

京都府公立大学法人若手研究者・地域未来づくり支援事業研究成果報告書

	(所 属)	(職名)	(氏 名)
研究者 (研究代表者)	府立医大附属医療センター・心身障害者福祉センター附属病院歯科	医長	足立 哲也
研究の名称	ラマン分光学法を用いた脱髄疾患の発症に関わる分子機構の解明		
研究のキーワード	ラマン分光法、ミエリン、脱髄疾患		
研究の概要	<p>多発性硬化症や脳卒中等の脱髄疾患は、運動障害や認知能力の低下によりQOLおよびADLが著しく低下するため、大きな問題となっている。絶縁性のリン脂質であるミエリンは何層にもわたりニューロンを覆っており、神経保護と跳躍伝導に重要な働きをしている。ミエリンが何らかの原因で損傷すると、神経伝達が阻害される。しかし、これらの疾患の多くはその発症メカニズムが不明であり、未だに有効な治療薬が確立されていない。そのため、超高齢社会を迎えた我が国において、これらの病態を明らかにし、新薬を開発することが喫緊の課題となっている。しかし、ミエリンの主成分である脂質は固定や蛍光プローブの使用により、その機能が損なわれるため、ミエリンの本来の性質を解析することは困難であった。</p> <p>そこで申請者は、ラマン分光法に着目した。ラマンスペクトルは、“<b>分子の指紋</b>”と呼ばれており、細胞の固定や蛍光標識を行わず、生きたまま非侵襲的に細胞特異的な分子の同定やその分子構造を解析することができる。また、ラマン分光法は、神経系を形成するニューロンやミエリンの脂質や神経伝達物質の含有量を一度に解析することで、神経系を構成する細胞（ニューロンやグリア細胞等）を区別することが可能である。そのため、ニューロンとグリア細胞を共培養することで形成されたミエリンで発現される神経伝達物質のダイナミックな変化を、ラマン分光法により非破壊かつ生きた状態のままで解析することができれば、脱髄疾患の病態解明につながると考えた。</p> <p>脱髄モデルではミエリン（スフィンゴ脂質）の脱落により、神経伝達物質（アセチルコリン）の発現低下が予想されること</p>		

	<p>から、これをラマン分光法で確認する。ニューロンとグリア細胞を共培養によるミエリン形成とラマン分光解析を組み合わせることで、ミエリン化や髄鞘に関与する分子機構を解明ができると考えられる。</p> <p>本法により、脱髄やミエリン化に関与する分子を明らかにすることで、様々な神経疾患の病態解明だけでなく、創薬研究や神経再生医療への応用が期待される。</p>
<p>研究の背景</p>	<p>ミエリンの主成分である脂質は固定や蛍光プローブの使用により、その機能が損なわれるため、ミエリンの本来の性質を解析することは困難であった。また、”リポクオリティ（脂質の質）”の評価は、PCR等の従来の遺伝子解析法では限界があった。申請者は、非染色かつそのままの状態、脂質の化学的狀態を評価できるラマン分光法に注目し、ミエリンの化学構造の分析を行った。</p>
<p>研究手法</p>	<p>褐色細胞腫 PC12細胞神経細胞分化培地にて7日間培養し、神経様細胞（ニューロン）へ分化させ、維持を行った。7日後、ニューロンの培養系にミエリン形成細胞であるラット由来のシュワン細胞株IFRS1を添加し、グリア細胞維持培地で7日間共培養することでミエリンを形成した。共培養系で形成されたミエリンにクプリゾン暴露することで、脱髄疾患モデルを作成した。ニューロンやミエリンのラマンスペクトルについては、足立等の方法をもとにし、神経伝達物質（アセチルコリンやタウリン）やスフィンゴミエリンなど（主に脂質）のスペクトルを取得した。これら分子の局在を可視化し、ミエリン化および脱髄によって変化する分子を探索した。</p>
<p>研究の成果 (実現できた研究の質の向上又は地域振興の内容等)</p>	<p>ニューロン、非ミエリン化シュワン細胞およびミエリン化シュワン細胞において、スフィンゴ脂質、リン脂質、ヌクレオシド三リン酸の存在が確認できた。一方、ミエリン化したグリア細胞は、ラマン分析により神経伝達物質であるハイポタウリンや抗酸化物質であるグルタチオン、水（自由水）といった分子の局在が確認できた。ニューロンおよび非ミエリン化グリア細胞では、これらの分子は確認できなかった。</p> <p>また、ラマン分光法により得られた結果と蛍光免疫染色で得られたタウリンの分子イメージングを照合することで、ミエリ</p>

	<p>ン化を制御する分子が明らかとなった。さらに、ラマン分光法は水分子の挙動を拡散テンソル画像法と同様に可視化することが可能であり、脱髄疾患だけでなく様々な神経変性疾患や精神疾患への応用が期待できる。</p> <p>なお、昨年米国科学誌ACS Chemical Neuroscienceにて、研究成果を発表した。</p>
<p>今後の期待</p>	<p>本法により、ミエリンモデルにおけるミエリンの変化（ミエリン化・脱髄）をラマン分光法により分子レベルで解析する手法が確立されれば、脱髄疾患の病態解明や神経回路の回復、iPS細胞等より分化された再生神経の品質管理、神経疾患の治療薬の創薬スクリーニングなどの様々な分野へ応用することが期待でき、京都府民や日本国民の健康増進に寄与する。これらの成果は神経科学や再生医学だけでなく神経内科学においても、大きなインパクトを与える。</p>
<p>研究発表</p>	<p>論文発表</p> <p>Pezzotti G, <b>Adachi T</b>, Miyamoto N, Yamamoto T, Boschetto F, Marin E, Zhu W, Kanamura N, Ohgitani E, Pizzi M, Sowa Y, Mazda O. Raman Probes for <i>In Situ</i> Molecular Analyses of Peripheral Nerve Myelination.</p> <p>ACS Chem Neurosci. 2020 Aug 5;11(15):2327-2339. doi: 10.1021/acchemneuro.0c00284.</p>