

論文の内容の要旨

論文題目 中枢神経における Erk2 シグナルの役割に関する研究

氏名 岡崎 廉太郎

序論

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。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。

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。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シスを形成する。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。脱髄においてもアストログリオ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。

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。Erkには84%相同の2つのisoform、Erk1 (44 kD) と Erk2 (42 kD) があり、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。培養アストロサイトでの実験論文では物理的刺激に対

し Erk の活性化が生じ持続すると報告されている。しかし、脱髄などの慢性炎症の *in vivo* 病態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。さらに Nestin-Cre によって神経幹細胞由来のアストロサイトで 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、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。

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

カプリゾンの経口投与は投与後 4 週から 5 週にかけて脳梁部を中心として脱髄し、多発性硬化症のモデルとして広く用いられている。我々の実験系においても脱髄の状況は脳梁部組織切片の LFB 染色等で確認された。脳梁部から得られたサンプルのウェスタンブロット (WB) 法を用いた解析では、カプリゾン投与後 1 日から 4 週にかけて Erk1/2 のリン酸化が亢進していた。免疫組織学的にはカプリゾン投与後 4 週における脳梁部のリン酸化 Erk1/2 増加、ミクログリアの浸潤、反応性アストロサイトの増加といったグリオーシスを認めた。リン酸化 Erk はその多くが GFAP 陽性アストロサイトと共染色された。一方で、CC1 陽性成熟オリゴデンドロサイトや Iba1 陽性ミクログリアとの共染色は僅かであった。アストロサイトにおける Erk1/2 リン酸化は核内と細胞体共に局在していた。以上より、カプリゾンモデルでは脳梁部の脱髄とグリオーシスを来とし、脳梁部の Erk 活性化はアストロサイトに優位であった。

結果② Erk2 欠失により脱髄や炎症は軽減した

我々は中枢神経特異的な Erk2 の機能解析のため、Nestin-Cre::Erk2cKO マウスを用いた。この mutant マウスでは神経幹細胞由来のニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトで 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 が欠失していなかった。

炎症性脱髄疾患の増悪期においては、グリオーシスと炎症の増悪が同時に進行することが知られている。そこでまず、Erk2 欠損がグリオーシスにもたらす影響を免疫組織染色で検討すると、Erk2 cKO マウスにおけるカプリゾン投与後 4 週におけるミクログリアとアストロサイトの増加は共に減弱していた。さらに、脳梁部の炎症関連分子発現は減少していた。次いで脳梁部の脱髄を LFB 染色で検討すると Erk2 cKO マウスでは脱髄が軽減しており、脱髄スコアで評価すると Erk2 cKO マウスではカプリゾン投与後 3 週から 6 週まで有意に脱髄が軽減していた。また、ロータロッドによる行動解析を行ったところ、Erk2 cKO マウスでは脱髄に伴う四肢協調運動機能障害が回避された。以上

より、Erk2 欠損は炎症の軽減と脱髄病態の軽減をきたすことが明らかとなった。

結果③ アストロサイトは Erk2 を介して炎症関連分子を産生した

中枢神経での炎症やグリオシスの進行はミクログリアとアストロサイトとの相互作用によって制御されていると考えられる。その過程における Erk2 の機能解析をするため、単離された培養系での実験を行った。初代培養から得られたミクログリアにリポポリサッカライド投与して炎症反応を誘発した後に、分泌因子を含むコンディショントメディアム (CM) を採取し、別個に培養したアストロサイトに添加した。アストロサイトでは CM 投与により Erk1/2 発現が亢進し、炎症関連分子産生が誘導された。Mek 阻害薬を用いると、アストロサイトの炎症関連分子発現は有意に減少した。従って、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 Erk1/2 シグナルを介すると考えられた。さらに Erk2 cKO マウスより単離培養された Erk2 欠損アストロサイトでは、炎症関連分子発現が減少していた。一方で、炎症環境における Erk2 欠損アストロサイトの BrdU 陽性細胞率には野生型アストロサイトとの間に差がなかった。以上より、炎症環境におけるアストロサイトの Erk2 は細胞増殖に関与せず、炎症関連分子を亢進させると考えられた。

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) グリオシスを認め、(iii) Erk の活性化はアストロサイトに局在しており、(iv) 炎症関連分子発現が増加し、そして (v) 運動機能障害をともなう脱髄がみられた。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 は炎症関連分子を産生しており、その一方で増殖には影響していなかった。

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。カプリゾンモデルではミトコンドリア機能障害によるオリゴデンドロサイト細胞死が病態の起点と考えられている。その結果、まずミクログリアが活性化、次いで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が生じ、増幅された炎症が更なる脱髄や軸索障害に導く。この病態においてアストロサイトの Erk2 シグナル欠損は、グリオシス抑制と炎症関連分子減少、そして脱髄と運動機能低下回避という結果をもたらした。したがって、アストロサイトは Erk2 を介して炎症関連分子を産生し、炎症を増悪し脱髄を進行させたと考えられる。

中枢神経における Erk2 の機能として、神経幹細胞増殖促進やオリゴデンドロサイト分化促進、そしてアストロサイトの細胞外基質産生という報告がある。我々の結果は、Erk2 が炎症性関連分子を産生する一方で、in vitro で Erk2 欠損は増殖に影響していなかった。in vivo の Erk2 cKO マウスではアストロサイトの増殖が抑制される傾向があったが、これにはミクログリア・マクロファージから分泌される成長因子による間接的作用も含まれると考えられる。

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かかわらず、アストロサイトの Erk2 欠失が極期の炎症と組織傷害・脱髄を抑制した。従って、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であると考えられる。但し、今回用いた Nestin-Cre Erk 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 が欠失するため、それらの影響は否定できない。従って、今後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、GFAP-CreER を用いた解析が求められる。

カプリゾンモデルでの炎症関連分子の機能について、TNF α 、IL-1 β 、LT- α 、LT- β 、あるいは MIP-1 α (Ccl-3) の KO マウスは脱髄を遅延させるものの局期の脱髄は同等であると報告されている。つまり単一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、我々は細胞内シグナル Erk2 のアストロサイトにおける欠失が、炎症関連分子減少とグリオシス抑制を伴った脱髄の抑制を来すことを示した。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。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にくく、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。但し、T細胞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疾患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、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。現在、siRNA による分子標的治療が 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、今後 Erk2 を標的とした多発性硬化症治療戦略として siErk2 投与などが検討されうる方法として挙げられる。