

輝け次代の担い手たち

白質障害モデルを応用した病態解明

山崎 礼二

自治医科大学医学部解剖学講座組織学部門

はじめに

中枢神経系の髓鞘（ミエリン）はグリア細胞の1つであるオリゴ денドロサイトによって形成される¹⁾。ミエリンは絶縁体として機能し、跳躍伝導に不可欠な構造であるが、1つのオリゴデンドロサイトは突起を数本から多いものでは数十本伸ばし、突起の先端が軸索に巻き付くことによってミエリンが形成されている²⁻⁴⁾。このような有髓線維を多く含む脳領域は白質と呼ばれ、ミエリンが脂質に富んだ構造をしていることから肉眼的に白く観察される^{5, 6)}。白質が障害される代表的な疾患には多発性硬化症が挙げられる。多発性硬化症は自己免疫の異常によって発症する脱髓性疾患だが、脱髓に伴う運動麻痺や感覚障害を呈する^{7, 8)}。また、脳梗塞に伴う脳虚血ではオリゴデンドロサイトの消失に伴う白質障害が見られることも知られている。通常、白質が障害されるとオリゴデンドロサイト前駆細胞が障害部位に集積し、分化に伴い再ミエリン化が誘導される^{9, 10)}。しかしながら、病態に応じて再ミエリン化が阻害されることが治療の大きな弊害となっており、病態の予後に大きく影響するが、白質の再生阻害機構には不明な点が存在する。そのため、オリゴデンドロサイトの分化に伴う白質再生を誘導する治療法開発が望まれている。本稿では、筆者がこれまで取り組んできた白質障害モデルマウスの開発からその応用と、これらの研究を通して展開してきた白質再生の阻害機構について概説する。

内包脱髓モデルマウスとその応用

白質障害を伴う神経疾患の治療法開発には、これまで様々なモデルマウスが汎用されてきた。特に炎症性脱髓反応を模倣する実験的自己免疫性脳脊髓炎（EAE）モデルによって大きな進歩がもたらされ、様々な免疫調節薬が開発された^{11, 12)}。しかし、従来使用してきたクプリゾンモデルやEAEモデルは作製に時間と手間がかかり、脱髓範囲や神経症状の調節は困難であった¹¹⁻¹³⁾。そのため、従来の白質障害モデルでは、脱髓に伴う運動機能障害と組織再生を再現性良く評価することは困難であった。そこで、界面活性剤であるリゾレシチンを四肢の運動機能を制御する皮質脊髄路の主要経路である内包白質に注入し、局所的に内包を脱髓させることで、組織再生と運動機能回復の両面を評価できる病態モデルマウスの開発に着手した。この内包脱髓モデルでは、急性の運動機能障害（半身麻痺）が誘導されるが、徐々に運動機能の回復が見られ、投与1ヶ月後にはコントロール群と同レベルまで運動機能が回復する。また、詳細な組織解析を行い、機能回復と共に再ミエリン化および軸索障害の軽減が見られることを明らかにした¹⁴⁾。同様に、これまで脱髓モデルによる病態解明や再ミエリン化の評価が頻繁に行われてきたが、脱髓部位のみを摘出することは困難であるという問題点があった。そこで、生染色にも使用されるニュートラルレッドに着目し、脱髓マウスにニュートラルレッドを腹腔内投与するだけで生体内の脱髓部位が標識され、肉眼的に病変領域が観察できることを発見した^{15, 16)}。この病変

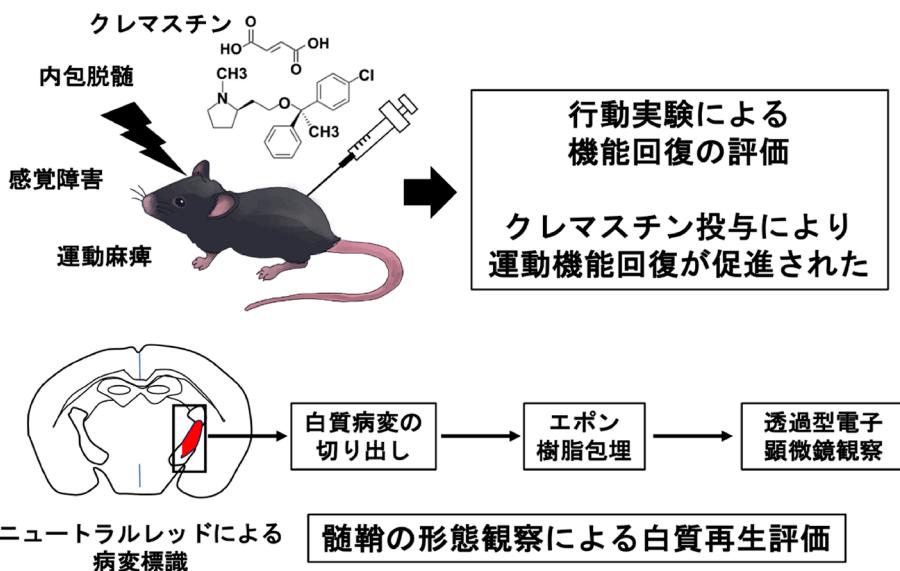


図1 内包脱髓モデルを応用した薬剤評価系の構築

リゾレシチンを内包に注入後、クレマスチンの投与を開始することで再ミエリン化促進に伴う機能回復が認められた。また、ニュートラルレッドを腹腔内投与することで、病変部位のみを肉眼的に観察して摘出することができる。この標識法によって摘出された組織を電顕観察することで、より正確な薬剤評価が可能となる。

標識法により、正確かつ迅速なサンプリングが可能になることや脱髓性疾患に対する病態解明や創薬研究にも幅広く応用可能となることが期待される¹⁷⁾。

そこで、これらの病態モデルと病変部位の標識法を薬剤評価に応用できるかを検討した。現在、最も再ミエリン化促進薬としてエビデンスの高い薬剤にはクレマスチンがあげられる。クレマスチンはハイスループットスクリーニングによって治療候補化合物として同定されて以来、マウスにおける再ミエリン化促進効果が数多く報告されてきた。そこで、内包脱髓モデルマウスに抗ヒスタミン薬であるクレマスチンを投与することで組織再生だけでなく、再ミエリン化に伴う運動機能回復を評価することに成功した^{18, 19)}。これらの研究から、クレマスチン投与による再ミエリン化の促進によって、機能回復が見られることを証明した。また、ニュートラルレッドによる標識法を応用し、脱髓病変のみを電子顕微鏡観察用に摘出し、薬効評価実験にも応用できることを実証した。

これらの研究より、内包脱髓モデルを応用した

脱髓性疾患に対する新たな薬剤評価系の構築に成功した(図1)。

白質病変におけるI型コラーゲンの沈着

前項で述べたように、皮質脊髄路の主要経路である内包に界面活性剤であるリゾレシチンを注入することで、内包白質の障害に伴う半身麻痺および再ミエリン化による機能回復が認められる新たな病態モデルの開発に成功した^{14, 18)}。その際、血管収縮剤であるエンドセリン1(ET1)を内包へ投与する白質梗塞モデルとの比較を行い、偶然にも白質が再生しない領域では、共通してI型コラーゲンが沈着していることを見出した。最近になって、多発性硬化症患者の死後脳解析から脱髓病変の血管周囲にコラーゲン線維が沈着していることや細胞外マトリックスがオリゴデンドロサイトの分化阻害に関与することが報告され始めた^{20, 21)}。そこで、次にI型コラーゲンが白質の再生阻害に寄与しているのではないかと仮説を立て、I型コラーゲンの役割を明らかにすることを目的として

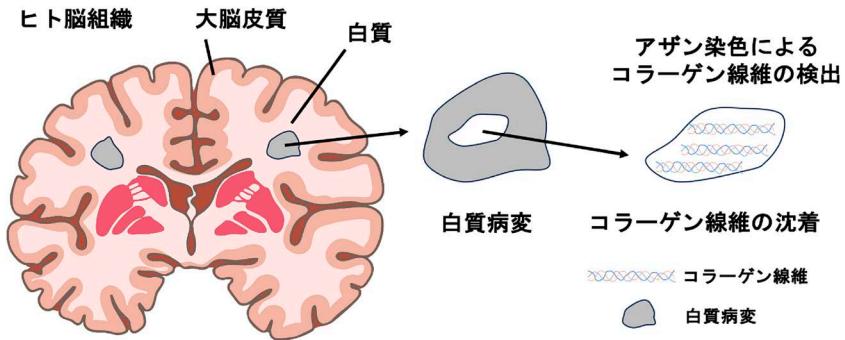


図2 ヒト白質病変におけるコラーゲン線維の沈着

多発性硬化症や脳梗塞患者の脳組織切片を用いてアザン染色を行なったところ、脳白質梗塞病変にコラーゲン線維やコラーゲンの凝集体が観察された。

研究を行った。

まず、多発性硬化症患者の生検組織と脳梗塞患者の剖検組織を用いて、白質病変にコラーゲン線維が沈着しているかをアザン染色によって調べた。その結果、多発性硬化症患者の生検組織中では、一部の白質障害領域に大量のコラーゲンが検出された。また、脳梗塞患者の剖検組織解析からも同様に、白質障害部位にコラーゲン線維やコラーゲンの凝集体が観察された(図2)。

次に、ET1誘導性の白質梗塞モデルマウスを用いて、I型コラーゲンの産生細胞を同定するため、免疫組織化学染色法と *in situ* hybridization法を組み合わせて解析した。その結果、病変部位に集積する全 Iba1 陽性細胞のうち、約2割の細胞が I型コラーゲンをコードする *Colla1* の mRNA を発現していた。これらの Iba1 陽性細胞には脳内に内在するミクログリアと脳障害時に末梢から流入する单球由来マクロファージが混在する²²⁻²⁴⁾。これまでの研究では、血液脳関門の破綻後に病変部に浸潤した单球由来マクロファージは、保護的である一方で、神経炎症時の貪食やインターロイキン-6、NO の分泌に関与し、疾患を増悪させることも報告されている²⁵⁾。そこで、单球由来マクロファージが I型コラーゲンを分泌しているのではないかと仮説を立て解析を進めた。その結果、白質病変に存在する *Colla1* mRNA 発現細胞の多くが单球由来マクロファージであることを突き止めた。さらに、その後の電子顕微鏡による解析か

ら、単球様の形態をした細胞がコラーゲン線維を分泌する様子が観察された。以上の結果より、白質障害領域に分泌されるコラーゲン線維は末梢から流入する单球由来マクロファージによって産生されることが明らかになった。

I型コラーゲンによる白質再生阻害作用

次に、I型コラーゲンが白質障害後の機能回復および再ミエリン化を阻害するかを調べるために、リゾレシチンに I型コラーゲンを混合し、内包に注入することで内包脱髓後の再ミエリン化および機能回復が阻害されるかを検証した。行動実験によって運動機能を計測したところ、内包に注入した7日後から21日後にかけて、コントロール群では有意に運動機能の回復が見られたのに対し、I型コラーゲンを混合することによって運動機能回復が阻害された。また、病変部位の組織学的解析から、I型コラーゲン存在下では神経炎症と軸索障害の増悪に加え、グリア瘢痕形成が促進されていることが示された。さらに、オリゴデンドロサイトの分化の程度を比較したところ、I型コラーゲン存在下ではオリゴデンドロサイト前駆細胞の数が有意に多いのに対し、成熟オリゴデンドロサイトの数が有意に少ないとから I型コラーゲンを混合することでオリゴデンドロサイトの分化が阻害された。最後に、ミエリンの形態を電子顕微鏡観察によって解析したところ、I型コ

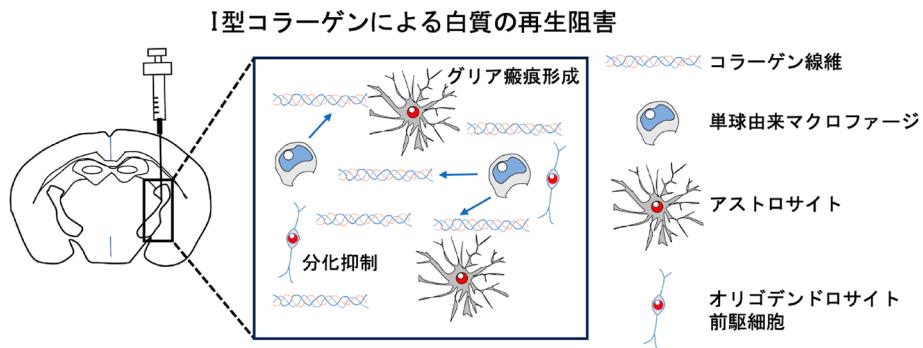


図3 新たな白質再生阻害機構

白質障害部位では末梢から流入する単球由来マクロファージがI型コラーゲンを分泌する。分泌されたI型コラーゲンがオリゴデンドロサイト前駆細胞の分化を抑制するとともにグリア瘢痕形成を促進させ、機能回復および再ミエリン化を阻害する。

ラーゲン存在下では有意に有髓軸索が少なく、G-ratio (ミエリンの厚さの指標となる数値: 軸索とミエリンを含んだ有髓線維の直径の比率で算出されるため、数値が低いほどミエリンが厚いことを示す) が高いことから再ミエリン化が阻害されていることが明らかになった。本研究から、白質障害領域に分泌されるI型コラーゲンは白質の再生阻害因子であることが示された²⁶⁾ (図3)。

おわりに

近年、精神疾患や統合失調症など様々な神経疾患でも白質に異常を伴うことが報告されている。また、これまでオリゴデンドロサイトによる再ミエリン化を標的として、分化やミエリン形成を制御するシグナルや神経細胞、その他グリア細胞との相互作用に焦点を当てた研究が数多く報告されてきた。しかしながら、白質再生を担うオリゴデンドロサイトを標的とした有効な治療法は存在しない。そのため、今後ますます白質再生を促進させる治療法にニーズが増えてくると考えられる。本研究では、筆者が留学中に開発した病態モデルから着想を得て、新たな白質再生阻害因子を同定した。今後はより詳細な分子機構を明らかにすることで、白質障害を伴う疾患に対する治療法開発へと展開していきたい。

謝 辞

本稿で紹介いたしました研究成果は、自治医科大学医学部解剖学講座組織学部門で得られました。多大なるご指導を賜りました大野伸彦教授に厚く御礼申し上げます。また、研究者として一から育てていただいた東京薬科大学馬場広子名誉教授 (現新潟医療福祉大学教授)、山口宜秀准教授、留学先のメンターであったGeorgetown大学Jeffrey Huang博士をはじめ、これまでご指導いただきました諸先生方、本稿の執筆機会を与えて下さいました日本神経化学会出版広報委員会の先生方、並びに関係者の先生方に深く感謝申し上げます。今後も研究をさらに発展させるため、精進して研究に取り組みたいと考えております。今後ともご指導ご鞭撻のほど、よろしくお願い申し上げます。

文 献

- 1) Bercuty KK, Macklin WB. Dynamics and mechanisms of CNS myelination. *Dev Cell*, 32(4), 447–458 (2015). doi: 10.1016/j.devcel.2015.01.016
- 2) Yamazaki R, Ohno N. Myosin superfamily members during myelin formation and regeneration. *J Neurochem*, 168(9), 2264–2274 (2024). doi: 10.1111/jnc.16202
- 3) Osanai Y, Yamazaki R, Shinohara Y, Ohno N. Heterogeneity and regulation of oligodendrocyte morphology.

Front Cell Dev Biol, 10, 1030486 (2022). doi: 10.3389/fcell.2022.1030486

- 4) Nave KA, Werner HB. Myelination of the nervous system: Mechanisms and functions. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 30(1), 503–533 (2014). doi: 10.1146/annurev-cellbio-100913-013101
- 5) Fields RD. Neuroscience. Change in the brain's white matter. *Science*, 330(6005), 768–769 (2010). doi: 10.1126/science.1199139
- 6) Ribeiro M, Yordanova YN, Noblet V, Herbet G, Ricard D. White matter tracts and executive functions: A review of causal and correlation evidence. *Brain*, 147(2), 352–371 (2024). doi: 10.1093/brain/awad308
- 7) Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet*, 372(9648), 1502–1517 (2008). doi: 10.1016/S0140-6736(08)61620-7
- 8) Reich DS, Lucchinetti CF, Calabresi PA. Multiple Sclerosis. *N Engl J Med*, 378(2), 169–180 (2018). doi: 10.1056/NEJMra1401483
- 9) Huang S, Ren C, Luo Y, Ding Y, Ji X, Li S. New insights into the roles of oligodendrocytes regulation in ischemic stroke recovery. *Neurobiol Dis*, 184, 106200 (2023). doi: 10.1016/j.nbd.2023.106200
- 10) Youssef MI, Ma J, Chen Z, Hu WW. Potential therapeutic agents for ischemic white matter damage. *Neurochem Int*, 149, 105116 (2021). doi: 10.1016/j.neuint.2021.105116
- 11) Constantinescu CS, Farooqi N, O' Brien K, Gran B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol*, 164(4), 1079–1106 (2011). doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01302.x
- 12) Robinson AP, Harp CT, Noronha A, Miller SD. The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS: Utility for understanding disease pathophysiology and treatment. *Handb Clin Neurol*, 122, 173–189 (2014). doi: 10.1016/B978-0-444-52001-2.00008-X
- 13) Matsushima GK, Morell P. The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system. *Brain Pathol*, 11(1), 107–116 (2001). doi: 10.1111/j.1750-3639.2001.tb00385.x
- 14) Yamazaki R, Ohno N, Huang JK. Acute motor deficit and subsequent remyelination-associated recovery following internal capsule demyelination in mice. *J Neurochem*, 156(6), 917–928 (2021). doi: 10.1111/jnc.15142
- 15) Baydyuk M, Cha DS, Hu J, Yamazaki R, Miller EM, Smith VN, Kelly KA, Huang JK. Tracking the evolution of CNS remyelinating lesion in mice with neutral red dye. *Proc Natl Acad Sci USA*, 116(28), 14290–14299 (2019). doi: 10.1073/pnas.1819343116
- 16) Yamazaki R, Osanai Y, Kouki T, Shinohara Y, Huang JK, Ohno N. Macroscopic detection of demyelinated lesions in mouse PNS with neutral red dye. *Sci Rep*, 11(1), 16906 (2021). doi: 10.1038/s41598-021-96395-4
- 17) Yamazaki R, Ohno N. Neutral red labeling: A novel vital staining method for investigating central and peripheral nervous system lesions. *Acta Histochem Cytochem*, 57(4), 131–135 (2024). doi: 10.1267/ahc.24.00038
- 18) Yamazaki R, Ohno N. The mouse model of internal capsule demyelination: A novel tool for investigating motor functional changes caused by demyelination and for evaluating drugs that promote remyelination. *Acta Histochem Cytochem*, 57(1), 1–5 (2024).
- 19) Yamazaki R, Osanai Y, Kouki T, Huang JK, Ohno N. Pharmacological treatment promoting remyelination enhances motor function after internal capsule demyelination in mice. *Neurochem Int*, 164, 105505 (2023). doi: 10.1016/j.neuint.2023.105505
- 20) Absinta M, Nair G, Monaco MCG, Maric D, Lee NJ, Ha SK, Luciano NJ, Sati P, Jacobson S, Reich DS. The “central vein sign” in inflammatory demyelination: The role of fibrillar collagen type I. *Ann Neurol*, 85(6), 934–942 (2019). doi: 10.1002/ana.25461
- 21) Yahn SL, Li J, Goo I, Gao H, Brambilla R, Lee JK. Fibrotic scar after experimental autoimmune encephalomyelitis inhibits oligodendrocyte differentiation. *Neurobiol Dis*, 134, 104674 (2020). doi: 10.1016/j.nbd.2019.104674
- 22) Kim E, Cho S. Microglia and monocyte-derived macrophages in stroke. *Neurotherapeutics*, 13(4), 702–718 (2016). doi: 10.1007/s13311-016-0463-1
- 23) Konishi H, Okamoto T, Hara Y, Komine O, Tamada H,

Maeda M, Osako F, Kobayashi M, Nishiyama A, Kataoka Y, Takai T, Udagawa N, Jung S, Ozato K, Tamura T, Tsuda M, Yamanaka K, Ogi T, Sato K, Kiyama H. Astrocytic phagocytosis is a compensatory mechanism for microglial dysfunction. *EMBO J*, 39(22), e104464 (2020). doi: 10.15252/embj.2020104464

24) Wicks EE, Ran KR, Kim JE, Xu R, Lee RP, Jackson CM. The translational potential of microglia and monocyte-derived macrophages in ischemic stroke. *Front Immunol*, 13, 897022 (2022). doi: 10.3389/fimmu.2022.897022

25) Spiteri AG, Wishart CL, Pamphlett R, Locatelli G, King NJC. Microglia and monocytes in inflammatory CNS disease: Integrating phenotype and function. *Acta Neuropathol*, 143(2), 179–224 (2022). doi: 10.1007/s00401-021-02384-2

26) Yamazaki R, Azuma M, Osanai Y, Kouki T, Inagaki T, Kakita A, Takao M, Ohno N. Type I collagen secreted in white matter lesions inhibits remyelination and functional recovery. *Cell Death Dis*, 16(1), 285 (2025). doi: 10.1038/s41419-025-07633-w