

## 脱髄疾患の病態解明と治療法の開発

板 東 良 雄

秋田大学大学院医学系研究科 形態解析学・器官構造学講座

(平成 31 年 2 月 4 日掲載決定)

### Molecular mechanisms of demyelination and axonal degeneration in demyelinating diseases

Yoshio Bando

Department of Anatomy, Akita University Graduate School of Medicine

**Key words :** Multiple Sclerosis, oligodendrocytes, demyelination, axonal degeneration, ER-stress

#### はじめに

多発性硬化症 (multiple sclerosis : MS) は中枢性炎症性脱髄疾患に分類され、様々な神経症状を呈するが、病理学的特徴として炎症を伴う脱髄と軸索変性が認められる。また、髄鞘や軸索に対する自己抗体や髄鞘反応性 T 細胞の存在が認められることから、中枢神経系に浸潤した免疫細胞や自己抗体を介した免疫学的機序によって病態が進展すると考えられている。このような背景から免疫学的アプローチを中心とした MS 研究が発展し、免疫療法を中心とした治療法が確立されるようになった。その一方で、脱髄や軸索変性の分子機序についてはまだまだ不明な点も多く、むしろ混沌としはじめているのが現状である。本稿では筆者らが最近見出した抗 MOG 自己抗体を介した新しい脱髄分子機構の一端について紹介したい。

#### MS と自己抗体

MS や視神経脊髄炎 (neuromyelitis optica spectrum disorders/Devic disease : NMOSD)、さらには急性散

在性脳脊髄炎 (acute disseminated encephalomyelitis : ADEM) において、髄鞘を構成するタンパク質の一つである myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) に対する自己抗体 (抗 MOG 自己抗体) が脳脊髄液や組織に検出される。MOG は髄鞘の最外層に局在し、髄鞘を形成するオリゴデンドロサイトに特異的に発現している糖蛋白であり、抗 MOG 自己抗体が MS における脱髄の中心的役割を担う可能性は十分に考えられる。しかしながら、数々の論争の結果、抗 MOG 自己抗体の存在は MS の再発リスクを上昇させる可能性はあるが、MS における脱髄には直接関与せず、むしろ ADEM の脱髄機序に関わるのではないかという説が有力視されるようになり、MS と自己抗体に関する研究は急速に衰退化した。ところが、近年の NMOSD 研究の発展により NMOSD では抗 AQP4 自己抗体がアストロサイトに直接作用しうることが証明されたのをきっかけに抗 MOG 自己抗体が再び着目されるようになった。実際、複数のグループが再検証を試みたところ、対象とする MS の population の施設間の相違は言うまでもなく、抗 MOG 自己抗体の検出法の各施設間の相違などの技術的な問題が数多く存在したことが判明した。現在では、NMOSD や ADEM などの MS 類似疾患においても抗 MOG 自己抗体が検出されることから MS 特異的な biomarker として抗 MOG 自己抗体を用いることは難しいが、MS の病態形成への関与について再検討の余地があると考えられている。

Correspondence : Yoshio Bando

Department of Anatomy, Akita University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Hondo, Akita 010-8543, Japan

Tel : 81-18-884-6053

Fax : 81-18-884-6440

E-mail : ybando@med.akita-u.ac.jp

## MS の動物モデル (実験的脳脊髄炎モデル)

実験的脳脊髄炎モデル (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: EAE) は MS の動物モデルとして MS 発症機構の解析や治療法の開発に広く利用されているが、その歴史は古く 1885 年にまでさかのぼる<sup>1-4,12)</sup>。当時、Pasteur らはウサギを用いて狂犬病ウイルスを継代し、中枢神経組織から弱毒ウイルスを精製することによってワクチンを作成していた。ところがある時、ワクチン接種後に狂犬病とは異なる症状・病理所見を呈する症例が見つかり、ワクチンに中枢神経組織の混入があったことを報告した。つまり、中枢神経組織を免疫することによって脳炎が発症するという可能性を Pasteur らが最初に見出した。その後、1920 年代にヒトから採取した脊髄組織や羊の脳組織をウサギに免疫することによって麻痺が生じることが次々と報告され、1933 年にはウサギの脳組織や脳抽出物をサルに免疫すると麻痺を生じ、中枢神経組織に脱髄を伴う急性散在性脳脊髄炎 (acute disseminated encephalomyelitis: ADEM) が認められることを Rivers らが報告した。当初、ADEM として記載されていたが、後に実験的脳脊髄炎 (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: EAE) と記載されるようになった。EAE が MS のモデル動物として認識されるようになったのは 1942 年の Freund らの画期的な発見に依るところが大きい。Freund らは結核死菌 (*Mycobacterium tuberculosis*: MT) を含むアジュバント (Freund's adjuvant) を用いて中枢神経組織を免疫することによって脳炎を誘導する方法の開発に成功した。この方法では、中枢神経組織の脱髄を起こしている病変部位に末梢からの白血球の浸潤が認められ、ヒト MS の病理学的所見と類似していることが明らかになった。この報告をきっかけにモルモット、サル、マウス、ラットといった種々の動物でも EAE を誘導できることが報告された。その後、ミエリン塩基性蛋白 (Myelin basic protein: MBP)、ミエリン糖蛋白質 (Myelin oligodendrocyte glycoprotein: MOG) やミエリンプロテオリピド蛋白 (proteolipid protein: PLP) といった髄鞘構成タンパク質の投与のみでも同様の所見が得られることや髄鞘構成タンパク質に対する自己抗体やミエリン反応性 T 細胞が病態形成に関与していることが次々と明らかとなり、1984 年に現在の EAE 誘導プロトコルが確立された。

## 脱髄における形態学的解析法

ヒト MS 剖検脳あるいは動物の病態モデルのいずれにおいても、髄鞘染色である luxol fast blue (LFB) 染色や LFB 染色とニッスル染色の二重染色を行う Kluver-Barrera (KB) 染色を用いた脱髄の病理学的評価が行われている。これらの染色では髄鞘が存在すれば青色に染まり、脱髄部位では白く抜けるため、髄鞘の有無の判定を簡単に行うことが出来る。そのため、これまでは「脱髄=髄鞘が消失」と考えられてきた。また、透過型電子顕微鏡 (Transmission Electron Microscope: TEM) を用いた形態学的解析は脱髄研究には欠かせないものとなっている。しかしながら、髄鞘は思っている以上にデリケートな構造であり、TEM 用試料の作成中にしばしば髄鞘がほどけてしまうなど、アーチファクトを含むことが少なくない。動物の固定技術や方法、固定液の条件など様々な要因があると考えられる。そのため、TEM による観察は髄鞘の有無のみを判断するには大きな問題はないが、髄鞘の初期変化や病態変化を鋭敏に捉えることは極めて困難である<sup>5)</sup>。さらに、TEM では異常な髄鞘構造として観察されても、このような髄鞘が LFB/KB 染色で染色されてしまうなど、TEM による所見と LFB/KB 染色の所見が必ずしも一致せず、評価が難しい場合もある (未発表データ)。つまり、単に青く染まっているからといって正常な髄鞘構造とは限らず、再髄鞘化の評価は非常に難しいことを念頭においておかなければならない。しかしながら、再髄鞘化を目指した MS 治療薬の薬効評価の多くはこの点が軽視されており、LFB/CV 染色や髄鞘構成蛋白質 myelin basic protein (MBP) の免疫染色による評価が今でも一般的である。

脱髄における新しい形態学的解析法の導入  
—オスミウム浸軟法を用いた試料作製と  
走査型顕微鏡による解析—

一方、我々はオスミウム浸軟法という方法を用いて試料を作成し、走査型電子顕微鏡 (scanning electron microscope: SEM) を用いて観察することによって、これまでの脱髄研究で生じていた様々な問題点を解決できることを見出した<sup>5)</sup>。オスミウム浸軟法は 1981 年に田中・名黒らによって開発された細胞内構造を走査型電子顕微鏡で観察するための試料の作成法である<sup>6-8)</sup>。この方法の特徴は低濃度のオスミウム中に長時間試料

を浸漬させることによって観察に不要な構造物（蛋白成分）を戦略的に除去するため、免疫電顕のように分子の局在を明らかにすることは出来ないが、膜成分を見やすくすることが出来る。実際、本法では少なくとも試料作成による髄鞘構造の変化はほとんど認められず、脱髄の初期変化の検出も可能であることが示唆された<sup>5)</sup>。このように書くと我々があたかも TEM よりも SEM が優れていると主張したいとの誤解を招きかねないが、TEM あるいは SEM で得られる情報は必ずしも同じではなく、お互いに補完的なものであり、その目的に応じて利用すべきであることは言うまでもない。

### SEM を用いた EAE における 脱髄の形態学的解析

では、実際にマウス MS モデルである EAE を誘導した時に認められる脱髄の形態変化はどのようになっているのであろうか。そこで、C57BL/6 雌マウスに MOG<sub>35-55</sub> 誘導性の EAE を発症させ、上述の方法を用いて SEM による観察を行った（図 1）<sup>9)</sup>。その結果、髄鞘がコンパクトなまま軸索膜から解離する現象が発症前に認められ、このような髄鞘の形態変化が脱髄の初期変化であることが示唆された（図 1B）。また、髄鞘が消失している典型的な脱髄像よりもむしろ髄鞘の過形成などの異常な髄鞘構造が極めて多数存在し、ヒト剖検脳を用いた解析でも同様の所見が認められた（図 1G-K）。そこで、我々は従来までの脱髄の概念を改め、異常な髄鞘構造を形成する場合も脱髄の定義に含めることとした<sup>9)</sup>。また、このような初期変化に引き続き、髄鞘が解離した部分において局所的な髄鞘の過形成が惹起されることが明らかとなった（図 1C-D）。さらに、このような異常な髄鞘をもつ軸索内ではミトコンドリアや滑面小胞体が異常に集積し、ovoid と呼ばれる病理所見を認め、軸索変性を惹起していることも明らかとなった（図 1E-F）。驚くべきことに、このような脱髄の初期変化は EAE 誘導後（免疫後）3 日目から認められ（図 2A-D）、炎症細胞の中樞神経組織内への浸潤は検討した限りでは認められなかった<sup>9-12)</sup>。つまり、炎症性脱髄の病態に先駆けて炎症細胞の浸潤を伴わない脱髄機構が存在する可能性が示唆された。この発見は長らく我々を困惑させたが、ようやく抗 MOG 自己抗体がこの病態を引き起こす可能性があることを突き止めた<sup>10)</sup>。ELISA 法を用いて抗

MOG 自己抗体の検出を試みたところ、低濃度ではあるものの、EAE 誘導後 3 日目から末梢血と脳脊髄液中に抗 MOG 自己抗体が存在していることが確認できた（図 2E）<sup>10)</sup>。免疫後 3 日間でどのようにして抗 MOG 自己抗体が産生されるのかについては今後の解析を待たなければならないが、非常に興味深い所見である。さらに、ヒト MS 患者髄液中においても抗 MOG 自己抗体の検出そのものは可能であったが、因果関係に迫る解析には至っていない（未発表データ）。

### 抗 MOG 自己抗体がオリゴデンドロサイトに 及ぼす影響

EAE を誘導したマウス脳脊髄液中や組織中に認められた抗 MOG 自己抗体が実際にオリゴデンドロサイトに直接作用し得るのであろうか。そこで、培養オリゴデンドロサイトの培地中に抗 MOG 自己抗体を添加することによって形態変化が起こるか否かについて検討を行った<sup>10,12)</sup>。抗 MOG 自己抗体を添加して 24 時間後に抗 MBP 抗体を用いて染色し、オリゴデンドロサイトの形態を観察したところ、抗 MOG 自己抗体の添加により細胞が異常に肥大することが明らかとなった（図 2F-G）。さらに western blot 法による解析を行った結果、髄鞘構成蛋白の一つである MBP 発現に関わる細胞内シグナル伝達系の一つである fyn のリン酸化を伴って MBP の発現上昇が認められたことから、このような現象は上述の髄鞘がコンパクトなまま軸索膜から解離した後に引き続いて起こる髄鞘の局所的な過形成を反映しているのかも知れない<sup>10)</sup>。

### オリゴデンドロサイトが発現する プロテアーゼと脱髄

上記の研究を進める一方で、我々は脱髄の分子メカニズムの解明を目指してオリゴデンドロサイトが発現するセリンプロテアーゼ Kallikrein 6 (KLK6) の機能解析も進めていた。KLK6 は Kallikrein family に属するセリンプロテアーゼであり、中枢神経損傷時にオリゴデンドロサイトにおいて発現上昇するプロテアーゼとして同定されたが、その後の解析から中枢神経系以外では皮膚や種々の癌細胞においても KLK6 の発現が報告され、様々な疾患の病態形成に関与していると考えられている。オリゴデンドロサイトにおいては、in vitro の系で KLK6 が髄鞘構成タンパク質 MBP を切

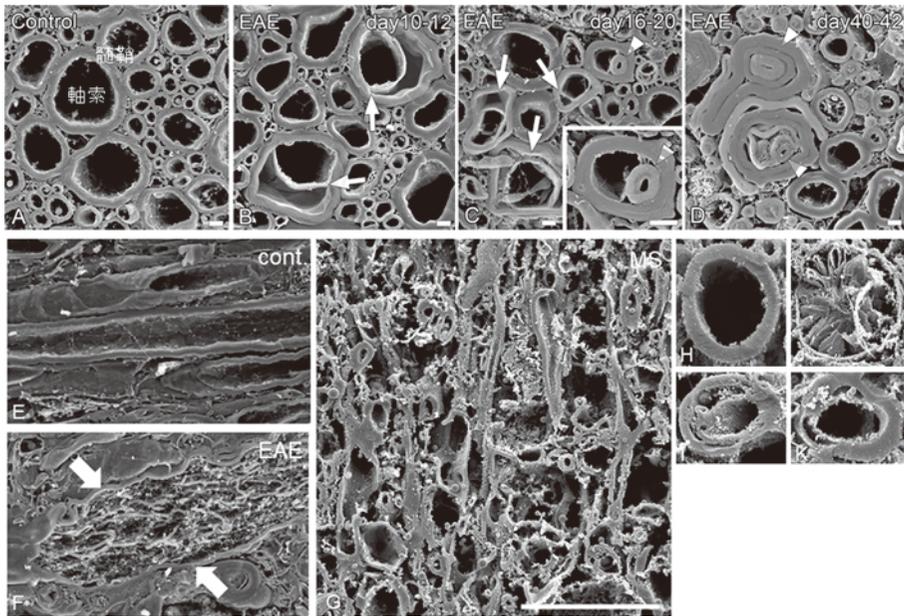


図1. マウス EAE とヒト MS 患者剖検脳における SEM 像  
 A-D) マウス脊髄白質における EAE 誘導後の髄鞘構造の変化。髄鞘がコンパクトなまま髄鞘から外れ (B, 矢印), 発症ピーク時には二重に形成された髄鞘 (double myelin, C), 寛解期には多重に形成された髄鞘構造 (矢頭) や軸索内腔が膜構造で閉塞した異常な軸索 (青色) が多数認められる。E) 正常マウスの脊髄白質の軸索, F) マウス EAE モデルの脊髄白質の軸索では軸索内に滑面小胞体の発達とミトコンドリアの集積が多数認められ, 軸索が膨張して ovoid を形成する (矢印)。G-K) ヒト MS 剖検脳における SEM 像。LFB 染色陰性の脱髄巣においては異常な髄鞘や軸索が多数認められる (H-K)。(文献 5, 9 を改変)

断する活性を持つことから脱髄に関与する可能性が示唆されたため、KLK6 KO マウスに EAE を惹起し、KLK6 が EAE の病態形成に及ぼす影響について検討を行った<sup>10)</sup>。その結果、KLK6 KO マウスでは EAE 発症が遅延し、症状が軽度であった。また、病理学的解析により KLK6 KO マウスでは末梢から中枢神経組織内への炎症細胞の浸潤やグリオーシスが抑制されていることが明らかとなった。エバンスブルーという色素をマウス尾静脈から注入し、血液脳関門の脆弱性について検討したところ、野生型マウスでは血液脳関門の破綻が観察されたが、KLK6 KO マウスでは血液脳関門の破綻は認められなかった。一方、脾臓やリンパ節における免疫系細胞に対する KLK6 の効果は認められなかったことから、少なくとも EAE モデルではオリゴデンドロサイトが発現する KLK6 が中枢神経組織内で機能することによって脱髄の病態形成を促進している可能性が示唆された<sup>10)</sup>。

### KLK6 と Matrix metalloprotease

プロテアーゼである KLK6 には必ず相手となる基質が存在する。我々は基質の同定を何度も試みたが、失敗の連続で半ば諦めていた。しかしながら、ようやく matrix metalloprotease-9 (MMP-9) を KLK6 の基質候補として同定することに成功した<sup>10)</sup>。とは言うものの、KLK6 は trypsin と構造が非常に似ていることや MMP-9 が trypsin によって活性化されるプロテアーゼであり、MMP-9 が MS や EAE で発現上昇することも既に報告されていたため、MMP-9 が KLK6 の基質候補になることは容易に想像できた。しかしながら、あまりにも安直すぎて面白くないと避けていた MMP-9 を結局掴むことになり、かなり落胆したことを今でも鮮明に覚えている。ただ、MMP-9 は KLK6 と同様に MBP を切断する活性をもち、脱髄に直接関与する可能性が示唆されていたが、laminin などを切断することから血液脳関門の破綻にも関与する因子で

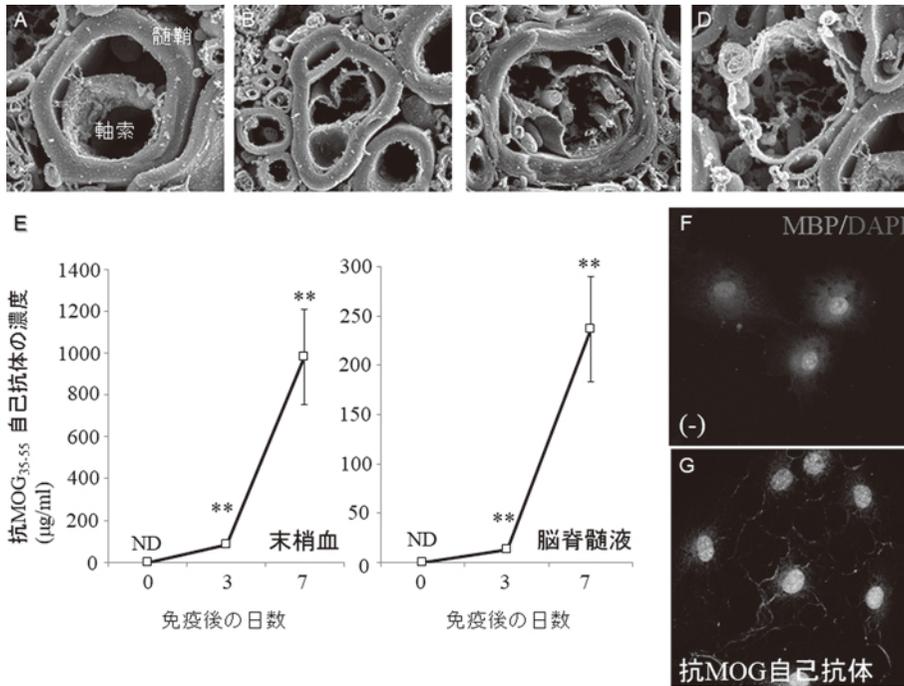


図2. EAE誘導後3日目における髄鞘構造の変化と抗MOG自己抗体

A-D) マウス脊髄白質におけるEAE誘導後3日目の異常な髄鞘構造. E) マウス末梢血中および脳脊髄液中の抗MOG自己抗体の濃度. 正常マウスでは検出感度以下(ND)であった. F) マウスES細胞由来のオリゴデンドロサイトに抗MOG自己抗体を24時間添加した際における形態変化. 抗MBP抗体を用いて細胞染色を行い, DAPIにて核染色を行った. 抗MOG自己抗体により細胞の表面積が増大した. (文献10を改変)

もあり, 脱髄の病態形成に極めて重要な因子であることは間違いない. 実際, *in vitro*の系においてKLK6はMMP-9の活性化を促進し, KLK6 KOマウスではMMP-9の活性化が認められなかった. また, EAE発症前からオリゴデンドロサイトやミクログリアにおいてMMP-9の発現が上昇し, 中枢神経組織内においてKLK6がMMP-9を活性化し, 脱髄および血液脳関門の破綻を促進していることが明らかとなった<sup>10)</sup>. 以上の結果は, 末梢の病原性T細胞をはじめとする免疫系細胞が末梢側から血液脳関門の破綻を誘導した結果, 中枢神経組織内に炎症細胞が浸潤するというこれまでの常識を覆し, 脱髄の被害者と考えられるオリゴデンドロサイトがむしろ積極的に脱髄に関与し, 中枢神経組織内からも同時に血液脳関門の破綻を促進する機序が存在することを初めて明らかにしたと言える.

### オリゴデンドロサイトにおけるKLK6の発現上昇

EAE誘導時のオリゴデンドロサイトにおいて, どのような因子がKLK6の発現上昇に関わるのであろうか. この疑問の解決にもかなりの時間を要したが, 抗MOG自己抗体が直接オリゴデンドロサイトに作用し, オリゴデンドロサイトにおけるKLK6の発現上昇を誘導することが明らかとなった<sup>10-12)</sup>. 以上のことから, 少なくともEAEの系では抗MOG自己抗体-KLK6-MMP-9の系がEAEの病態形成に大きく関与していることを示唆していると考えられる(図3)<sup>12)</sup>.

### 結 語

MSは現在, 臨床像の違いからMSとその類似疾患であるNMOSDの大きく2つに分類されている. しかしながら, 最近の研究から, NMOSD様の臨床症状

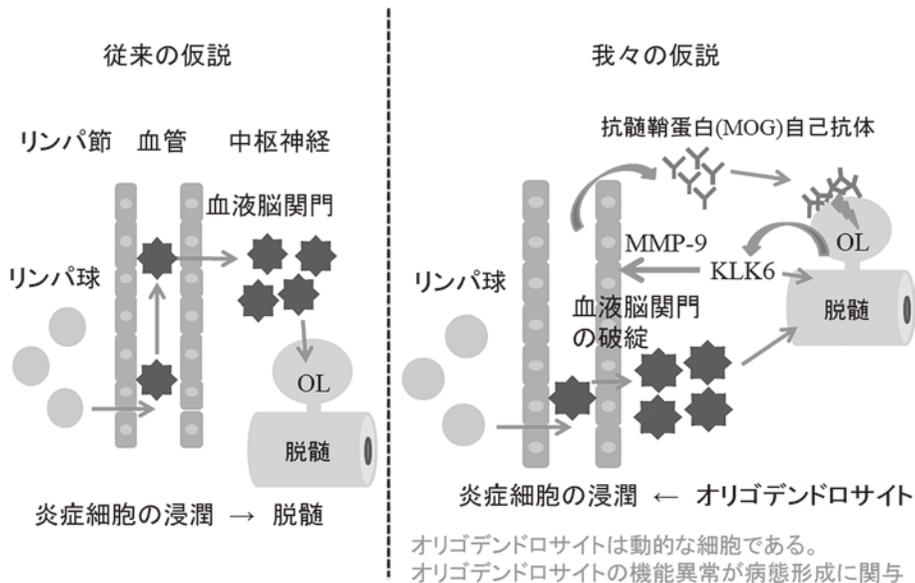


図3. 抗MOG自己抗体を介した新しい脱髄機序の仮説

従来までは末梢からの炎症細胞が中枢神経組織内に浸潤し、炎症性脱髄を惹起すると考えられてきたが、このような仮説に加えて、抗MOG自己抗体が炎症細胞の浸潤に先駆けて中枢神経組織内に浸潤し、オリゴデンドロサイトに作用することによってオリゴデンドロサイトからKallikrein 6 (KLK6) や Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) といったプロテアーゼの発現を誘導することによっても血液脳関門の破綻や脱髄を惹起する可能性が我々の研究結果から示唆された。

を呈しながら抗AQP4抗体陰性となる患者では抗MOG自己抗体陽性になることが明らかとなりつつある。そのため、近い将来、抗MOG自己抗体が関与する脱髄疾患は「抗MOG自己抗体関連疾患」としてNMOSDに続く第3の新しいMS類似疾患として認識されるようになる可能性も指摘されており、臨床の現場でも混沌としているのが現状である。したがって、本研究結果はMSの病態解明というよりはむしろ、抗MOG自己抗体関連疾患の分子機序の一端を解明したということになる可能性も大いに残されているが、その議論は別の機会にしたい。

これまでの脱髄の概念・定義は、①オリゴデンドロサイトおよび髄鞘は脱髄によって消失する、②オリゴデンドロサイトは極めて受動的で静的な細胞である、③MSで認められる血液脳関門の破綻は末梢の免疫細胞による、④脱髄は炎症細胞の浸潤による炎症性脱髄である、⑤再髄鞘化時にLFB/KB染色で染まる髄鞘は正常であるとされてきた。しかしながら、一連の研究結果から導き出された結論は、①オリゴデンドロサイトおよび髄鞘は脱髄によって大部分は消

失せず、むしろ異常な髄鞘構造を形成するが、このような異常な髄鞘はLFB/CV染色では染色されない、②オリゴデンドロサイトは極めて動的な細胞で積極的に脱髄に関与する、③MSで認められる血液脳関門の破綻は末梢の免疫細胞だけでなく、中枢神経組織内のオリゴデンドロサイトも関与する、④脱髄は必ずしも炎症細胞の浸潤を必要としない、⑤再髄鞘化時にLFB/KB染色で染まる髄鞘は必ずしも正常とは限らない、というものであり、脱髄の概念や定義を改めて考え直す必要があるのではないかと考えている<sup>11,12)</sup>。

## 最後に

本研究もまだまだ脱髄機序の一端を解明したに過ぎず、全貌解明に向けて検討すべき課題はまだまだ山積しているが、本研究を通して改めて実感した重要なことは、既存の確立された概念が必ずしも最終的なものではないということである。「既報の論文を鵜呑みにせず、自分の目を信じなさい。そのための技術をしっかりと身につけ、多角的に判断しなさい」と口酸っぱ

く上司や先輩に言われてきたが、まさにその通りである。実際、これまでは学会で発表してもなかなか相手にされず、悔しい思いをしたことが何度もあったが、その一方で実際に手を動かしている多くの研究者から賛同が得られていたのは大きな支えになった。その甲斐もあって、最近ようやく国内外のいくつかの製薬会社において再髄鞘化を目指したMS治療薬の開発は異常な髄鞘形成をむしろ促進する可能性があることを認識しはじめ、創薬の開発戦略を再考するようになりつつある。神経変性疾患であるアルツハイマー病でも治験は失敗の連続に終わっており、その原因の一つに固定観念に基づいた研究が挙げられている。そのため、これまでの概念を覆すほどのブレークスルーの出現が望まれている。そういった意味ではMSの基礎研究や治療薬開発に本研究結果が少しでも役立てばと考えている。また、秋田大学医学部においても、予想と異なる結果や既存の理論を覆すような現象に出会った際、そのような困難に対しても多角的かつ客観的に判断し、相手に関係なく自由に討論できる人材を育てていきたいと考えている。

## 文 献

- 1) Constantinescu, C.S., Farooqi, N., O'Brien, K., *et al.* (2011) Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br. J. Pharmacol.*, **164**(4), 1079-1106.
- 2) Mix, E., Pienecker, H.M., Hartung, H.P., *et al.* (2010) Animal models of multiple sclerosis—Potentials and limitations. *Progress in Neurobiology*, **92**, 386-404.
- 3) Croxford, A.L., Kurshus, F.C. and Waisman, A. (2011) Mouse models for multiple sclerosis: Historical facts and future implications. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1812**, 177-183.
- 4) Denic, A., Johnson, A.J., Bieber, A.J., *et al.* (2011) The relevance of animal models in multiple sclerosis research. *Pathophysiology*, **18**(1), 21-29.
- 5) Nomura, T., Bando, Y., Bochimoto, H., *et al.* (2013) Three-dimensional ultra-structures of myelin and the axons in the spinal cord: application of SEM with the osmium maceration method to the central nervous system in two mouse models. *Neurosci. Res.*, **75**(3), 190-197.
- 6) Tanaka, K. and Naguro, T. (1981) High resolution scanning electron microscopy of cell organelles by a new specimen preparation method. *Biomed. Res.*, **2** (Suppl.), 63-70.
- 7) Tanaka, K. and Mitsushima, A. (1984) A preparation method for observing intracellular structures by scanning electron microscopy. *J. Microsc.*, **133**, 213-222.
- 8) Koga, D. and Ushiki, T. (2006) Three-dimensional ultra-structure of the Golgi apparatus in different cells: high-resolution scanning electron microscopy of osmium-macerated tissues. *Arch. Histol. Cytol.*, **69**(5), 357-374.
- 9) Bando, Y., Nomura, T., Bochimoto, H., *et al.* (2015) Abnormal morphology of myelin and axon pathology in murine models of multiple sclerosis. *Neurochem. Int.*, **81**, 16-27.
- 10) Bando, Y., Hagiwara, Y., Suzuki, Y., *et al.* (2018) Kallikrein 6 secreted by oligodendrocytes regulates the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glia*, **66**(2), 359-378.
- 11) 板東良雄 (2013) 脱髄における髄鞘と軸索の形態変化. *脳* **21** **16**(4), 19-25.
- 12) 板東良雄 (2018) 抗MOG自己抗体を介した脱髄分子機構. *clinical neuroscience* **36**(11), 1296-1299.