずれの分子も有意な差を認めなかった(図 2B)。以上の結果から、カプリゾン投与による炎症性脱髄に Erk1/2 シグナルが関与していることが示唆された。

(3) **Erk2 cKO** マウスではニューロンとアストログリアの **Erk2** が欠失し、ミクログリアでは欠失しない

Erk1 と Erk2 はその機能の一部を相互に代償するが、Erk2 には Erk1 によって代償されない特異的な機能がある。そこで、中枢神経の脱髄や炎症における Erk2 の機能を Erk2 cKO マウスを用いて検討した。Erk2 KO マウスは胎生致死であるので、我々は中枢神経特異的な Erk2 の機能解析のため Nestin プロモーター制御下で Cre recombinase を発現する Nestin-Cre^{tg} マウスと、Erk2^{flox/flox} マウスを交配させた Erk2 cKO マウスを用いた^[10](図 3A)。

このマウスに対してカプリゾン投与を行ったところ、脳梁部組織の WB 解析で、Erk2

cKO マウスは、Erk2 発現が著しく減少しておりカプリゾン投与による Erk2 のリン酸化も観察されなかった(図 3B)。さらに免疫組織染色では、カプリゾン投与後の脳梁部における抗リン酸化 Erk1/2 抗体による染色性は、Erk2 の減少に一致して減少していた(図 3C)。

他方、この mutant マウスでは神経幹細胞由来の細胞で Erk2 が欠失すると報告されている^[10]。そこで、Cre レポーターマウス(B6.Cg-Tg (CAG-floxed Neo-EGFP))と Nestin-Cre^{tg} マウスを交配させて得られた成体マウス脳サンプルで GFP が発現する、すなわち Erk2 が欠失する細胞を確認した(図 3D)。その結果、神経幹細胞由来のニューロン(NeuN 陽性)、アストロサイト(GFAP 陽性)で GFP 陽性となった。一方で、ミクログリア/マクロファージ(Iba1 陽性)では GFP 陽性細胞は認められなかった(図 3E)。つまり、今回我々が用いた Erk2 cKO マウスでは、神経幹細胞由来の細胞で Erk2 が欠失するものの、骨髄由来のミクログリアやマクロファージでは Erk2 が欠失していないと考えられた。

以上から、Erk2 cKO マウスでは、カプリゾン投与で誘導される脳梁部での Erk2 の活性が、神経幹細胞由来の細胞特異的に抑制されていることが確認された。

(4) Erk2 cKO ではグリオシスが軽減した

脱髄の過程で Erk の活性化は脳梁部のアストロサイトに優位であったため、Erk2 欠

図 3

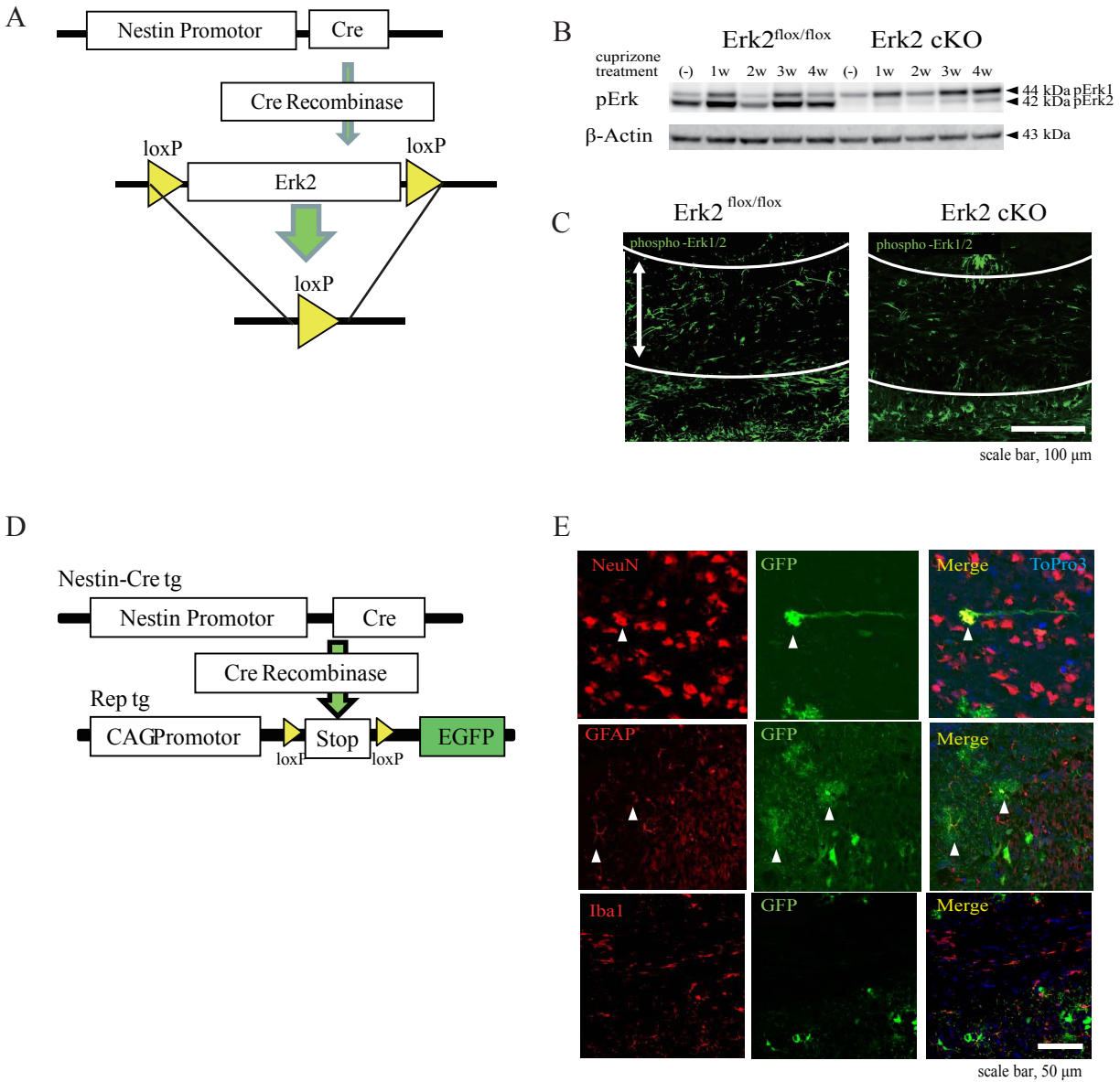


図 3 Erk2 cKO マウス

A. Erk2 cKO マウスでは、Nestin を発現した神経系の細胞で Erk2 が欠失する。

B. WB 法。脳梁部における Erk2 cKO マウスのリン酸化 Erk1/2 発現は欠失している。

C. カプリゾン投与後 3 週、脳梁部の免疫組織染色。Erk2 cKO マウスのリン酸化 Erk1/2

陽性細胞は減少している。矢印は脳梁部。

D. レポーターマウス。Nestin を発現した細胞、即ち Erk2 が欠失している細胞で EGFP が発現する。

E. レポーターマウス、カプリゾン投与後 1 週の免疫組織染色。GFP は NeuN 陽性ニューロンと GFAP 陽性アストロサイト

に発現しているが、Iba1 陽性ミクログリアには発現しない。矢頭は NeuN 陽性 GFP

陽性細胞と GFAP 陽性 GFP 陽性細胞。

損が、脱髄の特徴である脳梁部のグリオースにもたらす影響について検討した。免疫組織染色での抗 GFAP 抗体の染色性は、投与前には Erk2 cKO マウスと Erk2^{flox/flox} マウスに差がないが、グリオースが観察される投与後 4 週では Erk2 cKO マウスは Erk2^{flox/flox} マウスに比べ染色性が減弱していた(図 4A, B)。同様に、抗 Iba1 抗体の染色性も、投与後 4 週では Erk2 cKO マウスは Erk2^{flox/flox} マウスに比べ減弱していた(図 4C, D)。Iba1 陽性細胞の形態については、Erk2 cKO マウスと Erk2^{flox/flox} マウス共に、カプリゾン投与によって樹状マイクログリア (ramified microglia) から活性型の卵形マイクログリア (ovoid microglia) へ形態変化していた。よって、Erk2 cKO マウスではマイクログリアの活性化は起こっているが、その増殖や集積が抑制されていると考えられた。以上より、Erk2 欠失は脱髄部のアストログリオースの軽減と、マイクログリア/マクロファージの集積の抑制をもたらしたと考えられる。

(5) Erk2 cKO では炎症関連分子が減少した

中枢神経の脱髄期では、グリオースと炎症の増悪が同時に進行する^[18]。そこで、脳梁部の炎症を定量 RT-PCR で評価した。まず、コントロールとなる Erk2^{flox/flox} マウスでは炎症性サイトカイン (pro-inflammatory cytokine) TNF α 、IL-1 β や、ケモカイン Ccl-2、Ccl-3、Ccl-5、Cxcl-10 の mRNA 発現がカプリゾン投与後亢進していた。一方、Erk2 cKO マウスでは、TNF α と Ccl-3 は投与後 3 週で、また投与後 4 週ではいずれの分子

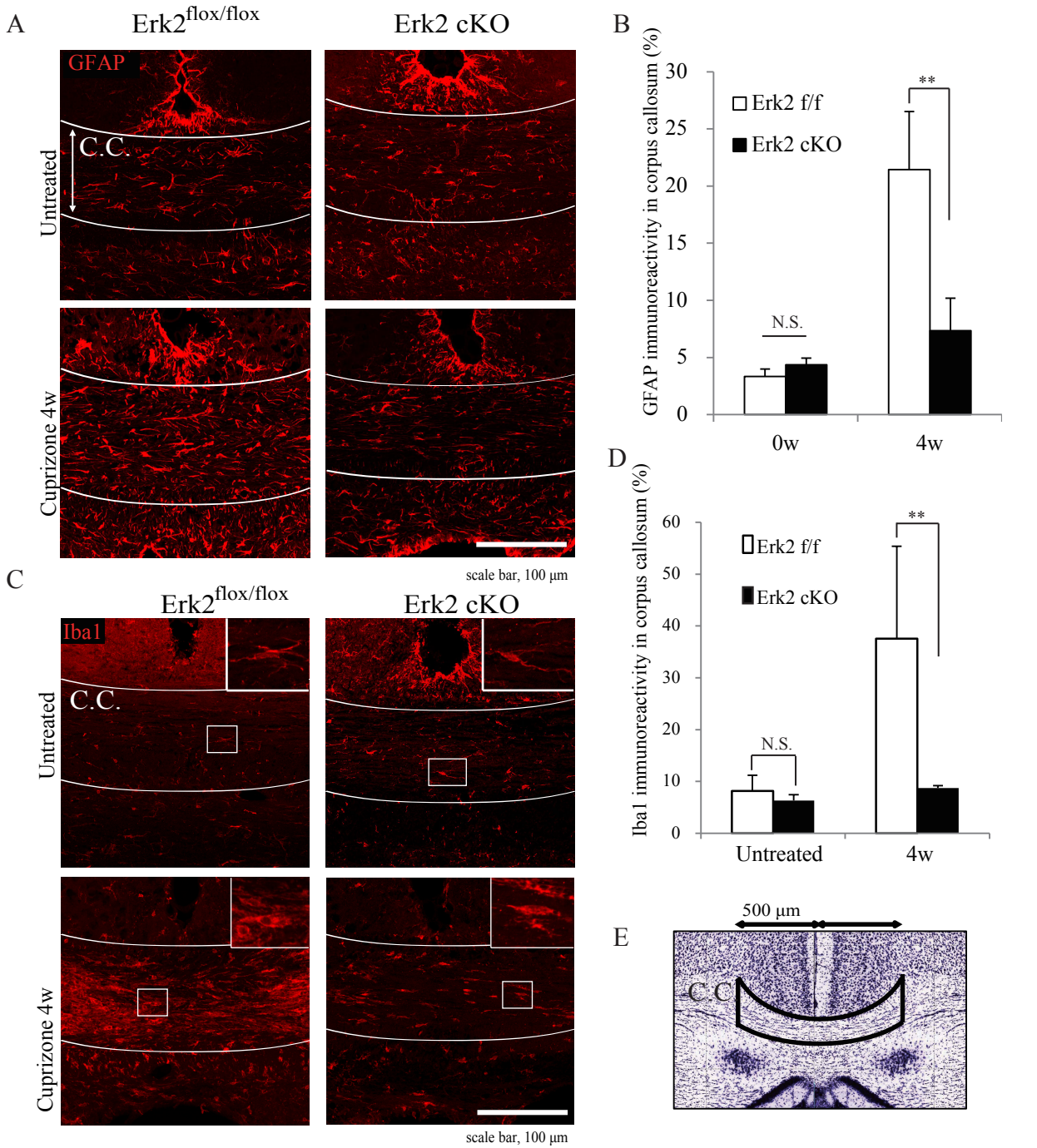


図 4 $Erk2$ cKO マウスではグリオシスが軽減した

A, C 免疫組織染色で、カプリゾン投与前と投与後4週目の脳梁部の GFAP 陽性細胞、Iba1 陽性細胞を $Erk2$ cKO マウスと $Erk2^{flox/flox}$ マウスで比較した。矢印は脳梁、C 右肩は Iba1 陽性細胞強拡大像。B, D 脳梁部における、GFAP と Iba1 の染色性を定量し、 $Erk2$ cKO マウスと $Erk2^{flox/flox}$ マウスで比較した。いずれも 1 週目では有意差なく、4 週目で $Erk2$ cKO マウスが有意に低かった。E 染色性の定量は、Bregma P 1.0 mm の脳梁部、正中から左右 500 μ m の領域で行った。N=3、Student's t 検定、** ; $p < 0.01$ 。C.C., 脳梁。

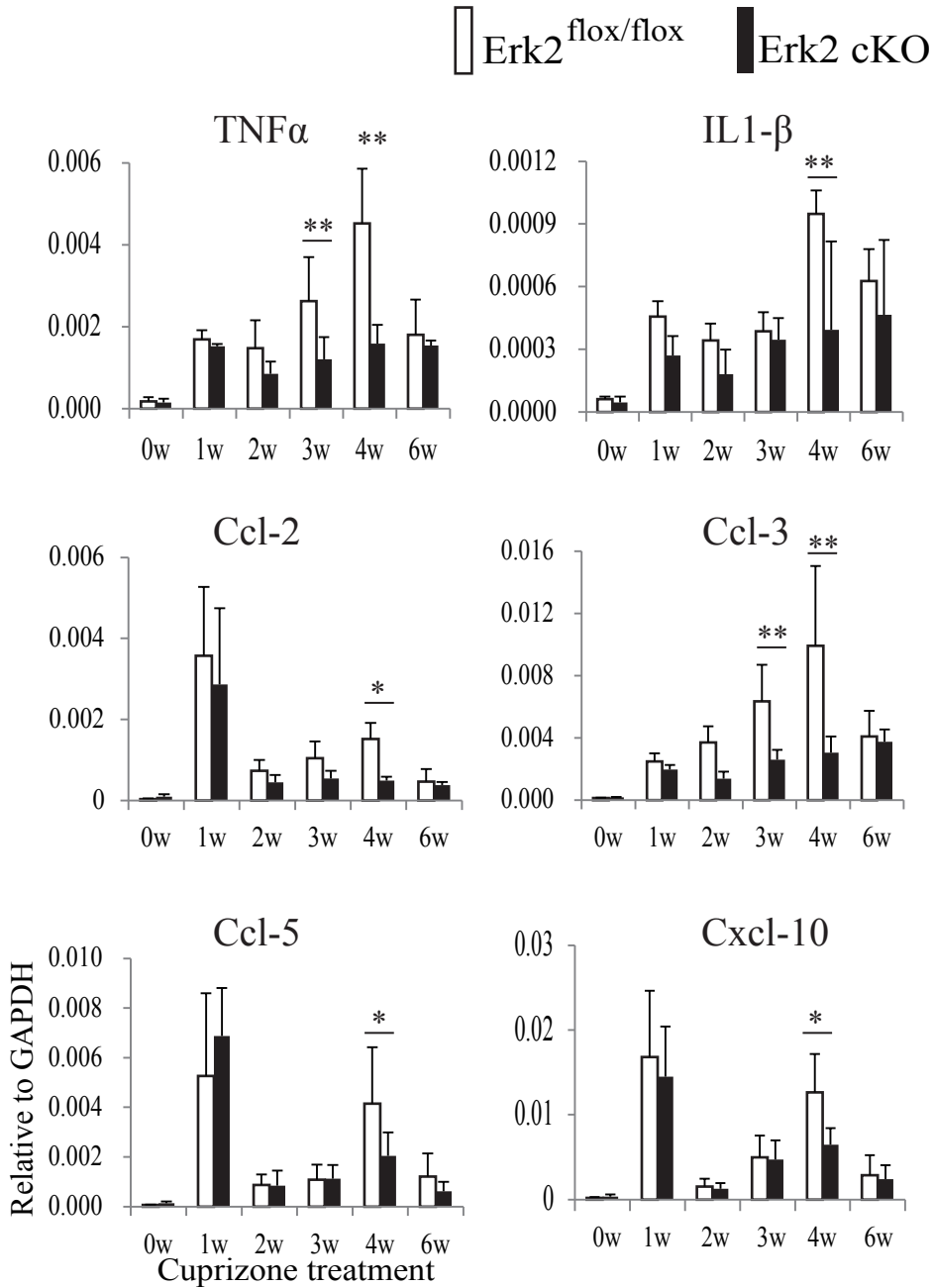


図 5 Erk2 cKO マウスの炎症関連分子発現が減少した

定量 RT-PCR 法で、カプリゾン投与前と投与後 1、2、3、4、6 週目における脳梁部の炎症関連分子 (TNFα、IL-1β、Ccl2、Ccl3、Ccl5、Cxcl10) 発現量を Erk2 cKO マウスと Erk2^{flox/flox} マウスで比較した。Erk2 cKO マウスでは、TNFα と Ccl-3 は 3 週目から、また全ての炎症関連分子発現が 4 週目で有意に低下していた。

N=4、two-way ANOVA の後に Student's t を用いて検定。* ; p<0.05、** ; p<0.01。

も 50%以上の減少がみられた(図 5)。すなわち、Erk2 cKO マウスではグリオーシスの軽減と共に炎症の軽減が観察された。

(6) Erk2 cKO では脱髄が軽度で、運動機能低下が回避された

さらに、こうしたグリオーシスや炎症の変化が脱髄にもたらす影響を LFB 染色で検討した。カプリゾン投与によって脳梁部の LFB 染色性は低下するが、Erk2 cKO マウスは Erk2^{flox/flox} マウスに比べ染色性の低下が軽減しており、脱髄が軽減していることが示唆された(図 6A)。脱髄スコア(実験方法- 4 参照)で評価すると、Erk2 cKO マウスはカプリゾン投与後 4 週から 6 週まで有意に低値を示しており(4w, Erk2^{flox/flox}, 2.83 (2-3); Erk2 cKO, 1.20 (1-2), 図 6B)、Erk2 cKO では脱髄が軽減していた。

脱髄所見の差が神経機能に与える影響をみるため、Rota-rod を用いて四肢協調運動機能を評価した^[24,26,27]。カプリゾン投与開始 2 ~ 3 週前から投与開始時まで訓練を行ったところ Erk2 cKO マウスと Erk2^{flox/flox} マウスには有意差がなかった。カプリゾン投与開始後 Erk2^{flox/flox} マウスの落下までの時間は漸減しカプリゾン投与後 4 週目で 24% 減少(Untreated, 140.1 sec; 4 week, 106.1 sec)し、その後回復傾向を示した。対して、Erk2 cKO マウスでは、カプリゾン投与後 8 週までの観察期間を通して、落下までの時間の有意な減少を認めず(Untreated, 156.5 sec; 4 week, 157.9 sec)、投与後 3 週以降 Erk2^{flox/flox} マウスとの間に有意な差を認めた(図 6C)。以上より、Erk2 欠損により、カプ

図 6-1

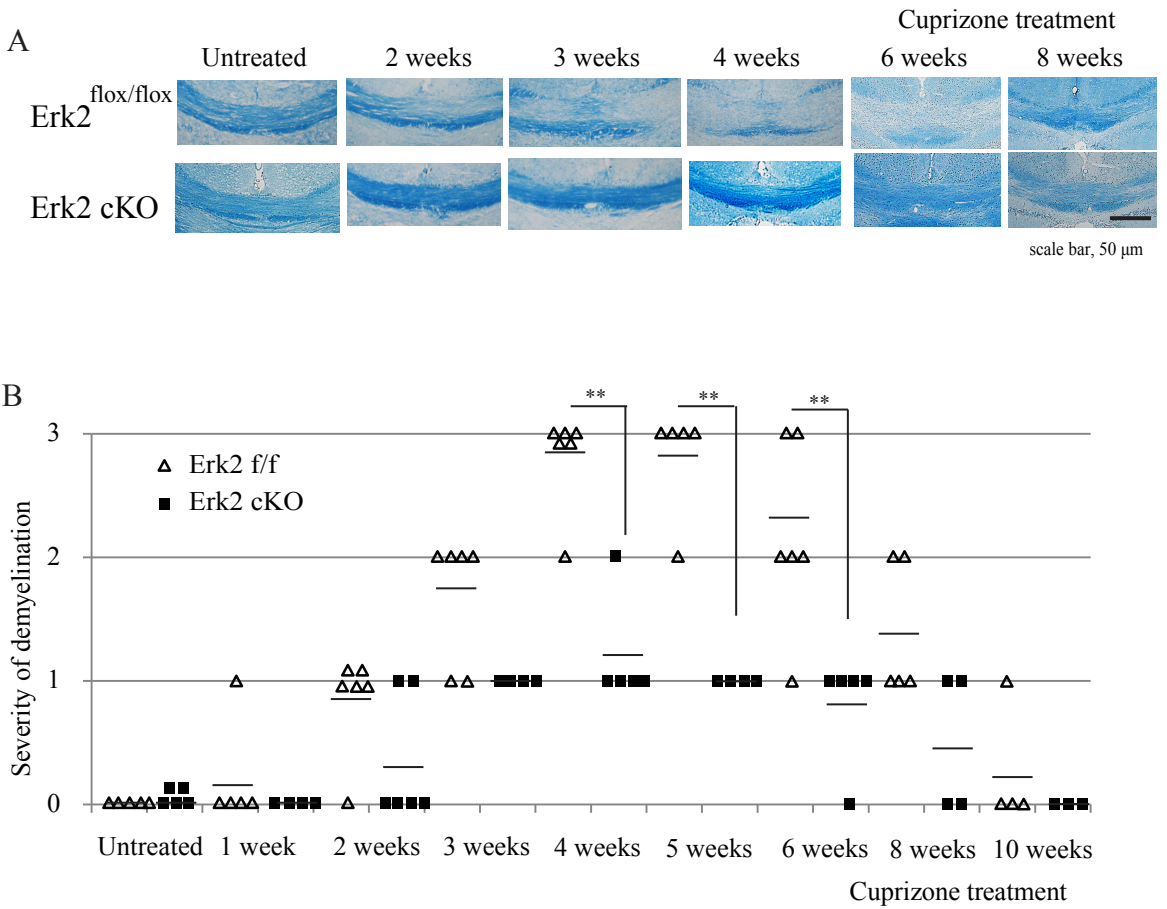


図 6-1 Erk2 cKO マウスでは、脱髄が軽減していた

脳梁部の脱髄を経時的に評価した。カプリゾン含有飼料は最大 6 週間までの投与でその後は通常飼料に戻した。

A. LFB 染色で脱髄を評価した。Erk2 cKO マウスと Erk2^{flox/flox} マウスの代表的組織像を示す。Erk2^{flox/flox} マウスは 2 週から脱髄を認め、4 週から 6 週にかけて最も強い脱髄となる。一方、Erk2 cKO マウスは 4 週から 6 週にかけて脱髄が軽度である。

B. 脱髄スコアリング (スコア 0 (完全なミエリン形成) から 3 (完全な脱髄)) では、Erk2 cKO マウスは Erk2^{flox/flox} マウスに比べ、カプリゾン投与後 4 週から 6 週まで脱髄が有意に軽減していた。N=3 ~ 6、two-way repeated ANOVA の後に Bonferroni 法を用いて検定した。 ** ; p<0.01。

図 6-2

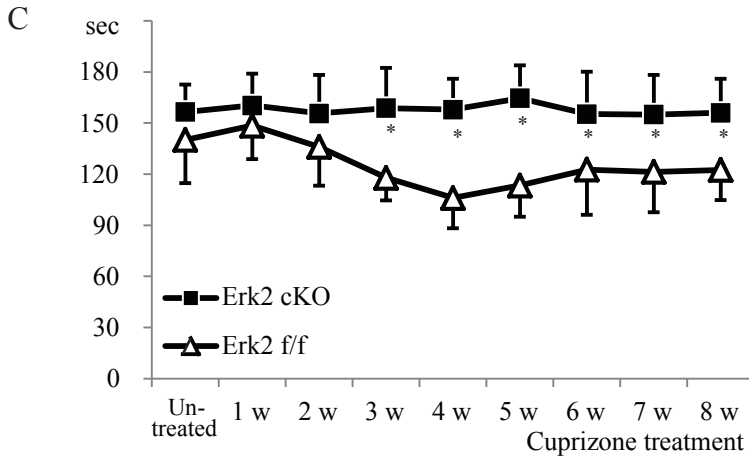


図 6-2 Erk2 cKO マウスは、脱髄による運動機能低下を回避した

C. 四肢協調運動をロータロッドを用いて評価した。カプリゾン投与は最大 6 週目までの投与でその後は通常飼料に戻した。Erk2 cKO マウスは Erk2^{fllox/fllox} マウスに比べ、カプリゾン投与後 3 週から 8 週まで、落下までの時間が有意に長かった。

N=8、two-way repeated ANOVA の後に Bonferroni 法を用いて検定した。

* ; p<0.05

リゾン投与後のグリオシス、炎症、脱髄、が軽減しており、その結果として運動機能低下が回避されていた。

(7) カプリゾン投与後、初期のオリゴデンドロサイト傷害、ミクログリア活性化に

Erk2 は関与していない

脱髄巣における Erk 活性がアストロサイトに優位であることから、Erk2 欠損によるカプリゾン投与後の病的変化軽減のメカニズムにはアストロサイトの Erk2 活性の関与が考えられる。一方で、カプリゾン投与による脱髄では、アストロサイトの活性化に先行して、カプリゾンによる直接的なオリゴデンドロサイト傷害による細胞死、次いで炎症細胞であるミクログリア活性化や、マクロファージ浸潤が起こると報告されている^[13,18]。

そこでこうした初期病態に Erk2 欠損による変化が生じているかを検討した。まず、初期のミクログリア活性の指標として脳梁組織中の Iba1 蛋白量を比較した。カプリゾン投与後初期(1週)においては Erk2 cKO マウスと Erk2^{flox/flox} マウスに有意な差がなく、脱髄極期(4週)においては Erk2 cKO マウスは Erk2^{flox/flox} マウスより Iba1 が増加していた(図 7A, 7B)。さらに、カプリゾン投与初期にはミエリン関連分子の発現が低下し、これがオリゴデンドロサイト細胞傷害を反映すると報告されている^[28]ため、ミエリン関連分子である MBP と MAG の mRNA 発現量を Erk2 cKO マウスと Erk2^{flox/flox} マウスで比較した。MBP と MAG の mRNA 発現はカプリゾン投与後 1 週から 4 週まで減少してい

図 7

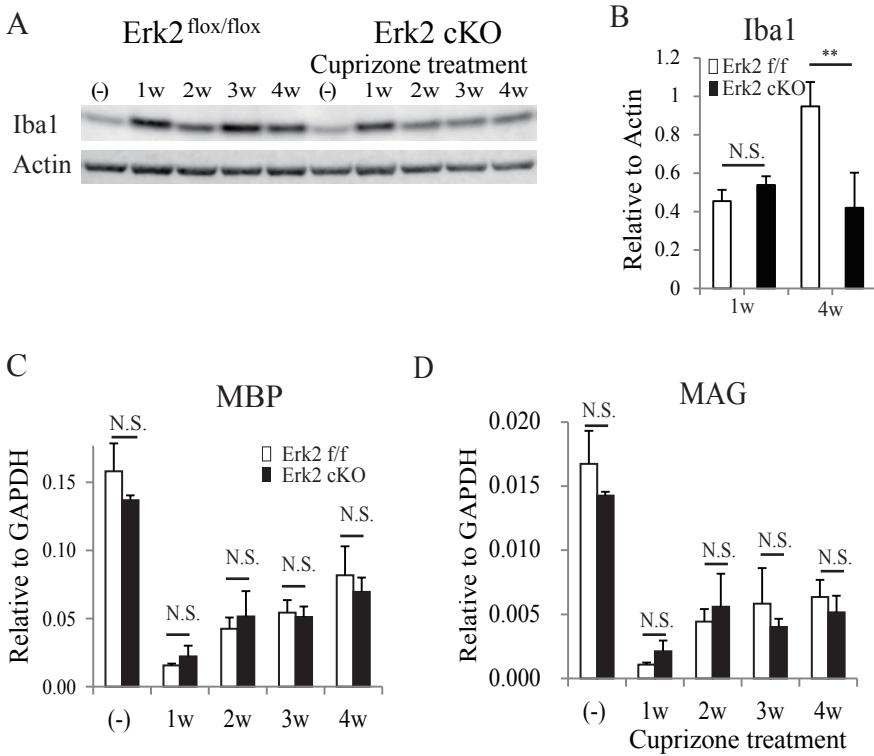


図 7 カプリゾン投与後、Erk2cKO は初期のオリゴデンドロサイト傷害やミクログリア活性化に影響しなかった

A. WB 法でカプリゾン投与前と投与後 1、2、3、4週目における脳梁部の Iba1 発現量を Erk2 cKO マウスと Erk2^{flx/flx} マウスで比較した。N=1。

B. カプリゾン投与後 1 週目と 4 週目の脳梁部 Iba1 発現量。1 週の Iba1 活性に有意差はなかった。N=4、Student's t 検定、** ; p<0.01。

C. 定量 RT-PCR 法で、カプリゾン投与前とカプリゾン投与後 1、2、3、4週目における、MBP と MAG の mRNA 発現を Erk2 cKO マウスと Erk2^{flx/flx} マウスで比較した。1 週目から 4 週目まで有意な差は認められなかった。

N=4、Student's t 検定。

たが、Erk2 cKO マウスと Erk2^{flox/flox} マウスに差がなかった(図 7C, 7D)。これらの結果から、Erk2 cKO マウスでは、カプリゾン投与初期のオリゴデンドロサイトの障害やマイクログリア活性に差がないことが確認された。

(8) アストロサイトは炎症細胞の液性因子により活性化され、炎症関連分子を産生する

一連の in vivo 実験系の結果から、カプリゾン投与後のオリゴデンドロサイト細胞傷害やマイクログリア活性化に続く、二次的なアストロサイト活性化における Erk2 欠損が、炎症関連分子産生減少、グリオシスの軽減、さらには脱髄を軽減させていると考えた。そこで、アストロサイトにおける Erk2 シグナルが炎症環境において炎症関連分子産生に関与しているかを検討するために、単離された培養系での実験を行った。病巣部ではマイクログリアの活性化によって産生される液性因子によってアストロサイトが活性化されている可能性が考えられるため、初代培養から得られたマイクログリアを LPS 投与によって活性化し、調整メディウムを採取し、それを別個に培養したアストロサイトに添加する実験を行った^[29] (図 8-1A, B, C)。

3 時間の血清除去後に調整メディウムを投与することにより、アストロサイトの Erk1/2、p38 MAPK、そして STAT3 のそれぞれのリン酸化および、IkB α の分解が誘導された(図 8-2D)。次いで、炎症関連分子産生における Erk シグナルの関与を検討するため、

Mek 阻害薬と p38 MAPK 阻害薬、さらに NF- κ B 阻害薬を用いた。Erk1/2 リン酸化は Mek 阻害薬 U0126 で抑制される一方、p38 阻害薬や NF- κ B 阻害薬では抑制されなかった(図 8-2E)。さらに、調整メディウム投与後 3 時間の mRNA 発現の解析を行ったところ、アストロサイトにおいて炎症関連分子産生が誘導された。Mek 阻害薬、p38 MAPK 阻害薬、JNK 阻害薬、そして NF- κ B 阻害薬を用いたところ、各阻害薬ともいずれかの炎症関連分子発現が減少したが、Mek 阻害薬では Cxcl-10 を除いた炎症関連分子が濃度依存的、有意に減少した(図 8-3F)。以上より、炎症環境におけるアストロサイトの炎症関連分子産生は、MAPK、なかでも Erk1/2 シグナルを介すると考えられた。

(9) Erk2 cKO マウスのアストロサイトでは Ccl-2 発現が減少し、Erk2 シグナル欠失は細胞増殖に影響しない。

炎症環境におけるアストロサイトの Erk2 欠損による影響を調べるため、Erk2 cKO マウスよりアストロサイトを単離培養した。Erk2 cKO マウスのアストロサイトでは Erk2 が欠失しており、代償的に Erk1 が増加しており、また調整メディウム投与後アストロサイトの Erk2 リン酸化は認めなかった(図.9A, 9B)。調整メディウム処理後 3 時間後、の mRNA 発現を解析したところ、Erk2 cKO マウスのアストロサイトは、TNF α 、IL1- β 、Ccl-3 発現が増加し、減少は Ccl-2 のみであった。(図 9C.)。

図 8-1

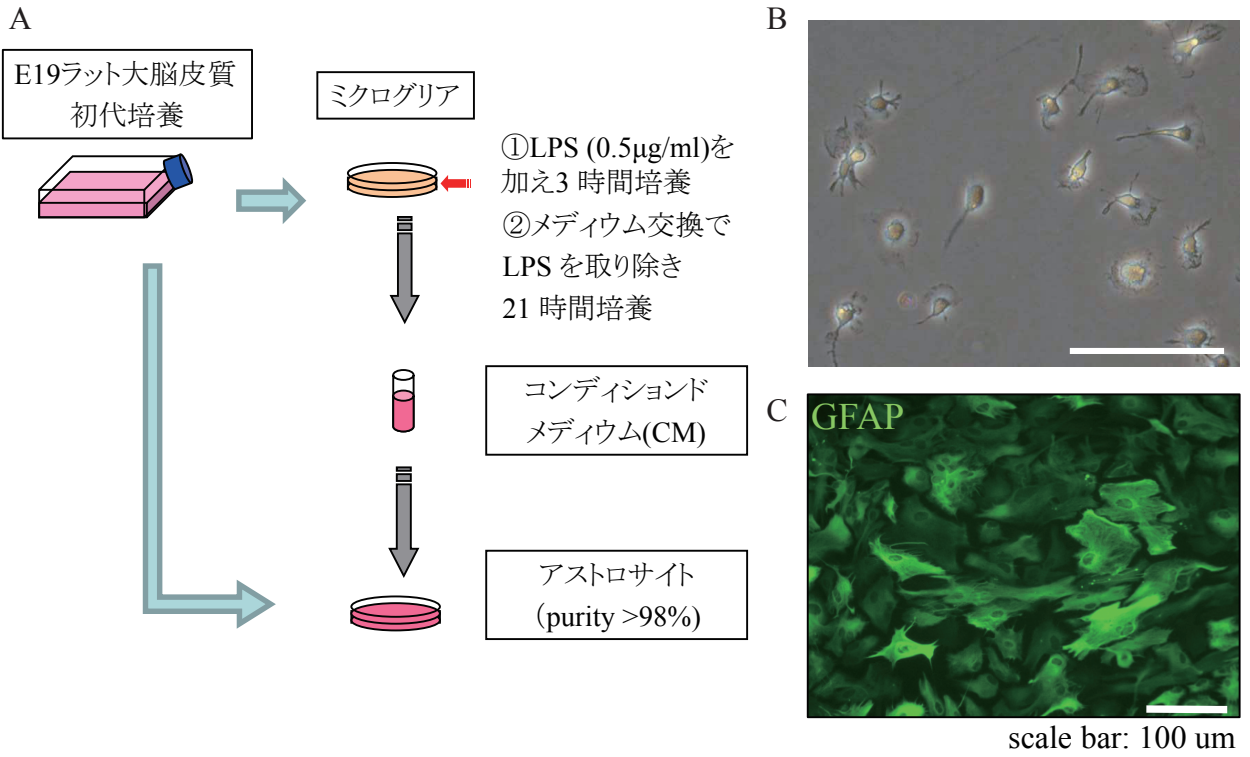


図 8-1 in vitro 実験系

A. in vitro 実験系のシェーマ。胎生 19 日ラット大脳皮質初代培養から、マイクログリア、アストロサイト単離培養を得た。コンディションドメディウムは、マイクログリアに LPS を 3 時間加え、メディウム交換で LPS を除去後 21 時間培養して得た。

B. マイクログリア単離培養の位相差顕微鏡像。振盪した初代培養上清を PDL コートディッシュへ播き 15 分後洗浄し弱接着細胞を除去。98 % Iba1 陽性の単離培養が得られた。

C. アストロサイト単離培養の免疫組織染色。初代培養から Shake Off 法で 3 回継代し 98 % GFAP 陽性のアストロサイト単離培養を得た。

図 8-2

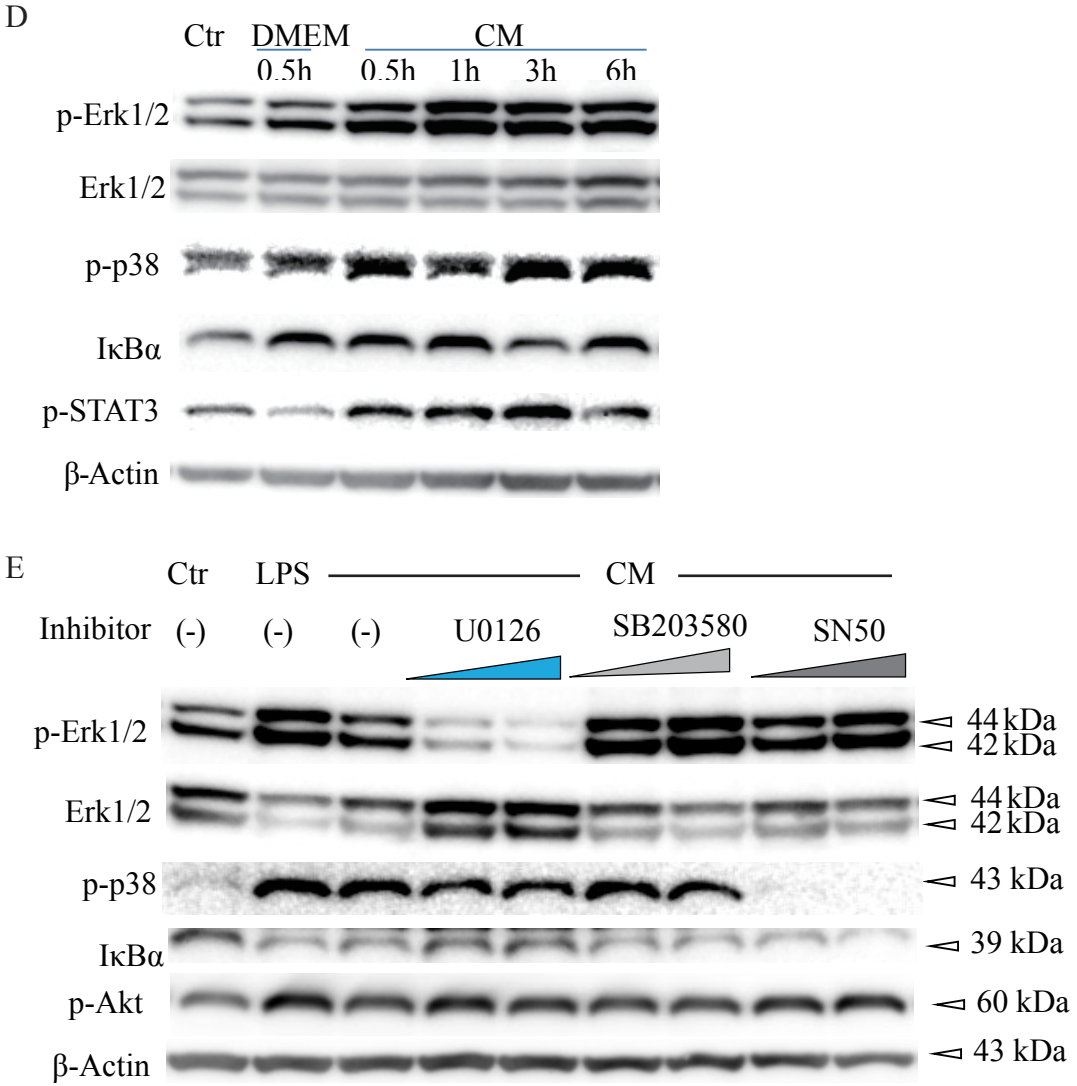


図 8-2 アストロサイトは炎症細胞の液性因子で活性化され、炎症関連分子を産生する

D. ラットのアストロサイト初代培養を調整メディウム（CM）で培養すると、細胞内シグナル分子 p38 MAPK や STAT-3 のリン酸化、IκBαの分解と共に、Erk1/2 のリン酸化を認めた（WB 法）

E. ラットのアストロサイト初代培養に LPS、CM、あるいは CM と各阻害薬を加え 3 時間培養。阻害薬は、Mek 阻害薬 U0126、p38 MAPK 阻害薬 SB203580、NF-κB 阻害薬 SN50 を用いた。Erk1/2 リン酸化は Mek 阻害薬 U0126 で抑制される一方、p38 阻害薬や NF-κB 阻害薬では抑制されなかった。（WB 法）

(p-Erk1/2, phospho-Erk; p-p38, phospho-p38 MAPK; p-STAT3, phospho-STAT3;

Ctrl, Control; CM, conditioned medium)

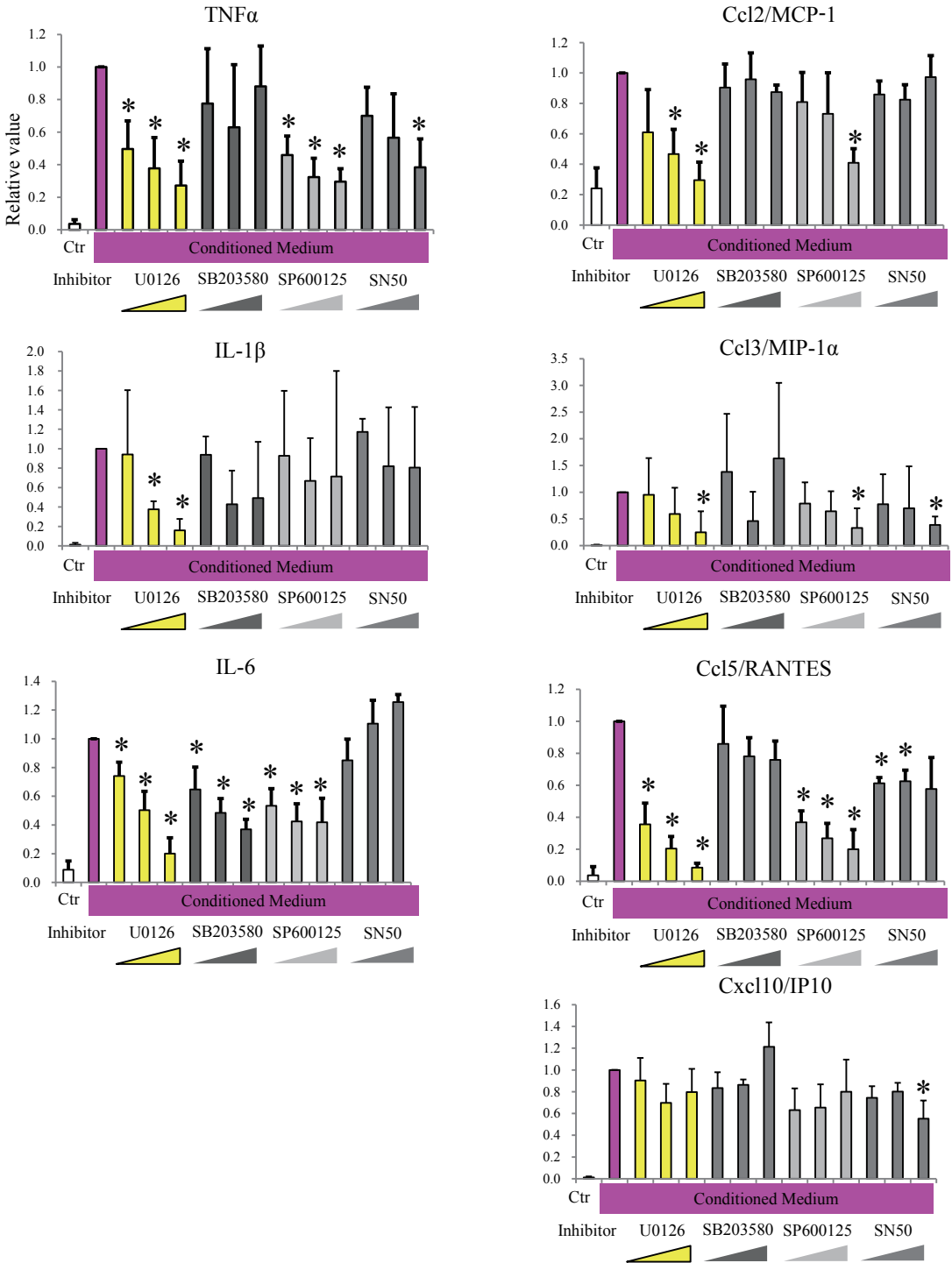


図 8-3 アストロサイトの炎症関連分子産生

F. アストロサイト調整メディウムにより炎症性サイトカイン (TNF α 、IL1 β 、IL-6) やケモカイン (Ccl2、Ccl3、Ccl5、Cxcl10) の mRNA 発現が亢進していた。Mek 阻害薬、p38 MAPK 阻害薬、JNK 阻害薬、NF- κ B 阻害薬を用いた。Cxcl10 以外の発現は Mek 阻害薬で減少していた。(定量 RT-PCR、Student's t 検定、*, p<0.05)

さらに、炎症環境における Erk2 欠損アストロサイトの増殖能を検討するため、BrdU 解析を行った。その結果、調整メディアウム刺激後の BrdU 陽性細胞率には差がなかった(図.9D)。以上より、炎症環境におけるアストロサイトの Erk2 は炎症関連分子産生に関与しているが、すべての炎症関連分子が減少する傾向にはなかった。一方で、増殖には影響していなかった。

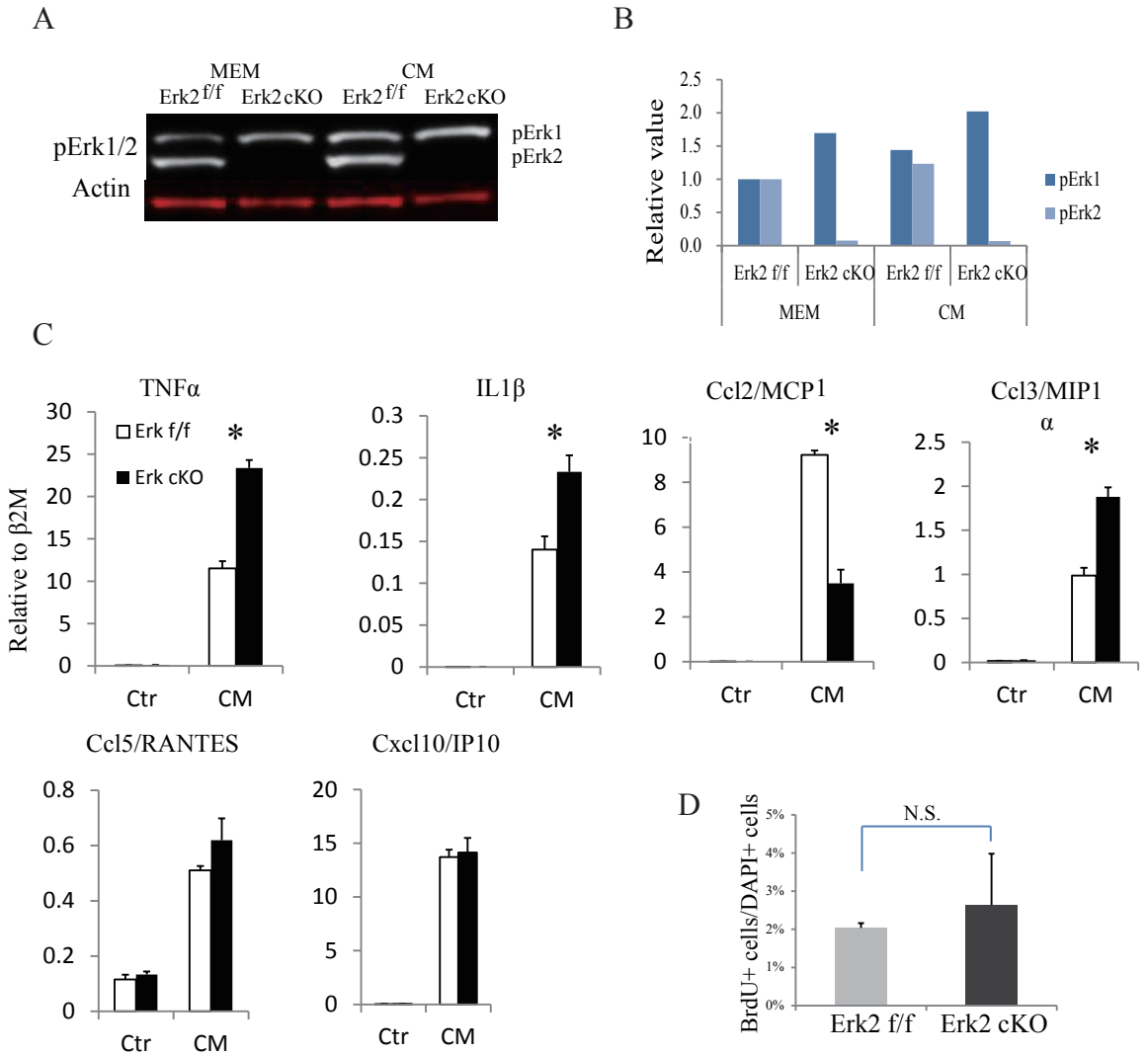


図 9 Erk2 cKO マウスのアストロサイトでは Ccl-2 発現が減少し、増殖には影響しない。

A, B. Erk2 cKO マウスと Erk2^{fllox/fllox} マウスから得られたアストロサイトを、調整メEDIUMで 1 時間培養し、WB 法でリン酸化 Erk を検出した。Erk2 cKO マウスではリン酸化 Erk2 が欠失しており、代償的にリン酸化 Erk1 が増加していた。調整メEDIUMによって Erk リン酸化が亢進していた。

C. 上記のアストロサイトを調整メEDIUMで 3 時間培養し、定量 RT-PCR 法で炎症関連分子発現を検討した。Erk2 cKO マウスでは、TNFα、IL1-β、Ccl-3 発現が増加し、減少は Ccl-2 のみであった。N=4, Student's t 検定, * ; p<0.05. Ctrl, control; CM, conditioned medium.

D. BrdU assay によりアストロサイトの増殖能を検討した。Erk2 cKO マウスのアストロサイトはコントロールに比べ増殖能の差はなかった。N=3, Student's t 検定。

第六章 考察

今回我々は、カプリゾンモデルを用いてErk2の炎症性脱髄過程における機能解析を行った。脳梁部では、(i)投与後1週から4週までErk1/2が活性化し、(ii)組織学的検討ではグリオシスがみられ、(iii)Erk1/2の活性化はアストロサイトに局在しており、(iv)生化学的には炎症関連分子が4週をピークとして発現し、そして(v)脱髄と運動機能低下がみられた。今回用いたErk2^{flox/flox};nestin-cre^{+/+}(Erk2 cKO)マウスでは、これら全てで病的変化が軽減した。炎症環境におけるErk活性化がアストロサイトに局在していたため、今回観察されたErk2 cKOの表現形はアストロサイトのErk2機能を反映していると考えられる。さらに、アストロサイト単離培養によるErk2機能解析では、炎症環境におけるアストロサイトのErk2は増殖とは別個の経路で、炎症関連分子発現を制御していた。

生理的状态で恒常性維持を担うアストロサイトは、炎症環境においては反応性アストロサイトとして働く。その作用は環境に依存し、炎症関連分子産生による有害作用、あるいは成長因子産生による神経保護作用をもたらす^[3]。特にヒトの多発性硬化症では、脱髄巣辺縁のアストロサイトがCcl-2やCxcl-10を産生し、アストロサイト自身の活性化や、ミクログリア/マクロファージの浸潤と活性化を誘導する病態が報告されている^[30]。

多発性硬化症モデルの一つであるカプリゾンモデルの病態は、ミトコンドリア障害によるオリゴデンドロサイト細胞死による一次損傷に続いて、ミクログリアが集積し活性化すると考えられている^[13,18,31]。我々の結果では、first responder である脳常在性ミクログリア (brain-resident microglia) の活性は、投与後 1 週目から増加しており(図 7A)、過去の報告と合致する。活性化したミクログリアから産生される炎症関連分子などの液性因子は、アストロサイト活性化やマクロファージと好中球の浸潤をきたし^[13,31]、その結果炎症が増幅され脱髄や軸索障害が導かれる。

この病態において、アストロサイトの増加は投与後 3 週以降で認められる^[18]。我々の結果から、アストロサイトの Erk2 シグナル欠損マウスは、カプリゾン投与後 1 週において、first responder である brain-resident microglia の増加には影響せず(図 7B)、さらにカプリゾン投与後のオリゴデンドロサイト障害にも影響していなかった(図 7C, 7D)。一方で、Mek 阻害薬脳室内投与は細胞特異的阻害ではないため、カプリゾン投与 1 週における脳梁部の炎症関連分子発現の有意差は、first responder であるミクログリアが阻害薬の影響があると考えられる。次いで、投与後 2 週から 4 週にかけては、脱髄組織中の炎症関連分子 (TNF α , IL-1 β , Ccl-2, Ccl-3, Ccl-5, Cxcl-10) の mRNA 発現が減弱した(図 5)。そして、投与後 4 週の脱髄極期には、アストロサイト活性化やミクログリア/マクロファージ活性が減弱していた(図 4)。その結果、脱髄の軽減(図 6A, B)、運動機能低下回避(図 6C)に至っていた。したがって、この中枢神経の脱髄・炎症モ

デルにおいて反応性アストロサイトはErk2を介してTNF α 、IL1 β 、Ccl-2、Ccl-3、Ccl-5、そしてCxcl-10などの炎症関連分子を産生し、脱髄巣の炎症を増悪し、グリオシス、そして脱髄を進行させる、というモデルが提案される。

中枢神経におけるErk2の機能として、神経幹細胞増殖促進^[32]やオリゴデンドロサイト分化促進^[33]、そしてアストロサイトの細胞外基質産生^[34]という報告がある。我々の実験では、Mek阻害薬の脳室内投与によって炎症関連分子産生が抑制され(図2B)、Erk2 cKOマウスの解析ではアストロサイトのErk2欠損により炎症性サイトカイン産生が抑制された(図5)。これまでも、Erk1/2がアストロサイトの炎症関連分子産生に働くことを示唆する報告は散見され^[5,35]、今回のErk2 cKOマウスによる結果はこれらと合致していた。

in vitroの調整メディアム刺激条件下ではErk2欠損は増殖に影響していないことから、Erk2を介するアストロサイトでの炎症関連分子産生は細胞数増加によるものではなく、転写レベルでの制御であると考えられる(図9D)。一方、in vivoのErk2 cKOマウスではアストロサイトのマーカーであるGFAPの陽性領域が減少しており、アストロサイトの増殖も減弱している可能性が否定できない。(図4A, B)。その原因としてはin vitroの実験系では再現されなかった増殖因子などが実際の病巣には発現しており、これがErk2を介してアストロサイトを介して増殖に影響したとも考えられる。

今回の結果では、Erk2欠損によるアストロサイトの活性低下は、グリオシスを抑制

し(図 4)、同時に脱髄の軽減(図 6A, B)をもたらした。一方で、カプリゾンモデルにおいて、アストロサイトの活性化は組織修復(再髄鞘化)を促進するという報告もある^[36]。つまり、病的状態のアストロサイトの機能は、時間的・空間的条件によって異なる。我々の結果では、炎症初期のミクログリア活性化には差がないにも拘らず(図 7B)、アストロサイトの Erk2 欠損が極期の炎症と組織傷害(脱髄)を著明に抑制した(図 6A, B)。また、活性化アストロサイトはケモカインを産生するだけでなく、ケモカインレセプターの発現が増加し自身のケモカイン感受性が高まっていると報告されている^[30,37]。これらの事実から、グリオシスが組織障害に働く過程では、アストロサイトはミクログリアから始まる炎症反応の増幅器として働いていると考えられる(図 10)。

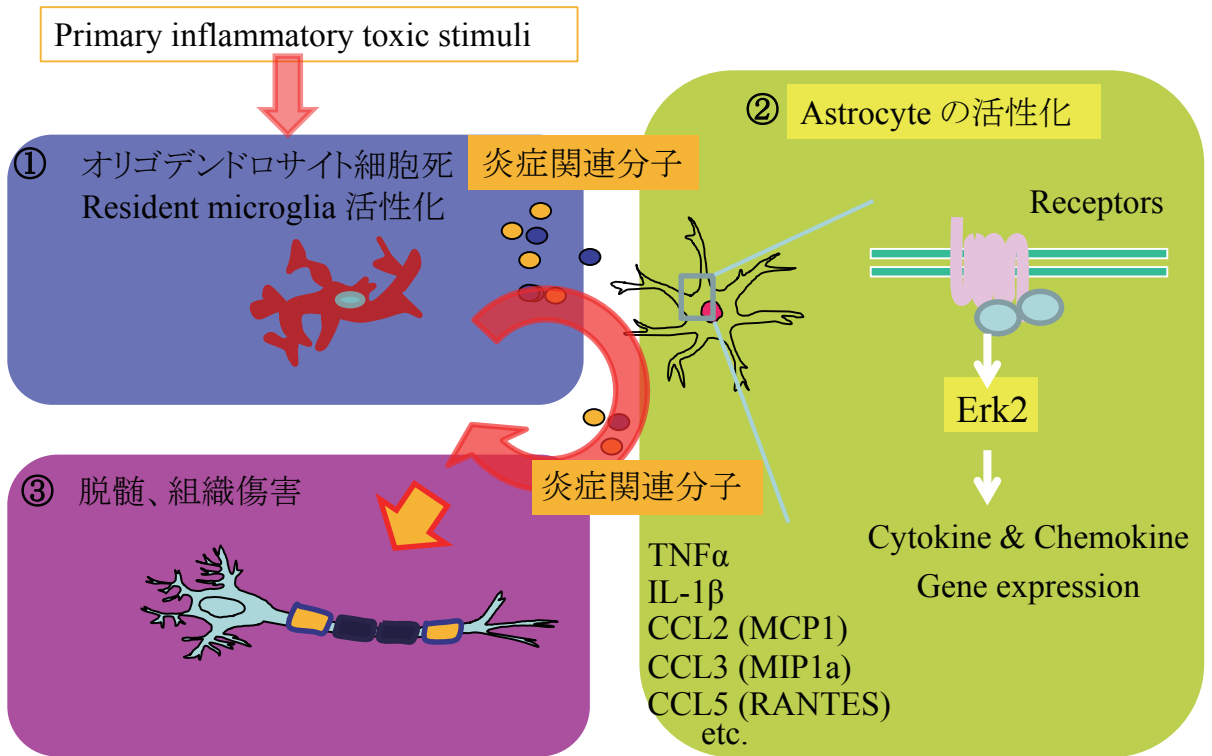
但し、今回用いた Erk2^{fllox/fllox};nestin-cre^{+/+} (Erk2 cKO)マウスでは、胎生期の神経幹細胞で Nestin プロモータが Cre を発現するため、アストロサイトの他にもニューロン、オリゴデンドロサイトでも Erk2 が欠失すると考えられる。それらの影響を除外して、成体の神経炎症モデルにおいてアストロサイト特異的な知見を得るためには、今後 GFAP-CreER を用いた時間・細胞特異的な Erk2 機能解析が求められる。

また今回は、四肢協調運動機能の評価に Rota-rod テストを用いた。カプリゾン投与モデルでは、脳梁以外に脊髄など白質で脱髄が起きている。そのため脳梁の脱髄だけの評価としてではなく、トータルの運動機能の評価する方法として用いた。

炎症とグリオシスは、MS 疾患モデルであるカプリゾンモデルの特徴である。今回

図 10

カプリゾン投与後の脱髄における、アストロサイト Erk2 シグナルの関与



Cuprizone 投与 (Primary inflammatory toxic stimuli) により、直接的なオリゴデンドロサイト細胞死と Resident microglia 活性化が起こる。次いで、炎症関連分子を介してアストロサイトの Erk2 シグナルが活性化、炎症関連分子発現が亢進し脱髄や組織傷害に至る機序が想定される。Erk2 cKO マウスでは初期のミクログリア活性化に差がないため、アストロサイトがこの反応を増幅させていると考えられる。

の結果は、グリオースの軽減とともに、炎症性サイトカインやケモカインの減少が起っていた。カプリゾンモデルにおける個々の炎症関連分子の機能については、TNF α 欠損^[19]、アストロサイト LT- α cKO マウス、LT- β KO マウス^[20,25]、さらに MIP1- α KO マウスで脱髄が遅延する^[38]との報告がある。その反面、IL1 β KO マウスでは脱髄に影響がない^[39]。また、炎症環境で発現している reactive oxidative species (ROS) に関しては、iNOS KO マウスでは脱髄はわずかに悪化し^[40]、nNOS KO マウスでは脱髄が軽減するという報告がある^[41]。これらの報告から、一つの炎症関連分子の抑制では脱髄の遅延が起きても、脱髄が軽症とはなり難いことが示唆される。一方、今回は細胞内シグナル Erk2 のアストロサイトにおける欠失が、炎症関連分子減少、グリオース抑制、そして脱髄の抑制を来たすことを示した。加えて、細胞内シグナルに関して、アストロサイト特異的 IKK β DN マウスでは炎症関連分子発現の減少とともに脱髄が軽減したと報告されている^[7]。従って、細胞内シグナル分子の機能抑制は他のシグナルで代償され難く、組織レベルの炎症過程に対してより大きな影響をもつと考えられる。

今回の結果はグリオースを病態の主体とする疾患への分子標的治療の可能性を示唆している。但し、T-cell を介した獲得免疫が関与しないカプリゾンモデルをヒトに適用してよいかについては慎重になるべきである。そういった制限はあるものの、アストロサイトが炎症の首座となっている病態では、治療のターゲットである。その一例として、ヒトの二次性進行性多発性硬化症 (secondary progressive MS) ではグリオースと病

態の増悪が同時に起こっているとの報告があり^[30]、この病態ではアストロサイトの Erk2 シグナルがグリオシスを制御しているかもしれない。siRNA による分子標的治療は MS を含め多くの中枢神経疾患の治療として検討されていることから、siErk2 は Erk2 を標的とした多発性硬化症をはじめとする中枢神経炎症疾患の治療戦略として今後検討されうる方法である。

第七章 結語

アストロサイトの Erk2 シグナルが、中枢神経の炎症、グリオシス、そして脱髄に至る病態において重要な役割を果たすこと示した。ヒトの二次性進行性多発性硬化症ではグリオシスと病態の増悪が同時に起こっているとの報告もあり、こうした病態ではアストロサイトの Erk2 シグナルがグリオシスを制御しているかもしれない。今回の結果は、多発性硬化症などのグリオシスを病態の主体とする疾患への分子標的治療の可能性を示唆している。今後 Erk2 を標的とした中枢神経炎症疾患の治療戦略として siErk2 投与などが検討されうる方法として挙げられる。

第八章 謝辞

本論文の作成に当たり次の先生方に感謝いたします。

基礎研究を始める機会を与えてくださった東京大学整形外科学教室 中村耕三前教授に深く感謝いたします。また、ご指導・ご鞭撻をいただいた東京大学整形外科学教室 田中栄教授に深く感謝いたします。そして本研究の立案・遂行にあたりきめ細かくも根気強く実験にたいするご指導・ご鞭撻をいただいた国立障害者リハビリテーションセンター運動機能系障害研究部部長 緒方徹先生に心より感謝いたします。研究室にて貴重なアドバイスをいただいた東邦大学生理学(細胞生理学)教室講師 浜之上誠先生、実験を一から丁寧に教えていただいた上野高明先生、森岡和仁先生、同僚の早川謙太郎先生、実験を手伝っていただいた実験助手の岩間さんに心より感謝いたします。

第九章 参考文献

1. Raine, C.S. The Norton Lecture: a review of the oligodendrocyte in the multiple sclerosis lesion. *Journal of Neuroimmunology* **77**(1997).
2. Lucchinetti, C., Brück, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Moses Rodriguez & Lassmann, H. Heterogeneity of Multiple Sclerosis Lesions: Implications for the Pathogenesis of Demyelination. *Annals of Neurology* **47**(2000).
3. Williams, A., Piaton, G. & Lubetzki, C. Astrocytes-Friends or foes in multiple sclerosis? *Glia* **55**, 1300-1312 (2007).
4. Norton, W.T., Aquino, D.A., Hozumi, I., Chiu, F.-C. & Brosnan, C.F. Quantitative Aspects of Reactive Gliosis: A Review. *Neurochemical Research* **17**, 877-895 (1992).
5. Pedrazzi, M., Patrone, M., Passalacqua, M., Ranzato, E., Colamassaro, D., Sparatore, B., Pontremoli, S. & Melloni, E. Selective Proinflammatory Activation of Astrocytes by High-Mobility Group Box 1 Protein Signaling. *The Journal of Immunology* **179**, 8525-8232 (2007).
6. Lee, S.J., Drabik, K., Wagoner, N.J.V., Lee, S., Choi, C., Dong, Y. & Benveniste, E.N. ICAM-1-Induced Expression of Proinflammatory Cytokines in Astrocytes: Involvement of Extracellular Signal-Regulated Kinase and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways. *The Journal of Immunology* **165**, 4658-4666 (2000).
7. Raasch, J., Zeller, N., van Loo, G., Merkler, D., Mildner, A., Erny, D., Knobloch, K.P., Bethea, J.R., Waisman, A., Knust, M., Del Turco, D., Deller, T., Blank, T., Priller, J., Bruck, W., Pasparakis, M. & Prinz, M. I kappa B kinase 2 determines oligodendrocyte loss by non-cell-autonomous activation of NF- kappa B in the central nervous system. *Brain* **134**, 1184-1198 (2011).
8. Ballif, B.A. & Blenis, J. Molecular Mechanisms Mediating Mammalian Mitogenactivated Protein Kinase (MAPK) Kinase (MEK)-MAPK Cell Survival Signals. *Cell Growth & Differentiation* **12**, 397-408 (2001).
9. Boulton, T.G., Nye, S.H., Robbins, D.J., Ip, N.Y., Radziejewska, E., Morgenbesser, S.D., DePinho, R.A., Panayotatos, N., Cobb, M.H. & Yancopoulos, G.D. ERKs: A Family of Protein-Serine/Threonine Kinases That Are Activated and Tyrosine Phosphorylated in Response to Insulin and NGF. *Cell* **65**, 663-675 (1991).
10. Satoh, Y., Endo, S., Nakata, T., Kobayashi, Y., Yamada, K., Ikeda, T., Takeuchi,

- A., Hiramoto, T., Watanabe, Y. & Kazama, T. ERK2 Contributes to the Control of Social Behaviors in Mice. *The Journal of Neuroscience* **31**, 11953–11967 (2011).
11. Katayama, T., Sakaguchi, E., Komatsu, Y., Oguma, T., Uehara, T. & Minami, M. Sustained activation of ERK signaling in astrocytes is critical for neuronal injury-induced monocyte chemoattractant protein-1 production in rat corticostriatal slice cultures. *European Journal of Neuroscience* **31**, 1359-1367 (2010).
 12. Imamura, O., Satoh, Y., Endo, S. & Takishima, K. Analysis of Extracellular Signal-Regulated Kinase 2 Function in Neural Stem/Progenitor Cells via Nervous System-Specific Gene Disruption. *Stem Cells* **26**, 3247-3256 (2008).
 13. Matsushima, G.K. & Morell, P. The Neurotoxicant, Cuprizone, as a Model to Study Demyelination and Remyelination in the Central Nervous System. *Brain Pathology* **11**, 107-116 (2001).
 14. Isaka, F., Ishibashi, M., Taki, W., Hashimoto, N., Nakanishi, S. & Kageyama, R. Ectopic expression of the bHLH gene *Math1* disturbs neural development. *European Journal of Neuroscience* **11**, 2582-2588 (1999).
 15. Suzuki, K. Giant Hepatic Mitochondria: Production in Mice Fed with Cuprizone. *Science* **163**(1969).
 16. Blakemore, W.F. Observations on oligodendrocyte degeneration, the resolution of status spongiosus and remyelination in cuprizone intoxication in mice. *Journal of Neurocytology* **1**, 413-426 (1972).
 17. Kondo, A., Nakano, T. & Suzuki, K. Blood-brain barrier permeability to horseradish peroxidase in twitcher and cuprizone-intoxicated mice. *Brain Research* **425**, 186-190 (1987).
 18. Hiremath, M.M., Saito, Y., Knapp, G.W., Ting, J.P.-Y., Suzuki, K. & Matsushima, G.K. Microglial / macrophage accumulation during cuprizone-induced demyelination in C57BL /6 mice. *Journal of Neuroimmunology* **92**, 38-49 (1998).
 19. Arnett, H.A., Mason, J., Marino, M., Suzuki, K., Matsushima, G.K. & Ting, J.P.Y. TNF α promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nature Neuroscience* **4**, 1116-1122 (2001).
 20. Plant, S.R., Iocca, H.A., Wang, Y., Thrash, J.C., O'Connor, B.P., Arnett, H.A., Fu, Y.X., Carson, M.J. & Ting, J.P.Y. Lymphotoxin Receptor (Lt R): Dual Roles in Demyelination and Remyelination and Successful Therapeutic Intervention Using Lt R-Ig Protein. *Journal of Neuroscience* **27**, 7429-7437 (2007).
 21. Röhl, C. & Sievers, J. Microglia is activated by astrocytes in trimethyltin

- intoxication. *Toxicol Appl Pharmacol* **204**, 36-45 (2005).
22. Röhl, C., Armbrust, E., Kolbe, K., Lucius, R., Maser, E., Venz, S. & Gülden, M. Activated microglia modulate astroglial enzymes involved in oxidative and inflammatory stress and increase the resistance of astrocytes to oxidative stress in vitro. *Glia* **56**, 1114-1126 (2008).
 23. Mildner, A., Schmidt, H., Nitsche, M., Merkler, D., Hanisch, U.-K., Mack, M., Heikenwalder, M., Brück, W., Priller, J. & Prinz, M. Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions. *Nature Neuroscience* **10**, 1544-1553 (2007).
 24. Harsan, L.A., Steibel, J., Zaremba, A., Agin, A., Sapin, R., Poulet, P., Guignard, B., Parizel, N., Grucker, D., Boehm, N., Miller, R.H. & Ghandour, M.S. Recovery from Chronic Demyelination by Thyroid Hormone Therapy: Myelinogenesis Induction and Assessment by Diffusion Tensor Magnetic Resonance Imaging. *Journal of Neuroscience* **28**, 14189-14201 (2008).
 25. Plant, S.R., Arnett, H.A. & Ting, J.P. Astroglial-derived lymphotoxin-alpha exacerbates inflammation and demyelination, but not remyelination. *Glia* **49**, 1-14 (2005).
 26. Golub, M.S., Germann, S.L. & Lloyd, K.C. Behavioral characteristics of a nervous system-specific erbB4 knock-out mouse. *Behav Brain Res* **153**, 159-170 (2004).
 27. Franco-Pons, N., Torrente, M., Colomina, M.T. & Vilella, E. Behavioral deficits in the cuprizone-induced murine model of demyelination/remyelination. *Toxicology Letters* **169**, 205-213 (2007).
 28. Morell, P., Barrett, C.V., Mason, J.L., Toews, A.D., Hostettler, J.D., Knapp, G.W. & Matsushima, G.K. Gene Expression in Brain during Cuprizone-Induced Demyelination and Remyelination. *Molecular and Cellular Neuroscience* **12**, 220-227 (1998).
 29. Röhl, C., Armbrust, E., Herbst, E., Jess, A., Gülden, M., Maser, E., Rimbach, G. & Bösch-Saadatmandi, C. Mechanisms Involved in the Modulation of Astroglial Resistance to Oxidative Stress Induced by Activated Microglia: Antioxidative Systems, Peroxide Elimination, Radical Generation, Lipid Peroxidation. *Neurotoxicity Research* **17**, 317-331 (2010).
 30. Tanuma, N., Sakuma, H., Sasaki, A. & Matsumoto, Y. Chemokine expression by astrocytes plays a role in microglia/macrophage activation and subsequent neurodegeneration in secondary progressive multiple sclerosis. *Acta neuropathologica* **112**, 195-204 (2006).
 31. Liu, L., Belkadi, A., Darnall, L., Hu, T., Drescher, C., Cotleur, A.C.,

- Padovani-Claudio, D., He, T., Choi, K., Lane, T.E., Miller, R.H. & Ransohoff, R.M. CXCR2-positive neutrophils are essential for cuprizone-induced demyelination: relevance to multiple sclerosis. *Nature Neuroscience* **13**, 319-326 (2010).
32. Samuels, I.S., Karlo, J.C., Faruzzi, A.N., Sweatt, D., Saitta, S.C. & Landreth, G.E. Deletion of ERK2 Mitogen-Activated Protein Kinase Identifies Its Key Roles in Cortical Neurogenesis and Cognitive Function. *The Journal of Neuroscience* **28**, 6983-6995 (2008).
33. Fyffe-Maricich, S.L., Karlo, J.C., Landreth, G.E. & Miller, R.H. The ERK2 Mitogen-Activated Protein Kinase Regulates the Timing of Oligodendrocyte Differentiation. *The Journal of Neuroscience* **31**, 843-850 (2011).
34. Heffron, D.S., Landreth, G.E., Samuels, I.S. & Mandell, J.W. Brain-Specific Deletion of Extracellular Signal-Regulated Kinase 2 Mitogen-Activated Protein Kinase Leads to Aberrant Cortical Collagen Deposition. *The American Journal of Pathology* **175**, 2586-2599 (2009).
35. Panenka, W., Jijon, H., Herx, L.M., Armstrong, J.N., Feighan, D., Wei, T., Yong, V.W., Ransohoff, R.M. & MacVicar, B.A. P2X7-Like Receptor Activation in Astrocytes Increases Chemokine Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression via Mitogen-Activated Protein Kinase. *The Journal of Neuroscience* **21**, 7135-7142 (2001).
36. Albrecht, P.J., Murtie, J.C., Ness, J.K., Redwine, J.M., Enterline, J.R., Armstrong, R.C. & Levisona, S.W. Astrocytes produce CNTF during the remyelination phase of viral-induced spinal cord demyelination to stimulate FGF-2 production. *Neurobiology of Disease* **13**, 89-101 (2003).
37. Tran, P.B. & J.Miller, R. Chemokine receptors: signposts to brain development and disease. *Nat Rev Neurosci* **4**, 444-455 (2003).
38. McMahon, E.J., Cook, D.N., Suzuki, K. & Matsushima, G.K. Absence of Macrophage-Inflammatory Protein-1 Delays Central Nervous System Demyelination in the Presence of an Intact Blood-Brain Barrier. *The Journal of Immunology* **167**, 2964-2971 (2001).
39. Mason, J.L., Suzuki, K., Chaplin, D.D. & Matsushima, G.K. Interleukin-1 beta Promotes Repair of the CNS. *The Journal of Neuroscience* **21**, 7046-7052 (2001).
40. Arnett, H.A., Hellendall, R.P., Matsushima, G.K., Suzuki, K., Laubach, V.E., Sherman, P. & Ting, J.P.-Y. The Protective Role of Nitric Oxide in a Neurotoxicant-Induced Demyelinating Model. *The Journal of Immunology* **168**, 427 (2002).

41. Linares, D., Taconis, M., Mana, P., Correcha, M., Fordham, S., Staykova, M. & Willenborg, D.O. Neuronal Nitric Oxide Synthase Plays a Key Role in CNS Demyelination. *Journal of Neuroscience* **26**, 12672-12681 (2006).