

## 152. 成体中枢神経系の内在性修復機構の解明

村松 里衣子

大阪大学 医学部 分子神経科学

Key words : 外傷, 培養細胞, DNA, T 細胞, toll like receptor

### 緒 言

中枢神経疾患による症状は、疾患の種類や個人による差はあるが、わずかではあるがしばしば症状が自然回復する。症状の改善は、疾患により傷ついた神経組織が自発的に修復したためと考えられている。かつては発生期や末梢神経系と異なり、中枢神経系は自然に修復しないと考えられてきたが、最近では、大人の中枢神経系にも修復ポテンシャルが残されており、それが自然修復をもたらすとわかってきた。しかし、内在性の修復力がいかにして促されるかは不明な点が多く、また内在性の修復力に頼るだけでは症状の顕著な改善は期待できない。そのため、中枢神経系の修復を促進させるメカニズムを解明し、その作用を増強させる方法を開発することが、患者や患者に寄り添う家族から強く待ち望まれている。

本研究では、中枢神経傷害後の内在性の修復機構の一端として、傷害環境に備わる分子群の働きに注目した。特に、病巣で観察される細胞傷害に着目し、傷ついた細胞から漏出する分子が、神経系細胞に与える作用について解析した。細胞内に含まれる物質が細胞外に漏れ出す。漏出する物質は damage associated molecular patterns (DAMPs) と呼ばれ、免疫系細胞を活性化させるなどの作用があると知られる<sup>1)</sup>。DAMPs の受容体は、免疫系細胞では Toll like receptor (TLR) などが報告されており、それらの受容体の一部は神経系細胞にも発現することが知られる<sup>2)</sup>。これらことから、DAMPs が神経系細胞に作用し、中枢神経傷害後の神経組織修復にも作用する可能性を考えた。

神経組織修復の工程のひとつに、髄鞘の修復が挙げられる。髄鞘は、神経軸索を取り囲む構造物であり、内部の神経細胞の恒常性維持を担うとともに、神経活動の跳躍伝導の実現にも重要な役割を担っている。髄鞘の脱落は、指定難病の多発性硬化症の特徴的な病理所見であり、本症では髄鞘が脱落した箇所に応じて、麻痺や視覚障害などの症状があらわれる。病巣には炎症性細胞が集積しており、本症の治療には免疫応答を抑制させるような処置が施される。しかし、ひとたび症状が悪化してしまった患者においては、脱落した髄鞘を修復させなければ症状は改善しないが、現時点で髄鞘を修復させる薬剤はない。そこで本課題では、DAMPs が髄鞘の修復に与える作用の解明、特に分子メカニズムの探索を行った。

### 方 法

すべての動物実験は大阪大学動物実験規程に沿って実施した。

#### 1. DAMPs を模擬する細胞抽出液の調製法と酵素処理方法

成体メス C57BL/6J マウスの脳組織を単離し、無菌的にホモジナイズしたのちに遠心し、冷蔵で遠心後、上清を採取した。上清は急速冷凍し、使用時まで -80℃ 保管した。細胞抽出液の処理には、トリプシン、DNase、RNase を用いて、それぞれ酵素添加後 37℃ で 30 分間反応させた。トリプシン処置群については、トリプシンの反応を停止するために、30 分の反応後にトリプシン阻害剤を加えた。

#### 2. 細胞培養法と薬理的なスクリーニング

オリゴデンドロサイト前駆細胞 (oligodendrocyte precursor cells, OPCs) は、哺乳 1 日齢の C57BL/6J マウス脳から採取した。Neural dissociation kit (P) (ミルテニー社) を用いて単一細胞を調製し、その後に A2B5 抗体<sup>3)</sup>あるいは

PDGFR  $\alpha$  [4](#)) が結合した磁気ビーズ (ミルテニー社) を用いて、OPC を単離した。採取した細胞は OPC medium に懸濁させ、予め poly-L-lysine でコートしておいた培養皿 (96 well plate) に  $1 \times 10^4$  cells/well で播種し、培養した [5](#))。培養 2 日後に Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) へ培地交換し、実験に用いた。薬理的なスクリーニングには各種 TLR の antagonist (Invivogen 社) を使用した。細胞抽出液を添加する 15 分前に各 antagonist を細胞に処置した。

### 3. 細胞増殖の評価

髄鞘の修復は、OPC の増殖からはじまるため、ここでは細胞抽出液処置による OPC の増殖促進効果に注目した。細胞増殖の評価は、細胞への Bromodeoxyuridine (BrdU) の取り込みを観察した [6](#))。BrdU 溶液は、培養終了 24 時間前に細胞培養液に加えた。BrdU の取り込み量の測定は、キットの添付文書に沿って評価した (Roche 社)。

### 4. ゲノム DNA とミトコンドリア DNA の抽出

ゲノム DNA ならびにミトコンドリア DNA は、それぞれ成体マウス脳組織から抽出した。各 DNA の抽出には、それぞれを抽出可能な市販のキットを使用した。

### 5. TLR siRNA の導入

マウス TLR9 の siRNA は Invitrogen より購入した。siRNA の導入には、Lipofectamine RNAiMAX を使用した。siRNA の導入 2 日後に、total RNA を回収し (キアゲン社のキットを使用)、real time PCR でノックダウン効果を確認した。RNA レベルでノックダウン効果が確認できた siRNA に関して、同様の導入プロトコルで siRNA 導入 3 日後にタンパク質を回収し、ウエスタンブロットによりタンパク質レベルでの発現抑制も確認した。

### 6. マウスシュワン細胞株細胞

OPC 特異的な現象であるかを検討するために、マウスシュワン細胞株 SW10 細胞 (ATTC) も使用した。

## 結 果

細胞抽出液を培養 OPC に加え、BrdU の取り込みを評価したところ、添加量依存的に BrdU の取り込みが増加した。このことから、細胞抽出液に OPC の増殖を促進させる作用が備わることが示唆された。細胞抽出液の中の何が、OPC の増殖促進に寄与するか検討するため、あらかじめ細胞抽出液を各種酵素で処理し、その後に培養 OPC へ加え、BrdU の取り込みへの影響を評価した。予め DNase で細胞抽出液を処理してから培養 OPC へ加えたものと、未処理群での BrdU の取り込み量を比較したところ、DNase 処理群では BrdU の取り込みが少ない状態であった。一方、トリプシンや RNase で予め処理した細胞抽出液は、未処理のもの BrdU の取り込み量と有意な差はなかった。このことから、細胞抽出液中の DNA が OPC の増殖に寄与することが示唆された (図 1)。

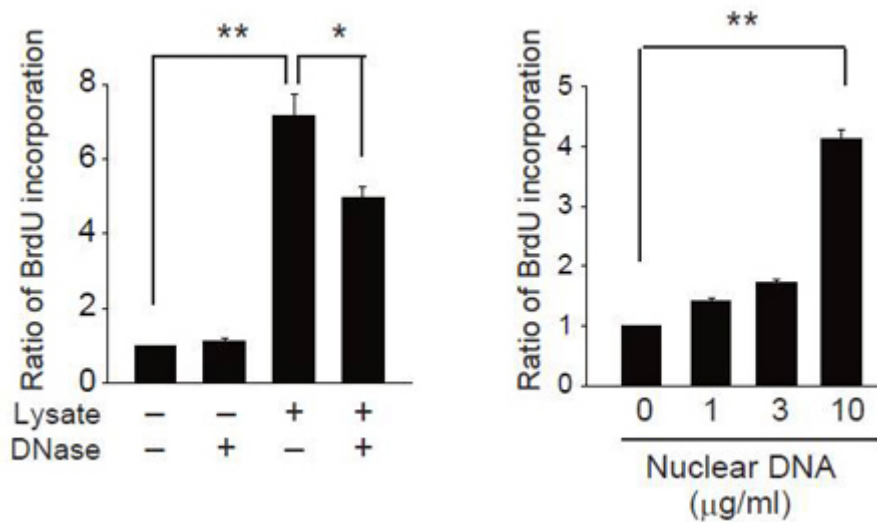


図1. 細胞抽出液ならびに抽出 DNA による OPC への BrdU 取り込み量の増加。

N = 4,  $p < 0.001$ , Tukey test.

細胞抽出液中の DNA が、OPC の増殖を直接促すかを検討するため、マウス脳からゲノム DNA およびミトコンドリア DNA をそれぞれ無菌的に抽出し、培養 OPC に添加し、培養後の BrdU 取り込み量を測定した。ゲノム DNA 添加群では OPC の BrdU 取り込み能が増加した。一方で、ミトコンドリア DNA 添加群では、顕著な OPC 増殖効果が得られなかった。これらの結果から、細胞抽出液中のゲノム DNA が、OPC の増殖効果を持つことが示された (図1)。

免疫系の細胞においては、細胞外の DNA による細胞内シグナルの伝達には TLR が関与すると知られる<sup>7)</sup>。細胞外のゲノム DNA による OPC の増殖にも TLR が関与するか、各種 TLR の拮抗剤を用いた薬理的検討を行った。その結果、TLR9 antagonist を予め処置しておく、ゲノム DNA による OPC への BrdU 取り込み量の増加が打ち消された。このことから、OPC における TLR9 がゲノム DNA による OPC の増殖に寄与すると考えた。そこでまず、OPC における TLR9 の発現を検討し、RNA レベル、タンパク質レベルで発現を検出することができた。続いて、OPC における TLR9 の発現を抑制するため、OPC を採取後、TLR9 の siRNA を導入し、RNA レベルならびにタンパク質レベルで発現低下を見出す条件を確立した。続いて、OPC に予め TLR9 siRNA を導入したのちに、ゲノム DNA を処置し、BrdU の取り込み能を評価した。その結果、コントロール siRNA 群と比較し、TLR9 siRNA 導入群では BrdU の取り込みは有意に少なかった。対照実験として、TLR4 や TLR8 の siRNA を用いた実験も行ったが、それらではゲノム DNA による BrdU の取り込みに対して顕著な影響はあらわれなかった。このことから、ゲノム DNA による OPC の増殖には、OPC に発現する TLR9 が必要であることが示唆された。

最後に、今回認められた現象が末梢の髄鞘を構成するシュワン細胞でも認められるかを検討するため、マウスシュワン細胞株 SW10 細胞へゲノム DNA を処置し、培養後の BrdU 取り込み量を評価する実験も行った。しかしながら、マウス OPC に対して作用を発揮する濃度では、SW10 細胞の BrdU 取り込みの増加は観察されなかった。そこで SW10 における TLR の発現が OPC と異なるを予想し、マウス OPC と SW10 細胞における TLR9 の発現量を比較した。その結果、RNA レベル、タンパク質レベルともに SW10 細胞における TLR9 の発現は、OPC と比較し低い状態であった。以上のことから、ゲノム DNA による細胞増殖効果は、中枢の髄鞘形成細胞に特異的であり、それは TLR9 の発現の差があるためである可能性が示唆された。

## 考 察

以上の結果から、傷ついた細胞から放出されるゲノム DNA が、OPC の増殖を促す働きを持つことが示唆された。またその分子メカニズムの一端として、OPC に発現する TLR9 が必要であることも示唆された。これまでの知見では、DAMPs の標的は主に免疫系細胞であったが、本研究から、DAMPs が非免疫系細胞にも作用することが示唆された。ただ、本研究で得られた成果は *in vitro* のデータに留まるため、今後、*in vivo* で同定分子の役割を検証することが、

生体での髄鞘修復の動作原理を解明する上で必須と考えられる。また、ヒトでも同じメカニズムが保存されているか、ヒトの患者脳脊髄液でゲノム DNA が検出されるか、同定した分子がヒト細胞でも発現するかなど、さらなる追求も必要である。それらの検討の際には、DAMPs による免疫系細胞への作用も併せて検討することになると予想されるが、今後、動物実験およびヒトサンプルでの解析が進むことで、中枢神経傷害後に細胞外に放出される DAMPs が神経組織修復に与える作用の解明が期待される。更なる研究を進め、DAMPs を起点とした神経組織修復の概念を構築し、中枢神経疾患に対する新しい分子標的としての可能性を追求していきたい。

## 文 献

- 1) Shichita T, Hasegawa E, Kimura A, Morita R, Sakaguchi R, Takada I, Sekiya T, Ooboshi H, Kitazono T, Yanagawa T, Ishii T, Takahashi H, Mori S, Nishibori M, Kuroda K, Akira S, Miyake K, Yoshimura A. Peroxiredoxin family proteins are key initiators of post-ischemic inflammation in the brain. *Nat Med*. 2012;18(6):911-9. PMID:22610280
- 2) Steelman AJ, Li J. Poly(I:C) promotes TNF  $\alpha$ /TNFR1-dependent oligodendrocyte death in mixed glial cultures. *J Neuroinflammation*. 2011;8:89. PMID:21812954
- 3) Takahashi C, Muramatsu R, Fujimura H, Mochizuki H, Yamashita T. Prostacyclin promotes oligodendrocyte precursor recruitment and remyelination after spinal cord demyelination. *Cell Death Dis*. 2013;4:e795. PMID:24030147
- 4) Matoba K, Muramatsu R, Yamashita T. Leptin sustains spontaneous remyelination in the adult central nervous system. *Sci Rep*. 2017;7:40397.
- 5) Li J, Lin JC, Wang H, Peterson JW, Furie BC, Furie B, Booth SL, Volpe JJ, Rosenberg PA. Novel role of vitamin k in preventing oxidative injury to developing oligodendrocytes and neurons. *J Neurosci*. 2003;23(13):5816-5826. PMID:12843286
- 6) Kuroda M, Muramatsu R, Maedera N, Koyama Y, Hamaguchi M, Fujimura H, Konishi M, Yoshida M, Itoh N, Mochizuki H, Yamashita T. Peripheral FGF21 promotes central nervous system remyelination. *J Clin Invest*. 2017 in press
- 7) Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*. 2000; 408(6813):740-5.