

細胞保護を標的とした多発性硬化症に対する脱髄予防法の開発

自治医科大学医学部解剖学講座組織学部門・助教 山崎 礼二



背景・目的

多発性硬化症は中枢神経系のミエリンが破壊されることにより、神経麻痺や感覚障害が引き起こされる難治性の脱髄性疾患である。現在、多発性硬化症の再発予防には免疫抑制薬が使用されているが、再発と寛解を繰り返すことで病状が進行する。これまでの多発性硬化症研究には頻繁に脱髄モデルマウスが使用されてきた。しかしながら、従来の脱髄モデルでは脱髄後の組織再生と運動機能を同時に評価することは困難であった。そこで、研究代表者は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脱髄誘導剤であるリゾレシチンを局所投与することで半身麻痺が誘導され、その後の組織再生に伴い運動機能が回復する新たな脱髄モデルの開発に成功した(図1)。また、研究代表者はこれまでの研究から細胞保護効果を持つクレアチンに脱髄軽減効果があることを見出した。

そこで、本研究は研究代表者が独自に開発した内包脱髄モデルマウスを用いた薬剤評価系を確立させ、内包脱髄モデルを用いてクレアチンの効果を運動機能解析と組織学的解析の両面から検証することを目的とした。

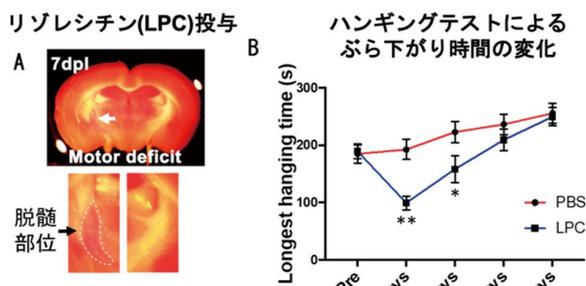


図1 内包脱髄モデルの表現系

A. LPC投与7日後、ニュートラルレッドによって内包に大きな脱髄(点線内)が観察された。B. 内包脱髄後に急性の運動麻痺が見られ、再ミエリン化とともに運動機能が回復する。

方法・結果

① 内包脱髄モデルマウスを用いた薬剤評価系の確立

内包脱髄モデルマウスによって、薬剤評価が可能かどうかを調べるために、脳定位固定装置を用いて成熟マウスの内包白質にリゾレシチンを投与し、内包脱髄モデルマウスを作製した。次に、現在再ミエリン化を促進することが明らかになっているクレマスチンをポジティブコントロールとして、早期の脱髄が観察されるリゾレシチン投与3日後からPBSまたはクレマスチン(10mg/kg)を腹腔内に1日1回計7日間投与した。その後脱髄誘導10日後の運動機能を測定するために、Grip strength test(握力試験)とワイヤーハンギングテストを行った。その結果、PBS投与群と比べてクレマスチン投与群では握力が上昇し、ワイヤーハンギングテストによるぶら下がり時間が伸びた。また、内包脱髄に伴う半身麻痺の程度を比較するためにシリンダーテストを行なったところ、クレマスチン投与により半身麻痺の軽減が見られた。次に、組織学的に再ミエリン化が促進されている

かを調べるためにマウス脳凍結切片と超薄切片を作製し、各種マーカーを用いた免疫蛍光染色法と電子顕微鏡観察によって解析した。その結果、クレマスチンの投与によりミエリン形成細胞である成熟オリゴデンドロサイトの増加と軸索障害の軽減が観察された。また、電子顕微鏡解析から脱髄軸索数の減少と再ミエリン化の促進が認められた。

② 内包脱髄モデルマウスを用いたクレアチンの薬効解析

成熟マウスにクレアチン欠損飼料 (CR-Def) または2%クレアチン含有飼料 (CR) を4週間摂取させ、クレアチン欠乏マウスとクレアチンを十分に摂取したマウスを作製した。次に、これらのマウスの内包にリゾレシチンを注入することで内包脱髄モデルを作製した。クレアチン投与により内包脱髄に伴う運動機能障害が軽減されるかを検証するために、リゾレシチン注入前、注入7、14日後に握力試験とワイヤーハンギングテストを行った。その結果、CR-Def投与群ではリゾレシチン注入7日後に顕著な運動機能障害が観察された。それに対して、CR投与群ではリゾレシチン注入7日後には注入前と比べて内包脱髄に伴う運動機能障害が見られなかった。また、電子顕微鏡による観察結果から、クレアチンの長期摂取によりリゾレシチンによる脱髄が軽減される可能性が示唆された。

考察と今後の展望

本研究により、内包脱髄モデルマウスを用いた新たな薬剤評価系を構築することができた。そのため、このモデルマウスを用いることで再ミエリン化に伴う運動機能評価が可能となり、これまで以上に有効な薬剤評価ができると考えられる。また、クレアチンの経口摂取により脱髄に伴う運動機能障害を軽減させる可能性が示された。

従来の多発性硬化症治療では免疫細胞に作用する治療法が中心であったが、クレアチンは細胞の代謝機構にアプローチする新たな再発予防法である。そのため、従来の再発予防薬とは明らかに作用機序が異なる。したがって、将来的には従来の免疫抑制薬とクレアチンのような細胞代謝の調節薬を併用することで、より高い再発予防効果が期待される。今後はクレアチンによる髄鞘保護メカニズムを明らかにし、多発性硬化症の治療法開発に繋げたいと考えている。

謝 辞

この度は公益財団法人難病医学研究財団からのご支援をいただきありがとうございました。この場をお借りして心より感謝を申し上げますとともに、貴財団のますますの発展と少しでも早く多くの難病が克服されることをお祈りいたします。

論 文

Reiji Yamazaki, Yasuyuki Osanai, Tom Kouki, Yoshiaki Shinohara, Jeffrey K. Huang & Nobuhiko Ohno

Macroscopic detection of demyelinated lesions in mouse PNS with neutral red dye

scientific reports; <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96395-4>