

論文の内容の要旨

論文題目 低温の、低酸素虚血負荷からのオリゴデンドロサイト保護効果 —細胞死抑制
とニューロンとの接触能維持—

氏名 市瀬（鈴木） 茉里

脳室周囲白質軟化症は、在胎 28 から 32 週の早産児に好発し、脳性麻痺の原因となる脳障害である。新生児医療の進歩により極低出生体重児の生存率は改善しているが、それに伴い、慢性的な神経障害をかかえる早産で出生した児の数は増えている。この時期の脳室周囲白質には、オリゴデンドロサイトの分化過程の中で特に低酸素虚血負荷に脆弱である、髄鞘形成前オリゴデンドロサイト (premyelinating oligodendrocytes; pre-OLs) が豊富に存在し細胞死に至るために、選択的に障害を受ける。また、慢性期の病巣では、未分化なオリゴデンドロサイト前駆細胞は増殖しているものの、分化障害が起き、髄鞘形成不全に陥ると報告されている。脳低温療法は、正期産児の低酸素虚血性脳症に対しては標準的治療となっているが、早産児へは、安全性と有効性が確立されていないために適応となっていない。脳室周囲白質軟化症の動物モデルにおいて低温の有効性を示唆する報告はあるものの、低温は早産児の全身的な合併症を惹起する可能性があり、低温の低酸素虚血負荷からのオリゴデンドロサイト保護効果について、より詳細な機序を明らかにし、低温の作用機序を応用した分子標的治療の開発へ繋げる必要がある。そこで我々は、*in vivo*、*in vitro* 実験系で低酸素虚血負荷をかけ、低温による pre-OLs の細胞死抑制効果と、オリゴデンドロサイト髄鞘化能維持効果について検討を行った。成熟したオリゴデンドロサイトに発現し髄鞘化に必須の蛋白である myelin basic protein (MBP) の mRNA 及び蛋白レベルでの発現を解析し髄鞘化能について評価した。MBP 遺伝子は、exon 1 から 7 のスプライシング

バリエーションにより、14、17、18.5、21.5kDa の四つのアイソフォームを持つことが知られている。また、MBP のリン酸化は、髄鞘構造の安定化、タンパク融解からの保護、ニューロンとの共培養においてリン脂質二重層との接触に、重要であることが報告されている。MBP は幾つかの蛋白リン酸化酵素による影響を受けるが、その中でも extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2) は、オリゴデンドロサイトの増殖、生存、分化において特に重要であることが知られており、低温による保護効果における関与について検討した。

In vivo では、日齢 6 の仔ラットを、全身麻酔下に左総頸動脈を結紮し、6%酸素環境下に 1 時間、直腸温が常温 ($36 \pm 1^\circ\text{C}$) あるいは低温 ($32 \pm 1^\circ\text{C}$) になるように置いた。母獣の元に戻し日齢 7 に仔ラットの大脳を摘出し、TUNEL 染色により細胞死について評価した。常温群では頸動脈結紮側で TUNEL 陽性細胞が増加していたが、低温群では有意に抑制されていた。日齢 11 に行った免疫組織学染色では、頸動脈結紮側の脳室周囲白質で、常温群では MBP とリン酸化 ERK1/2 の発現が低下していたが、低温群では維持されていた。日齢 14 に行ったウェスタンブロットでは、14、21.5、特に 17kDa リン酸化 MBP が常温群の頸動脈結紮側で減少し、低温により有意に維持されていた。

In vitro では、妊娠 18 日目のラットより、全身麻酔下で胎児大脳半球を摘出し、pre-OLs 初代培養系を作成した。ここに低酸素無糖負荷 (oxygen glucose deprivation; OGD) を 6 時間、常温 (37°C) あるいは低温 (31.5°C) のインキュベーター内でかけた。OGD 負荷から解放し常温に戻し 24 時間後には、常温下で OGD 負荷をかけた場合、TUNEL 陽性細胞、cleaved caspase3 陽性細胞が増加しており、低温下では有意に抑制されていた。また、OGD 負荷の直前に MEK 阻害剤の U0126 を添加し、ERK1/2 リン酸化を抑制すると、低温のアポトーシス抑制効果は減弱した。さらにオリゴデンドロサイトの髄鞘化能についても検討を行うために、日齢 1 から 3 の仔ラットより脊髄後根神経節ニューロン (dorsal root ganglion neurons; DRG neurons) を単離し、OGD 負荷直後の pre-OLs 培養系に添加して

共培養を行った。OGD 負荷をかけないオリゴデンドロサイトでは、DRG ニューロンとの 2 日間の共培養により、MBP を細胞突起末端まで発現するようになり、DRG ニューロンとの接触も認めた。常温で OGD 負荷をかけたオリゴデンドロサイトでは、MBP の発現は主に細胞体周囲に留まり、DRG ニューロンとの接触も阻害されていたが、低温で OGD 負荷をかけた場合は、MBP の細胞内分布とニューロンとの接触が維持されていた。また、ウェスタンブロットでは、リン酸化 MBP のうち 21.5kDa が最初に発現することが明らかとなり、この発現も常温で OGD 負荷をかけると減少し、低温では有意に維持された。また、OGD 負荷後に U0126 を添加すると、低温による、リン酸化 MBP 21.5kDa 及びニューロンとの接触能維持効果は減弱した。

In vivo、in vitro で低酸素虚血負荷と低温による変動を認めた、17 及び 21.5kDa MBP は、いずれも exon2 を含むスプライシングバリエーションである。オリゴデンドロサイトと DRG ニューロンの共培養系において、pre-OLs に対する OGD 負荷より 18 時間後に mRNA を回収し、MBP exon2 を含む、あるいは含まない mRNA をリアルタイム PCR で定量解析した。低温下では MBP exon2 を含む mRNA が特にその発現を抑制されており、低温下で OGD 負荷をかけた後に常温に戻すことにより、OGD 負荷をかけていない条件と同じレベルまで発現が回復することが明らかとなった。また、MBP の発現調節に関与する可能性がある候補遺伝子のうち、DEAD box RNA ヘリカーゼである Ddx54 の mRNA が低温下で上昇していることが明らかとなった。オリゴデンドロサイト初代培養系はトランスフェクション試薬による毒性に耐えられなかったため、NIH3T3、NG108-15、FBD-b12 細胞を用いて、Ddx54 を含むプラスミドを遺伝子導入し、MBP のプロモーター活性をレポーターアッセイで検討したところ、いずれの細胞においても Ddx54 を遺伝子導入することで、MBP の転写活性が減少することが明らかとなった。

以上の結果より、低温は低酸素虚血負荷から pre-OLs の細胞死を抑制することが確認された。また、低温はオリゴデンドロサイトの髄鞘化能を維持し、MBP の特に exon2 を含む

アイソフォームに対する保護効果を有していることが明らかとなった。21.5kDa リン酸化 MBP は髄鞘化の初期段階で発現し、ニューロンとオリゴデンドロサイトとの接点で発現していることが示唆されたことから、他のアイソフォームが何層にも折り重なった髄鞘を形成する際に誘導役として機能している可能性が考えられた。また、低酸素虚血負荷により MBP のオリゴデンドロサイト内分布に異常を来し、低温により保護されたことから、低温は MBP の細胞突起への運搬機構も維持していることが示唆された。In vivo、in vitro において、リン酸化 ERK1/2 は低酸素虚血負荷で減少し低温により維持されていた。In vitro では ERK1/2 リン酸化が低温の細胞死抑制効果に関与していると考えられた。また、in vivo、in vitro で ERK1/2 リン酸化は、リン酸化 MBP の発現維持を介して髄鞘化能維持に関与していると考えられた。低温下では MBP の特に exon2 を含む mRNA 発現が顕著に抑制され、常温に戻すことで回復することは新たな知見であり、多大なエネルギーを必要とする髄鞘化の開始を低酸素虚血負荷中には抑制しておくことで、正常環境に戻った際の髄鞘化能を維持している可能性が示唆された。MBP 転写制御は髄鞘化能維持に寄与する可能性があり、低温下で上昇する Ddx54 は MBP 転写活性を減少させたことから、低温の作用機序の解明を分子基盤とした新規分子標的療法の候補として今後期待される。