

論文名 : Histological detection of dynamic glial responses in the dysmyelinating *Tabby-jimpy* mutant brain.

(ミエリン形成不全 *Tabby-jimpy* マウス脳におけるグリア応答の組織学的検出)

新潟大学大学院医歯学総合研究科 (論文博士は氏名のみでも可)

氏名 池田 正直

---

(以下要約を記入する)

( 目 的 )

オリゴデンドロサイトは、中枢神経系において軸索の周囲に髓鞘 (ミエリン) を形成するグリア細胞である。*jimpy* (*jp*) 変異マウスは、中枢神経のオリゴデンドロサイトに異常を呈し、ミエリン形成不全疾患であるペリツェウス・メルツバッハー病 (PMD) のモデル動物として知られる。*jp* マウスの原因遺伝子は X 染色体上に存在する *Proteolipid protein* (*PLP*) 遺伝子である。*jp* マウスは点突然変異を持ち、Exon5 のスキップや C 末端のフレームシフトを引き起こし、そのオリゴデンドロサイトでは異常な *PLP* を発現する。その結果、異常な *PLP* タンパクの蓄積が、小胞体 (ER) ストレスや細胞死につながるものが明らかになってきた。*jp* 変異マウス脳におけるグリア応答を組織学的に解析するため、種々の系譜特異的マーカーを用いて組織解析を行った。

( 方 法 )

生後 3 週齢の *Tabby-jimpy* (*Ta-jp*) 二重変異マウスを用いて組織解析を行った。二重変異マウスを用いた理由は *Ta* 遺伝子と *jp* 遺伝子は同一の X 染色体上に存在し、*Ta-jp* 変異雄マウス (*Ta-jp/Y*) およびヘテロ接合体雌マウス (*Ta-jp/+*) いずれも特徴的な毛色を呈することから、変異マウスの同定を容易に行うことができるためである。対照として、野生型雄マウス (*+/Y*) を用いた。生後 3 週でマウスを灌流固定し、脳を剖出した。パラフィン包埋した後にパラフィン切片を作成し、種々のマーカーで免疫染色法および *in situ* ハイブリダイゼーションによる組織解析を行った。具体的には、抗 *PLP* 抗体、抗 Myelin basic protein (MBP) 抗体によるミエリンの染色、CC-1 抗体による成熟オリゴデンドロサイト、および抗 *Olig1* 抗体、抗 *Olig2* 抗体によるオリゴデンドロサイト前駆細胞、抗 Glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体によるアストロサイト、抗 *Iba1* 抗体、抗 *CD11b* 抗体によるミクログリアの染色を行った。さらに *PLP* mRNA 発現や ER ストレスを検出するため、*PLP* および *CHOP* (別名 *Ddit3*) プロンプを用いた *in situ* ハイブリダイゼーションによる解析を行った。

( 結 果 )

*Ta-jp* マウスは同腹仔に比べて体のサイズが小柄であった。生後 2 週で企図振戦を呈し、さらに生後 3 週になると後肢が麻痺し、全身の痙攣を認めた。*Ta-jp* マウス脳の MBP 染色は遺残したオリゴデンドロサイトが標識され、突起が太く異常な染色像を示した。

オリゴデンドロサイトマーカーの CC-1 や、および前駆細胞マーカーの Olig2 の染色を行うと、*Ta-jp* マウス脳におけるオリゴデンドロサイト系譜細胞の数は有意に減少していた。生後 21 日の切片において Olig1 転写因子の免疫染色を行うと、野生型マウスでは細胞質染色が認められたのに対し、*Ta-jp* マウスでは核が染色され、後者の脳では髄鞘化が継続して起きていることが示唆された。変異マウス脳においては、PLP の C 末端を標識する抗 PLP 抗体 (AA3) による染色シグナルは見られなかったが、in situ ハイブリダイゼーションによる *PLP* mRNA は弱く発現しており、変異型 PLP が発現したという過去の報告に矛盾しなかった。生後 21 日の変異マウス脳でオリゴデンドロサイトが残存する白質の内包や脳梁において、ミクログリアマーカーである *Iba1* や *CD11b* の強い染色が認められ、活性化型ミクログリアが有意に増加していた。GFAP の高シグナルを呈する活性化アストロサイトも、主に白質で観察された。さらに、*Ta-jp* マウスの残存オリゴデンドロサイトにおいては、ER ストレスで発現が上昇する *CHOP* mRNA が強発現することが示された。

#### ( 考 察 )

本研究では、*Ta-jp* マウス脳の組織学的解析により、残存するオリゴデンドロサイトの局在パターンを観察することができた。また、Olig1 タンパクの細胞内局在の解析により、生後 21 日の *Ta-jp* マウスの脳において、髄鞘化が継続して起こっていることが示唆された。

*jp* マウスの脳から初代培養したオリゴデンドロサイトの小胞体に、変異型 PLP タンパクが蓄積するという報告がある。本研究では、*Ta-jp* マウス脳において *PLP* mRNA の弱い発現が観察された。*jp* マウス脳において細胞死を起こしつつあるオリゴデンドロサイトの形態やミエリンを取り込むミクログリアの形態についての報告もなされている。これらは、*jp* 発症に際して変異 PLP を発現するオリゴデンドロサイトが細胞自律的に細胞死を引き起こすという考えに矛盾しない。さらに、PLP ノックアウトマウスが *jp* マウスの表現型より軽症であることを踏まえると、*jp* 変異をもつ異常 PLP タンパクは、機能獲得メカニズムにより細胞毒性を示していると考えられる。

*Ta-jp* マウスのオリゴデンドロサイトにおいて *CHOP* 発現の強い誘導を認めたことから、*CHOP* プロンプは、ER ストレスを生じたオリゴデンドロサイトの検出に有用な組織学的マーカーであると考えられた。*CHOP* mRNA はグリア細胞のみならず、DNA ダメージ、低栄養、グルコース欠損、アミノ酸欠損、ER ストレスなどの状況下でニューロンを含めた多くの細胞種で誘導される。*CHOP* 転写因子は、*PLP* 遺伝子変異を伴う強い ER ストレス下ではオリゴデンドロサイトでアポトーシスを誘導するが、軽度の ER ストレス下ではむしろアポトーシス抑制因子として働く。興味深いことに、オリゴデンドロサイトにおける *CHOP* 過剰発現マウスは、正常ないしストレス下ではアポトーシスを誘導しない。PMD 病態における *CHOP* の役割を明らかにするためには、*jp* マウスにおける *CHOP* 欠失実験が有用である。さらに、PMD の病態における *CHOP* 転写因子の役割を明らかにするためには、機能的な標的遺伝子の解明に加え、他の ER ストレス応答経路 (ATF6 や *Ire1* 経路) の細胞死への関与を探ることも必要である。死につつま

## 【別紙2】

るオリゴデンドロサイトは、ミクログリアへ誘引シグナルや eat-me シグナルを出している可能性が高い。ミクログリアは、ミエリン化の亢進および抑制に影響を及ぼすことが報告されており、薬剤によりミクログリアを活性化あるいは抑制することは、PMDの症状を軽減させる治療戦略につながる可能性があると考えられる。