

AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

旭川医科大学研究フォーラム (2016.3) 16:16-17.

平成25・26年度「独創性のある生命科学研究」個別研究課題 5) 多発性硬化症における再髄鞘化療法を目指した基礎研究

板東 良雄

5) 多発性硬化症における再髄鞘化療法を目指した基盤研究

研究代表者 板東 良雄

【研究の背景と目的】

多発性硬化症 (multiple sclerosis : MS) は中枢性炎症性脱髄疾患であり、オリゴデンドロサイト (oligodendrocytes : OLs) が形成する髄鞘が炎症性に壊されることにより脱髄や2次的に軸索障害が生じると考えられている。本邦における罹患率は約10人/10万人とされており、北欧・北米といった高緯度地域ほど高い罹患率になる傾向がある。したがって、本邦では北海道 (特に十勝・旭川地方) での罹患率が他の地域に比べて高いことが報告されている。本疾患に対する根治療法は現在のところ存在せず、対症療法が主な治療法となっている。一方、病理学的には脱髄を起こしている病変部位近傍にオリゴデンドロサイト前駆細胞が存在しているにも関わらず、髄鞘再生が起こっていないことも明らかとなっており、このような前駆細胞が何故髄鞘化しないのか、どのようにして髄鞘化に導くかが重要な問題となっている。さらに、ES細胞やiPS細胞を用いた分化誘導実験においてもOLsを高純度に採取する方法は未だ確立されていない。そこで本研究では、生体内で髄鞘化を効率よく起こすための“質の良いオリゴデンドロサイト前駆細胞 (Oligodendrocyte Precursor Cells: OPCs)”を如何に作成するかについて検討を行った。

【研究方法】

ES細胞からOPCsへの分化誘導に関しては発生学に基づいた既存の方法 (Chandran et al., Development 2003; Bouhon et al., Stem Cells 2006) の一部を改良したものをを用いた。具体的には、培地に含まれるinhibitorや栄養因子などの組成を随時変えながら、ES細胞から誘導した神経幹細胞を一度olig1陽性の運動神経分化に方向付けを行い、bFGF/PDGF-AA添加によってOPCsへの分化を行った (脊髄の発生を模倣)。OPCsは一般的にPDGFR α を発現しているため、PDGFR α の

発現を指標にOPCsへの分化効率を評価した。

次にOPCsからOLsへの分化誘導実験を行った。分化誘導には一般的に良く用いられている甲状腺ホルモンT3を用いた (既存の報告の多くは~20%程度の分化効率)。OLsの特異的マーカー (O1, O4, MBPなど) の発現を指標に分子生物学および形態学的な検討により分化状態や効率を評価した。

【結果】

マウスES細胞 (CMTI-1) を用いて検討したところ、20~24日でPDGFR α 陽性のOPCsに高純度に変化させることに成功した。このタイムスケジュールは胎児脳由来の初代培養OLsの場合とほぼ同様であった。しかしながら、CMTI-1は129Sv由来であり、DISC-1変異を持つことが知られており (DISC-1は統合失調症関連遺伝子)、最適な条件とは言い難い。そこで、次にC57Bl/6マウス系統のES細胞 (DSファーマ社) に変更し、CMTI-1を用いた先行実験を元にOPCsの作成を試みた。これまでの検討からCMTI-1に比べて若干困難を伴うが、C57Bl/6マウス由来のES細胞でもOPCsまでCMTI-1とほぼ同様のタイムスケジュールで分化誘導を行えることを確認した (図1)。これらのOPCsは凍結ストックが可能であり、ES細胞からOPCsへの分化誘導に要する時間は短縮できることを確認した。

次に、成熟OLsへの分化効率や髄鞘化に関して解析・評価を行ったところ、T3 1-3 μ Mによる分化効率は免疫染色法による評価を行った限りではほとんどの細胞がMBP陽性細胞のOLsに分化していた。また、ウェスタンブロット法によってもMBPの発現を確認した。

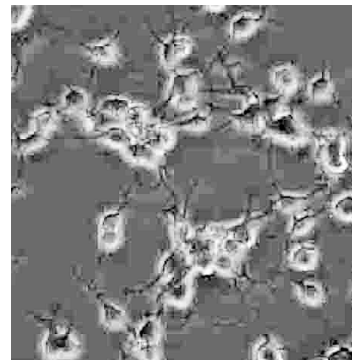


図1 ES細胞から誘導されたOPC (FGFによる分化誘導28日目)

【本研究の成果と将来性】

本研究では ES 細胞から高効率に OLs に分化誘導を行える方法を確認した。次のステップとして、生体内でこのような OPCs が髄鞘化を起こせるか否かを検討することを計画している。具体的には、生直マウスや髄鞘形成不全 shiverer マウスに移植を行い、in vivo でも髄鞘化が起こることを明らかにする。さらに、マウス多発性硬化症モデルなどの病態モデルへ細胞移植を行い、再髄鞘化療法を目指した基盤研究やこのような OPCs を用いた創薬への応用を検討していきたい。

また、本技術は iPS 細胞から OPCs を作成する際にも応用できる基盤的技術であり、将来的には MS 患者から iPS 細胞を樹立することを視野に入れつつ、産学連携プロジェクトに発展させていきたいと考えている。

【謝 辞】

今回、このような機会を与えていただきましたことをこの場を借りて厚く御礼申し上げます。