

氏 名 清水 崇弘

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1527 号

学位授与の日付 平成 24 年 3 月 23 日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻  
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 慢性脱髄巣におけるオリゴデンドロサイト前駆細胞の細胞  
運命とその運命を決定する因子の解析 - Analysis of fate  
of oligodendrocyte progenitor cells in chronic  
demyelinated lesions and identification of a factor that  
influences their cell fate determination -

論文審査委員 主 査 教授 重本 隆一  
教授 池中 一裕  
教授 川口 泰雄  
教授 錫村 明生 名古屋大学

## 論文内容の要旨

In the chronic demyelinated lesions of the CNS, it has long been thought that the lack of the progenitor cells of oligodendrocytes, the myelin forming cells of the CNS, is the main cause of remyelination failure. However, it was reported that oligodendrocyte progenitor cells (OPCs) were present abundantly and pre-myelinating oligodendrocytes were also found in chronic demyelinated lesions of multiple sclerosis (MS). Thus, lack of OPCs is not the main cause for the inhibition of remyelination in chronic demyelinated lesions. This thesis is composed of two parts. The first part is about the Olig2-lineage cell fate in chronic demyelinated lesions of a murine demyelinating disease model to identify the cause of remyelination inhibition. Olig2 is an essential factor for oligodendrocyte development, differentiation and maintenance. The author found that Olig2-lineage cells differentiate into oligodendrocytes attempting to recover the demyelinated lesions but they cannot survive. He also found that the Olig2-lineage cells are not the main source of reactive astrocytes, which is found abundantly in demyelinating lesions. From these results, it is considered that the environment surrounding oligodendrocytes in the chronic demyelinated lesions is not supportive for the maintenance of myelin. Thus, in the second part, the author explored a factor that controls the environment surrounding oligodendrocytes. It was reported that cystatin F shows a unique expression pattern in cDNA microarray assay using PLP transgenic mouse, a demyelinating mouse model. Cystatin F is a member of cysteine proteinase inhibitor. By using PLP transgenic mouse, cuprizone model, myelin oligodendrocyte glycoprotein experimental autoimmune encephalomyelitis (MOG EAE) model and the spinal cord sample of MS patient, the authors reported that cystatin F is expressed by microglia only in remyelinating lesions (Ma, Tanaka, Shimizu et al., 2011). From these results, the author generated mice whose gene expressions can be manipulated to suppress and overexpress cystatin F gene by using FAST system to explore the role of cystatin F and applied FAST system derived cystatin F knock down (CysF KD) mouse to MOG EAE model (FAST system: Tanaka et al., 2010). The author found that MOG EAE model of CysF KD mouse showed more severe symptom and wider demyelinated lesions than those of wild type mouse. From these results, it is suggested that cystatin F works to prevent expansion of demyelination lesions or is important for remyelination. Moreover, it was reported that cystatin F inhibits cathepsin C under the physiological condition (Hamilton et al., 2008). Thus, the author examined the expression patterns of cystatin F and cathepsin C in MOG EAE model using wild type mouse. He found that their pattern was similar in remyelinating lesions but in chronic lesions, cystatin F ceased expression and cathepsin C expression remained. Additionally, the author found that cystatin F and cathepsin C colocalized in primary cultured microglia. Therefore, it is considered that one of the functions of cystatin F is to inhibit cathepsin C in demyelinating disease. From these results, the author concluded that OPCs differentiate into oligodendrocytes preferentially to recover the demyelinated lesions but fail to survive in chronic demyelinated lesions and that microglia change their own character responding to myelin degeneration by expressing cystatin F to support remyelination. However, chronic demyelinated lesions appear

when cystatin F is no more expressed in microglia. Thus, cystatin F expression could be one of the regulatory mechanisms switching from remyelination to demyelination.

ヒトの中枢神経系の慢性脱髄巣において、髄鞘再生できない原因は髄鞘を形成するオリゴデンドロサイトの前駆細胞(OPC)の欠如であると考えられてきた。しかしながら脱髄巣で髄鞘形成直前のオリゴデンドロサイトや OPC も豊富に存在することが報告されたため、OPC の欠如は髄鞘再生抑制の主な要因ではないと考えられている。本論文は二部構成となっており、前編では PLP トランスジェニックマウスを用いることにより慢性脱髄巣におけるオリゴデンドロサイトの最終分化が抑制されている原因を、オリゴデンドロサイトの発生・分化・維持に関わる Olig2 遺伝子陽性の細胞の慢性脱髄巣における細胞運命を追跡することによって調べようと考えた。その結果、Olig2 陽性細胞は脱髄を回復するように髄鞘形成オリゴデンドロサイトに分化/成熟し続けるものの、その後、変性してしまい髄鞘を維持することができなくなっているということが明らかになった。また、Olig2 陽性細胞は脱髄性疾患で豊富にみられる反応性アストロサイトの主要な供給源ではないということも示された。この Olig2 系譜細胞運命追跡実験の結果から、慢性脱髄巣におけるオリゴデンドロサイトを取り巻く環境が、髄鞘の維持にとってよくないということが考えられる。後編はオリゴデンドロサイトの周囲の環境を制御する因子を、PLP トランスジェニックマウスの cDNA を用いたマイクロアレー解析によって探索した結果、特異的な発現パターンを示したシスタチン F 遺伝子に着目して研究を行った。シスタチン F はシステインプロテアーゼインヒビター的一种である。このシスタチン F は脱髄疾患モデルマウスである PLP トランスジェニックマウス、キュプリゾンモデル、myelin oligodendrocyte glycoprotein experimental autoimmune encephalomyelitis (MOG EAE)モデル、さらに多発性硬化症患者の脊髄病変部位のサンプルを用いて髄鞘再生部位でのみ発現があるということが分かった(Ma et al., 2011)。これらの結果からシスタチン F の機能を調べるために FAST システム(Tanaka et al., 2010)を用いて、シスタチン F の発現抑制を可能にするマウス(シスタチン F ノックダウンマウス)を作製し、MOG EAE モデルに応用した。その結果、野生型マウスに比べてシスタチン F ノックダウンマウスでは臨床的症状観察において症状が激しくなることがわかった。また、脱髄巣の大きさも野生型に比べて大きくなるということが分かった。このことから、シスタチン F は脱髄の範囲が広がるのを防ぐ、あるいは髄鞘の再生に必要であるということが考えられる。また、シスタチン F が生理的条件下においてカテプシン C の活性を抑制するということが報告されているため(Hamilton et al., 2008)、野生型マウスの MOG EAE モデルを用いてそれぞれの発現パターンを観察したところ、慢性脱髄巣ではシスタチン F の発現がなくなり、カテプシン C の発現のみが残ることが野生型マウスの MOG EAE モデルの解析により分かった。また、初代培養ミクログリアにおいてこれらの共局在が観察された。これらのことより、シスタチン F の作用機序の一つとしてカテプシン C の活性阻害が考えられる。以上のことより、慢性脱髄病巣において OPC は髄鞘を再生しようと髄鞘形成オリゴデンドロサイトに分化するものの生き残れないということが明らかになった。慢性的に脱髄するまでにミクログリアは脱髄に敏感に反応して自身の性質を種々変化させるが、その中で発現を誘導するシスタチン F は髄鞘再生をサポートする働きをしていることが明らかとなった。この発現が低下することが慢性脱髄巣の形成に寄与していることが示唆された。以上の結果は、慢性脱髄疾患にお

ける髄鞘再生不全のメカニズムの一端を明らかにしており、またその一部が国際誌に掲載されていることから、審査委員全員によって学位論文としてふさわしいとの結論に至った。