

＜シンポジウム (3)－13－3＞脱髄性疾患の病態に基づいた新規治療戦略

光機能制御グリア細胞をもちいた神経修復・髄鞘再生戦略

澤田 誠

(臨床神経 2012;52:1357-1359)

Key words : ミクログリア, オリゴデンドロサイト前駆細胞, チャンネルロドプシン, オプトジェネティクス, 光活性化制御

ミクログリアは種々の疾患により神経細胞などが変性すると活性化され、疾患部分に集積しその一部が増殖することが観察される。このようなミクログリアの反応は病理学的解析でみると病変後数時間～数日のタイムスケールでおこり、他の変化に対し比較的早い変化を示すため、各種脳病変の病態形成において重要な過程であると考えられている。また、活性化して集積するミクログリアには損傷したり回復不可能な機能不全をおこした細胞を攻撃して排除する細胞（細胞傷害性ミクログリア）と、傷害から細胞を保護する役割の細胞（保護的ミクログリア）があることがわかってきた。そのため最近ではミクログリアが活性化していることが知られているアルツハイマー病やパーキンソン病、脳梗塞、脳腫瘍などの種々の脳疾患で、神経細胞の変性や生存維持に対する活性化ミクログリアの作用について注目されている¹⁾。

脱髄疾患におけるミクログリアの動態も詳細に解析されている。種々の脱髄疾患のうち浸透圧性脱髄症候群（osmotic demyelination syndrome ; ODS）は低ナトリウム血症の治療時に血清ナトリウム濃度が急速に補正されることによって生じるもので、血液脳関門の崩壊による血清成分の中枢神経系への漏出とそれともなうグリア細胞の活性化、ミクログリアの集積が観察される²⁾。ODSモデル動物での観察から、低ナトリウム血症の急速補正後の約2日後の早期で神経学的症状が急速に増悪するが、その数日後神経症状が増悪する速度が低下することと、ナトリウム補正2日後と5日後の脱髄完成期に脱髄部に集積するミクログリア数や活性化の状態に差があることに相関関係があることがわかった³⁾。そこで、ミクログリアの活性化を抑制する事が報告されているミノサイクリンを投与したところ、顕著な神経症状の改善がみられ、また

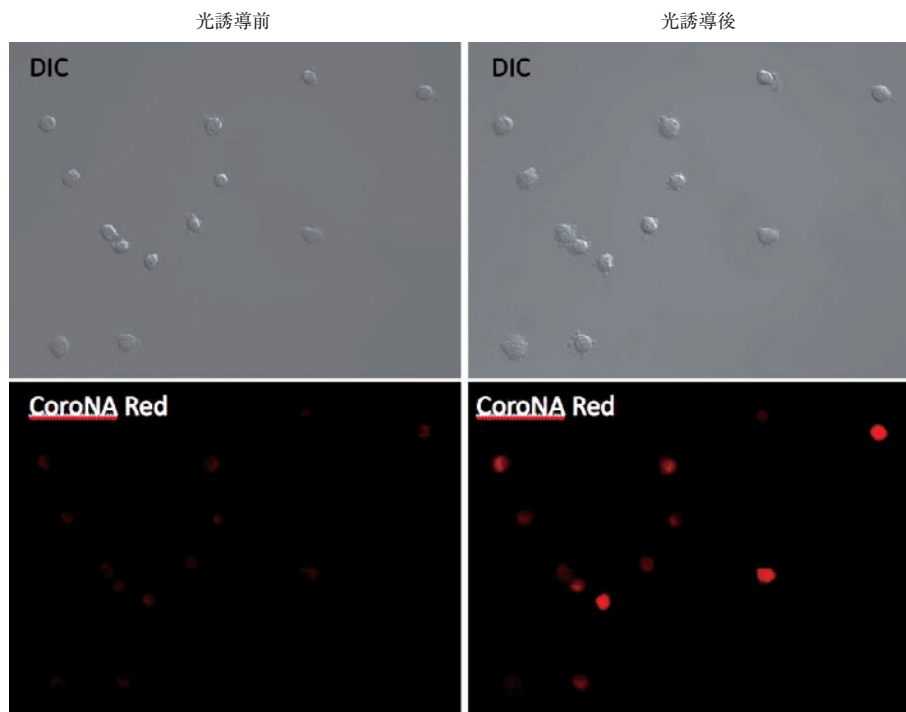


Fig. 1 ChR GR 発現ミクログリアの光誘導による細胞内 Na^+ の増大.

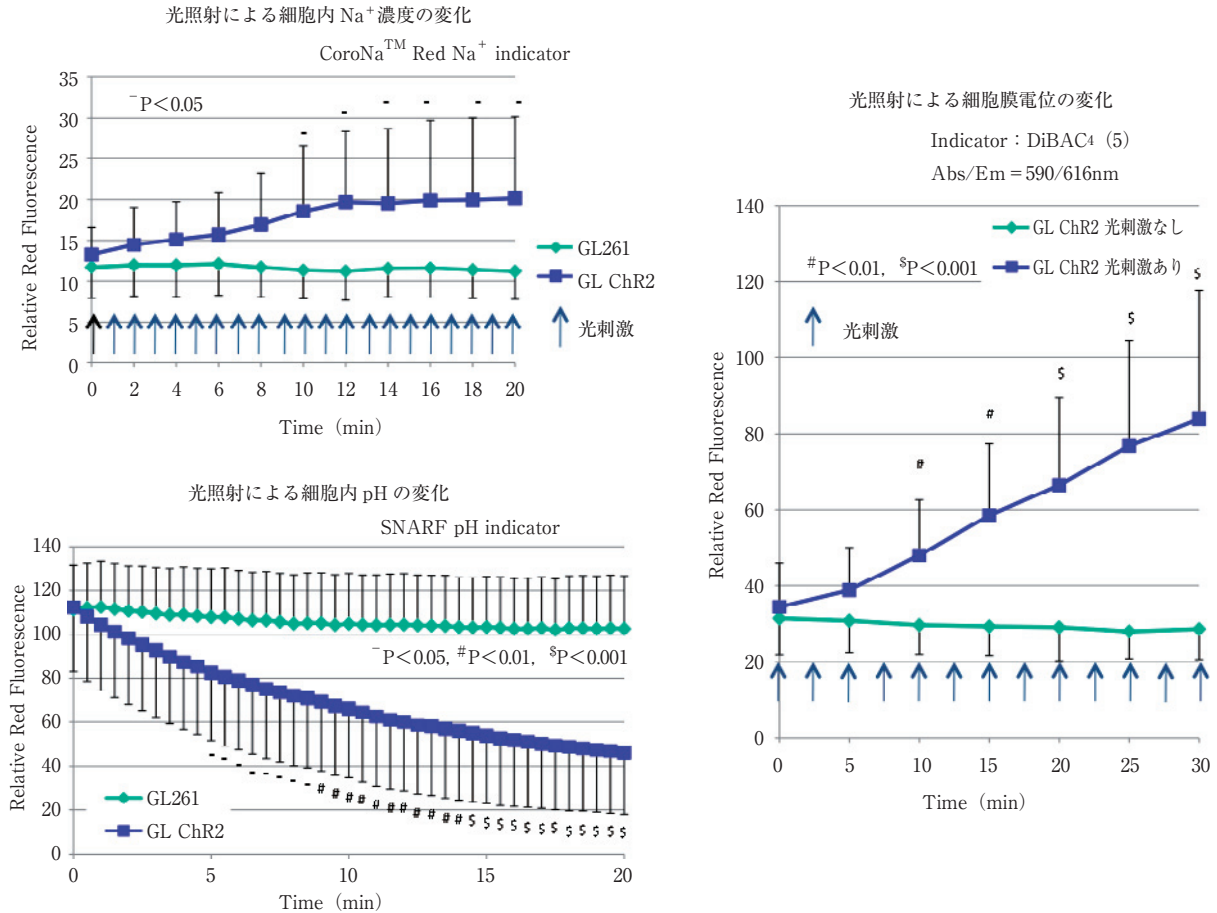


Fig. 2 ChR2 発現 OS3 細胞の光照射による細胞内イオン状態の変化。

ミクログリアの炎症性サイトカイン産生および脱髄部への移動・集積を抑制する事がわかった⁴⁾。このとき、血液脳関門の破綻には影響がみられなかったため、ODSにおける脱髄はミクログリアの細胞傷害性活性化により生じると考えられる。

生体内でのミクログリアの状態を調節する方法としてミノサイクリンのほかステロイド剤などをもちいる事が有効であるといわれており、最近ではゾニサミドなどの有効性も示されている。しかし、薬物投与では活性化したミクログリア細胞全体を抑制してしまうため、場合によっては生体にとって有害となることもある。合目的的には細胞傷害性ミクログリアの活性化を抑制し保護的ミクログリアの活性を増大させる手法が必要でありいくつかの候補物質も散見されるが、生体内で有効性がみとめられるものはほとんどない。このような中、われわれは optogenetics の手法⁵⁾をもちいてミクログリアに Channelrhodopsin-2 (ChR2)⁶⁾や光応答性にすぐれ誘導性が高い変異体タンパク質 green receiver (GR)⁷⁾を発現させその活性化を光操作によって調節する試みをおこなっている。これまでのところ ChR2 を導入したミクログリアでは発現が弱いものの、培養下で青色光の照射により TNF や IL1 などのサイトカイン産生を誘導する事に成功した。一方、GR を導入したミクログリアでは安定した高発現が維持でき、光照射に

よって蛍光プローブで十分検出可能な程度に細胞内イオン濃度を変化させることに成功し (Fig. 1)、サイトカインや iNOS、ケモカイン、栄養因子などの遺伝子発現を操作できた。

グリア細胞などの活動電位を生じない細胞においても細胞膜の電位変化やそれともなう細胞内外のイオン環境の変化により代謝や細胞機能、分化形質発現、増殖などが調節されている事が知られている。最近では生体内において幹細胞や前駆細胞から特定の細胞へ分化誘導させるには細胞分化に影響をおよぼす幹細胞や前駆細胞を取り巻く微小環境を制御する事が重要であり、細胞膜の電位を制御する事によって特定細胞への分化を促進させられることが示されている⁸⁾。したがって、脱髄疾患の2つ目の戦略として細胞膜電位を制御する事によって前駆細胞からのオリゴデンドロサイトへの効率的な分化誘導を促進する方法が考えられる。われわれはオリゴデンドロサイトとタイプ2アストロサイトの前駆細胞 O2A プロジェニター株である OS3 細胞⁹⁾¹⁰⁾に ChR2 を発現させた細胞を作製し、この可能性について検討した (Fig. 2)。ChR2 を発現する OS3 細胞は、青色光照射によって膜電位変化が生じるだけでなく、mRNA およびタンパクレベルにおいてオリゴデンドロサイトの表現型を示す細胞数が増加することが確認できた。そこで、ChR2 を発現する OS3 細胞を光照射したあ

とに正常マウス脳に移植したところ、光照射しなかった細胞を移植した場合にくらべオリゴデンドロサイトに特徴的な形質が維持されていた。したがって、ChR2を発現させた幹細胞や前駆細胞に青色光を照射することにより膜電位変化を生じさせ、細胞機能を可変させたり特定細胞に分化させたりすることが可能であると考えられる。

optogeneticsの手法による細胞の活性化—脱活性化の調節は、局所の細胞を調節できる事(レーザーを絞れば細胞単位での調節も可能)、必要な時間だけ活性化もしくは脱活性化の負荷をかけられること、負荷系と検出系が同時におこなえる事など、メリットが多い。しかし、生体深部への刺激には光ファイバーの刺入が必要なこと、光応答遺伝子を組み込んだ細胞にしか操作できないことなど、課題もある。

※本論文に関連し、開示すべきCOI状態にある企業、組織、団体はいずれも有りません。

文 献

- 1) Sawada M. Neuroprotective and toxic changes in microglia in neurodegenerative disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2009;15 Suppl 1 :S39-41.
- 2) Sugimura Y, Murase T, Takefuji S, et al. Protective effect of dexamethasone on osmotic-induced demyelination in rats. *Exp Neurol* 2005;192:178-183.
- 3) Iwama S, Sugimura Y, Suzuki H, et al. Time-dependent changes in proinflammatory and neurotrophic responses

of microglia and astrocytes in a rat model of osmotic demyelination syndrome. *Glia* 2011;59:452-462.

- 4) Suzuki H, Sugimura Y, Iwama S, et al. Minocycline prevents osmotic demyelination syndrome by inhibiting the activation of microglia. *J Am Soc Nephrol* 2011;21:2090-2098.
- 5) Zhang F, Wang LP, Boyden ES, et al. Channelrhodopsin-2 and optical control of excitable cells. *Nat Methods* 2006;3:785-792.
- 6) Zhang F, Wang LP, Brauner M, et al. Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature* 2007;446:633-639.
- 7) Wen L, Wang H, Tanimoto S, et al. Opto-current-clamp actuation of cortical neurons using a strategically designed channelrhodopsin. *PLoS One* 2011;5:e12893.
- 8) Stroh A, Tsai HC, Wang LP, et al. Tracking stem cell differentiation in the setting of automated optogenetic stimulation. *Stem Cells* 2011;29:78-88.
- 9) Sawamura S, Sawada M, Ito M, et al. The bipotential glial progenitor cell line can develop into both oligodendrocytes and astrocytes in the mouse forebrain. *Neurosci Lett* 1995;188:1-4.
- 10) Asakura K, Suzumura A, Rodriguez M, et al. Differentiation-specific mRNA expression of a mouse bipotential glial cell line. *Neurosci Lett* 1998;258:21-24.

Abstract

Strategies of myelin regeneration with optogenetically controlled glial cells

Makoto Sawada

Research Institute of Environmental Medicine, Nagoya University

Microglia, macrophage-like cells in the CNS, are multi-functional cells; they play an important role in removal of dead cells or their remnants by phagocytosis in the CNS degeneration as well as are one of important cells in the CNS cytokine network. They are thought to be originated from mesoderm, and to be similar cells to other tissue-resident macrophages. As macrophages, activated microglia have been shown to remove potentially deleterious debris and promote tissue repair by secreting neurotrophic factors at the neuronal injury sites, however, they can release potentially cytotoxic substances in vitro, and at least so-called fully activated form of microglia which are observed at the injury site in AIDS dementia is neurotoxic. These suggest that some factor (s) may contribute to change microglial phenotype from protective to toxic, but the detail is not clear. Recently we generated channelrhodopsin-mutant protein expressing microglia, Ra2_GR and 6-3_GR. Channelrhodopsin is an ion channel activated by light irradiation. Intracellular sodium ion increased by light irradiation in both Ra2_GR and 6-3_GR accompanied by increase of mRNA expression such as pro-inflammatory cytokines, chemokines and iNOS. This technique can control microglial activation, therefore, it may provide a new strategy for repair/regeneration of neural and oligodendrocytic damages.

(*Clin Neurol* 2012;52:1357-1359)

Key words: microglia, oligodendrocyte progenitor, channelrhodopsin, optogenetics, optical activity control