

## 血液による中枢神経障害後の瘢痕形成機構の解明

村松里衣子

国立精神・神経医療研究センター神経研究所 神経薬理研究部

### 【研究の背景】

脳神経回路の再生は難しい。その理由は、神経回路を取り囲む環境が神経回路に再生に不適であるためと知られ、これまでに成体の脳・脊髄環境、特に損傷部位に形成される瘢痕に含まれる再生阻害分子が複数同定された。このような再生阻害分子の作用を減弱させることで一定の神経再生効果が得られているが、その基となる瘢痕自体が形成するメカニズムは未だ不明な点が多い。申請者はこれまでに、中枢神経系の傷害により損傷部位では血管のバリア機能が破綻し血液が脳や脊髄へ流入すること、また流入した血液に含まれるホルモンの一部は神経系細胞に直接働きかけ、神経機能を制御することで損傷後の神経回路形成を制御することを報告している<sup>1,2)</sup>。これらの研究を進める中で、脊髄損傷マウスにおいて、損傷部位で血液の流入が盛んな時期に、瘢痕形成細胞として近年同定されたペリサイト<sup>3)</sup>の増殖が盛んである様子を観察した。このことから、血液の流入によりペリサイトの増殖が促進し、その結果瘢痕が形成されて神経回路の再生を阻害するという仮説に至った。

### 【目 的】

脊髄損傷後に患部に流入する血液が、ペリサイトによる瘢痕形成に対して促進的に作用するか、特にペリサイトの増殖と血液流入に正の相関があるか検討した。また血液によりペリサイトの増殖を促進する分子メカニズムを探索した。

### 【方 法】

マウスの下部胸髄背側に脊髄損傷(半切断)を施し、術後の瘢痕形成と血液の漏出の経時変化を解析した。脊髄切片を作成し、瘢痕形成はペリサイトマーカーおよび細胞増殖マーカー(Ki67)を用いた免疫染色により可視化し、ペリサイトマーカー陽性のエリアおよび増殖ペリサイト数の計測を行った。血液の漏出は蛍光色素を尾静注し脊髄へ漏出する色素を組織学的に検出するとともに、組織から抽出された蛍光色素量の定量的評価を実施した。

血液によりペリサイトの増殖作用は、マウスの脳と脊髄から調整した培養ペリサイトに対して、成体マウス血清を暴露し培養後、Bromodeoxyuridine (BrdU)の取り込みにより評価した。血液に含まれるペリサイトの増殖を促進する分子の同定のため、ペリサイトに高発現し細胞増殖と関連づけられる受容体に対して、CRISPR-Cas9 システムを用いたスクリーニング実験を行った。

### 【結 果】

脊髄損傷後1日目から蛍光色素の脊髄内への漏れ込みが検出された。術後2週間までの観察期間内では、術後5日をピークとして術後2週間まで蛍光色素の漏れ込みが観察された。ペリサイトの増殖は術後5日で顕著な増加が検出され、2週間後においても増殖は認められたものの術後5日と比較すると有意に抑制された。血液によるペリサイトの増殖効果の有無をin vitroで検討した結果、血清暴露によりペリサイトへのBrdUの取り込みが亢進し、血液の中にペリサイトの増殖を促進させる作用を有する因子が含まれること、またその因子はペリサイトに直接作用して、細胞増殖を促進させると推察された。また、メカニズム解析の結果、血液に含まれるペリサイトの増殖を促進させる因子とペリサイト側の受容体が同定された(特許出

願準備中)。さらに、同定した血中のペリサイト増殖因子を暴露した際のペリサイトでの遺伝子発現変化について RNAseq を行い、IPA を行ったところ、細胞増殖にアノテーションされる遺伝子の発現変動を確認した。

### 【考 察】

血液の中にペリサイトの増殖を促進させる作用をもつ因子が含まれることが示唆された。現在、同定した因子の *in vivo* の機能を解析するため、ペリサイト特異的に同定した因子に対する受容体の発現を抑制する手法(遺伝子組み換えマウスおよびウイルス感染実験による発現抑制手法)を確立中で、確立した手法を用いて脊髄損傷マウスでのペリサイトの増殖への作用を検討することを予定している。

### 【臨床的意義・臨床への貢献度】

生体内に備わる神経回路の修復を阻む機序の解明は、これまで脳や脊髄の内部の環境(細胞、分子)の機能を解析する方向で知見が蓄積し、見出された機序に対して介入する治療法の開発が試みられている。本研究で得られる知見は、従来と異なるコンセプトから神経回路の修復阻害のメカニズムを解明することから、得られる分子メカニズムは神経回路の修復促進を促す治療薬の新しい分子標的になる可能性を有する。

### 【参考・引用文献】

1. Kuroda M, Muramatsu R, Maedera N, Koyama Y, Hamaguchi M, Fujimura H, Yoshida M, Konishi M, Itoh N, Mochizuki H, Yamashita T. Peripherally derived FGF21 promotes remyelination in the central nervous system. *J Clin Invest.* 2017;127(9):3496-3509.
2. Hamaguchi M, Muramatsu R, Fujimura H, Mochizuki H, Kataoka H, Yamashita T. Circulating transforming growth factor-beta1 facilitates remyelination in the adult central nervous system. *Elife.* 2019;8:e41869.
3. Dias DO, Kim H, Holl D, Werne Solnestam B, Lundeberg J, Carlén M, Göritz C, Frisén J. Reducing Pericyte-Derived Scarring Promotes Recovery after Spinal Cord Injury. *Cell.* 2018;173(1):153-165.e22