

オリゴデンドロサイト前駆細胞の制御機構
および病態時の機能に関する研究

2022

大橋 佳奈

目次

緒言.....	1
第一章 初代培養 OPC における TRPV4 の機能解析.....	4
方法.....	5
結果.....	9
考察.....	16
第二章 初代培養 OPC における TRPM3 の機能的発現.....	18
方法.....	19
結果.....	21
考察.....	25
第三章 自己免疫性脱髄病態における OPC の役割解明.....	28
方法.....	29
結果.....	32
考察.....	41
総括および結論.....	44
謝辞.....	45
発表論文目録.....	46
引用文献.....	47

緒言

中枢神経系のグリア細胞であるオリゴデンドロサイトは、髄鞘形成を行い神経伝導の高速化を担う。髄鞘の維持は神経機能の保持に重要である。髄鞘異常は、加齢、多発性硬化症や神経変性疾患などの病態時において広く認められるため、高齢化社会において増加している中枢神経疾患の治療標的として今後さらに重要となるであろう。

オリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) は成体脳細胞数の5%ほどを占め、増殖、病変部への遊走、オリゴデンドロサイトへの分化を行い、髄鞘形成に寄与する。しかし、その機能制御機構はほとんど解明されていない。また、病態時には、OPCの異常が髄鞘異常の一因となることが示唆されているものの、その詳細な機能は不明である。従って、OPCの機能制御機構および疾患時の役割解明は、中枢神経系の正常な機能や疾患メカニズム理解のために重要である。

本研究の第一章、第二章では、OPC機能制御機構の一端を解明するために、Ca²⁺透過性非選択的カチオンチャネルであるtransient receptor potential (TRP) チャネルのサブタイプ、TRPV4とTRPM3に着目して研究を行った。これらのチャネルは、体温ほどの温かい温度域や機械刺激、低浸透圧といった脳内の生理的刺激や病態刺激で活性化するが、OPCにおける機能は不明であったため、Ca²⁺シグナリングおよび細胞機能への関与について検討を行った。

第三章では、自己免疫性脱髄疾患である多発性硬化症(MS)におけるOPCの役割を、モデルマウスを用いて検討した。OPCはオリゴデンドロサイトの前駆細胞としての役割から、脱髄病態においても保護的に働くものと想定されている。しかし、MS患者やMSモデルマウスでは、一部のOPCで炎症性因子の遺伝子発現が上昇しており、生理的なOPCとは異なる性質を持つ可能性がある。しかし、病態モデルを用いた介入実験は未だされておらず、OPCが従来の想定通り保護的に働くのか、それとも病態増悪に働くのかは不明である。そこで、MSモデルマウスにおいてOPCを病期特異的に除去することにより、OPCの病態形成への関与を検討した。

本研究により得られた新規知見は以下の通りである。第一章では、初代培養OPCを用いた検討により、TRPV4がOPCに発現し、その活性化により細胞内Ca²⁺流入とプロテインキナーゼC活性化を介して細胞増殖が促進されることを明らかにした。第二章では、初代培養OPCでTRPM3が発現し、その活性化により細胞内Ca²⁺流入が惹起されることを示した。さらに、OPCのTRPM3は脳梗塞モデルや炎症条件下にて発現上昇し、病態時における機能が示唆された。第三章では、多発性硬化症モデルマウスにおいて、予想に反し、OPCが急性期の病態悪化や脱髄悪化に関与することを見出した。さらにその機序として、OPCが末梢から浸潤したマクロファージを脊髄において活性化させ、T細胞の再活性化を促進することが示唆された。

これらの研究成果について、以下に論述する。

なお、本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
BrdU	bromodeoxyuridine
CC	corpus callosum
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CD3	cluster of differentiation 3
CD4	cluster of differentiation 4
CD8	cluster of differentiation 8
CIITA	class II major histocompatibility complex transactivator
cRNA	complementary ribonucleic acid
CNS	central nervous system
CNTF	ciliary neurotrophic factor
CTX	cerebral cortex
DMSO	dimethyl sulfoxide
DTR	diphtheria toxin receptor
EAE	experimental autoimmune encephalomyelitis
FGF	fibroblast growth factor
FISH	fluorescence in situ hybridization
Fura 2-AM	Fura 2-acetoxymethyl ester
GFAP	glial fibrillary acidic protein
HEK	human embryonic kidney
Iba1	ionized calcium-binding adapter molecule 1
IFN γ	interferon γ
IL1 β	interleukin 1 β
IL17A	interleukin 17A
MBP	myelin basic protein
MHC	major histocompatibility complex
MMP9	matrix metalloproteinase 9
MOG	myelin oligodendrocyte glycoprotein
MS	multiple sclerosis
NFAT5	nuclear factor of activated T cells 5
NF- κ B	nuclear factor-kappa B
NG2	neuron-glia antigen 2
NMDA	N-methyl-D-aspartate

OPC	oligodendrocyte precursor cell
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	platelet-derived growth factor
PDGFR α	platelet-derived growth factor receptor α
PDGFR β	platelet-derived growth factor receptor β
PFA	paraformaldehyde
PKC	protein kinase C
PLP	proteolipid protein
PS	pregnenolone sulfate
P4	postnatal day 4
RNA	ribonucleic acid
RT-PCR	reverse transcription-PCR
rRNA	ribosomal RNA
TNF α	tumor necrosis factor α
TRP	transient receptor potential
TRPC1	transient receptor potential canonical 1
TRPM3	transient receptor potential melastatin 3
TRPV4	transient receptor potential vanilloid 4
TLR	toll-like receptor
T3	triiodo-L-thyronine
VEGF	vascular endothelial growth factor

第一章 初代培養OPCにおけるTRPV4の機能解析

オリゴデンドロサイトはグリア細胞の一種であり、神経軸索を髄鞘で覆うことで神経伝導を高速化し、神経の代謝を助ける[1, 2]。オリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) は、増殖、遊走し、オリゴデンドロサイトに分化する。脱髄や白質傷害は、多発性硬化症、アルツハイマー病、精神疾患など、様々な中枢神経疾患において認められる[3, 4, 5]。そのため、OPCの増殖、遊走、分化の制御は、これらの病態の改善につながる可能性がある。OPCの増殖は、中枢神経系 (CNS) 傷害後の髄鞘修復の過程で最初におこる。多発性硬化症において、OPCは傷害を受け、髄鞘修復が低下する[6]。また、OPCはオリゴデンドロサイトに分化するだけでなく、脳由来神経栄養因子(BDNF) を産生し、神経をアポトーシスから保護する役割も担う[7, 8]。したがって、OPC数を増やすことは、CNS傷害後の髄鞘修復や機能回復を促進するための重要な戦略となりうる[9, 10]。

OPCの機能を制御する細胞内シグナリングは十分に解明されていないが、OPC機能に影響を与える分子として、ソニックヘッジホッグ、Wntタンパク質、NMDA、血小板由来成長因子 (PDGF)、線維芽細胞成長因子 (FGF)、ニューレグリン、BDNFが報告されている[11, 12, 13, 14, 15]。

また、 α -アミノ-3-ヒドロキシ-5-メチル-4-イソキサゾールプロピオン酸(AMPA)受容体[16]、P2Xプリン受容体[17]、電位依存性 Ca^{2+} チャネル[18]を介してOPCの細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇することが報告されており、これらの受容体やチャネルへの刺激は、OPCの増殖[18]、形態[16]、分化や髄鞘形成[18]を制御する。さらに、PDGFやFGFは Ca^{2+} 応答を惹起する[19]。しかし、 Ca^{2+} シグナリングの詳細なメカニズムは未だ十分に理解されていない。

Transient receptor potential (TRP) チャネルは、多様な機能を持つ Ca^{2+} 透過性非選択的カチオンチャネルである。哺乳類では、28種類のTRPチャネル遺伝子が6ファミリー (TRPC, TRPM, TRPV, TRPA, TRPP, TRPML) を構成している[20]。これまでに、OPCにおいては、TRPC1活性化がストア作動性 Ca^{2+} 流入を介して増殖を促進することが報告されている[21]。また、髄鞘形成期の初期のオリゴデンドロサイトでTRPM3が発現し、活性化によって Ca^{2+} 応答を惹起する[22]。成熟オリゴデンドロサイトにおいて、プロトン作動性のTRPA1が機能的に発現しており、TRPA1活性化による Ca^{2+} 応答は髄鞘傷害を引き起こす[23]。しかし、他のTRPチャネルのオリゴデンドロサイト系譜細胞の機能への関与は未だ不明である。本章では、温度刺激、低浸透圧、機械刺激、アラキドン酸代謝物などの様々な環境刺激で開口するTRPV4のOPCにおける機能を解析した。その結果、TRPV4は*in vivo*および初代培養系両方においてOPCで発現し、TRPV4選択的アゴニストGSK1016790A処置が、 Ca^{2+} 流入やプロテインキナーゼC (PKC) 経路を介してOPCの増殖を促進することを見出した。

実験方法

蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH) と免疫組織学的検討

FISHは、既報[24, 25]に従って行った。*Trpv4*, *Pdgfra*, プロテオリピドタンパク質 (*Plp*), グリア繊維性酸性タンパク質 (*Gfap*) の相補リボ核酸 (cRNA) プローブは既報[24, 26, 27]に従って作製し、ビオチンやジゴキシゲニンによるcRNAプローブの標識は、既報[25]に従って行った。8週齢マウス脳の矢状切片は、ハイブリダイゼーション緩衝液中で、ビオチン標識またはジゴキシゲニン標識cRNAプローブと反応後、洗浄した。ビオチンは、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(PerkinElmer; 1:100)と1時間反応後に、フルオレセインイソチオシアネート-チラミドシグナル増幅キット(PerkinElmer)を用いて検出した。残存ペルオキシダーゼ不活化のために1.0% H₂O₂と30分間反応後、ジゴキシゲニンはペルオキシダーゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体(Roche Diagnostics;1:500)と1時間反応させた。Ionized calcium-binding adapter molecule 1 (*Iba1*)の検出には、抗*Iba1*抗体(1:500, Wako)およびAlexa Flour 564標識ヤギ抗ウサギIgG (1:2000)を用いた。切片の観察には、冷却CCDカメラ(DP80, Olympus)搭載の蛍光顕微鏡(BX53, Olympus)を用いた。

初代培養OPC

全実験は、京都大学動物実験委員会が定める倫理指針に従って行った。初代培養OPCは、0-2日齢のWistar/STラット新生仔 (Japan SLC) の大脳皮質から調製した。まず、大脳皮質をトリプシン (2.5 mg/mL; ナカライテスク) とDNase I (25 µg/mL; D5025, Sigma-Aldrich)で37 °C 15分間処理して細胞を解離させ、ポリ-L-オルニチンでコーティングした75 cm²フラスコに播種した。非働化した10%ウシ胎仔血清および1%ペニシリン/ストレプトマイシン混合液 (ナカライテスク) 含有ダルベッコ改変イーグル培地 (D5796, Sigma-Aldrich) 中で、37 °C 5% CO₂下で培養し、混合グリア培養を作製した。10-15日後、OPCを単離するために、シェイカーでフラスコを120-130 rpmで1時間振とう後、ミクログリアを含む上清を取り除き、新たな培地を追加した。その後、230-250 rpmで16-18時間振とうし、浮遊した細胞を回収し、コーティングしていない10 cm ディッシュ上で37 °C 5% CO₂で1時間培養して張り付いたアストロサイトを除去し、上清の細胞懸濁液を、ポリ-L-オルニチンでコーティングされた10 mm カバーガラス、35 mm ディッシュまたは48 ウェルプレートに再播種した。増殖培地として、1 × B27 (Life Technologies)、グルタミン (2 mM)、1%ペニシリン/ストレプトマイシン混合液、血小板由来成長因子 (PDGF) -AA (10 ng/mL; PeproTech)、および塩基性FGF (10 ng/mL; PeproTech)を添加したNeurobasal 培地 (Life Technologies) を用い、細胞は播種から1日以上置いた後使用した。OPCの分化誘導には、トリヨード-L-チロニン (T3, 30 ng/mL; Sigma-Aldrich)と毛様体神経栄養因子 (CNTF, 10 ng/mL; PeproTech)含有の分化培地を用いた。

免疫細胞化学

OPCは、ガラスカバーガラス上にて増殖培地で2日間培養した。分化検討用には、分化培地でさらに5日間培養した。細胞は4%パラホルムアルデヒド (PFA) 固定後、3%ウシ血清アルブミンと0.1%トリトンX-100含有リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中で30分間透過処理した。1次抗体と室温で3時間反応後、洗浄し、2次抗体と4°Cで一晩反応した。血小板由来成長因子受容体 α (PDGFR α) およびミエリン塩基性タンパク質 (MBP) の検出には、以下の抗体を用いた。1次抗体：ウサギ抗PDGFR α 抗体 (1:1000; Santa Cruz)、ラット抗MBP抗体 (1:375; Millipore)。2次抗体: Alexa Fluor 594標識ロバ抗ウサギIgG (1:500; Invitrogen)、Alexa Fluor 488標識ロバ抗ラットIgG (1:500; Invitrogen)。DAPI Fluoromount-G (Southern Biotechnology Associates)で核染色後、FluoView FV10i共焦点顕微鏡 (Olympus) を用いて蛍光画像を撮影した。

逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)

35 mmディッシュで培養したOPCからの総リボ核酸 (RNA) 抽出には、Nucleo Spin RNAキット (TaKaRa Bio) を使用した。1本鎖相補デオキシリボ核酸(cDNA)は、ReverTra Ace qPCR RTキット (Toyobo) を用いて調製した。ラット*Trpv4* cDNAは、Blend Taq (Toyobo) を用い、プライマーペア (5' -GGTTGTGTCTGCGGCGCTCT-3' , 5' -GTGGTGGCCCACTGCAGCTT-3') で増幅した。94 °C 2分間反応後、94 °C 30 秒間、58 °C 30 秒間、72 °C 1 分間の反応を30サイクル行った。増幅したPCR産物は、臭化エチジウム含有アガロースゲルで電気泳動し、紫外線ライトで検出した。画像取得には、Quantity One software (Bio-Rad) を用いた。

ウェスタンブロットティング

ウェスタンブロットティングは、既報[28]に軽微な修正を加えて行った。2日間培養したOPCは、RIPAバッファー (Nacalai Tesque)で溶解した。タンパクは、NuPAGE 4× LDS sample buffer (Life Technologies)で希釈し、10%ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲルにロードし、Immobilon-P PVDF transfer membranes (Millipore)にブロットした。Blocking One (Nacalai tesque)によるブロッキング後、メンブレンは抗TRPV4抗体(1:250; ab39260, Abcam)と0.1% Tween-20と10% Blocking One含有トリス緩衝生理食塩水中で4°Cで一晩反応させた。洗浄後、メンブレンはペルオキシダーゼ標識ロバ抗ウサギIgG (1:5000; GE Healthcare) と室温で1時間反応させた。特異的バンドは、Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate (Millipore) で検出し、ChemiImager 4400 imaging system (Alpha Innotech) を用いて可視化した。

蛍光Ca²⁺イメージング

Ca²⁺イメージングは、既報[28]に軽微な修正を加えて行った。カバーガラス上で培養したOPCに、0.005% Cremophor EL (Sigma-Aldrich) 含有 Krebs-Ringer buffer (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 10 mM グルコース, 10 mM HEPES, pH 7.4に調整) 中で希釈した 5 μM Fura 2-アセトキシメチルエステル (Fura 2-AM; Dojindo) と 30–40 分間反応させた。励起波長 340 nm / 380 nm、 蛍光波長 510 nm を用い、 蛍光画像は室温で 2 秒おきに AQUACOSMOS/ORCA-AG imaging system (Hamamatsu Photonics) で撮影した。 細胞内 Ca²⁺ 濃度定量のために、 励起波長 340 nm / 蛍光波長 510 nm (F340) で得た 蛍光強度と、 励起波長 380 nm / 蛍光波長 510 nm (F380) で得た 蛍光強度の比率 (F340/F380) を計算した。

ホールセルパッチクランプ

ホールセル電流は、既報[29]に軽微な変更を加え、室温で記録した。外径 1.5 mm のフィラメント入りガラス毛細管 (Narishige) を P-87 (Sutter) で引いて作製した記録電極を用いた。バス溶液は、150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1.5 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, 10 mM D-glucose (NaOH で pH 7.4 に補正)、内液は、150 mM CsCl, 10 mM BAPTA 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES (CsOH で pH 7.2 に補正) を用いた。電極を内液で満たした際のアクセス抵抗は、2–5 MΩ であった。電流電圧曲線は、ランプ電圧 (200 ms かけて -100 mV から +100 mV に、0.2 Hz) を用いて測定した。保持電位は 0 mV に設定した。アクセス抵抗は 70% 補正した。パッチクランプ記録は、パッチクランプアンプ EPC-10 (HEKA Instruments) と、PATCHMASTER software (HEKA) を用いて測定した。

スクラッチアッセイ

35 mm ディッシュで培養し 70–80% コンフルエントに達した OPC の一部を、セルスクレーパー (BM Bio) を用いて削り取った。PBS で 2 回洗浄後、GSK1016790A または溶媒 (ジメチルスルホキシド, DMSO) を含む培地を加え、6–48 時間遊走させた。位相差画像は、DIAPHOT 300 inverted phase contrast microscope (Nikon) と DS-U1 DIGITAL SIGHT camera system (Nikon) を用いて取得し、削り取った部位に遊走した細胞数を計測した。

MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) アッセイ

細胞の増殖や生存率は、MTT (Nacalai Tesque) を用いたアッセイにより、製品プロトコルに従って評価した。薬物処置から 24–72 時間後、細胞に MTT (0.025 mg/mL) を 3 時間処置した。MTT の細胞内代謝により生成したホルマゼン結晶を DMSO に溶解し、570 nm の吸光度を測定した。細胞生存率は対照群の細胞との比で表した。

ブロモデオキシウリジン (BrdU) 取り込み実験および染色

10 mm カバーガラスに播種してから 2 日後、OPC に 24 時間薬物処置した。BrdU (1 μM;

Sigma-Aldrich) を3時間処置し、4%PFAで固定後、1 N HCl を37 °C 20分間浸透させ、核DNAを変性させた。その後、細胞にマウスモノクローナル抗BrdU抗体 (1:500; Roche) を室温で3時間処置し、Alexa Fluor 488標識ロバ抗マウスIgG (1:500; Invitrogen) を4 °Cで1晩処置した。DAPI Fluoromount-Gで核染色後、FluoView FV10i confocal microscope (Olympus) で蛍光画像を撮影した。全細胞数に対するBrdU陽性細胞の割合を求めた。

定量的RT-PCR

ReverTra Ace qPCR RTキット (Toyobo) を用いて総RNAからcDNAに逆転写後、StepOne Real-Time PCR System (Life Technologies) と THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (Toyobo) を用いてリアルタイム定量的PCRを行った。使用したプライマーは以下の通りである。ラット18S リボソーム RNA (18S rRNA) (5' -CGGTCCAAGAATTTACCTC-3' , 5' -ACCGCGTTCTATTTTGTG-3') 、 ラット *Pdgfra* (5' -GATAGCTTCATGAGCCGACACCCA-3' , 5' -CATTGGCACGTACTGTGTGGTGTCA-3') 、 ラット *Mbp* (5' -CTCTGGCAAGGACTCACACA-3' , 5' -TGTCTCTTCCTCCCCAGCTA-3') 。 PCR反応条件は、95 °C 10分間の後、95 °C 15秒間、60 °C 60秒間を45サイクル行った。各遺伝子発現量は18S rRNA発現量で補正した。

統計解析

全てのデータは平均値 ± 標準誤差で表示した。Student's t検定またはOne-way ANOVAの後にTukey検定を用いて、GraphPad Prism 5 で解析した。危険率5%未満の場合に統計学的な有意差があると判定した。

結果

OPCは生体内でTRPV4を発現する

既報[24, 30, 31]において、ニューロン、アストロサイト、ミクログリアがTRPV4を発現することが報告されており、OPCにおける発現を検討した。FISHを用いて、生後4日齢(P4)および成体ラットの大脳皮質 (CTX, 灰白質) と脳梁 (CC, 白質) におけるTRPV4とPDGFR α (OPCマーカー) のmRNA発現を検討した(図1-1A)。P4において、TRPV4はPDGFR α ⁺ OPCのほとんどで発現したが (~ 80%, 矢頭)、明白なTRPV4シグナルが認められないOPCもあり (~ 20%, 矢印)、CTXとCCとの間の差は認められなかった(図1-1A)。成体では、CTXでTRPV4⁺/PDGFR α ⁺細胞数が減少したのに対し、CCではTRPV4⁺/PDGFR α ⁺細胞が多数認められた(図1-1A)。以上より、OPCにおいてTRPV4が発現することが示唆された。また、成体の皮質と白質において、PLP陽性成熟オリゴデンドロサイトにおいてもTRPV4が検出された(図1-1B)。以上の結果から、TRPV4はOPCと成熟オリゴデンドロサイトの両方で発現することが示唆された。また、アストロサイトマーカーGFAPのFISHでは、TRPV4⁺/GFAP⁺細胞がP4と成体の両方で認められた(図1-1C, 矢頭)。ほとんどのGFAP陽性アストロサイトで明白なTRPV4シグナルが検出された一方、弱いシグナルしか検出されないアストロサイトも存在した。さらに、P4にてミクログリアマーカーIba1の免疫組織化学染色およびTRPV4のFISHを行ったところ、既報[30]と一致して、Iba1陽性ミクログリアはCTXとCCの両方でTRPV4を発現した(図1-1D)。従って、*in vivo*において、TRPV4はアストロサイトとミクログリアに加え、オリゴデンドロサイト系譜細胞でも発現することが示唆された。

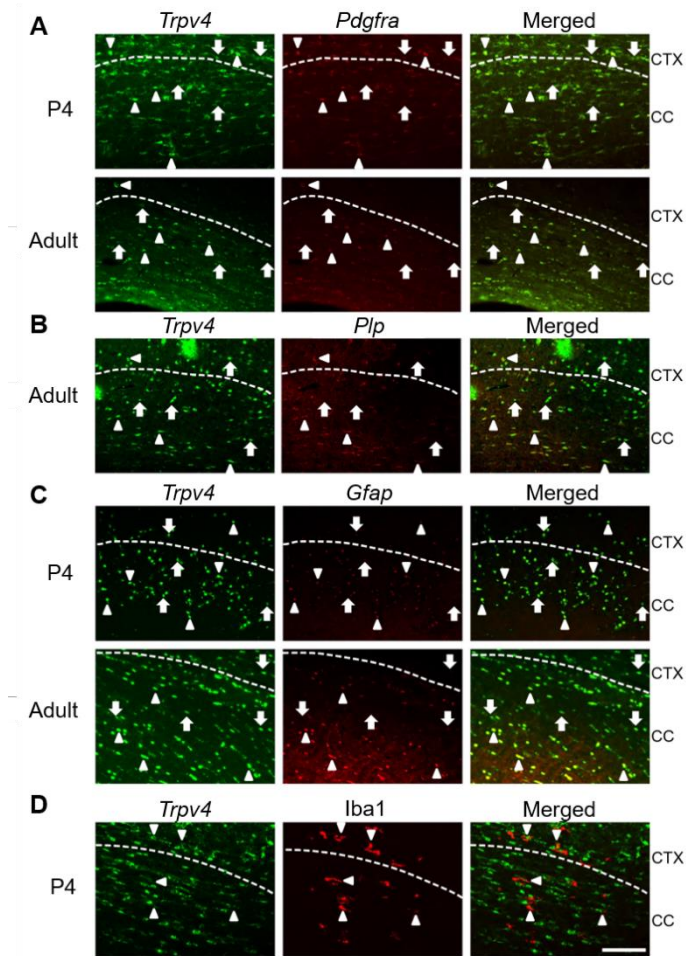
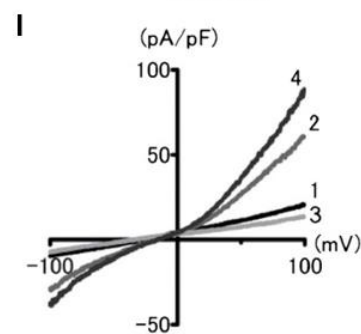
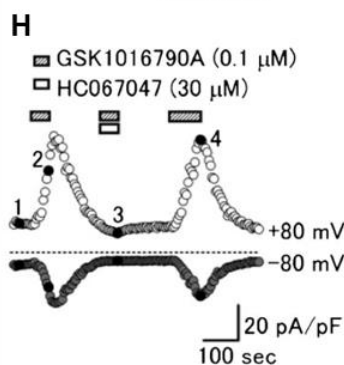
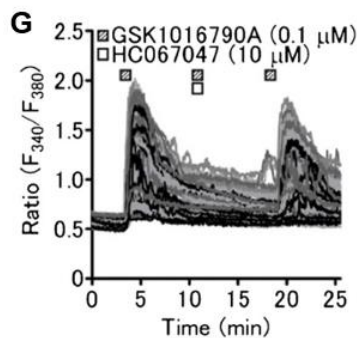
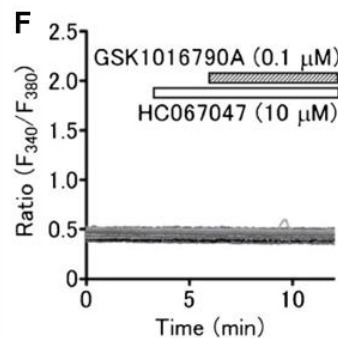
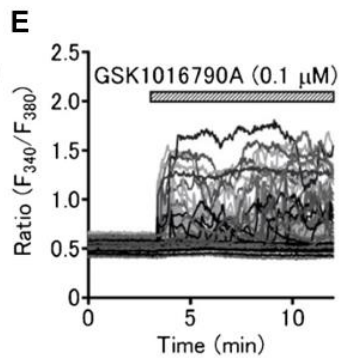
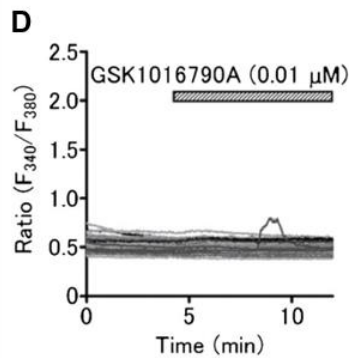
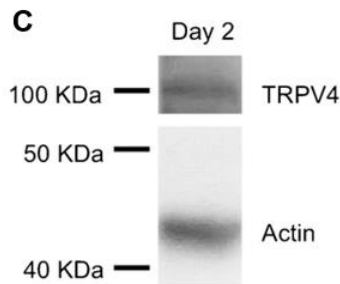
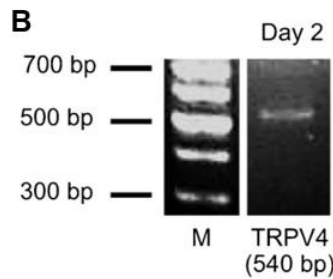
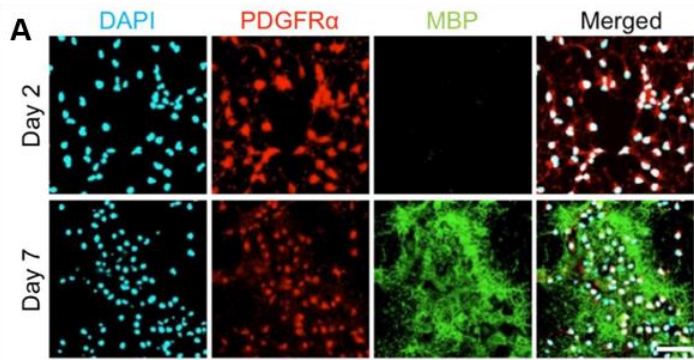


図1-1 TRPV4は生体内OPCで発現する
 A. P4および成体ラットCTXとCCにおける*Trpv4*および*Pdgfra* mRNAの検出。TRPV4⁺/PDGFR α ⁺(矢頭)とTRPV4⁺/PDGFR α ⁻(矢印)両方が認められた。
 B. 成体ラットCTXとCCにおける*Trpv4*および*Plp* mRNAの検出。TRPV4⁺/PLP⁺(矢頭)とTRPV4⁺/PLP⁻(矢印)両方が認められた。
 C. P4および成体ラットCTXとCCにおける*Trpv4*および*Gfap* mRNAの検出。TRPV4⁺/GFAP⁺(矢頭)とTRPV4⁺/GFAP⁻(矢印)両方が認められた。
 D. P4ラットCTXとCCにおける*Trpv4* mRNAおよびIba1タンパク質の検出。TRPV4⁺/Iba1⁺(矢頭)が観察された。破線はCTXとCCの境界を示す。スケールバーは20 μ mを示す。

TRPV4はラット初代培養OPCにおいて機能的に発現する

続いて、ラット初代培養OPCにおいてTRPV4の生理的機能を検討した。播種2日後では、細胞は幼若OPCマーカーPDGFR α を発現し、成熟オリゴデンドロサイトマーカーMBPは発現しなかった。播種7日後 (T3とCNTFを含有する分化培地で5日間培養後) では、MBPを高発現し、PDGFR α はほとんど発現しなかった(図1-2A)。増殖培地で2日間培養したOPCにおいて、RT-PCRによりTRPV4のmRNA発現が(図1-2B)、ウェスタンブロッティングによりTRPV4のタンパク発現が(図1-2C)認められた。TRPV4がOPCにおいて機能的に発現するかどうか調べるために、Fura 2-AMを用いて細胞内Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i) を測定した。選択的TRPV4アゴニストGSK1016790Aを処置すると、濃度依存的な[Ca²⁺]_i上昇が認められた(図1-2D, E)。GSK1016790A (0.1 μ M) 処置により惹起された[Ca²⁺]_i上昇は、選択的TRPV4アンタゴニストHC067047 (10 μ M)処置により完全に抑制された(図1-2F)。GSK1016790A (0.1 μ M)の反復処置実験により、HC067047 (10 μ M)によるTRPV4阻害作用は可逆的であることが示唆された(図1-2G)。ホールセルパッチクランプ法による検討で、GSK1016790Aの細胞外処置は電流応答を惹起し(図1-2H)、電流電圧曲線はTRPV4⁺ミクログリアの既報[30]と同様に外向き整流性を示した(図1-2I)。GSK1016790Aにより惹起された電流応答は、HC067047



(30 μM)により抑制された(図1-2H, I)。これらの結果から、初代培養OPCにおいてTRPV4が機能的に発現することが示唆された。

図1-2 TRPV4はラット初代培養OPCにおいて機能的に発現する。A. 増殖培地で2日間培養したOPCと、増殖培地で2日間、分化培地で5日間、計7日間培養したオリゴデンドロサイトにおけるPDGFR α とMBPの免疫染色。スケールバーは50 μm を示す。B. 増殖培地で2日間培養したOPCのRT-PCRによるTrpv4 mRNA検出。Mは100 bp DNAラダーを示す。C. 増殖培地で2日間培養したOPCにおけるTRPV4のウェスタンブロットティング。D, E. TRPV4選択的アゴニストGSK1016790Aを図示した濃度(0.01–0.1 μM)で処置した際の Ca^{2+} 応答。F. TRPV4選択的アンタゴニストHC067047 (10 μM)前処置後にGSK1016790A (0.1 μM)を処置した際の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化。G. HC067047 (10 μM)存在下または非存在下でGSK1016790A (0.1 μM)を処置した際の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化。

H, I. HC067047 (30 μM)存在下または非存在下でGSK1016790A (0.1 μM)を処置した際のホールセル電流。Hは代表的なトレース、Iは電流電圧曲線を示す。斜線入りバーはGSK1016790A、白いバーはHC067047を処置したタイミングを示す。

TRPV4刺激はPKC経路を介してOPCの増殖を促進する

TRPV4刺激がOPCの増殖を促進するかどうか検討するために、MTTアッセイで細胞生存率を、BrdU取り込み実験で増殖を評価した。GSK1016790A処置によって、濃度依存的に細胞生存率が上昇した(図1-3A)。GSK1016790A (0.1 μM)による細胞生存率上昇は、HC067047 (10 μM)共処置により抑制されたが、HC067047単独による影響は認められなかった(図1-3B)。BrdUを取り込んだ増殖中の細胞は、GSK1016790A (0.1 μM) 処置で有意に増加し、HC067047 (10 μM)共処置により抑制された(図1-3C, D)。これらの結果から、TRPV4刺激はOPCの増殖を促進することが示唆された。続いて、メカニズムの検討を行った。まず、TRPV4からの Ca^{2+} 流入が増殖に必要なか否か検討するために、細胞内 Ca^{2+} キレーター-BAPTA-AMを使用した。BAPTA-AM (3 μM)処置は、GSK1016790Aにより惹起されるOPCの増殖を有意に抑制した(図1-3D)。さらに、PKC経路阻害薬bisindolylmaleimide II (BIM II; 0.5 μM)処置も、GSK1016790Aにより惹起されるOPCの増殖を抑制した(図1-3E)。これらのデータから、TRPV4刺激がPKC経路を介してOPCの増殖を促進することが示唆された。

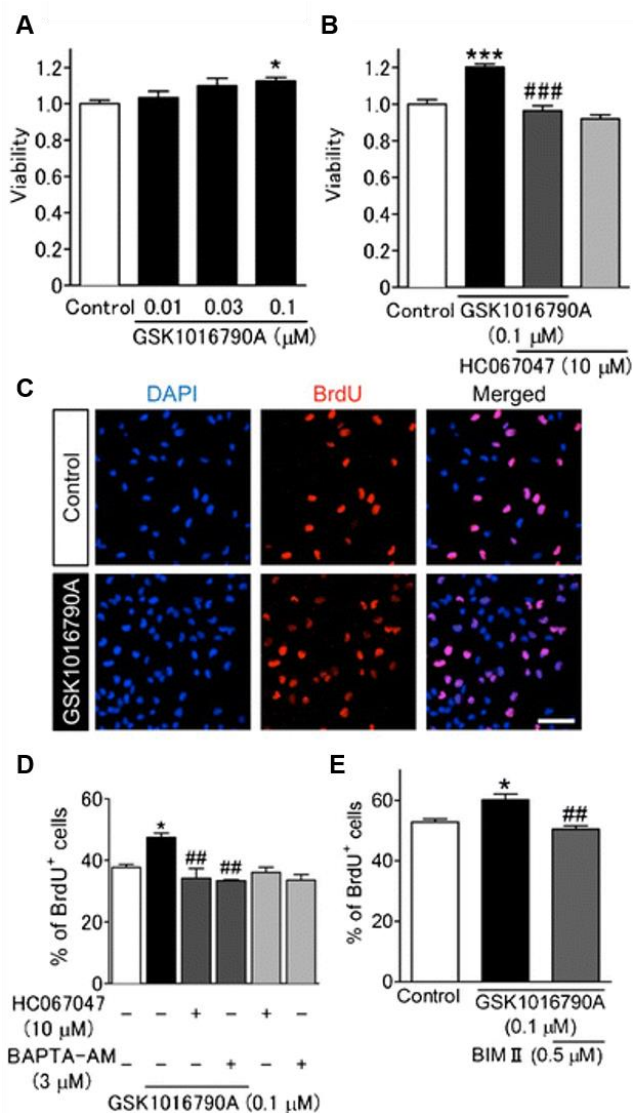


図1-3 TRPV4はPKC経路を介してOPCの増殖を促進する

A, B. OPCにTRPV4選択的アゴニストGSK1016790AおよびTRPV4選択的アゴニストHC067047 (10 μM)を24時間処置した際の、MTTアッセイで評価した細胞生存率。* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs. control; ### $P < 0.001$ vs. GSK1016790A (0.1 μM) alone; $n = 6-8$.

C. 対照培地 (上段) またはGSK1016790A (0.1 μM)含有培地 (下段)を処置したOPCのBrdU取り込み実験の代表画像。増殖中の細胞はBrdU陽性であり、全細胞核はDAPIで染色した。スケールバーは50 μm を示す。

D, E. DAPI⁺細胞に占めるBrdU⁺細胞の割合の定量。薬物処置は48時間行った。

* $P < 0.05$ vs. 対照群; ## $P < 0.01$ vs.

GSK1016790A (0.1 μM)単独処置群; $n = 3$.

TRPV4はOPCの遊走に関与しない

OPCのTRPV4の他の機能を評価するために、スクラッチアッセイで遊走能を評価した。遊走時間6–48時間のいずれにおいても、スクラッチした部位の細胞数はGSK1016790A処置で変化しなかった(図1-4A, B)。スクラッチから24時間後と48時間後では、GSK1016790A処置群において細胞生存率が有意に高かったため、TRPV4の細胞増殖への関与が再度確かめられた(図1-4C)。これらの結果から、TRPV4はOPCの増殖に関与する一方、遊走には関与しないことが示唆された。

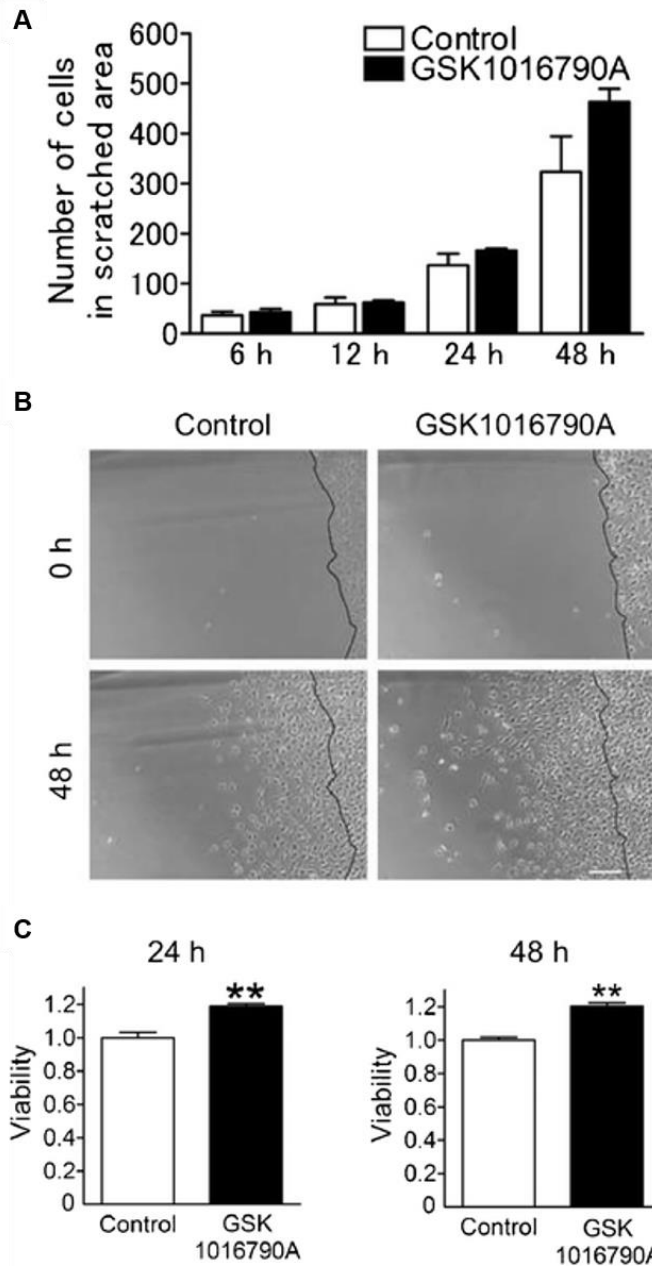


図1-4 TRPV4刺激はOPCの遊走に影響を与えない

A. スクラッチ法によるOPC遊走評価。スクラッチした部位に遊走した細胞数を評価した。白カラム: 対照群、黒カラム: GSK1016790A (0.1 μ M)処置群。n = 4.

B. 対照群およびGSK1016790A (0.1 μ M)処置群の、スクラッチ直後および48時間後の細胞の代表画像。黒線はスクラッチ部位の端を示す。スケールバーは100 μ mを示す。

C. スクラッチ後、GSK1016790A (0.1 μ M)を24時間または48時間処置し、MTTアッセイで細胞生存率を評価した。

** $P < 0.01$ vs. 対照群; n = 3.

TRPV4刺激はOPCの分化に関与しない

TRPV4刺激のOPCの分化への影響を検討するために、OPCマーカーPDGFR α と成熟オリゴデンドロサイトマーカーMBPのmRNA発現量を定量的RT-PCR法で検討した。分化培地中でPDGFR α 発現量が低下しMBP発現量が上昇した一方、増殖培地中でのGSK1016790A (0.1 μ M) 24時間処置は、PDGFR α とMBPの発現量を変化させなかった(図1-5A, B)。また、分化培地中でのGSK1016790A (0.1 μ M) 72時間処置は、PDGFR α とMBPの発現量を変化させず(図1-5C, D)、細胞生存率への影響も認められなかった(図1-5E)。免疫細胞化学的検討においても、増殖培地と分化培地いずれでも、GSK1016790A処置によるPDGFR α とMBPの発現率への影響は認められなかった(図1-5F-K)。これらの結果から、TRPV4刺激はOPC分化には関与せず、TRPV4は分化抑制を介さずにOPCの増殖を促進することが示唆された。

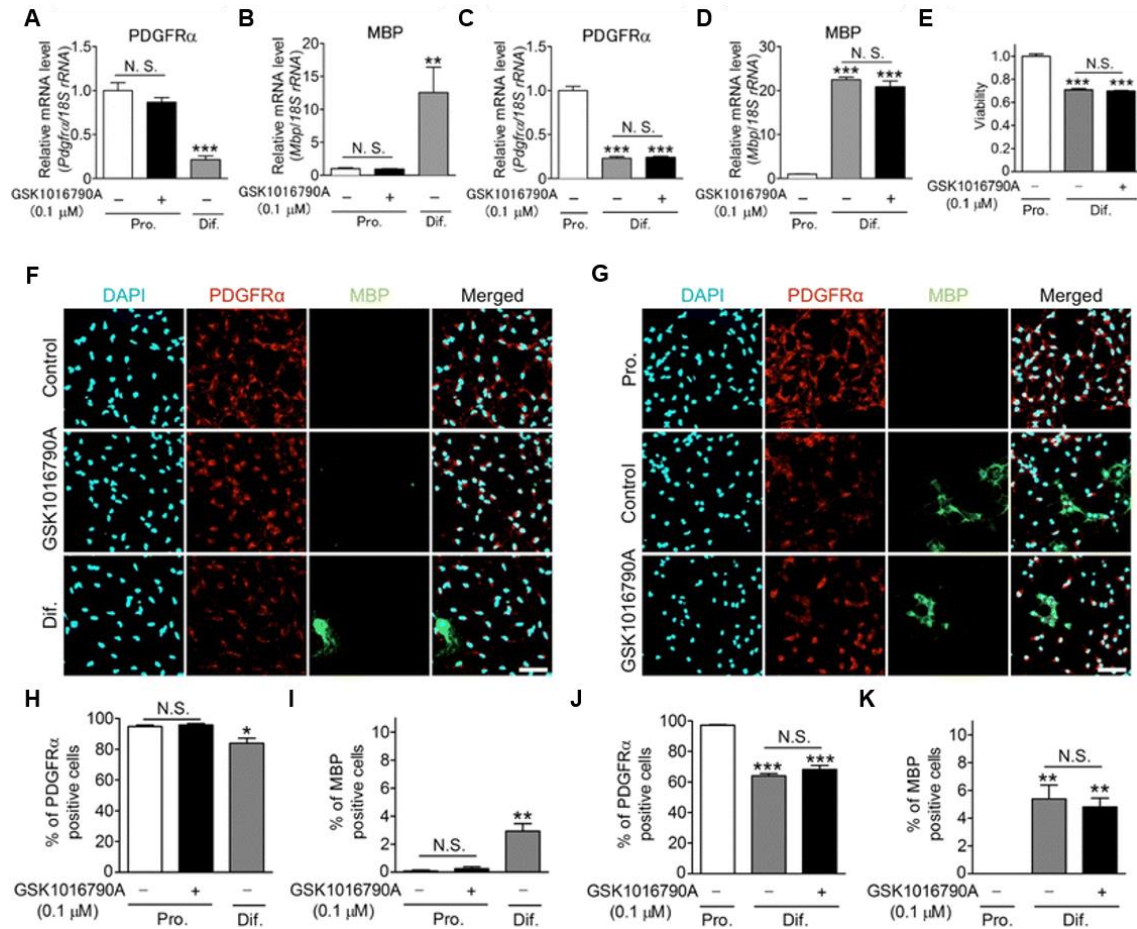


図1-5 TRPV4刺激はOPCの分化に影響を与えない

A–E. OPCにGSK1016790A (0.1 μ M)含有または非含有増殖培地(Pro)を24時間、または分化培地(Dif)を72時間処置した。A–D. *Pdgfra* (a, c)または*Mbp* (b, d)のmRNA発現量を定量的RT-PCRで測定した。n = 3–4. E. MTTアッセイによる細胞生存率評価。n = 4.

F, H, I. 薬物処置24時間後に細胞を固定し、PDGFR α とMBPの免疫染色を行った。F. 代表画像。上段：対照増殖培地、中段：GSK1016790A (0.1 μ M)含有増殖培地、下段：分化培地。スケールバーは50 μ mを示す。

H. PDGFR α ⁺細胞の割合定量。n = 3. I. MBP⁺細胞の割合定量。n = 3.

G, J, K. 薬物処置72時間後に細胞を固定し、PDGFR α とMBPの免疫染色を行った。G. 代表画像。上段：増殖培地、中段：対照分化培地、下段：GSK1016790A (0.1 μ M)含有分化培地。スケールバーは50 μ mを示す。

J. PDGFR α ⁺細胞の割合定量。n = 3. K. MBP⁺細胞の割合定量。n = 3.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. 対照増殖培地群。

考察

本章では、TRPV4が生体内と初代培養系においてOPCで発現し、選択的アゴニストGSK1016790AがCa²⁺流入を惹起し、アンタゴニストHC067047共処置によりほぼ完全に抑制されることを示した。TRPV4刺激は、Ca²⁺流入とPKC経路を介してOPCの増殖を促進したが、遊走と分化には関与しなかった。これらの結果は、TRPV4はOPCからオリゴデンドロサイトへの分化に影響することなく、OPCの増殖を促進することを示唆している。

増殖評価において、TRPV4選択的アンタゴニストHC067047単独処置はOPCの増殖に影響を与えなかったため、恒常的条件においてはTRPV4の増殖への関与は小さいことが示唆される。これは、TRPV4ノックアウトマウスの脳では白質の厚さは正常で、組織学的な異常は認められないという報告[24]と合致した結果である。一方で、GSK1016790Aによる刺激は、OPCの増殖を有意に増加させた。この結果は、脳においてTRPV4がある特定の条件下で活性化されると、OPC増殖を促進することを示唆している。

脳において、どのような内在性分子がOPCのTRPV4を開口させるのであろうか？グラム陰性菌の細胞壁の主要構成分子であるリポ多糖がTRPV4を直接活性化することが報告されている[32]。脱髄部位では、多くの炎症性因子（タンパク質、糖鎖、脂質など）がミエリンデブリや傷害を受けた軸索から放出されるため、このような分子が脱髄病態においてTRPV4を活性化し、OPCの増殖を促進する可能性がある。TRPV4は、アラキドン酸代謝により様々な細胞種で産生される5', 6' -エポキシエイコサトリエン酸によっても活性化する[33]。アラキドン酸は、外傷性脳損傷で発現が増加する[31]。OPCはCNS傷害時に増殖するが[35]、これは炎症で産生されるアラキドン酸代謝物によるTRPV4活性化を介している可能性がある。

低浸透圧と機械刺激も、TRPV4を活性化する[36]。細胞分裂時には張力が発生することが知られており[37]、神経幹細胞では機械刺激受容チャネルであるPiezo1を介してそのような力に応答するため[38]、OPCのTRPV4も細胞分裂時に活性化して増殖を促進する可能性がある。また、TRPV4は白質構成分子によっても活性化される。白質はラミニンやコラーゲンなどの細胞外マトリックスタンパク質を含有するが、ラミニン-2はインテグリンシグナルを介してオリゴデンドロサイトの膜伸展を促進することが報告されている[39]。興味深いことに、TRPV4は物理的にインテグリンと相互作用して機械的痛覚過敏に関与することが報告されており[40]、TRPV4は白質の細胞外マトリックスによって過敏化する可能性がある。しかし、本章のTRPV4の機能評価実験はすべてin vitroで行ったため、多様な生理的条件下におけるTRPV4の本来の機能を再現できていない可能性があり、in vivo実験でOPCのTRPV4の機能を精査する必要があるだろう。

もう一つの重要なTRPV4活性化刺激として、温かい温度(> 27–34 °C)が挙げられる[24]。HC067047単独による薬理的なTRPV4抑制は、37 °Cで培養したOPCの増殖を抑制しなかったことから、in vitroでは温かい温度のみではOPCのTRPV4は開口しないことが示唆され

る。しかし、アラキドン酸代謝物などの他のリガンド刺激と体温との相乗効果で、OPCのTRPV4が開口する可能性はある。局所的な神経活動によって脳内局所温度が上昇するとの報告があり[41, 42]、活動が活発な神経の近くに存在するOPCは、より高い温度にさらされている可能性がある。従って、活動中の神経近傍のOPCのTRPV4は特に強く活性化されている可能性があり、これが神経活動依存的なOPCの増殖とその後の髄鞘形成に寄与する可能性がある。このように、TRPV4刺激はCNSの生理的または病態時の様々な条件下で、OPCの増殖を促進する可能性がある。

多くの研究で、OPCの増殖へのCa²⁺シグナリングの関与が報告されている[43, 44]。TRPC1を介した細胞外からのCa²⁺取り込みがOPCの増殖に重要であることが報告されている[21]。本章では、Ca²⁺シグナリングとPKC経路活性化がTRPV4を介したOPC増殖に関与することを示したが、これはPKC経路がOPC増殖に関与するという知見[45, 46]と一致した結果である。一方、電位依存性Ca²⁺チャネルからのCa²⁺流入は、OPCの遊走と分化を促進するという報告[18, 44]があり、本章のTRPV4を介したCa²⁺流入との結果の相違の理由は不明である。しかし、これらのチャネルは開口動態や流入させる細胞外Ca²⁺の量が異なるため、別のCa²⁺シグナリング経路が活性化している可能性があり、OPCのCa²⁺シグナリングについてはさらなる研究が必要であろう。

結論として、本章ではin vivoでOPCがTRPV4を発現し、初代培養OPCにおけるTRPV4刺激は増殖を促進することを示した。この新規知見は、脳内でTRPV4がOPC数の増加に関与する可能性を示している。

第二章 初代培養OPCにおけるTRPM3の機能的発現

OPCの増殖、遊走、分化は、様々な脳病態で変化する[47]。OPCは脳傷害に応答して迅速に増殖するが[48]、炎症的環境下では完全な髄鞘修復は阻害される[49]。脳血管障害では、OPCがサイトカイン等の分子を分泌し、保護的[7]または傷害的[50]な機能を持つことが報告されている。そのため、病態生理的条件下におけるOPCの機能制御機構を明らかにすることは、脳傷害治療法創出のために重要である。

第一章で論述したように、OPCの機能制御にはCa²⁺シグナリングが関与する。AMPA受容体からのCa²⁺流入は、遊走[51]や生存[52]に関与する他、L型電位依存性Ca²⁺チャネルCav1.2は髄鞘修復[53]や増殖と生存[54]を担う。OPCのCa²⁺シグナリングを理解することは機能制御につながるだろう。TRPチャネルを介したCa²⁺シグナリングの重要性は前章で述べた通りであるが、TRPC1[21]や前章で明らかにしたTRPV4以外のTRPチャネルのOPCにおける機能はほとんど分かっていない。そこで本章では、TRPチャネルの1つTRPM3に着目して機能解明を試みた。TRPM3は、視神経のオリゴデンドロサイトに高発現し、Oraiや他のTRPチャネルと同様にストア作動性Ca²⁺流入を担う[55]。さらに、分化したオリゴデンドロサイトはTRPM3を発現する[22]。一方で、OPCにおけるTRPM3の機能は未だ不明であった。TRPM3は、神経ステロイドの硫酸プレグネノロン(PS)[56]や、D-エリスロ-スフィンゴシン[57]、低浸透圧[58, 59]、温かい温度[60, 61]で開口する。TRPM3は脳で高発現し[62]、PSが惹起するTRPM3開口は、大脳皮質神経のグルタミン酸放出を促進し、グルタミン酸神経伝達に関与する[63, 64]。

本章では、TRPM3が*in vivo*および*in vitro*においてラットOPCに発現し、初代培養OPCにおいてPSによるTRPM3刺激はCa²⁺流入を惹起することを見出した。さらに、TRPM3は、エンドセリン-1 (ET-1)注入ラクナ脳梗塞モデルラットの脱髄病変部のOPCや、腫瘍壊死因子 α (TNF α)処置OPCにおいて高発現していた。これらの知見は、虚血脱髄病変部においてTRPM3が重要な役割を果たす可能性を示すものである。

実験方法

試薬

PSはSigma-Aldrichから、isosakuranetinはExtrasyntheseから、ヒトリコンビナント血管内皮細胞増殖因子(VEGF) 165 (100-20)とラットリコンビナントTNF α (400-14)とラットリコンビナントインターロイキン1 β (IL1 β ; 400-01B)はPeproTechから、その他の試薬はNacalai Tesqueから購入した。

初代培養OPC

初代培養OPCは、第一章で示した方法に軽微な変更を加えて作製した。より高純度のOPCを得るために、混合グリア細胞からのOPC単離の際のフラスコの振とう時間および速度を変更した。ミクログリア除去のための振とうは130–150 rpmで1.5時間、アストロサイト層からOPCを浮遊させる際の振とうは220–230 rpmで15–17時間行った。

RT-PCR

初代培養OPCからのRNAの抽出、RT-PCR、電気泳動は第一章で示した方法に従って行った。Rat Trpm3 cDNAのPCRに用いたプライマー配列は、5'-AGCAGTGGCCGGTAGGGTCC-3', 5'-GAGCTTGCAGGCCACCAGGG-3'で、94 °C 2分間反応後、94 °C 30 秒間、60 °C 30 秒間、72 °C 1 分間の反応を30サイクル行った。

蛍光Ca²⁺イメージング

蛍光Ca²⁺イメージングは、第一章で示した方法に軽微な修正を加えて行った。カバーガラス上で培養したOPCに、0.005% Cremophor EL (Sigma-Aldrich)含有Krebs-Ringer buffer (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 10 mM グルコース, 10 mM HEPES, pH 7.4に調整)中で希釈した5 μ M Fura 2-AMと45–55分間反応させた。蛍光画像は室温で2秒おきに撮影し、励起波長340 nm/蛍光波長510 nm (F340)で得た蛍光強度と、励起波長380 nm/蛍光波長510 nm (F380)で得た蛍光強度の比率 (F340/F380)を計算した。

スクラッチアッセイ

スクラッチアッセイは、第一章で示した方法に軽微な修正を加えて行った。70–80%コンフルエントに達した初代培養OPCの一部をセルスクレーパーで削り取り、PBSで2回洗浄後、PSまたは溶媒 (DMSO) を含む培地を加え、12–24時間培養後に画像撮影し、削り取った部位のOPC数を計測した。

定量的RT-PCR

定量的RT-PCRは、第一章で示した方法に従って行った。ラット18S rRNA、ラット*Pdgfra*、ラット*Mbp*のプライマーは、第一章と同じものを使用した。その他に使用したプライマーは、以下の通りである。ラット*Trpm3* (5' -AGGCCTCAAGGTAATTCTGG-3' , 5' -CGGCTCCTTCTCTTGGAGAT-3'), ラット *Actb* (beta-actin) (5' -TAAGGCCAACCGTGAAAAG-3' , 5' -TACATGGCTGGGGTGTTG-3'), ラット*Ldha* (lactate dehydrogenase A) (5' -TCCAGTGTGTAAGTCCATCG-3' , 5' -CATCATCCATATGCAGATCTTAC-3')。各遺伝子発現量は、低酸素実験では*Actb*、その他は18S rRNA発現量で補正した。

酸素欠乏実験

OPC播種3日後に、新しい増殖培地に交換し、Personal CO₂ Multi Gas Incubator (APM-30D; ASTEC, Fukuoka, Japan)を使用した37 °Cの低酸素条件下(2% O₂, 5% CO₂, 93% air)、または通常条件下(5% CO₂, 95% air)で12時間培養した。低酸素処置後直ちに、OPCからRNAを抽出した。2% O₂条件下では18S rRNA発現量が増加したため、発現量補正に用いる対照遺伝子として*Actb*を使用した。

ET-1局所注入

ET-1は、既報[65]に従って注入した。8週齢のSprague-Dawleyラットを麻酔し、脳定位台に固定した。ET-1溶液(200 pmol/L) 1 μLを一定速度(0.5 L/min)で、内包後脚(2.3 mm posterior and 6.1 mm lateral left to the bregma; depth, 3.7 mm; angle, 25°)に注入した。虚血傷害の形成が完了するモデル作製7日後に脳を回収した。脳切片は、既報[66]に従い、ルクソールファストブルー(LFB)染色により内包を可視化した。

FISHおよび免疫組織学的検討

FISHおよび免疫組織学的検討は、P4または12週齢ラットの冠状切片を用い、第一章の方法に従って行った。*Trpm3*と*Pdgfra*のcRNAリボプローブは既報[26, 60]で報告されたものを使用した。*Trpm3* FISHの後にNeuron-gial antigen 2 (NG2)を検出するために、抗NG2抗体(1:200, Millipore, Burlington, MA, U.S.A.)とAlexa Flour 564標識ヤギ抗ウサギIgG(1:2000)を用いた。*Trpm3*の検出には、アルカリホスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体(Roche)とnitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3'-indolyl phosphate (Roche)を用いた。

統計解析

全てのデータは平均値 ± 標準誤差で表示した。Student's t検定またはOne-way ANOVAの後にTukey検定を用いて、GraphPad Prism 5 で解析した。危険率5%未満の場合に統計学的な有意差があると判定した。

結果

P4および成体ラットのOPCでTRPM3が発現する

成熟オリゴデンドロサイトにおけるTRPM3が報告されている[22]。OPCにおけるTRPM3の発現を検討するため、P4と成体ラットのCTX（灰白質）とCC（脳梁）において、*Trpm3*と*Pdgfra*（OPCマーカー）をFISH法で検出した(図2-1)。P4ラットにおいて、ほとんどの*Pdgfra*陽性OPCは*Trpm3*を発現した（80%以上、矢頭）。CTXとCCで、*Trpm3*⁺/*Pdgfra*⁺細胞数に差は認められなかった。成体ラットのCTXとCCにおいても、ほとんどの*Pdgfra*陽性OPCは*Trpm3*を発現した（80%以上、矢頭）。これらの結果より、生体内のほとんどのOPCがTRPM3を発現することが示された。

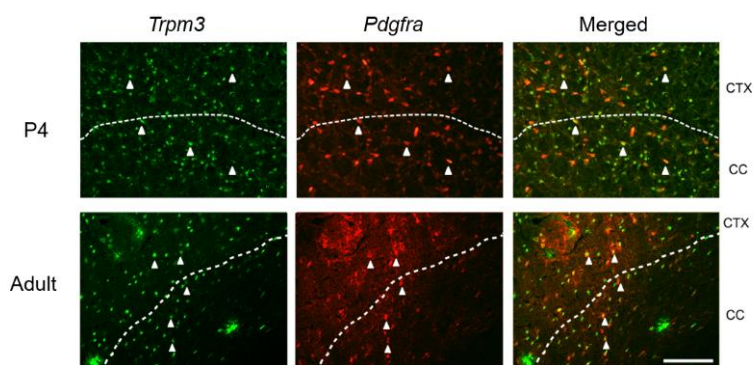


図2-1 生体内のOPCでTRPM3が発現する
P4または成体ラットのCTXとCCにおける*Trpm3*と*Pdgfra*のmRNA検出。破線はCTXとCCの境界を示す。矢頭は*Trpm3*⁺/*Pdgfra*⁺細胞を示す。スケールバーは200 μm を示す。

TRPM3は初代培養OPCにおいて機能的に発現する

続いて、ラット初代培養OPCにおいてもTRPM3が発現するか検討した。RT-PCRにおいて、TRPM3 mRNA発現が認められた(図2-2A)。このTRPM3が機能するかどうか検討するために、Fura 2-AMを用いた蛍光で、細胞内Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i)変化を測定した。TRPM3を直接活性化する神経ステロイドであるPSを処置すると、濃度依存的に[Ca²⁺]_iが増加した(図2-2B-D)。非選択的TRPチャネルブロッカーGd³⁺ (100 μM , 図2-2E)やTRPM3アンタゴニスト isosakuranetin [67] (10 μM , 図2-2F)は、ほぼ完全にPS (50 μM)刺激による細胞内Ca²⁺流入を阻害した。これらの結果より、TRPM3はラット培養OPCにおいて機能的に発現し、細胞外Ca²⁺取り込みに重要な役割を果たすことが示唆された。

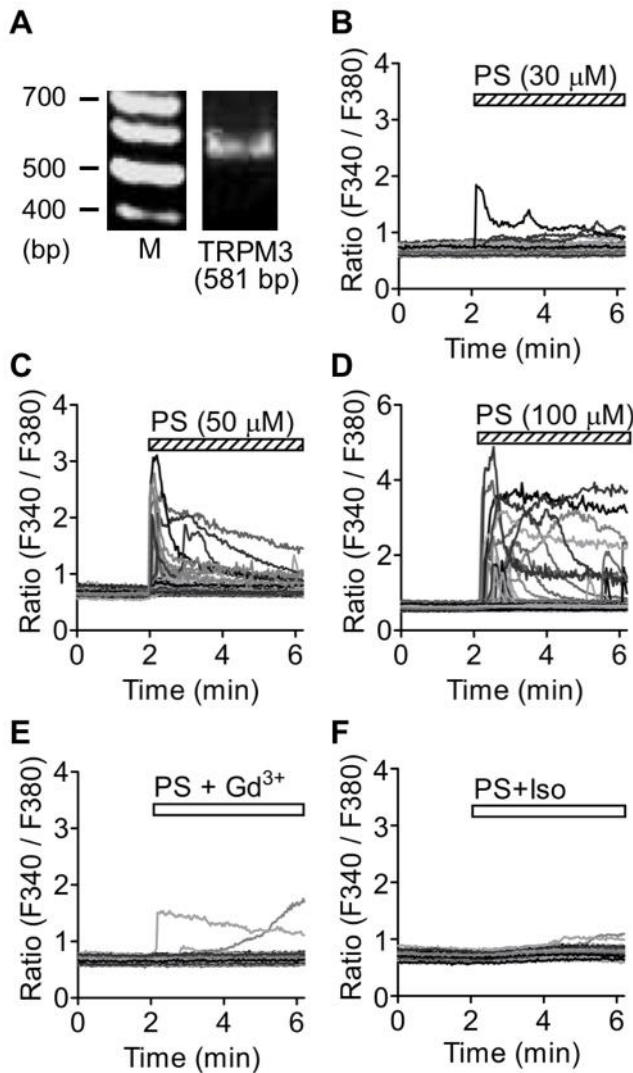


図2-2 初代培養OPCにおいてTRPM3が機能的に発現する

A. 初代培養OPCにおけるTRPM3のRT-PCR解析。マーカ(M)は100 bp DNAラダーを示す。

B-F. Fura 2-AMによる $[Ca^{2+}]_i$ 測定。

B-D. OPCに図示した濃度のPS (30-100 μ M)を処置した際の $[Ca^{2+}]_i$ 変化。

E. PS (50 μ M)と非選択的TRPチャンネル拮抗薬Gd³⁺ (100 μ M)を共処置した際の $[Ca^{2+}]_i$ 変化。

F. PS (50 μ M)と選択的TRPM3拮抗薬isosakuranetin (10 μ M, Iso)を共処置した際の $[Ca^{2+}]_i$ 変化。

TRPM3はOPCの遊走や分化に関与しない

次に、TRPM3のOPC分化に対する影響を検討した。PS (50 μ M)を含む増殖培地で48時間培養後、幼若OPCマーカー*Pdgfra* (図2-3A)や成熟オリゴデンドロサイトマーカー*Mbp* (図2-3B)のmRNA発現量に変化はなかった。分化培地で培養した細胞は、*Pdgfra*のネガティブコントロール、*Mbp*のポジティブコントロールとして用いた。従って、TRPM3活性化はOPCの分化に関与しないことが示唆された。

続いて、スクラッチ法でOPCの遊走に対するTRPM3活性化の影響を検討した。既報でOPCの遊走を促進することが報告されているVEGF-A [68]処置群では、24時間後に遊走したOPC数が増加した。一方、スクラッチ12, 24時間後いずれにおいても、PS処置による遊走したOPC数の変化は認められなかった(図2-3C-E)。したがって、TRPM3はOPCの遊走にも関与しないことが示唆された。

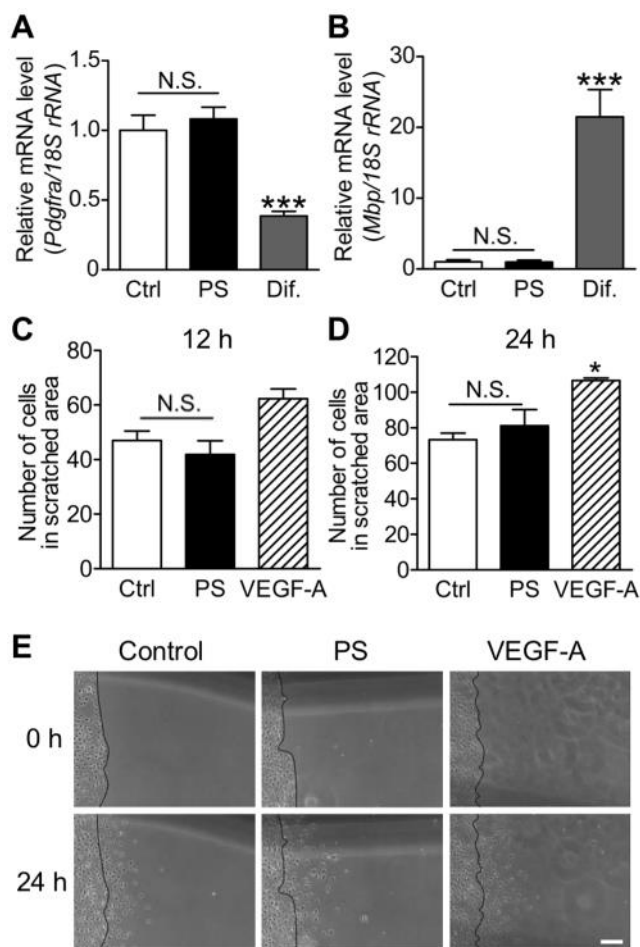


図2-3 PSによるTRPM3刺激は、OPCの分化や遊走に影響を与えない

A, B. OPCに対照増殖培地(Ctrl)、PS (50 μM)含有増殖培地、分化培地(Dif)を48時間処置し、*Pdgfra* (A)および*Mbp* (B)のmRNA発現量を定量的RT-PCRで測定した。*** $P < 0.001$ vs. Ctrl; $n = 8$.

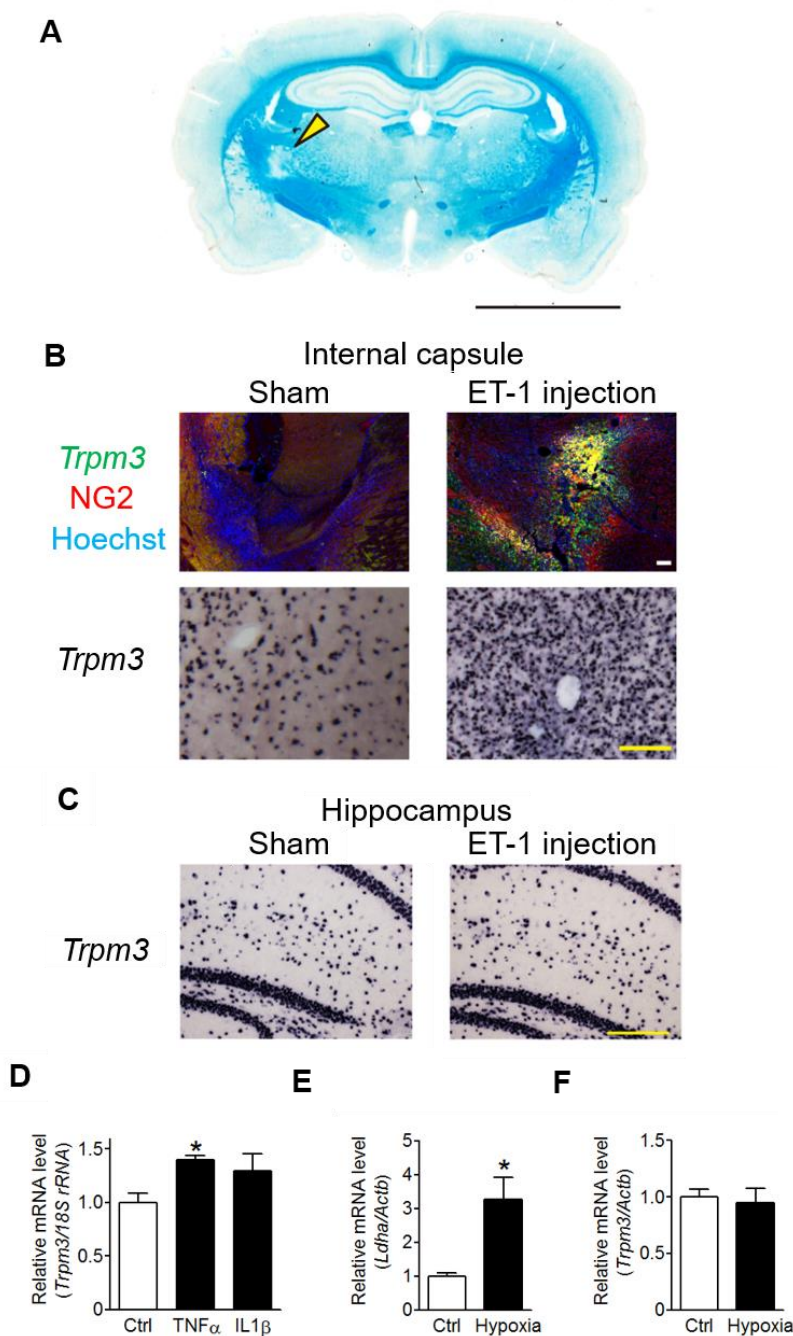
C-E. スクラッチアッセイによるOPCの遊走評価。スクラッチ後、PS (50 μM)またはVEGF-A (200 ng/mL)を処置し、24時間遊走させた。C. D. 12時間後(C)または24時間後(D)までにスクラッチ部位に遊走したOPC数。* $P < 0.05$ vs. Ctrl (24 h); $n = 3$. E. スクラッチ直後(上段)または24時間後(下段)の細胞の代表画像。黒線はスクラッチ部位の端を示す。スケールバーは100 μmを示す。

ET-1局所注入ラット脳梗塞モデルの脱髄部位においてTRPM3⁺OPCが増加する

最後に、OPCの病態生理学的役割を検討した。既報において、内包へのET-1局所注入によって顕著な脱髄が惹起され、注入7日後では脱髄部位近傍のOPCの増殖が増加することが報告されている[48]。このモデルの脱髄部位において、*Trpm3* mRNA発現が認められた。既報[48]の通り、注入7日後において、内包のNG2⁺OPC数はsham群と比較してET-1注入群において顕著に増加していた(図2-4A, B, 上段)。*Trpm3*シグナルのほとんどがNG2シグナルと共局在した。内包において、*Trpm3*⁺/NG2⁺細胞数がET-1注入群で顕著に増加した。一方、*Trpm3*⁺/NG2⁺細胞もET-1注入群で増加しており(図2-4B, 上段)、OPC以外の脳細胞または浸潤した免疫細胞においても、*Trpm3*発現が増加することが示唆された。FISH法では、ハレーションにより個々の細胞を見分けるのが困難なため、アルカリホスファターゼ標識 in situ ハイブリダイゼーションによる*Trpm3*検出も行った。*Trpm3*シグナル数は、ET-1注入群の内包で増加した(図2-4B, 下段)。一方、ET-1注入群の海馬では*Trpm3*シグナル数は変化しなかった(図2-4C)。

*Trpm3*発現上昇の機序を探るために、脳梗塞で発現が増加する炎症性サイトカインが*Trpm3*発現量に影響を与えるかどうか、ラット初代培養OPCで検討した。*Trpm3*発現量は、TNFα (30 ng/mL)処置で有意に増加し、IL1β (30 ng/mL)処置でも有意差はないものの増加傾

向が認められた(図2-4D)。続いて、低酸素が*Trpm3*発現量に与える影響を検討した。通常酸素条件下と比較して低酸素条件下(2% O₂)では、低酸素による発現誘導が報告されている乳酸デヒドロゲナーゼA (LDHA) [69]のmRNA発現量が増加した一方で(図2-4E)、*Trpm3*発現量は変化しなかった(図2-4F)。TNF α 処置による*Trpm3*発現上昇幅は小さいことから、ET-1注入群における顕著な*Trpm3*発現増加は、*Trpm3*⁺ OPC数の増加の寄与が大きいと考えられる。これらの結果から、TRPM3が脳梗塞モデルの炎症的環境下におけるOPCの何らかの機能の制御に関与する可能性が示された。



考察

本章では、ラットCTXとCCのPDGFR α ⁺ OPCおよび初代培養OPCにおいてTRPM3が発現し(図2-1, 2-2)、TRPM3アゴニストPS処置はCa²⁺流入を惹起する(図2-3)ことを示した。従って、OPCのTRPM3はCa²⁺シグナリングを担うことが示唆された。TRPM3は、成熟オリゴデンドロサイトで機能的に発現しているが[22, 55]、本章では幼若OPCにおけるTRPM3における機能的発現を示し、本チャンネルがオリゴデンドロサイト系譜細胞の早期から機能することが示唆された。

脳のTRPM3はPS、スフィンゴシン、低浸透圧、温かい温度で活性化される。PSは、脳で産生される神経ステロイドで、脳脊髄液中にナノモル濃度レベルで存在する[70]。本章の実験および既報[71]において、マイクロモル濃度レベルのPSがTRPM3活性化に必要であったが、PS濃度は局所的に、また、不安・うつ障害[72]や甲状腺機能亢進症[73]などの特定の疾患において増加する[71]ことが報告されている。プレグネノロンの硫酸化は、細胞質基質の硫酸転移酵素サブファミリーである、SULT2A1、SULT2B1a、SULT2B1bによって触媒される[74]。神経がコレステロールをプレグネノロンに変換し[75]、SULT2B1bを発現する[76]ことから、内在性PSはニューロンが産生しOPCのTRPM3を活性化する可能性がある。従って、OPCのTRPM3は、ニューロン-OPC間の相互作用に関わる重要な分子である可能性がある。さらに、*Trpm3*⁺ OPC数は脳梗塞モデルの脱髄部位で増加していた(図2-4)ことから、病変部の傷害を受けた神経がPSを産生してOPCのTRPM3を活性化する、という細胞間コミュニケーションが存在し、脳梗塞部位の細胞の挙動に影響を与えている可能性がある。

スフィンゴシンはTRPM3の内因性アクチベーターであり[57]、TRPM3を介して成熟オリゴデンドロサイトでCa²⁺流入を惹起する[22]。スフィンゴシンは、セラミダーゼによりセラミドから合成され、リン酸化を受けてスフィンゴシン-1-リン酸となる。脳梗塞においてセラミド、スフィンゴシン、スフィンゴシン-1-リン酸が増加することから[77]、OPCにおけるTRPM3は健常脳よりも脳梗塞部位において強く活性化される可能性がある。さらに、体温(30–40 °C) [60]や低浸透圧刺激(200–300 mOsM) [58]もTRPM3の開口を増加させることから、TRPM3の内因性アクチベーターとして知られている。このように多くの内因性アゴニストが存在するため、脳梗塞モデル脱髄部位のTRPM3発現増加はCa²⁺流入増加につながるだろう。

TRPM3には内因性の抑制機構も存在することが明らかとなってきた。TRPM3活性化は、Gタンパク質の $\beta\gamma$ サブユニット[78, 79]や、PLC活性化[78]によって抑制されることが報告されている。TRPM3とPDGFR β を両方発現するヒト胚性腎臓(HEK)細胞では、PDGF処置によるPLC γ 活性化を介して、PS刺激誘発TRPM3電流が抑制される[78]。本章で用いた培養OPCはPDGFR α を高発現し、Ca²⁺イメージングを除くほとんど全ての実験は、PDGF-AAを含む培地で行われた。PDGFによる強いPDGFR α 刺激がPLCを活性化し、PSによるTRPM3活性化

を抑制した可能性は十分に考えられる。PDGF-AAはOPCの細胞機能に重要な役割を果たすため、PDGF-AAを含まない培地での実験は行えなかったが、PDGF-AAによる抑制効果についてはさらなる検討が必要である。さらに、ET-1注入ラクナ梗塞モデルにおける*Pdgfb*発現増加が報告されている[80]ため、分泌されたPDGFが病変部におけるOPCに影響を与える可能性がある。また、脳の血管内皮細胞由来PDGF-BBは、OPCのPDGF-BB/PDGFR α シグナリングを介して血液脳関門の完全性を促進する[81]。TRPM3がPDGF-BBで抑制される[78]ことを考慮すると、ET-1注入部位におけるTRPM3の機能は限定的である可能性もある。病変部のOPCにおけるTRPM3とPDGF-BB/PDGFR α シグナリングの機能連関についてさらなる検討が必要であろう。

内包へのET-1注入は、ラクナ梗塞様の微小血管の収縮と白質傷害を惹起する[82]。ET-1注入群の脱髄部位では、OPCのほとんどでTRPM3を発現しており、OPC数が増加していた。TRPM3発現量はTNF α によって増加することを考えると、TRPM3は炎症部位のOPCのCa²⁺シグナリングを変化させる可能性がある。ET-1注入脳梗塞モデルでは、軸索は損傷しない[48]一方で、脱髄が起こる。従って、TRPM3の発現や開口を制御することは、OPCの正常な機能を促進し髄鞘修復を促進する治療法の開発につながる可能性がある。本章の*in vitro*のデータでは、TRPM3アゴニストPSは非炎症条件下においてOPCの分化や炎症を変化させなかった。TRPM3が脳梗塞モデルにおいて*Trpm3*⁺ OPC数が増えることから、TRPM3は増殖やサイトカイン産生などの何らかの細胞機能に寄与する可能性がある。OPCのTRPM3の病態生理学機能を明らかにするために、さらなる検討が必要である。

脱髄部位のOPCのTRPM3は、脳梗塞の病態にどのような影響を与えるだろうか。病変部の増殖中のOPCの一部はオリゴデンドロサイトに分化すると考えられている。OPCのL型Ca²⁺チャンネルCav1.2は、髄鞘修復を促進すると報告されている[53]ため、TRPM3を介したCa²⁺流入も髄鞘修復や脳梗塞からの回復を促進するかもしれない。TRPM3活性化は、増殖培地で培養したOPCの分化には影響を与えなかった。しかし、分化培地や、炎症性サイトカイン存在下では分化に関与する可能性があり、今後の検討課題となるだろう。また、驚くべきことにOPCは、脳傷害時にマトリックスメタプロテアーゼ9 (MMP9)を産生し血液脳関門を破綻させる[50]など、有害な機能も持ちうる。炎症性脱髄モデルにおいては、OPCは分化能を失い、その代わりに抗原提示能を獲得し炎症をさらに拡大させるという報告[83]もある。仮にOPCがTRPM3活性化によって有害な作用を持つ場合、TRPM3発現上昇は脳梗塞後の傷害増悪につながる可能性もある。Ca²⁺流入量の制御も、細胞の正常な機能に重要である。AMPA受容体は生理的にオリゴデンドロサイトの生存に重要であるが[52]、AMPA受容体からの過剰なCa²⁺流入は多発性硬化症モデルの脱髄を悪化させる[84]。脳梗塞モデルにおけるOPCのTRPM3発現上昇(図2-4)は、細胞内のCa²⁺ホメオスタシスを乱し、細胞機能異常につながる可能性がある。今後TRPM3KOマウスを用いた検証が必要だろう。

結論として、本章では、TRPM3が*in vivo*と*in vitro*においてOPCに機能的に発現することを示した。また、脳梗塞モデルの脱髄部位で増殖するOPCや、炎症性サイトカインTNF α を

処置した培養OPCにおいて、TRPM3発現量が増加した。OPCのTRPM3は脳傷害や炎症時に機能する可能性が示された。

第三章 自己免疫性脱髄病態におけるOPCの役割解明

多発性硬化症(MS)は、CNSの炎症性脱髄疾患であり、自己免疫性T細胞やマクロファージがCNSへ浸潤し、顕著な炎症と脱髄が起こる。抗原特異的なCD4⁺ T細胞はCNSにおいて抗原提示細胞により再活性化され[85]、クローン増殖し[86]、インターロイキン17A (IL17A)などの炎症性サイトカインを産生する。しかし、これらの末梢免疫細胞とCNS常在性細胞の相互作用はまだ十分に明らかになっていない。

OPCは、成熟オリゴデンドロサイトに分化するグリア細胞の一種であり、正常なCNSでは、髄鞘を形成するだけでなく、軸索への栄養供給をも担う[87]。ヒトにおいて、オリゴデンドロサイトの大部分は5歳までに産生され、年間0.3 %しか置き換わらない[88]。MS患者脳の¹⁴C解析の結果、ほとんどの患者では、髄鞘修復はOPCから新たに分化したオリゴデンドロサイトによってではなく、主に既存のオリゴデンドロサイトによって行われることが明らかとなった[89]。このことは、多くのOPCがオリゴデンドロサイトの補充以上の機能を担う可能性を示している。

いくつかのトランスクリプトーム解析[83, 90, 91]により、OPCはオリゴデンドロサイトへの分化以外の細胞機能を持つことが報告されている。MS患者や実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)マウスのOPCでは、フェノタイプが変化し、炎症関連分子の発現が上昇する[83, 90, 91]。しかし、幼若OPCが生体内でEAE病態に寄与するかどうかは未解明であり、特に末梢免疫細胞の浸潤や脱髄が開始するEAE急性期における機能は明らかになっていない。

そこで本章では、EAEにおけるOPCの機能を明らかにするために、ジフテリア毒素受容体(DTR)が*Pdgfra*プロモーター下流で誘導されるトランスジェニックマウスを用い、OPC除去を行った。PDGFR α はOPCの生存や増殖に関わる受容体型チロシンキナーゼである[92]。このシステムでは、ジフテリア毒素投与により、DTR発現細胞が除去される。本章の実験により、EAE急性期におけるOPC除去は、臨床症状を改善することを見出した。さらに、EAE病態におけるOPC除去によって、浸潤や増殖をしたCNSのT細胞数が減少することが明らかとなったため、詳細な検討を行った。

方法

実験動物

B6N.Cg-Tg(Pdgfra-cre/ERT)467Dbe/J (ジャクソン系統 #018280) と C57BL/6-Gt(ROSA)26Sortm1(HBEGF)Awai/J (ジャクソン系統 #007900) を交配し、*Pdgfra*^{CreER/+};*Rosa26*^{DTR/+} (Depl) と *Pdgfra*^{+/+};*Rosa26*^{DTR/+} (Ctrl) を得た。麻酔は、メドトミジン、ミダゾラム、ブトルファノールの3種混合麻酔を使用した。全実験は、京都大学動物実験委員会が定める倫理指針に従って行った。

PDGFR α ⁺細胞除去

コーン油(C8267, Sigma-Aldrich)に溶解したタモキシフェン(150 mg/kg/day, T5648, Sigma-Aldrich) と、生理食塩水に溶解したジフテリア毒素(2 μ g/kg/day, D0564, Sigma-Aldrich)を、*Pdgfra*^{CreER/+};*Rosa26*^{DTR/+} (Depl) と *Pdgfra*^{+/+};*Rosa26*^{DTR/+} (Ctrl) それぞれに腹腔内投与した。ナイーブマウス(図3-2)におけるOPC除去には、雄性および雌性の2-3カ月齢マウスを用いた。

EAE

能動免疫によるEAE誘導は、雌性7-11週齢マウスを用い、既報[93]の方法に軽微な変更を加えて行った。*Pdgfra*^{CreER/+};*Rosa26*^{DTR/+} (Depl) と *Pdgfra*^{+/+};*Rosa26*^{DTR/+} (Ctrl) に、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質ペプチド35-55 (MOG 35-55; Scrum) 200 μ g含有生理食塩水と、M-ツベルクローシスH37Ra (231141, BD Difco) 6 mg/ml含有完全フロイントアジュバント(231131, BD Difco)を1:1で混合して調製したエマルジョン200 μ lを皮下注射し免疫した。さらに、免疫日および免疫2日後に、17.5 μ g/kg百日咳毒素(P7208, Sigma-Aldrich)を腹腔内投与した。野生型マウスの免疫には、MOG 35-55 100 μ gと百日咳毒素10 μ g/kgを投与した。臨床スコアは、免疫10日目までは1日おき、それ以降は毎日、次のように評価した(0, 正常; 1, 尾の一部下垂; 2, 尾の完全下垂; 3, 後肢の部分麻痺; 4, 後肢の完全麻痺; 5, 前肢の麻痺)。EAE症状を免疫惹起14-28日後から示した個体のみ解析対象とした。強い頭の傾きを特徴とする非定型EAEを発症した個体は除外した。

血液検査

マウスに麻酔をかけ断頭し、全血をEDTA-2K入りチューブに回収した。血液サンプルは、サンリツセルコバ検査センター (Tokyo) に冷蔵輸送した。

定量的RT-PCR

EAE発症4日後に麻酔をかけ、PBSを経心灌流後、腰髄(L3-L5)、腸骨下リンパ節、脾臓を摘出した。総RNAは、ISOGENキット(Wako)を用いて抽出した。1本鎖相補cDNAは、

ReverTra Ace qPCR RTキット(Toyobo) を用いて調製した。定量的PCRは、StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems)およびTHUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (Toyobo)を用いて行った。使用したプライマーは以下の通りである。18S rRNA (5' - GCAATTATTCCTCCATGAACG-3' , 5' -GGCCTCACTAAACCATCCAA-3'), *Mbp* (5' - TGTACAAGGACTCACACACGA-3' , 5' -CTTCCCTTGGGATGGAGGTG-3'), *Cldn5* (5' - AGTTAAGGCACGGGTAGCAC-3' , 5' -CAACGATGTTGGCGAACCAG-3'), *Tjp1* (5' - GCTGCCTCGAACCTCTACTC-3' , 5' -ACTGCTTGGGCTCAGATGAC -3'), *Vcam1* (5' - TACTGTTTGCAGTCTCTCAAGC-3' , 5' -TCACCTTCGCGTTTGTAGTGGG-3'), *Icam1* (5' - AGCTCGGAGGATCACAAACG-3' , 5' -TCCAGCCGAGGACCATACAG-3'), *H2-D1* (5' - GTAAAGCGTGAAGACAGCTGC-3' , 5' -CTGAACCCAAGCTCACAGG-3'), *Gzmb* (5' - GTGCGGGGGACCCAAAGACCAAAC-3' , 5' -GCACGTGGAGGTGAACCATCCTTATAT-3'), *H2-Aa* (5' -AGCCTCTGTGGAGGTG-3' , 5' -TACTGGCCAATGTCTC-3'), *Cd74* (5' - CTGGATGAAGCAGTGGCTCT-3' , 5' -CCCAGGCCAGAAGATAGGTC-3'), *Cd40lg* (5' - GGATAAGGTCTGAAGAGGAAGTAA-3' , 5' -CGTTATATCCTTGACAAGGTCTT-3'), *Tbet* (5' -CGGAGCGGACCAACAGCATCGTTTC-3' , 5' -CAGGGTAGCCATCCACGGGCGGGT-3'), *Gata3* (5' -GGCAGAACCGGCCCTTATC-3' , 5' -TGGTCTGACAGTTCGCGCAG-3'), *Rorc* (5' -GACAGGGAGCCAAGTTCTCA-3' , 5' -CTTGTCCCCACAGATCTTGCA-3'), *Foxp3* (5' -CCTGGTTGTGAGAAGGTCTTCG-3' , 5' -TGCTCCAGAGACTGCACCACTT-3'). PCR反応は、95 °C 10分間の後、95 °C 15秒間、60 °C 60秒間を40サイクル行った。各遺伝子発現量は18S rRNA発現量で補正した。

免疫組織化学的検討

マウスに麻酔をかけ、PBSと4 % PFAを経心灌流後、腰髄(L3-L5)を摘出し、4 % PFA中で3時間後固定した。15 %スクロース中で静置後、OCTコンパウンドに包埋して-80 °C で凍結保存し、cryomicrotome (Leica)で20 μmの冠状切片を作製した。切片は、0.1 % Triton X-100含有PBSで透過化処理後、3 %ウシ血清アルブミンおよび0.1 % Triton X-100含有PBSでブロッキングを行った。1次抗体は、以下のものを使用し、4 °C で1晩反応させた。

抗PDGFR α 抗体(AF1062-SP, ヤギIgG, 1:250; R&D Systems)、抗GFAP抗体(ab7260, ウサギIgG, 1:200; Abcam)、抗CD31抗体(553370, ラットIgG, 1:200; BD Biosciences)、抗CD3抗体(555273, ラットIgG, 1:200; BD Biosciences)、抗IL17抗体(NBP1-76337, ウサギIgG, 1:150; Novus Biologicals)、抗Iba1抗体(019-19741, ウサギIgG, 1:200; Wako Pure Chemical Industries)、抗MHCクラスII (556999, ラットIgG, 1:50; BD Biosciences)、抗collagen I抗体(ab21286, ウサギIgG, 1:250; Abcam)、抗CD45抗体(AF114-SP, ヤギIgG, 1:50; R&D Systems)、抗CD11c抗体(14-0114-82, アルメニアンハムスターIgG, 1:50; eBioscience)。洗浄後、以下の蛍光標識2次抗体を室温で1.5時間反応させた。Alexa Fluor 488標識ロバ抗ウサギIgG (1:500; A21206, Invitrogen)、Alexa Fluor 488標識抗ラットIgG (1:500; A21208, Invitrogen)、Alexa Fluor 594標識ロバ抗ヤギIgG

(1:300; A11058, Invitrogen)、Alexa Fluor 594標識抗ウサギIgG (1:500; A21207, Invitrogen)、DyLight 594標識ヤギ抗アルメニアンハムスターIgG (1:200; 405512, BioLegend)、Alexa Fluor 647標識ロバ抗ウサギIgG (1:500; A31573, Invitrogen). 画像は、FluoView FV10i共焦点顕微鏡 (Olympus)で撮影した。白質の0.08 mm²の領域内のPDGFR α ⁺細胞数、画像内のCD3⁺またはCD3⁺IL17A⁺細胞数、白質のGFAP⁻, CD31⁻, Iba1⁻, MHCクラスII-蛍光シグナル強度は、ImageJソフトウェアを用いて定量した。

フルオロミエリン染色

脱髄は、既報[94]に軽微な変更を加えて評価した。厚さ20 μ mの凍結脊髄冠状切片は、FluoroMyelin green fluorescent myelin stain (1:1000, Invitrogen)で染色し、DAPI Fluoromount-G (Southern Biotech)で封入した。脱髄部位と白質の全領域の面積は、ImageJソフトウェアで定量した。脱髄割合は、次式で計算した。

脱髄部位(%) = (白質の脱髄部位面積) / (白質総面積) \times 100 (%)

統計解析

全てのデータは平均値 \pm 標準誤差で表示した。統計解析には、GraphPad Prism 9を使用した。用いた統計解析や例数についての詳細は各図のレジェンドに記載している。対照群と1つの実験群との比較には、unpaired Student's t検定またはWelch's t検定を用いた。また適宜、two-way ANOVAの後にBonferroni法を用いた。危険率5%未満の場合に統計学的な有意差があると判定した。

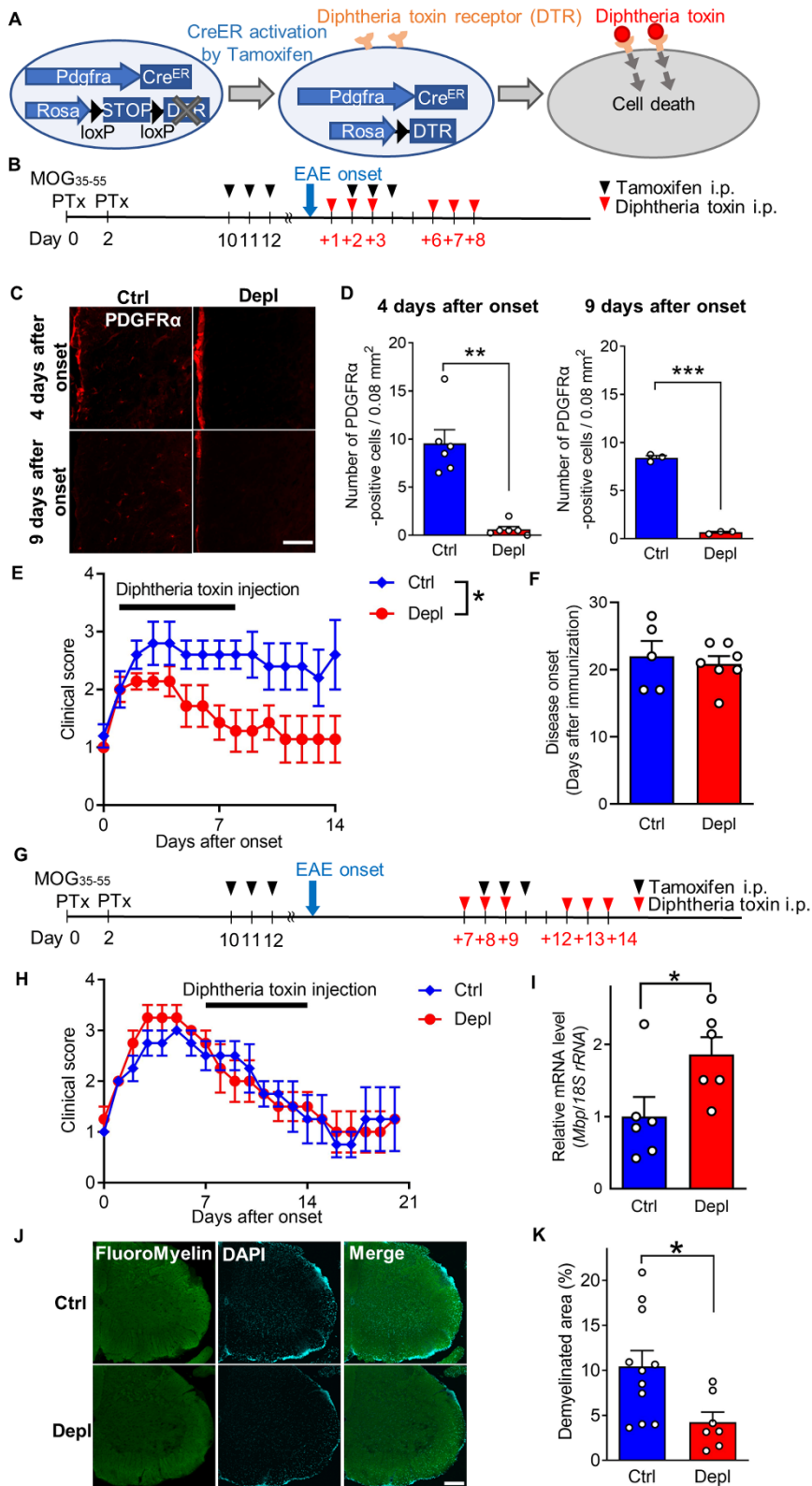
結果

EAE急性期のPDGFR α ⁺ OPC除去は臨床スコアと脱髄を改善する

OPC除去には、トランスジェニックマウス *Pdgfra*^{CreER/+};*Rosa26*^{DTR/+} (Depl) を使用した。このマウスでは、タモキシフェン投与によりPDGFR α ⁺細胞特異的にCreERが活性化し、ジフテリア毒素受容体(DTR)が発現する。そこへジフテリア毒素を投与すると、PDGFR α ⁺細胞が除去される(図3-1A)。対照群には、*Pdgfra*^{+/+};*Rosa26*^{DTR/+} (Ctrl) を使用した。PDGFR α ⁺ OPCから分化した成熟オリゴデンドロサイトの除去を防ぐために、タモキシフェン投与はEAEモデル作製10日後から開始した。ジフテリア毒素投与は、EAE発症日の翌日から投与した(図3-1B)。EAE発症4日後と9日後に、脊髄のPDGFR α ⁺ OPCの除去を免疫染色によって確かめた(図3-1C, D)。OPC除去群においてEAE臨床スコアが有意に抑制された一方(図3-1E)、EAE発症日は群間で差が認められなかった(図3-1F)。EAE発症7日後からの除去では、臨床スコアに差が認められなかった(図3-1G, H)ことから、OPCはEAE慢性期ではなく、急性期において病態悪化に関与することが示唆された。EAE急性期におけるOPC除去後の症状改善と相関して、OPC除去群において髄鞘タンパク質*Mbp*のmRNA発現量が有意に増加した(図3-1I)。白質の脱髄面積割合は、OPC除去群において有意に減少した(図3-1J, K)。

図3-1 EAE急性期におけるOPC除去により臨床スコアと脱髄が抑制される (図は次頁)

- A. *Pdgfra*^{CreER/+};*Rosa26*^{DTR/+}マウスにおけるCreER活性化によるDTR発現と、ジフテリア毒素投与によるPDGFR α ⁺細胞除去の模式図。
- B. EAE急性期におけるOPC除去のための、EAE免疫惹起、タモキシフェンとジフテリア毒素の腹腔内投与のタイムコース。
- C, D. 脊髄腰髄における発症4日後および9日後のPDGFR α 免疫染色の代表画像(C)および0.08 mm²内のPDGFR α 陽性細胞数定量(D)。スケールバー100 μ m。発症4日後はn = 6、発症9日後はn = 3。発症4日後はUnpaired Welch's *t*検定、発症9日後はunpaired Student's *t*検定を用いた。
- E. EAE急性期のOPC除去における、EAE発症後のEAE臨床スコア。n = 5-7. two-way ANOVAの後にBonferroni法を用いた。
- F. EAE免疫惹起からEAE発症までの日数。n = 5-7. Unpaired Student's *t*検定を用いた。
- G. EAE慢性期のOPC除去のタイムコース。
- H. EAE慢性期のOPC除去における、EAE発症後のEAE臨床スコア。n = 4。
- I-K. EAE急性期にOPC除去を行い、発症4日後(ジフテリア毒素3回投与後)に脊髄を回収した。I. 定量的RT-PCRによる*Mbp* mRNA発現量測定。n = 6. Unpaired Student's *t*検定を用いた。J, K. フルオロミエリン染色(髄鞘化された領域)とDAPI染色(細胞核)の代表画像(J)および、脊髄白質に占める脱髄部位面積割合の定量(K)。スケールバーは200 μ mを示す。n = 7-11. Unpaired Student's *t*検定を用いた。
- **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001.



また、末梢血中の血球数はナイーブマウスにおけるOPC除去によって変化せず(図3-2A-D)、この除去プロトコルでは、末梢免疫細胞は影響を受けないことが示唆された。PDGFR α は、コラーゲン発現線維芽細胞でも発現が報告されているが[95]、既報[95, 96]と一致して、collagen I⁺PDGFR α ⁺線維芽細胞は慢性期病変部において観察された(図3-3)。急性期病変部では、collagen I⁺細胞数が少なく、PDGFR α ⁺細胞はほとんどがcollagen I⁻ OPCであった(図3-3)。これらの結果より、EAE急性期におけるOPC除去は、EAE症状と脱髄を改善することが示された。

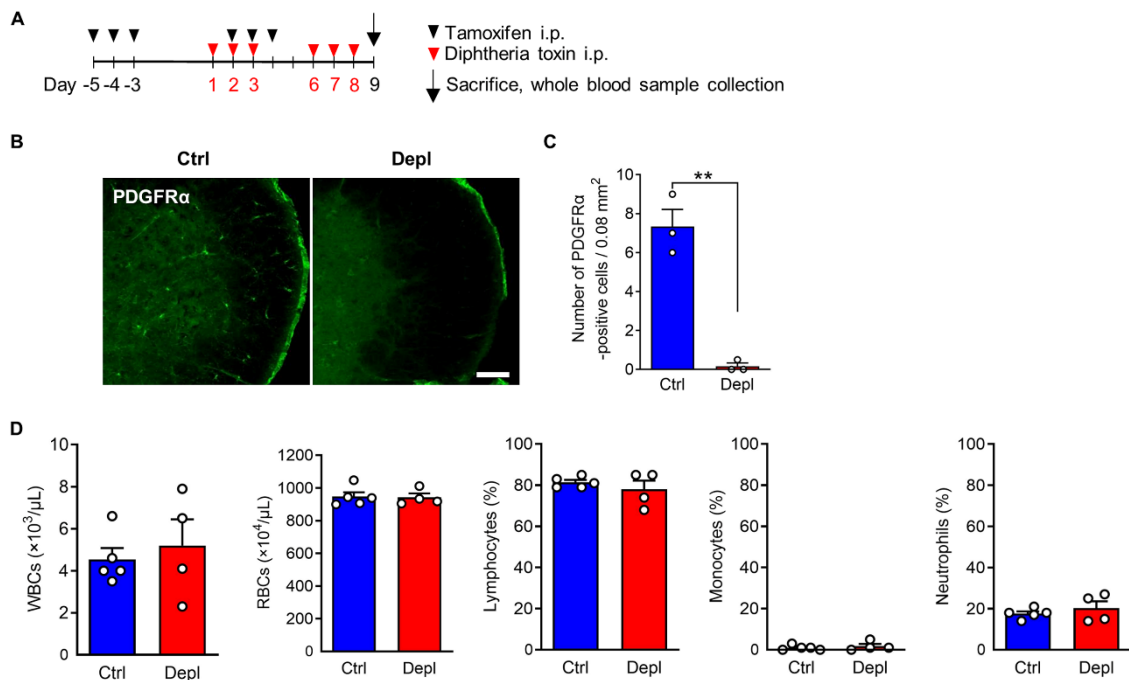


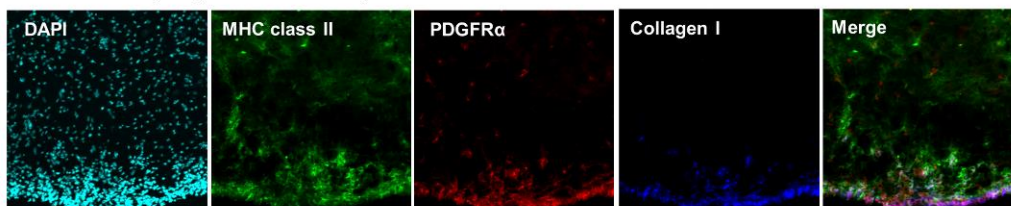
図3-2 ナイーブマウスにおけるOPC除去は末梢血の血球構成に影響を与えない

A. ナイーブマウスにおけるOPC除去のタイムコース

B, C. Day9脊椎腰髄におけるPDGFR α 免疫染色の代表画像(B)および0.08 mm²内のPDGFR α 陽性細胞数定量(C)。スケールバーは100 μ mを示す。n = 3. Unpaired Student's *t*検定を用いた。

D. Day9における全血中の白血球(WBCs)、赤血球(RBCs)、白血球に占めるリンパ球、単球、好中球の割合。n = 4-5 mice. リンパ球のみUnpaired Welch's *t*検定、その他はUnpaired Student's *t*検定を用いた。

Chronic lesion (8 days after EAE onset)



Acute lesion (2 days after EAE onset)

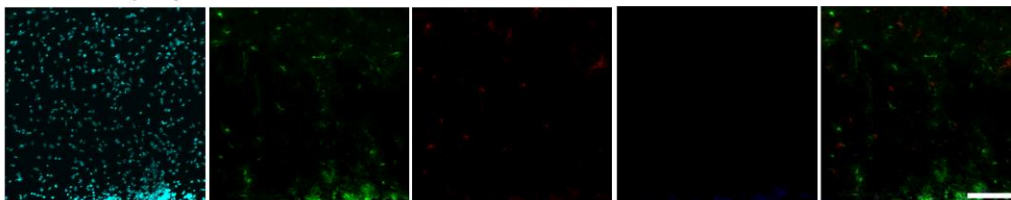


図3-3 PDGFR α は主にOPCで発現するが、EAE慢性期では線維芽細胞でも発現する野生型EAEマウス慢性期（発症8日後、上段）と野生型EAEマウス急性期（発症2日後、下段）の脊髄白質におけるMHCクラスII, PDGFR α , collagen Iの免疫染色。スケールバーは100 μ mを示す。

主要組織適合遺伝子複合体(MHC)クラスIIを介する抗原提示がOPC除去群で低下する

OPC除去によるEAE改善の機序を探るために、EAE発症4日後の脊髄において、免疫染色と定量的リアルタイムPCRによる検討を行った。アストロサイトは、CNSに最も豊富に存在する細胞であり、炎症性サイトカイン産生を介して炎症を惹起する。しかし、白質におけるアストロサイトマーカーGFAPの蛍光強度は、群間で差が認められなかった(図3-4A, B)。末梢免疫細胞は、破綻した血液脳関門や血液脊髄関門からCNSに浸潤し、血管内皮細胞上の接着因子と相互作用する。OPCの一部は血管内皮細胞の近傍に存在し、MSや脳梗塞モデルにおいて血液脳関門/血液脊髄関門の破綻に関与することが示唆されている[50, 97, 98]。しかし、血管内皮細胞マーカータンパク質であるCD31の発現量(図3-4C, D)や、タイトジャンクションタンパク質*Cldn5*や*Tjp1* (図3-4E, F)、接着因子*Vcam1*や*Icam1*(図3-4G, H)のmRNA発現量は、OPC除去による差は認められなかった。これらの結果より、OPC除去は、アストロサイト活性化や血液脊髄関門の機能に影響を与えないことが示唆された。

病原性CD4⁺およびCD8⁺ T細胞は、EAEに重要な役割を果たす。末梢で活性化されたT細胞が脳炎を惹起するには、CNSで再活性化を受ける必要がある[99]。CD8⁺ T細胞の活性化に関与するMHC-I遺伝子H2-D1や、CD8⁺ T細胞から放出される細胞傷害性セリンプロテアーゼであるグランザイムB (*Gzmb*)の発現量は、群間で差が認められなかった(図3-4I, J)。一方、MHCクラスII遺伝子H2-Aaや、MHCクラスIIシャペロン*Cd74*はOPC除去群で減少した(図3-4K, L)。腸骨下リンパ節と脾臓ではH2-Aa発現量は変化しなかったため、抗原提示はCNSで選択的に低下していることが示唆された(図3-4M, N)。これらのデータから、OPC除去により、脊髄においてMHCクラスIIを介する抗原提示が抑制されることが示唆された。

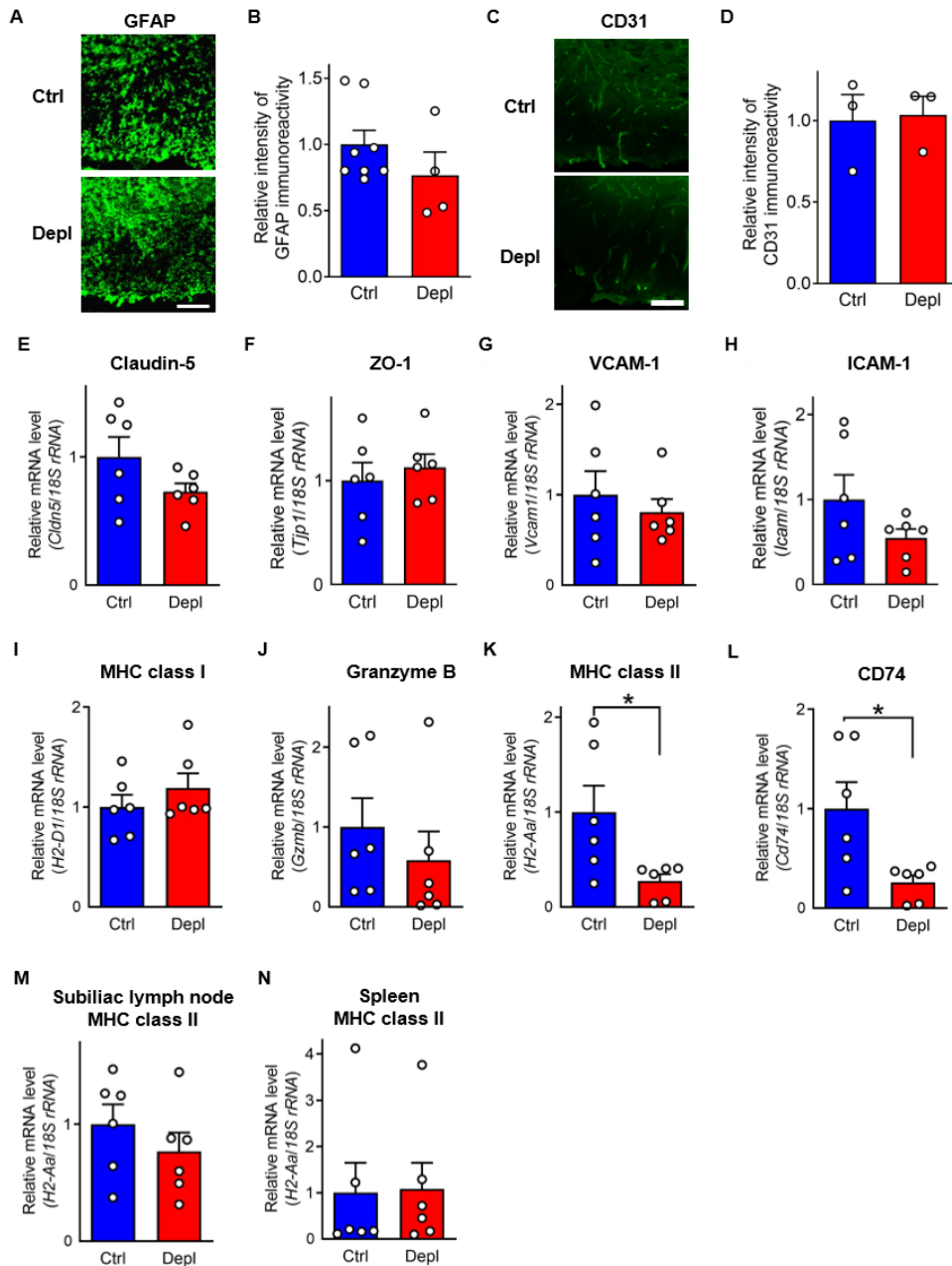


図3-4 EAE急性期におけるOPC除去は、アストロサイトマーカーと血液脊髄関門関連因子には影響を与えない一方で、MHCクラスII発現量を低下させる

A, B. EAE発症4日後脊髄におけるGFAPの免疫染色の代表画像(A)と白質の蛍光強度定量(B)。スケールバー100 μ m。n = 4–8。Unpaired Student's *t*検定。

C, D. EAE発症4日後脊髄におけるCD31の免疫染色の代表画像(C)と白質の蛍光強度定量(D)。スケールバー100 μ m。n = 3。Unpaired Student's *t*検定。

E–L. EAE発症4日後脊髄における*Cldn5* (E), *Tjp1* (F), *Vcam1* (G), *Icam1* (H), MHC-I遺伝子*H2-D1* (I), *Gzmb* (J), MHC class II遺伝子*H2-Aa* (K), *Cd74* (L) mRNAの定量的RT-PCRによる測定。n = 6。

Unpaired Student's *t*検定(E, F, G, I, J) またはUnpaired Welch's *t*検定(H, K, L)。

M, N. EAE発症4日後腸骨下リンパ節(M)および脾臓(N)におけるMHC class II遺伝子*H2-Aa* mRNA発現量。n = 6 mice。Unpaired Student's *t*検定。

**P* < 0.05。

OPC除去はTh17細胞とエフェクターサイトカイン産生抑制に関与する

MHCクラスIIを介する抗原提示の低下と相関して、活性化CD4⁺ T細胞に高発現する*Cd40lg* (CD40L/CD154)発現量が、OPC除去群の脊髄で有意に低下した(図3-5A)。一方、腸骨下リンパ節においては*Cd40lg*発現量に差は認められなかった(図3-5B)。続いて、CD4⁺ T細胞サブセットマーカーTbet (Th1)、Gata3 (Th2)、Rorc (Th17)、Foxp3 (Treg)の発現量を脊髄で解析した。Th17マーカー発現量は、有意差はないものの、OPC除去群で低下傾向が認められた(図3-5C)。腸骨下リンパ節と脾臓においては、どのサブセットマーカーも変化がなく、末梢でのCD4⁺ T細胞のプライミングには差がないことが示唆された(図3-5D, E)。そこで、IL17産生細胞に注目し、免疫染色によりさらなる検討を行った。脊髄におけるCD3⁺ T細胞や、CD3⁺IL17⁺ Th17細胞数は、OPC除去群で低下した(図3-5F-H)。一方、CD3⁺全細胞数に対するCD3⁺IL17⁺細胞の割合には、群間で差が認められなかった(図3-5I)。

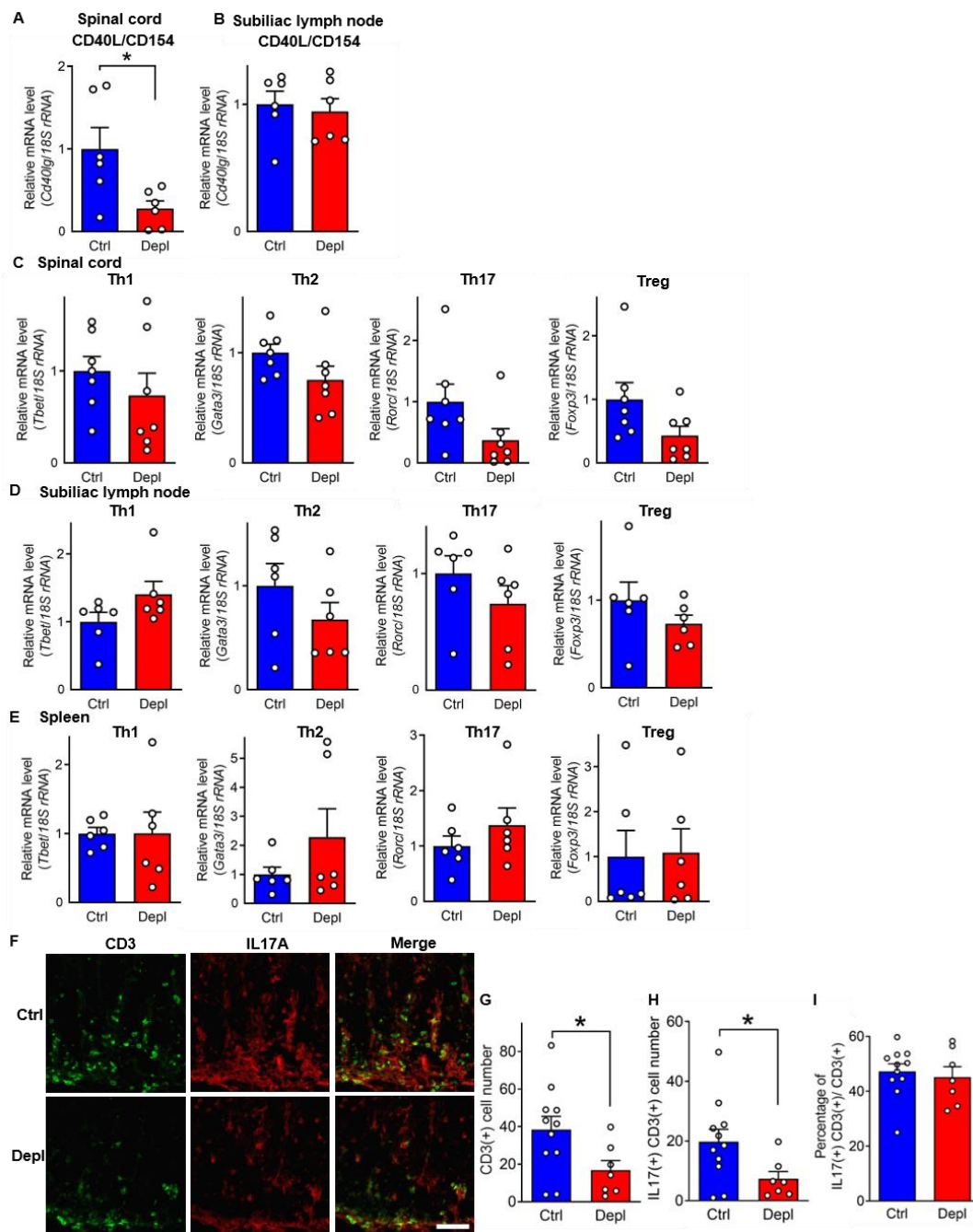


図3-5 EAE急性期におけるOPC除去により、脊髄の病原性T細胞が減少する

A, B. EAE発症4日後脊髄(A)および腸骨下リンパ節(B)における*Cd40lg* mRNAの定量的RT-PCRによる解析。n = 6. Unpaired Welch's *t*検定。

C. EAE発症4日後脊髄におけるThサブセットマーカー*Tbet* (Th1), *Gata3* (Th2), *Rorc* (Th17), *Foxp3* (Treg) mRNAの定量的RT-PCRによる解析。n = 7. Unpaired Student's *t*検定。

D, E. EAE発症4日後の腸骨下リンパ節(D)および脾臓(E)におけるThサブセットマーカー*Tbet* (Th1), *Gata3* (Th2), *Rorc* (Th17), *Foxp3* (Treg) mRNAの定量的RT-PCRによる解析。n = 6. 脾臓の*Tbet*と*Gata3*はUnpaired Welch's *t*検定、その他はUnpaired Student's *t*検定を用いた。

F-I. EAE発症4日後脊髄におけるCD3とIL17Aの共染色の代表画像(F)およびCD3⁺細胞数の定量(G)、CD3⁺IL17⁺細胞数の定量(H)、全CD3⁺細胞数に占めるCD3⁺IL17⁺細胞数の割合(I)。スケールバーは50 μmを示す。n = 7-11. Unpaired Student's *t*検定。**P* < 0.05.

マクロファージ活性化抑制がOPC除去マウスにおけるEAE病態改善に関与する

OPC除去群における脊髄のT細胞数減少(図3-5)は、MHCクラスII発現低下(図3-2K)を介する可能性がある。そこで、変化に関与する細胞種を調べたところ、MHCクラスIIは主に脊髄病変部のIba1⁺細胞が発現していた(図3-6A)。Iba1の蛍光強度は群間で有意差が認められなかった一方(図3-6B)、MHCクラスIIの蛍光強度はOPC除去群で低下することが確認された(図3-6C)。既報では、OPCにおけるMHCクラスII発現が報告されているが[90, 100]、野生型EAEマウス脊髄において、PDGFR α ⁺ MHCクラスII⁺細胞は認められなかった(図3-3)。しかし、MHCクラスII⁺細胞の近傍に位置するPDGFR α ⁺細胞が認められたことから(図3-3)、これらの細胞が相互作用をしている可能性もある。Iba1⁺ MHCクラスII⁺細胞の性質をさらに調べるために、野生型EAEマウスで細胞種特異的マーカーの発現を検討した。まず、野生型マウスにおいてもMHCクラスIIがIba1⁺細胞で発現することを確認した(図3-6D)。病変部のIba1⁺ MHCクラスII⁺細胞はCD45を高発現したが、病変辺縁部のIba1⁺細胞はほとんどがMHCクラスII⁺でCD45を低発現していた(図3-6D)。ミクログリアはCD45^{low}、マクロファージはCD45^{high}であることが知られているため、病変部のIba1⁺ MHCクラスII⁺細胞はマクロファージである可能性が高い。このIba1⁺ MHCクラスII⁺細胞は、CD11cも発現しており(図3-6E)、単球由来の抗原提示細胞はCD11cも共発現するという既報[101]と一致した結果である。これらの結果より、マクロファージにおけるMHCクラスII発現が脊髄のOPC除去マウスにおいて減少し、T細胞やTh17細胞のクローン増殖減少に寄与している可能性がある。

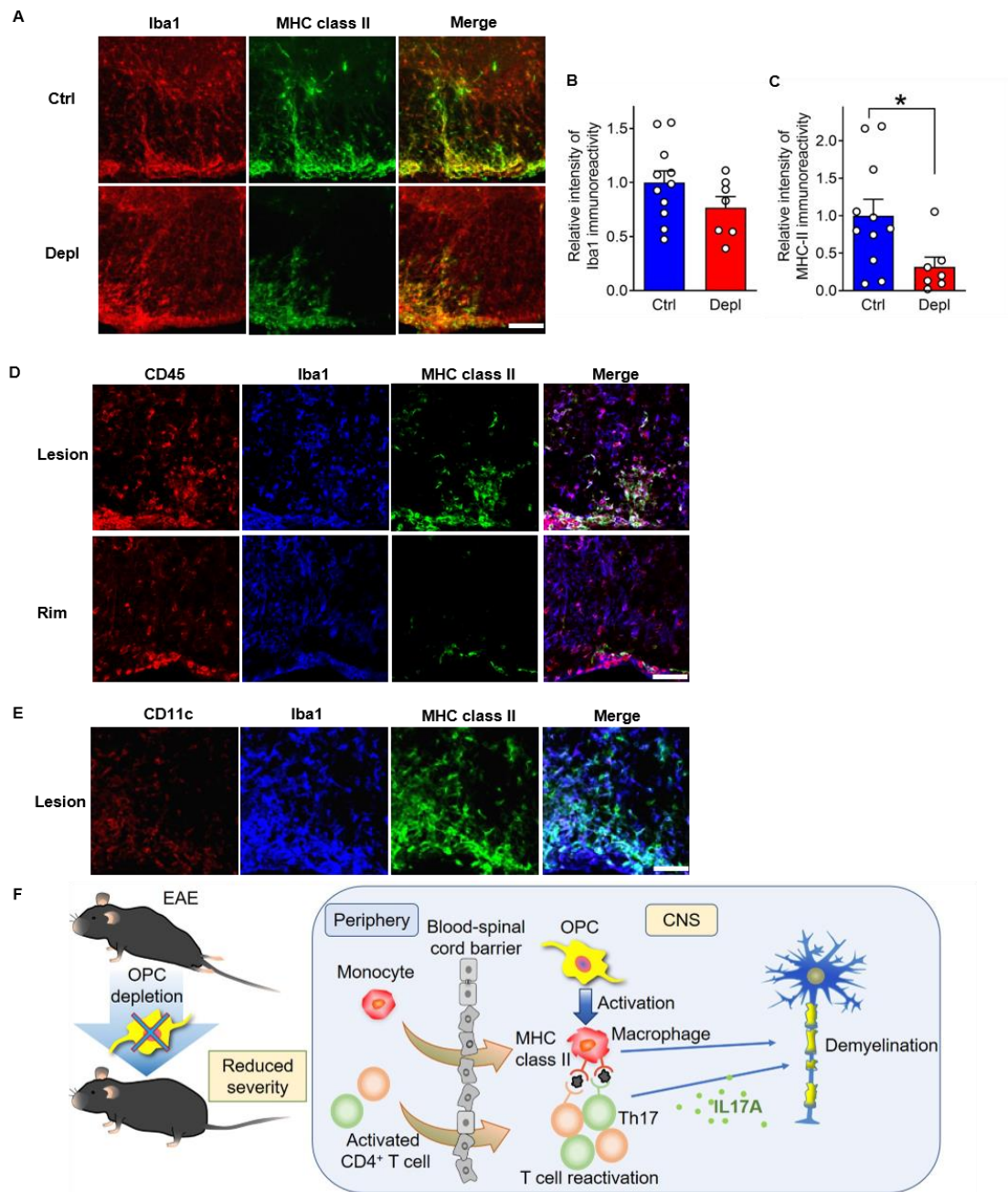


図3-6 EAE急性期におけるOPC除去により、マクロファージにおけるMHCクラスII発現が減少する
 A–C. EAE発症4日後脊髄におけるIba1とMHCクラスIIの免疫染色の代表画像(A)および、脊髄白質におけるIba1 (B)とMHCクラスII(C)の蛍光強度。スケールバー100 μm . $n = 7-11$. Unpaired Student's t 検定。
 $*P < 0.05$.

D. 野生型EAEマウス急性期（発症2日後）の脊髄白質病変部と周辺部におけるCD45, Iba1, MHCクラスIIの免疫染色画像。スケールバーは50 μm を示す。

E. 野生型EAEマウス急性期（発症2日後）の脊髄白質病変部におけるCD11c, Iba1, MHCクラスIIの免疫染色画像。スケールバーは50 μm を示す。

F. 本章の総括。PDGFR α^+ OPCはEAE急性期の病態増悪に関与する。CNSにおいてOPCは浸潤したマクロファージの活性化を促進する。マクロファージは髄鞘を直接傷害する[102]だけでなく、MHCクラスIIを介して抗原提示を行い、T細胞やTh17の増殖を促進する。Th17が産生するIL17Aなどのサイトカインは、さらなる神経炎症と、オリゴデンドロサイト傷害による脱髄を引き起こす。

考察

本章では、EAE急性期におけるPDGFR α ⁺ OPC除去は、臨床スコアを改善し、脊髄のT細胞数を減少させることを見出し、EAEにおいてOPCが病態増悪に関与することが示唆された。OPCは髄鞘修復に寄与する成熟オリゴデンドロサイトの元となる細胞であるが、当初の予想に反し、EAE急性期におけるOPC除去は脱髄を惹起しないどころか、脱髄を抑制した。OPC除去マウスの脊髄におけるT細胞減少は、マクロファージが発現するMHCクラスII減少と相関していたため、EAEの脊髄実質では、OPCが抗原提示マクロファージによるT細胞再活性化に関わる可能性がある。

今回の実験では、OPCの長期的な機能ではなく、EAE発症後の短期における未分化OPCの役割に着目した。生後45日の健康な成体マウスにおける細胞運命追跡実験において、PDGFR α ⁺ OPCの70%が髄鞘形成オリゴデンドロサイトに分化するには、2ヶ月以上かかることが示唆されているが[103]、それと比較し本研究の実験タイムコースは短期である。OPC除去をより長期間行ったり、より早期にタモキシフェン投与を行ったりすれば、成熟オリゴデンドロサイトの数が減少し、髄鞘修復が抑制され、EAEに及ぼす結果も逆になった可能性がある。しかし、EAE急性期においてOPCが免疫機能を制御し、病態促進的に働くことを示唆する今回の結果は、EAE病態におけるOPCの重要な機能についての知見を提供するものである。

EAE慢性期におけるOPC除去は臨床スコアに影響を与えなかった(図3-1)。慢性期ではCNSへの大量の免疫細胞の浸潤が既に起こっており、OPCは既存の炎症には影響を与えないことが推察される。MS患者の研究で、MSの病期によってOPCの性質が異なることが報告されている。早期のMSではOPC数が増加する一方、進行型MS患者の慢性脱髄病変部ではOPCプールが減少する[104]。再発寛解型MS患者の脳脊髄液を処置した培養OPCでは核内因子 κ B (NF- κ B)や炎症性サイトカイン発現量が増加する一方、進行型MS患者の脳脊髄液処置では炎症関連因子の発現量は有意に低かった[100]。これらの研究は、MS急性期と比べてMS慢性期においては、OPCの活性化が抑制されていることを示しており、OPCの機能を回復させる戦略が治療法として有用である可能性がある。しかし、本章の実験で用いたEAEは進行型MSのモデルではないため、進行型MSにおけるOPCの役割についてはさらなる研究が必要である。

OPC除去でEAE急性期の脱髄が抑制されたのはなぜだろうか？ OPC除去マウスの脊髄では、マクロファージで主に発現するMHCクラスIIが減少していることを示した(図3-6)。マクロファージは、単球から由来し、髄鞘を直接貪食して脱髄を開始させる[102]だけでなく、抗原提示や炎症性サイトカイン産生などを行う[105]。MHCクラスIIを介した抗原提示は、CNSにおけるT細胞の再活性化や増殖に重要である[85]。近年、*Cx3cr1*^{CreERT2}や*Cx3cr1*^{CreER}マウスを用いた実験によって、CNSにおけるMHCクラスII依存的な抗原提示は、ミクログリアや境界関連マクロファージではなく、骨髄由来細胞によって行われることが明らかとな

った[106, 107]。骨髄由来マクロファージと骨髄由来樹状細胞はこのシステムでは判別できないため[106]、どちらも抗原提示細胞として機能する可能性がある。本章では、Iba1⁺MHCクラスII⁺マクロファージは、CD11cも共発現したため(図3-6)、樹状細胞としての性質も持ち合わせている可能性がある。まとめると、マクロファージのMHCクラスIIが、T細胞の再活性化(図3-5)に関与する可能性がある。

これまで、OPCによるマクロファージ活性化の制御についてはほとんど知られていない。今回の結果により、EAE急性期のOPCはマクロファージ活性化を促進し、脊髄におけるMHCIIを増加させた。腎尿細管細胞内転写因子5 (NFAT5)は、マクロファージの主要組織適合遺伝子複合体IIトランス活性化因子(CIITA)と下流のMHC class II発現量を制御することが報告されている[108]。NFAT5発現はインターフェロン γ (IFN γ)とトル様受容体(TLR)刺激により上昇する[109]。従ってOPCは、マクロファージにおいてIFN γ 受容体やTLRを介するシグナルを活性化させる可能性がある。EAE急性期病変部では、MHCクラスII⁺マクロファージの近傍に局在するOPCが観察された(図3-3)。従って、脊髄実質におけるOPCとの直接接触によって、マクロファージにおけるこれらのシグナル経路が活性化する可能性も考えられる。OPCとマクロファージとの相互作用については、マクロファージ表面のTLR4がOPC表面のNG2プロテオグリカンと結合するとの報告がある[110]。また、他の可能性として、OPCが産生するサイトカインがマクロファージの活性化を促進することも考えられる。OPCは病態時に様々なサイトカインを産生するが、そのうちIL1 β [111, 112]は、マクロファージにおけるNFAT5発現を上昇させることが報告されている[113]。今後はOPCがマクロファージのMHCクラスII発現を促進する分子メカニズムを明らかにする必要がある。

本研究では、CNSにおけるマクロファージの活性化を抑制することで、T細胞の増殖が阻害され、神経炎症が抑制されることが示唆された。病態下におけるマクロファージの機能については、EAE発症後の単球を除去することでピーク期の臨床スコアを抑制し、CNSのCD4⁺T細胞数を減少したという既報[114]でも示されている。現在のMS治療薬は、T細胞やB細胞を標的としていると考えられているが、マクロファージの活性化抑制作用も治療効果に寄与するとの見方もある[115, 116]。今後、CNSでOPCがマクロファージを活性化する分子メカニズムについて研究することで、新たなMS治療戦略が生まれるかもしれない。

OPCの一部はMMP9を産生し[50]、病態下では血液脳関門の破綻に関与する[97]。また、血管周囲に集積した機能不全OPCのクラスターが、血液脳関門を構成するアストロサイトのエンドフィートをはがし、血管内皮細胞の密着結合を破壊し、血液脳関門の透過性を上昇させるとの報告もある[98]。そのため、OPCが血液脳関門や血液脊髄関門の機能に関与する可能性もあると考え、血液脊髄関門の密着結合タンパク質や接着因子の発現レベルを調べたが、変化は認められなかった(図3-4)。従って、OPC除去マウス脊髄のT細胞やTh17減少は、血液脊髄関門の完全性の変化によるものではない可能性がある。

今回はOPCマーカーとしてPDGFR α を使用した。PDGFR α はEAE慢性期において線維芽細胞でも発現するとの報告がある[95]。既報[95, 96]と一致して、急性期では

PDGFR α ⁺collagen I⁺線維芽細胞はわずかで、慢性期では線維芽細胞数が増加した(図3-3)。Collagen⁺線維芽細胞除去により、EAE慢性期の臨床スコアのみが改善され、脊髄のT細胞数には影響がなかったという既報[95]を考慮すると、今回の結果は線維芽細胞除去とは異なる結果である。他のOPCマーカーであるNG2は、EAEマウスの活性化ペリサイト[117]やマクロファージ[118]にも発現しており、特異性に欠ける。従って、OPCの役割をより深く理解するには、NG2⁺PDGFR α ⁺ OPCのみを特異的に除去することが必要であろう。

結論として、本章では、EAE急性期におけるOPC除去は、マクロファージ活性化の抑制とT細胞の再活性化抑制を介して、麻痺の重症度と脱髄を改善することを明らかにした。一方、EAE慢性期におけるOPC除去は、病態経過に影響を与えなかった。分子メカニズムは十分に明らかとなっていないが、これらの結果から、OPCは髄鞘を形成するオリゴデンドロサイトの供給源となるだけでなく、神経炎症の急性期においては免疫制御にも関わる可能性が示された。

総括および結論

本研究では、オリゴデンドロサイト前駆細胞の制御機構および病態時の機能に関して検討を行い、以下の知見を得た。

第一章

初代培養OPCおよびラット脳梁、大脳皮質のOPCにおいて、TRPV4が発現した。TRPV4アゴニスト処置により、細胞内Ca²⁺濃度が上昇し、TRPV4アンタゴニスト共処置により抑制された。初代培養OPCへのTRPV4アゴニスト処置は、OPCの分化や遊走には影響を与えなかった一方、増殖を促進した。TRPV4アゴニスト処置による増殖促進は、細胞内Ca²⁺キレーターやPKC阻害薬共処置により抑制された。

第二章

初代培養OPCおよびラット脳梁、大脳皮質のOPCにおいて、TRPM3が発現した。TRPM3アゴニスト処置により、細胞内Ca²⁺濃度が上昇し、TRPM3アンタゴニスト共処置により抑制された。初代培養OPCへのTRPM3アゴニスト処置は、OPCの分化や遊走に影響を与えなかった。ET-1局所注入による脳梗塞モデルラットの病変部においてTRPM3⁺ OPCが増加した。初代培養OPCにおけるTRPM3発現量は、低酸素条件下では変化が認められなかったが、炎症性サイトカインTNF α 処置により増加した。

第三章

多発性硬化症モデルであるEAEマウスにおいて、急性期におけるPDGFR α ⁺ OPC除去は、臨床スコアと脊髄白質の脱髄割合を抑制した。一方、EAE慢性期におけるPDGFR α ⁺ OPC除去は、臨床スコアに影響を与えなかった。EAE急性期におけるOPC除去によって、脊髄のCD3⁺T細胞数やCD3⁺IL17A⁺病原性T細胞数が減少した。OPC除去マウス脊髄において、密着結合タンパク質や接着因子などの血液脊髄関門関連遺伝子の発現量に変化は認められなかった一方、T細胞の活性化に関与するMHCクラスIIの発現量が減少した。MHCクラスII発現細胞は、主に末梢から浸潤したマクロファージであった。

以上、著者は、初代培養OPCを用いた検討により、TRPV4およびTRPM3がOPC機能制御を担うことを明らかにした。また、多発性硬化症モデルマウスにおいて、OPCが急性期の病態悪化に関与することを見出した。これらの知見は、中枢神経系の機能維持や自己免疫性脱髄疾患の病態解明のための基礎的知見を提供するものである。

謝辞

本研究に際しまして、終始懇切丁寧な御指導および御鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科教授 金子周司 先生に謹んで感謝の意を表します。また、直接御指導を賜り、多くの有益な御助言を頂きました京都大学大学院薬学研究科准教授 白川久志 先生、助教 永安一樹 先生に心から感謝の意を表します。さらに、終始有益な御助言を頂きました京都大学医学部附属病院薬剤部副薬剤部長・准教授 中川貴之 先生、和歌山県立医科大学薬学部医療薬学部門部門長・教授 赤池昭紀 先生、富山大学大学院総合医薬学研究科教授 久米利明 先生、神戸薬科大学薬学部講師 泉安彦 先生に深く感謝いたします。

本研究の遂行に当たり、共同研究者として多大なる御協力および御助言を頂きました長崎県立大学看護栄養学部教授 柴崎貢志 先生、京都大学大学院医学研究科講師 眞木崇州 先生に深く感謝いたします。

研究生活を始めるにあたり御指導、御助言を頂きました出屋敷綾音 学士、京都大学大学院薬学研究科助教 三宅崇仁 先生、勇昂一 博士、金沢大学医薬保健研究域助教 西谷直也 先生、京都大学大学院医学研究科助教 浅岡希美 先生、宮之原遵 博士、日本大学医学部助教 長島卓也 先生、Soni Siswanto 博士、川原田宗一 博士、大阪公立大学大学院医学研究科助教 河合洋幸 先生、鈴木茉莉 学士、田中景吾 博士をはじめ諸先輩方に心から感謝いたします。

また、本研究の遂行に多大なる御協力を頂きました、中澤駿基 学士、松尾凜紗 学士、谷山一修さん、植村凜さんに心から感謝いたします。そして、日々の研究生活において互いに切磋琢磨し合えた抱将史 学士、澁井紀宏 学士、永井佑茉 博士、長岡巧樹博士、古田晴香 学士、矢野佑一 学士、山本浩貴 学士に心から御礼を述べると共に、浅尾靖仁 学士、富澤恵里 学士、平瀬僚 学士、樋口拓哉 修士、楊秋斌 修士、栗田沙織 学士、藤田沙也香 修士、宮村咲映 学士、戸堀翔太 学士、森嶋美沙 学士、國政椋太郎 さん、中島弘貴 学士、山下志織 学士、川下綾香 さんをはじめとする京都大学大学院薬学研究科生体機能解析学分野の諸氏に深く感謝いたします。

本研究の遂行に関しまして御援助をいただきました日本学術振興会および京都大学大学院教育支援機構プログラムに深く感謝いたします。

最後に、著者の良き理解者であり研究活動に専念できるよう終始支えてくださりました父 正良、母 匡子および両祖父母に心から感謝いたします。

発表論文目録

1. TRPV4 is functionally expressed in oligodendrocyte precursor cells and increases their proliferation
Kana Ohashi, Ayane Deyashiki, Takahito Miyake, Kazuki Nagayasu, Koji Shibasaki, Hisashi Shirakawa, Shuji Kaneko.
Pflügers Archiv - European Journal of Physiology (2018) 470, 705-716 に掲載
2. Transient Receptor Potential Melastatin 3 Is Functionally Expressed in Oligodendrocyte Precursor Cells and Is Upregulated in Ischemic Demyelinated Lesions
Kana Ohashi, Koji Shibasaki, Hayaki Nakazawa, Ryotaro Kunimasa, Kazuki Nagayasu, Hisashi Shirakawa, Shuji Kaneko
Biological & Pharmaceutical Bulletin (2021) 44, 181-187 に掲載

引用文献

1. Waxman SG *et al.*, Relative conduction velocities of small myelinated and non-myelinated fibres in the central nervous system. *Nat New Biol.* **238**:217–219 (1972)
2. Lee Y *et al.*, Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature.* **487**:443–448 (2012)
3. Frohman EM *et al.*, Multiple sclerosis—the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med.* **354**:942–955 (2006)
4. Fornari E *et al.*, Demyelination of superficial white matter in early Alzheimer’s disease: a magnetization transfer imaging study. *Neurobiol Aging.* **428**: e7–19. (2012)
5. Najjar S *et al.*, Neuroinflammation and white matter pathology in schizophrenia: systematic review. *Schizophr Res.* **161**:102–112 (2016)
6. Cui QL *et al.*, Oligodendrocyte progenitor cell susceptibility to injury in multiple sclerosis. *Am J Pathol.* **183**:516–525 (2013)
7. Sypecka J *et al.*, The neuroprotective effect exerted by oligodendroglial progenitors on ischemically impaired hippocampal cells. *Mol Neurobiol.* **49**:685–701 (2014)
8. Chen LX *et al.*, Neuroprotective effects of oligodendrocyte progenitor cell transplantation in premature rat brain following hypoxic-ischemic injury. *PLoS One.* **10**:e0115997 (2015)
9. Faulkner J *et al.*, Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitors for the treatment of spinal cord injury. *Transpl Immunol.* **15**:131–142 (2005)
10. Kuroda M *et al.*, Peripherally derived FGF21 promotes remyelination in the central nervous system. *J Clin Invest.* **127**:3496–3509 (2017)
11. Ferent J *et al.*, Sonic Hedgehog signaling is a positive oligodendrocyte regulator during demyelination. *J Neurosci.* **33**:1759–1772 (2013)
12. Ortega F *et al.*, Oligodendroglial and neurogenic adult subependymal zone neural stem cells constitute distinct lineages and exhibit differential responsiveness to Wnt signalling. *Nat Cell Biol.* **15**:602–613 (2013)
13. Li C *et al.*, A functional role of NMDA receptor in regulating the differentiation of oligodendrocyte precursor cells and remyelination. *Glia.* **61**:732–749 (2013)
14. Baron W *et al.*, PDGF and FGF-2 signaling in oligodendrocyte progenitor cells: regulation of proliferation and differentiation by multiple intracellular signaling pathways. *Mol Cell Neurosci.* **15**:314–329 (2000)
15. Lundgaard I *et al.*, Neuregulin and BDNF induce a switch to NMDA receptor-dependent myelination by oligodendrocytes. *PLoS Biol.* **11**:e1001743 (2013)
16. Fannon J *et al.*, Neuronal activity and AMPA-type glutamate receptor activation regulates the morphological development of oligodendrocyte precursor cells. *Glia.* **63**:1021–1035 (2015)

17. Hamilton N *et al.*, Axons and astrocytes release ATP and glutamate to evoke calcium signals in NG2-glia. *Glia*. **58**:66–79 (2010)
18. Cheli VT *et al.*, Voltage-gated Ca²⁺ entry promotes oligodendrocyte progenitor cell maturation and myelination in vitro. *Exp Neurol*. **265**:69–83 (2015)
19. Paez PM *et al.*, Multiple kinase pathways regulate voltage-dependent Ca²⁺ influx and migration in oligodendrocyte precursor cells. *J Neurosci*. **30**:6422–6433 (2010)
20. Wu LJ *et al.*, International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current progress in the mammalian TRP ion channel family. *Pharmacol Rev*. **62**:381–404 (2010)
21. Paez PM *et al.*, Modulation of canonical transient receptor potential channel 1 in the proliferation of oligodendrocyte precursor cells by the golli products of the myelin basic protein gene. *J Neurosci*. **31**:3625–3637 (2011)
22. Hoffmann A *et al.*, TRPM3 is expressed in sphingosine-responsive myelinating oligodendrocytes. *J Neurochem*. **114**:654–665 (2010)
23. Hamilton NB *et al.*, Proton-gated Ca(2+)-permeable TRP channels damage myelin in conditions mimicking ischaemia. *Nature*. **529**:523–527 (2016)
24. Shibasaki K *et al.*, Effects of body temperature on neural activity in the hippocampus: regulation of resting membrane potentials by transient receptor potential vanilloid 4. *J Neurosci*. **27**:1566–1575 (2007)
25. Shibasaki K *et al.*, Expression of the basic helix-loop-factor Olig2 in the developing retina: Olig2 as a new marker for retinal progenitors and late-born cells. *Gene Expr Patterns*. **7**:57–65 (2007)
26. Ma J *et al.*, An animal model for late onset chronic demyelination disease caused by failed terminal differentiation of oligodendrocytes. *Neuron Glia Biol*. **2**:81–91 (2006)
27. Ma J *et al.*, Induced expression of cathepsins and cystatin C in a murine model of demyelination. *Neurochem Res*. **32**:311–320 (2007)
28. Shirakawa H *et al.*, Sphingosine-1-phosphate induces Ca²⁺ signaling and CXCL1 release via TRPC6 channel in astrocytes. *Glia*. **65**:1005–1016 (2017)
29. Miyake T *et al.*, Cold sensitivity of TRPA1 is unveiled by the prolyl hydroxylation blockade-induced sensitization to ROS. *Nat Commun*. **7**:12840 (2016)
30. Konno M *et al.*, Stimulation of transient receptor potential vanilloid 4 channel suppresses abnormal activation of microglia induced by lipopolysaccharide. *Glia*. **60**:761–770 (2012)
31. Shibasaki K *et al.*, A novel subtype of astrocytes expressing TRPV4 (transient receptor potential vanilloid 4) regulates neuronal excitability via release of gliotransmitters. *J Biol Chem*. **289**:14470–14480 (2014)
32. Alpizar YA *et al.*, TRPV4 activation triggers protective responses to bacterial lipopolysaccharides in airway epithelial cells. *Nat Commun*. **8**:1059 (2017)

33. Watanabe H *et al.*, Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. *Nature*. **424**:434–438 (2003)
34. Zheng F *et al.*, Plasma metabolomics profiles in rats with acute traumatic brain injury. *PLoS One*. **12**:e0182025 (2017)
35. McTigue DM *et al.*, Proliferation of NG2-positive cells and altered oligodendrocyte numbers in the contused rat spinal cord. *J Neurosci*. **21**:3392–3400 (2001)
36. Mochizuki T *et al.*, The TRPV4 cation channel mediates stretch-evoked Ca²⁺ influx and ATP release in primary urothelial cell cultures. *J Biol Chem*. **287**:21257–21264 (2009)
37. Jahan MGS *et al.*, Traction force and its regulation during cytokinesis in Dictyostelium cells. *Eur J Cell Biol*. **96**:515–528 (2017)
38. Pathak MM *et al.*, Stretch-activated ion channel Piezo1 directs lineage choice in human neural stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **111**:16148–16153 (2014)
39. Chun SJ *et al.*, Integrin-linked kinase is required for laminin-2-induced oligodendrocyte cell spreading and CNS myelination. *J Cell Biol*. **163**:397–408 (2003)
40. Alessandri-Haber N *et al.*, Interaction of transient receptor potential vanilloid 4, integrin, and SRC tyrosine kinase in mechanical hyperalgesia. *J Neurosci*. **28**:1046–1057 (2008)
41. Kiyatkin EA *et al.*, Brain temperature fluctuation: a reflection of functional neural activation. *Eur J Neurosci*. **16**:164–168 (2002)
42. Fekete Z *et al.*, Simultaneous in vivo recording of local brain temperature and electrophysiological signals with a novel neural probe. *J Neural Eng*. **14**:034001 (2017)
43. Cheli VT *et al.*, Conditional deletion of the L-type calcium channel Cav1.2 in oligodendrocyte progenitor cells affects postnatal myelination in mice. *J Neurosci*. **36**:10853–10869 (2016)
44. Paez PM *et al.*, Golli myelin basic proteins stimulate oligodendrocyte progenitor cell proliferation and differentiation in remyelinating adult mouse brain. *Glia*. **60**:1078–1093 (2012)
45. Bhat NR *et al.*, Cell proliferation and protooncogene induction in oligodendroglial progenitors. *J Neurosci Res*. **32**:340–349 (1992)
46. Radhakrishna M *et al.*, Protein kinases mediate basic fibroblast growth factor's stimulation of proliferation and c-fos induction in oligodendrocyte progenitors. *Mol Brain Res*. **24**:118–128 (1994)
47. Dimou L *et al.*, NG2-glia and their functions in the central nervous system. *Glia*. **63**:1429–1451 (2015)
48. Iijima K *et al.*, Transplanted microvascular endothelial cells promote oligodendrocyte precursor cell survival in ischemic demyelinating lesions. *J Neurochem*. **135**:539–550 (2015)
49. Xu S *et al.*, Glial cells: role of the immune response in ischemic stroke. *Front Immunol*. **11**:294 (2020)
50. Seo JH *et al.*, Oligodendrocyte precursors induce early blood–brain barrier opening after white

- matter injury. *J Clin Invest.* **123**:782–786 (2013)
51. Harlow DE *et al.*, Myelin proteolipid protein complexes with α v integrin and AMPA receptors in vivo and regulates AMPA-dependent oligodendrocyte progenitor cell migration through the modulation of cell-surface GluR2 expression. *J Neurosci.* **35**:12018–12032 (2015)
 52. Kougioumtzidou E *et al.*, Signalling through AMPA receptors on oligodendrocyte precursors promotes myelination by enhancing oligodendrocyte survival. *eLife.* **6**:e28080 (2017)
 53. Santiago González DA *et al.*, Conditional deletion of the L-type calcium channel *cav1.2* in NG2-positive cells impairs remyelination in mice. *J Neurosci.* **37**:10038–10051 (2017)
 54. Pitman KA *et al.*, The voltage-gated calcium channel CaV1.2 promotes adult oligodendrocyte progenitor cell survival in the mouse corpus callosum but not motor cortex. *Glia.* **68**:376–392 (2020)
 55. Papanikolaou M *et al.*, Lewis A, Butt AM. Store-operated calcium entry is essential for glial calcium signalling in CNS white matter. *Brain Struct Funct.* **222**:2993–3005 (2017)
 56. Wagner TF *et al.*, Transient receptor potential M3 channels are ionotropic steroid receptors in pancreatic β cells. *Nat Cell Biol.* **10**:1421–1430 (2008)
 57. Grimm C *et al.*, Activation of the melastatin-related cation channel TRPM3 by D-erythro-sphingosine. *Mol Pharmacol.* **67**:798–805 (2005)
 58. Grimm C *et al.*, Kraft R, Sauerbruch S, Schultz G, Harteneck C. Molecular and functional characterization of the melastatin-related cation channel TRPM3. *J Biol Chem.* **278**:21493–21501 (2003)
 59. Son A *et al.*, TRPM3/TRPV4 regulates Ca^{2+} -mediated RANKL/NFATc1 expression in osteoblasts. *J Mol Endocrinol.* **61**:207–218 (2018)
 60. Vriens J *et al.*, TRPM3 is a nociceptor channel involved in the detection of noxious heat. *Neuron.* **70**:482–494 (2011)
 61. Held K *et al.*, TRPM3 in temperature sensing and beyond. *Temperature (Austin).* **2**:201–213 (2015)
 62. Fonfria E *et al.*, Tissue distribution profiles of the human TRPM cation channel family. *J Recept Signal Transduct Res.* **26**:159–178 (2006)
 63. Zamudio-Bulcock PA *et al.*, Pregnenolone sulfate increases glutamate release at neonatal climbing fiber-to-Purkinje cell synapses. *Neuroscience.* **175**:24–36 (2011)
 64. Zamudio-Bulcock PA *et al.*, Activation of steroid-sensitive TRPM3 channels potentiates glutamatergic transmission at cerebellar Purkinje neurons from developing rats. *J Neurochem.* **119**:474–485 (2011)
 65. Puentes S *et al.*, Brain microvascular endothelial cell transplantation ameliorates ischemic white matter damage. *Brain Res.* **1469**:43–53 (2012)
 66. Sheehan D *et al.*, Theory and practice of histotechnology, second ed., The CV Mosby Company,

- St. Louis, pp. 235–237 (1980)
67. Straub I *et al.*, Flavanones that selectively inhibit TRPM3 attenuate thermal nociception in vivo. *Mol Pharmacol.* **84**:736–750 (2013)
 68. Hayakawa K *et al.*, Vascular endothelial growth factor regulates the migration of oligodendrocyte precursor cells. *J Neurosci.* **31**:10666–10670 (2011)
 69. Tokumoto Y *et al.*, Quiescence of adult oligodendrocyte precursor cells requires thyroid hormone and hypoxia to activate Runx1. *Sci Rep.* **7**:1019 (2017)
 70. Meletti S *et al.*, Decreased allopregnanolone levels in cerebrospinal fluid obtained during status epilepticus. *Epilepsia.* **58**:e16–e20 (2017)
 71. Nilius B *et al.*, A TRP channel-steroid marriage. *Nat Cell Biol.* **10**:1383–1384 (2008)
 72. Bičíková M *et al.*, Serum concentrations of some neuroactive steroids in women suffering from mixed anxiety-depressive disorder. *Neurochem Res.* **25**:1623–1627 (2000)
 73. Tagawa N *et al.*, Serum dehydroepiandrosterone, dehydroepiandrosterone sulfate, and pregnenolone sulfate concentrations in patients with hyperthyroidism and hypothyroidism. *Clin Chem.* **46**:523–528 (2000)
 74. Schumacher M *et al.*, Pregnenolone sulfate in the brain: a controversial neurosteroid. *Neurochem Int.* **52**:522–540 (2008)
 75. Zwain IH *et al.*, Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology.* **140**:3843–3852 (1999)
 76. Salman ED *et al.*, Hydroxysteroid sulfotransferase 2B1b expression and localization in normal human brain. *Horm Mol Biol Clin Investig.* **8**:445–454 (2011)
 77. Chudakova DA *et al.*, Integrin-associated Lyn kinase promotes cell survival by suppressing acid sphingomyelinase activity. *J Biol Chem.* **283**:28806–28816 (2008)
 78. Badheka D *et al.*, Inhibition of transient receptor potential melastatin 3 ion channels by G-protein $\beta\gamma$ subunits. *eLife.* **6**:e26147 (2017)
 79. Quallo T *et al.*, G protein $\beta\gamma$ subunits inhibit TRPM3 ion channels in sensory neurons. *eLife.* **6**:e26138 (2017)
 80. Shimauchi-Ohtaki H *et al.*, The dynamics of revascularization after white matter infarction monitored in Flt1-tdsRed and Flk1-GFP mice. *Neurosci Lett.* **692**:70–76 (2019)
 81. Kimura I *et al.*, Oligodendrocytes upregulate blood–brain barrier function through mechanisms other than the PDGF-BB/PDGFR α pathway in the barrier-tightening effect of oligodendrocyte progenitor cells. *Neurosci Lett.* **715**:134594 (2020)
 82. Ono H *et al.*, Rat white matter injury model induced by endothelin-1 injection: technical modification and pathological evaluation. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* **76**:212–224 (2016)
 83. Kirby L *et al.*, Oligodendrocyte precursor cells present antigen and are cytotoxic targets in inflammatory demyelination. *Nat Commun.* **10**:3887 (2019)

84. Evonuk KS *et al.*, Reduction of AMPA receptor activity on mature oligodendrocytes attenuates loss of myelinated axons in autoimmune neuroinflammation. *Sci Adv.* **6**:eaax5936 (2020)
85. Dong Y *et al.*, When encephalitogenic T cells collaborate with microglia in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol.* **15**:704-717 (2019)
86. Planas R *et al.*, Detailed Characterization of T Cell Receptor Repertoires in Multiple Sclerosis Brain Lesions. *Front Immunol.* **9**:509 (2018)
87. Fünfschilling U *et al.*, Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. *Nature.* **485**:517–521 (2012)
88. Yeung MS *et al.*, Dynamics of oligodendrocyte generation and myelination in the human brain. *Cell.* **159**:766–774 (2014)
89. Yeung MSY *et al.*, Dynamics of oligodendrocyte generation in multiple sclerosis. *Nature.* **566**:538–542 (2019)
90. Falcão AM *et al.*, Disease-specific oligodendrocyte lineage cells arise in multiple sclerosis. *Nat Med.* **24**:1837–1844 (2018)
91. Jäkel S *et al.*, Altered human oligodendrocyte heterogeneity in multiple sclerosis. *Nature.* **566**:543–547 (2019)
92. Barres BA *et al.*, Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell.* **70**:31–46 (1992)
93. Miyamura S *et al.*, Oligodendrocyte Glycoprotein 35-55 (MOG 35-55)-induced Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: A Model of Chronic Multiple Sclerosis. *Bio Protoc.* **9**:e3453 (2019)
94. M. Tsutsui *et al.*, TRPM2 Exacerbates Central Nervous System Inflammation in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Increasing Production of CXCL2 Chemokines. *J Neurosci.* **38**:8484–8495 (2018)
95. Dorrier CE *et al.*, CNS fibroblasts form a fibrotic scar in response to immune cell infiltration. *Nat Neurosci.* **24**:234–244 (2021)
96. Yahn S *et al.*, Fibrotic scar after experimental autoimmune encephalomyelitis inhibits oligodendrocyte differentiation. *Neurobiol Dis.* **134**:104674 (2020)
97. Maki T, Novel roles of oligodendrocyte precursor cells in the developing and damaged brain. *Clin Exp Neuroimmunol.* **8**:33–42 (2017)
98. Niu J *et al.*, Aberrant oligodendroglial-vascular interactions disrupt the blood-brain barrier, triggering CNS inflammation. *Nat Neurosci.* **22**:709–718 (2019)
99. Kawakami N *et al.*, The activation status of neuroantigen-specific T cells in the target organ determines the clinical outcome of autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med.* **199**:185–197 (2004)
100. Zveik O *et al.*, Cerebrospinal fluid of progressive multiple sclerosis patients reduces

- differentiation and immune functions of oligodendrocyte progenitor cells. *Glia*. **70**, 1191–1209 (2022)
101. Monaghan KL *et al.*, Monocytes and Monocyte-Derived Antigen-Presenting Cells Have Distinct Gene Signatures in Experimental Model of Multiple Sclerosis. *Front Immunol.* **10**:2779 (2019)
 102. Yamasaki R *et al.*, Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system. *J Exp Med.* **211**:1533–1549 (2014)
 103. Rivers LE *et al.*, PDGFRA/NG2 glia generate myelinating oligodendrocytes and piriform projection neurons in adult mice. *Nat Neurosci.* **11**:1392–1401 (2008)
 104. Kuhlmann T *et al.*, Differentiation block of oligodendroglial progenitor cells as a cause for remyelination failure in chronic multiple sclerosis. *Brain.* **131**:1749–1758 (2008)
 105. Wang J *et al.*, Targeting Microglia and Macrophages: A Potential Treatment Strategy for Multiple Sclerosis. *Front Pharmacol.* **10**:286 (2019)
 106. Wolf Y *et al.*, Microglial MHC class II is dispensable for experimental autoimmune encephalomyelitis and cuprizone-induced demyelination. *Eur J Immunol.* **48**:1308–1318 (2018)
 107. Mundt S *et al.*, Conventional DCs sample and present myelin antigens in the healthy CNS and allow parenchymal T cell entry to initiate neuroinflammation. *Sci Immunol.* **4**:eaau8380 (2019)
 108. Buxadé M *et al.*, Macrophage-specific MHCII expression is regulated by a remote Ciita enhancer controlled by NFAT5. *J Exp Med.* **215**:2901–2918 (2018)
 109. Lee N *et al.*, Role of NFAT5 in the Immune System and Pathogenesis of Autoimmune Diseases. *Front Immunol.* **10**:270 (2019)
 110. Hayakawa K *et al.*, CD200 restrains macrophage attack on oligodendrocyte precursors via toll-like receptor 4 downregulation. *J Cereb Blood Flow Metab.* **36**:781–793 (2016)
 111. Moyon S *et al.*, Demyelination causes adult CNS progenitors to revert to an immature state and express immune cues that support their migration. *J Neurosci.* **35**:4–20 (2015)
 112. Zeis T *et al.*, The immunomodulatory oligodendrocyte. *Brain Res.* **1641**:139–148 (2016)
 113. Choi S *et al.*, Transcription factor NFAT5 promotes macrophage survival in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* **127**:954–969 (2017)
 114. Moreno MA *et al.*, Therapeutic depletion of monocyte-derived cells protects from long-term axonal loss in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* **290**:36–46 (2016)
 115. Mishra MK *et al.*, Myeloid cells - targets of medication in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol.* **12**:539–551 (2016)
 116. Nally FK *et al.*, Nanomodulation of Macrophages in Multiple Sclerosis. *Cells.* **8**:543 (2019)
 117. Girolamo F *et al.*, Defining the role of NG2-expressing cells in experimental models of multiple sclerosis. A biofunctional analysis of the neurovascular unit in wild type and NG2 null mice.

PLoS One. **14**:e0213508 (2019)

118. Moransard M *et al.*, NG2 expressed by macrophages and oligodendrocyte precursor cells is dispensable in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain.* **134**:1315–1330 (2011)