

加齢による脳白質病変の発症メカニズムの解明

代表研究者 国立精神・神経医療研究センター神経研究所
部長 村松 里衣子

【まとめ】

加齢に伴い脳機能が低下する分子メカニズムの解明を目指した。特に、脳の白質が高齢者ではなぜ脱落するかを検討するため、高齢マウスでの白質の恒常性の破綻に関わる分子の探索した。高齢マウスの脳のオリゴデンドロサイトで発現量が低下する分子の中に、オリゴデンドロサイトの分化を阻害する分子が含まれると仮定し探索したところ、*susd5* という分子が新規のオリゴデンドロサイト分化促進因子である可能性が示唆された。

1. 研究の目的

1-1. 高齢マウスオリゴデンドロサイトにおける遺伝子発現変化の検討

加齢に伴い細胞内での遺伝子発現は変化すると考えられている。老化にともなう白質傷害の修復が不良になる機序として、オリゴデンドロサイトの組織幹細胞であるオリゴデンドロサイト前駆細胞(Oligodendrocyte precursor cells, OPCs)の発達、少なくとも OPC からオリゴデンドロサイトへの分化は不良であることが指摘されている(Franklin & Charles French-Constant, Nat. Rev. Neurosci., 2017)。オリゴデンドロサイト内での遺伝子発現の変化についての報告も散見されるが、特定の単一遺伝子の発現を経時的に見るものが多い。そこで本研究では、網羅的な解析を行い、多数のデータの中から統計的に有意に差がある遺伝子を絞り込む形で、発現変動が高い遺伝子の選抜を行った。

1-2. 選抜した遺伝子の *in vitro* での機能解析

1-1で有意な発現変動を示した遺伝子の機能解析を行うため、マウス培養オリゴデンドロサイトを用いてオリゴデンドロサイトの発達に関する解析を実施する。オリゴデンドロサイトはその前駆細胞が増殖し、遊走して成熟細胞へ分化することで髄鞘形成に至ると考えられているため、各過程における候補遺伝子の作用を解析した。

1-3. 選抜した遺伝子の *in vivo* での機能解析

培養実験で差が認められた分子の *in vivo* での発現解析を行うため、選抜した遺伝子の生体内での発現様式および発達にともなう発現量の変動を評価した。加齢に伴い発現変動が確認できた遺伝子について、その発現を抑制させる処置を施した際の髄鞘修復効果を組織学的行動学的に解析した。

2. 研究方法と経過

2-1. 高齢および若齢マウス脳由来のオリゴデンドロサイトにおける遺伝子発現変化の検討

本研究は、国立精神・神経医療研究センター神経研究所の動物実験倫理問題検討委員会および遺伝子組み換え実験安全委員会の承認を得て行った。実験動物は、日本エスエルシーおよび日本チャールズブリバーより購入し、3Rの概念を遵守して実験に用いた。

本研究で対象とする髄鞘として、神経機能と関連が深い脳梁に着目した。脳梁の髄鞘は、生後盛んに発達をはじめ、マウスでは生後3週齢で髄鞘関連タンパク質の発現が検出される。また、生後1年齢を超えたマウスでは脳梁における髄鞘関連タンパク質が乏しいことが報告されている。髄鞘関連タンパク質は髄鞘の機能獲得に必要なため、このたんぱく質の発現量の差が若齢と高齢における髄鞘機能の差と考え、それぞれのマウスの脳からオリゴデンドロサイトを単離し、遺伝子発現の差を比較した。各マウスから大脳皮質を摘出し、Neural dissociate kit (P)を用いて単一細胞を調整した。その細胞に対して、オリゴデンドロサイトの細胞表面マーカー(O4)の抗体が結合した磁器ビーズを反応させ、磁器でトラップされる細胞を回収することで、オリゴデンドロサイトを単離した。回収した細胞の純度をフローサイトメトリー法により確認したところ、72.4 ± 1.4%がO4陽性細胞であった。この細胞集団から total RNAを抽出し、RNAseqを行い各群における遺伝子発現量を検出し、GOtermの分析、階層クラスタリングとヒートマップ作成、主成分解析を実施した。

2-2. 選抜した遺伝子の *in vitro* での機能解析

オリゴデンドロサイトの発達は、OPC の増殖や遊走、そして OPC の成熟オリゴデンドロサイトへの分化により評価される。2-1.で群間での発現量に差が豊富であった遺伝子の作用を解析するため、哺乳1日齢のマウスの大脳皮質より OPC を採取した。大脳皮質をミンチングしたのちに 0.25%トリプシン-phosphate buffer saline (PBS)で 15 分、37 度で反応させたのちに、トリプシンと等量の Fetal bovine serum (FBS)を加え中和し、ピペティングで分散した。遠心後(1,500 rpm, 5 min)、DNase を 0.5 mg/ml となるように加え懸濁した後、細胞を 100 μ m セルストレイナーに通し、180 \times g で 3 分間遠心した。上清を取り除き、10% FBS-DMEM を加えて細胞を懸濁した。細胞は poly-L-lysine (PLL) コートをした 10 cm ディッシュに 5×10^5 cells/ml の密度で播種し、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ で 7-10 日間培養した。培養後、PBS で洗浄しマイクログリアを除去したのち、0.05%トリプシン-PBS を加え 36 $^{\circ}$ C で 4 分間静置した OPC をはく離した。回収した細胞は、コーティングをしていない 10 cm ディッシュに播種し、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ で 30 分間静置した。浮遊している細胞を回収し、40 μ m セルストレイナーに通した。採取した細胞は、あらかじめ PLL でコーティングをしたディッシュに 1×10^5 cells/ml となるように播種し、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ で培養した。培養 2 日後、2-1 で選抜した遺伝子に対する siRNA を Lipofectamin RNAiMAX を用いて導入し、さらに培養 2 日後にノックダウン効果を real time PCR により確認した。

ノックダウン効果が確認された細胞を用いて、細胞の増殖、遊走、分化への作用を検討した。増殖は、同細胞の培養液へ BrdU を添加し、24 時間後に固定し、BrdU 陽性細胞を呈色する Cell proliferation kit で染色し、plate reader により細胞増殖比率を評価した。遊走は、ノックダウン効果を確認した細胞を 0.25%トリプシン溶液で剥離し、Trans well の well 内に注ぎ、培養 8 時間後に well 内のメンブレンに固定液を注ぎ、DAPI で染色後、well 下層に遊走する DAPI 陽性細胞数を計測することで、遊走能を評価した。分化の評価方法は、siRNA 導入 2 日後の細胞を T3 を含む分化誘導培地へ置換し、培養 48 時間後に固定して、抗 myelin basic protein (MBP)抗体、抗 olig2 抗体を一次抗体として染色した。二次抗体としてそれぞれの一次抗体に対する抗原に Alexa fluor 488 および 568 抗体が結合した抗体および DAPI を 1 時間反応させ、染色後、

Olig2 陽性細胞分の MBP 陽性エリアを検出するとともに、DAPI 陽性細胞数および Olig2 陽性細胞を In Cell Analyzer および In Cell Developer を用いて解析した。

なお、OPC medium は、DMEM に次の試薬を加え調整した。4 mM L-glutamine, 1 mM Sodium pyruvate, 0.1% Bovine serum albumin (BSA; minimum 98% electrophoresis grade), 50 μ g/ml apo-Transferrin, 5 μ g/ml Insulin, 30 nM Sodium selenite, 10 nM Biotin, 10 nM Hydrocortisone, 10 ng/ml Platelet-Derived Growth Factor-AA (PDGF-AA), 10 ng/ml basic Fibroblast growth factor (basic-FGF; Peprotech)。分化 medium は上記から PDGF と basic-FGF を除き、T3 (20 ng/ml)を加えたものを用いた。

2-3. 選抜した遺伝子の in vivo での機能解析

2-2 でオリゴデンドロサイトの発達を制御する分子の候補となったものに関して、その生体内での発現様式を検討した。全身のどの臓器で発現が豊富かを検討するため、各臓器から RNeasy mini kit を用いて total RNA を回収し、real time PCR により臓器ごとの候補分子の mRNA レベルを SYBR green 法により検出し、臓器間の発現比率を算出した。また、マウス脳内の細胞種による発現量の差を検討するため、オリゴデンドロサイトや神経細胞、アストロサイトの表面マーカーに対する抗体を用いたソーティングを行い、real time PCR により発現量を比較した。さらに、オリゴデンドロサイトにおける加齢に伴う発現変化を確認するため、3 週齢から 1.5 年齢までの複数の月齢のマウスの脳の RNA および、同マウスの脳内オリゴデンドロサイト(O4 陽性細胞)の RNA を用いて、同様に real time PCR により発現比率の差を検討した。

加齢に伴う発現量の減少が認められた分子に関しては、その分子により若齢期のマウスの髄鞘発達が維持されるか検討した。候補の分子に対する siRNA を in vivo 用の導入試薬 (in vivo jetPEI)を用いて脳実質に投与すると、導入部位では siRNA の効果を検出することができる。生後 3 週齢のマウスの脳梁へ候補分子に対する siRNA を注入し、その後に脳梁の髄鞘を形態学的に観察した。siRNA の注入は、ガラスキャピラリーに導入試薬と siRNA の混合液を充填し、局所的に注入する手法を用いた。脳梁の組織解析のため、マウス脳から 30 mm の切片を凍結切片を作成し、免疫染色を

行った。使用した一次抗体は、MBP 抗体、Olig2 抗体、APC 抗体で、それぞれに対して、蛍光標識された二次抗体を反応させて可視化して観察した。また、髄鞘染色として、Black gold 染色も実施した。

3. 研究の成果

3-1 高齢および若齢マウス脳由来のオリゴデンドロサイトにおける遺伝子発現変化の比較

高齢および若齢マウスの脳から採取し O4 陽性細胞の細胞数を比較したところ有意な差はなかった。それぞれマウス 3 個体ずつからオリゴデンドロサイトを回収し RNA を抽出したのちに RNAseq を行った。各サンプルの遺伝子発現を count 値 (count +1 で log 値で解析) で評価し、差が見いだされた遺伝子の Top500 について群間の相関解析を実施し、若齢同士、高齢同士で高い正の相関関係があった。また、群間で差が認められた遺伝子の Biological process を調査したところ、大部分は GO として others に分類されたが、negative regulation of cell proliferation に含まれるものが複数含まれていた。細胞増殖が抑制されることで、増殖以降の細胞の発達へシフトすると予測されるため、オリゴデンドロサイトの遊走や分化を制御する遺伝子が含まれる可能性を推察した。

続いて、RNAseq により発現に差がある遺伝子を上位から順に検索したところ、*susd5* が最も群間で差がある遺伝子として抽出された。*Susd5* はヒアルロン酸に結合することが予測されている細胞外ドメインを持つタンパク質であり、Uniprot の情報を参照すると、細胞内にチロシンキナーゼリン酸化ドメイン類似構造を持つと示唆されている。現時点で *susd5* の生理機能はほぼわかっていないが、その発現は脳で認められることが Human protein atlas で示されている。そこで、*susd5* が新規のオリゴデンドロサイト発達因子である可能性を検証するため、次の培養実験を行った。

3-2 選抜した遺伝子の in vitro での機能解析

マウス脳より採取したオリゴデンドロサイトに対して *susd5* の siRNA を導入し、細胞の増殖、遊走、分化に対する作用を検討した。細胞増殖と遊走には群間で差は認められなかった。一方、分化に関しては、*susd5* の発現を抑制させた細胞を分化誘導培地へ置換して培養を継続し、培養後の MBP 陽性領域を Olig2 陽性細胞数で割り返すという形で、分化力を評価

した。その結果、*susd5* 発現抑制細胞では MBP 領域が狭いという結果であり、このことから *susd5* が分化効果の発揮を後押しする働きがあることが示唆された。なお、同培養後の Olig2 陽性細胞には差がなかったことから、細胞の生存率にも影響がないことが示唆された。

3-3 選抜した遺伝子の in vivo での機能解析

まず *susd5* の生体内での発現洋式について検討した。Real time PCR による検討の結果、脳と肝臓で他臓器より mRNA 量が豊富であり、これは公開データベースと同様の傾向であった。また、脳内の細胞種ごとの *susd5* の発現量の比較するため、3 週齢のマウス脳からアストロサイト、神経細胞、ミクログリア、血管内皮細胞、オリゴデンドロサイトを採取し *susd5* の mRNA 量を検出したが、オリゴデンドロサイトで特異的に高発現していた。続いて、加齢に伴いオリゴデンドロサイトの *susd5* の発現が低下するか検討した。各週齢のマウスより O4 陽性細胞を採取し、その細胞での mRNA の相対量を検出した結果、週齢に対して負の相関をもって *susd5* の発現量が調節されており、加齢にともない *susd5* の発現量が低下することが示唆された。

若齢マウスのオリゴデンドロサイトで豊富に発現する *susd5* が脳梁の発達の維持に寄与するかを検討するため、*susd5* の発現を抑制させたマウスの脳梁を組織学的に解析した。まず *susd5* の発現抑制効果を確認するため、siRNA 注入部位の組織を採取し、real time PCR で発現抑制効果を確認し、*susd1* の発現が妨げられないことからオフターゲット効果を確認した。また、解析部位を確認するために蛍光標識されたオリゴヌクレオチドを同様に注入して、蛍光色素の拡散領域を調査することで、髄鞘の会脊髄を定めた。実際に *susd5* の発現を抑制させたマウスでの脳切片の解析を行ったところ、コントロール群と比較して MBP 陽性エリアの低下と APC 陽性細胞数の低下が観察された。一方、Olig2 陽性細胞数に差は認められなかったことから、in vitro の結果と同様に、*susd5* はオリゴデンドロサイトの数には影響しないことと示唆させた。また、black gold 染色により可視化させた髄鞘の領域も、*susd5* の発現抑制群ではコントロール群より狭い様子が観察され、これらの結果から発達期にオリゴデンドロサイトに豊富に発現している *susd5* が髄鞘の発達、特にオリゴデンドロサイトの分化を促進させることで、髄鞘の恒常性維持を担っていることが示唆された。

4. 今後の課題

発生期に発現量が豊富な分子が、髄鞘の正常な発達の維持に寄与することが示唆された。ただ、現時点では外科的処置で可能な限局した髄鞘の形成についての評価にとどまっているため、オリゴデンドロサイト特異的な遺伝子欠損マウスを用いた解析が必要と考える。また、オリゴデンドロサイトの発達に関連する神経機能も、同コンディショナルノックアウトマウスを用いた解析により評価できると期待される。

さらに、加齢に伴う髄鞘の破綻に対して、発生期で髄鞘維持を担う分子の働きを高めることで、高齢個体での髄鞘脱落が抑制できるかを検討していくこと、またそれにより高齢個体で検出される神経機能の低下が改善するかを追

求したい。そして、本研究で注目したのは生理的な加齢に伴う髄鞘不良や神経機能の低下であるが、髄鞘の破綻は種々の脳神経疾患で検出されることから、病態モデルマウスに対して、得られた知見を基にした介入が治療効果を発揮するかを検討すること、また得られた分子メカニズムがヒトサンプルでも検出されるかを検討することで、臨床的な意義が深まると期待される。

5. 研究成果の公表方法

今後の課題に関する実験が終了次第、論文投稿へ進める。

以上