

京都大学	博士（薬科学）	氏名	大橋 佳奈
論文題目	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		

(論文内容の要旨)

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、髄鞘形成を行うことで神経伝導を高速化する。髄鞘傷害は、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、髄鞘機能の維持は神経機能保持に重要である。オリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) は成体脳の5-8%ほどを占め、増殖、分化して髄鞘形成に寄与する。一方で病態時には、OPCの機能異常が髄鞘傷害の一因となるだけでなく、生理的機能とは異なる炎症性フェノタイプを持つことが示唆されている。従って、OPCの機能制御および疾患時の役割解明は、中枢神経系の機能維持や疾患メカニズム理解のために重要である。第一章、第二章では、OPC機能への関与が報告されているCa²⁺シグナリングの分子機序の一端を解明するために、Ca²⁺透過性カチオンチャネルであるtransient receptor potential (TRP) チャネルに着目して検討を行った。第三章では、多発性硬化症モデルマウスにおいて、OPCの病態形成への関与を検討した。

第一章 初代培養OPCにおけるTRPV4の機能解析

TRPV4は、温度刺激、機械刺激、低浸透圧、アラキドン酸代謝物により開口する。ラット新生仔大脳皮質から単離した初代培養OPCにおけるTRPV4活性化は、細胞内Ca²⁺濃度を上昇させた。TRPV4活性化は、細胞内Ca²⁺流入とプロテインキナーゼC経路活性化を介してOPCの増殖を促進した一方、OPCの分化と遊走には影響を与えなかった。以上より、TRPV4は脳内のOPC数増加に関与することが示唆された。

第二章 初代培養OPCにおけるTRPM3の機能的発現

TRPM3は、温度刺激、機械刺激、低浸透圧、硫酸プレグネノロンにより開口する。初代培養OPCにおけるTRPM3活性化は、細胞内Ca²⁺濃度を上昇させた。しかし、TRPM3活性化は、OPCの分化と遊走には影響を与えなかった。局所脳虚血モデルマウスにおいてTRPM3発現OPCが病変部で増加し、初代培養OPCにおいて腫瘍壊死因子α (TNFα) 処置はTRPM3発現量を増加させた。以上より、TRPM3がOPCのCa²⁺シグナリングに関与し、特に炎症的環境において機能することが示唆された。

第三章 自己免疫性脱髄病態におけるOPCの役割解明

多発性硬化症は、視覚障害、感覚障害、運動障害などの症状を示す、自己免疫性脱髄疾患である。T細胞やマクロファージなどの末梢免疫細胞の浸潤により、中枢神経系で炎症と脱髄が惹起される。脱髄部位にはオリゴデンドロサイトへの分化能が低下したOPCが多数存在するものの、その機能は明らかでない。そこで、髄鞘構成タンパク質のペプチド抗原で免疫して作製する多発性硬化症モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) マウスにおいてOPCを除去し、病態変化を評価した。OPC除去群として、血小板由来成長因子受容体α (PDGFRα) 発現細胞 (OPC) 特異的に、タモキシフェン誘導型 CreER 依存的にジフテリア毒素受容体 (DTR) が発現するトランスジェニックマウス (Pdgfra^{CreER/+}:Rosa26^{DTR/+}) を用い、ジフテリア毒素投与によりOPC選択的に細胞死を誘導した。対照群には CreER を発現しないマウス (Pdgfra^{+/+}:Rosa26^{DTR/+}) を用いた。EAE発症7日後からの毒素投与では重症度を示

す臨床スコアに群間差は認められなかった。一方、発症翌日からの急性期における毒素投与では、OPC 除去群において臨床スコアが低下し、脊髄白質の脱髄が抑制された。従って、OPC は EAE 急性期の病態悪化に関与することが示唆された。免疫組織学的検討において、脊髄白質の CD3 陽性 T 細胞数が OPC 除去群で減少した。T 細胞活性化には抗原提示が関与するため、主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) の発現量を検討したところ、脊髄において MHC クラス II 発現量が OPC 除去群で低下した。一方、T 細胞のプライミングが起こる脾臓や腸骨下リンパ節では MHCII 発現量に差が認められなかった。このことから、脊髄における T 細胞再活性化が OPC 除去群で低下することが示唆された。脊髄の MHC クラス II 発現細胞は主にマクロファージであった。これらの結果から、EAE 急性期において OPC は、脊髄に浸潤したマクロファージによる T 細胞の活性化を促進し、病態悪化に関与する可能性が示された。

以上、著者は、初代培養 OPC を用いた検討により、Ca²⁺透過性カチオンチャネルが 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。

(論文審査の結果の要旨)

(論文内容の要旨)

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、髄鞘形成を行うことで神経伝導を高速化する。髄鞘傷害は、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、髄鞘機能の維持は神経機能保持に重要である。オリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) は成体脳の5-8%ほどを占め、増殖、分化して髄鞘形成に寄与する。一方で病態時には、OPCの機能異常が髄鞘傷害の一因となるだけでなく、生理的機能とは異なる炎症性フェノタイプを持つことが示唆されている。従って、OPCの機能制御および疾患時の役割解明は、中枢神経系の機能維持や疾患メカニズム理解のために重要である。第一章、第二章では、OPC機能への関与が報告されているCa²⁺シグナリングの分子機序の一端を解明するために、Ca²⁺透過性カチオンチャネルであるtransient receptor potential (TRP) チャネルに着目して検討を行った。第三章では、多発性硬化症モデルマウスにおいて、OPCの病態形成への関与を検討した。

第一章 初代培養OPCにおけるTRPV4の機能解析

TRPV4は、温度刺激、機械刺激、低浸透圧、アラキドン酸代謝物により開口する。ラット新生仔大脳皮質から単離した初代培養OPCにおけるTRPV4活性化は、細胞内Ca²⁺濃度を上昇させた。TRPV4活性化は、細胞内Ca²⁺流入とプロテインキナーゼC経路活性化を介してOPCの増殖を促進した一方、OPCの分化と遊走には影響を与えなかった。以上より、TRPV4は脳内のOPC数増加に関与することが示唆された。

第二章 初代培養OPCにおけるTRPM3の機能的発現

TRPM3は、温度刺激、機械刺激、低浸透圧、硫酸プレグネノロンにより開口する。初代培養OPCにおけるTRPM3活性化は、細胞内Ca²⁺濃度を上昇させた。しかし、TRPM3活性化は、OPCの分化と遊走には影響を与えなかった。局所脳虚血モデルマウスにおいてTRPM3発現OPCが病変部で増加し、初代培養OPCにおいて腫瘍壊死因子α (TNFα) 処置はTRPM3発現量を増加させた。以上より、TRPM3がOPCのCa²⁺シグナリングに関与し、特に炎症的環境において機能することが示唆された。

第三章 自己免疫性脱髄病態におけるOPCの役割解明

多発性硬化症は、視覚障害、感覚障害、運動障害などの症状を示す、自己免疫性脱髄疾患である。T細胞やマクロファージなどの末梢免疫細胞の浸潤により、中枢神経系で炎症と脱髄が惹起される。脱髄部位にはオリゴデンドロサイトへの分化能が低下したOPCが多数存在するものの、その機能は明らかでない。そこで、髄鞘構成タンパク質のペプチド抗原で免疫して作製する多発性硬化症モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) マウスにおいてOPCを除去し、病態変化を評価した。OPC除去群として、血小板由来成長因子受容体α (PDGFRα) 発現細胞 (OPC) 特異的に、タモキシフェン誘導型 CreER 依存的にジフテリア毒素受容体 (DTR) が発現するトランスジェニックマウス (Pdgfra^{CreER/+}:Rosa26^{DTR/+}) を用い、ジフテリア毒素投与によりOPC選択的に細胞死を誘導した。対照群には CreER を発現しないマウス (Pdgfra^{+/+}:Rosa26^{DTR/+}) を用いた。EAE発症7日後からの毒素投与では重症度を示す臨床スコアに群間差は認められなかった。一方、発症翌日からの急性期における毒素投与では、OPC除去群において臨床スコアが低下し、脊髄白質の脱髄が抑制された。従って、OPC

は EAE 急性期の病態悪化に関与することが示唆された。免疫組織学的検討において、脊髄白質の CD3 陽性 T 細胞数が OPC 除去群で減少した。T 細胞活性化には抗原提示が関与するため、主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) の発現量を検討したところ、脊髄において MHC クラス II 発現量が OPC 除去群で低下した。一方、T 細胞のプライミングが起こる脾臓や腸骨下リンパ節では MHCII 発現量に差が認められなかった。このことから、脊髄における T 細胞再活性化が OPC 除去群で低下することが示唆された。脊髄の MHC クラス II 発現細胞は主にマクロファージであった。これらの結果から、EAE 急性期において OPC は、脊髄に浸潤したマクロファージによる T 細胞の活性化を促進し、病態悪化に関与する可能性が示された。

以上、著者は、初代培養 OPC を用いた検討により、Ca²⁺透過性カチオンチャネルが 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。

よって、本論文は博士（薬科学）の学位論文として価値あるものと認める。また、令和 5 年 2 月 14 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公表可能日： _____ 年 _____ 月 _____ 日以降