

令和元年6月21日現在

機関番号：13101

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2013～2017

課題番号：25117007

研究課題名(和文)オリゴデンドロサイト前駆細胞と神経回路の機能的相互作用

研究課題名(英文)Functional interaction between OPC and neural circuits

研究代表者

竹林 浩秀(Hirohide, Takebayashi)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：60353439

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 51,000,000円

研究成果の概要(和文)：酵母2ハイブリッドスクリーニングによりOlig2 binding protein 2 (Obp2)を同定し、Obp2コンディショナルノックアウト(cKO)マウスを作成した。中枢神経系特異的cKOマウスは出生直後に死亡し、成熟オリゴデンドロサイト特異的cKOマウスは、生後数週で死亡した。Obp2はオリゴデンドロサイト前駆細胞や成熟オリゴデンドロサイトの維持に必須の因子であることがわかった。研究分担者の榎戸博士らは、オリゴデンドロサイト前駆細胞の初代培養系を確立し、ガラクトセレブロシダーゼの欠損によるKrabbe病のモデルマウスを解析しサイコシンの蓄積を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、オリゴデンドロサイト系譜細胞の維持・分化・細胞死のメカニズムを明らかにするとともに、生後マウス脳において、オリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖・分化などを制御するマウスを作製し、神経機能への影響を明らかにする。本研究を進めることにより、オリゴデンドロサイトの異常によるミエリン形成不全や多発性硬化症の病態や症状の発現について理解が深まり、治療法開発への基盤となる知識が得られると期待される。

研究成果の概要(英文)：We identified Olig2 binding protein 2 (Obp2) by yeast two hybrid screening. Central nervous system-specific Obp2 conditional knockout (cKO) mice died just after birth and mature oligodendrocyte-specific Obp2 cKO mice died at several weeks old. It was shown that Obp2 is essential factor for maintenance of oligodendrocyte progenitor cells and mature oligodendrocyte. Dr. Enokido established primary culture system for murine oligodendrocyte progenitor cells. Using this culture system, they investigated on Krabbe disease model mice and then showed accumulation of psychosine in the oligodendrocytes.

研究分野：神経解剖学

キーワード：オリゴデンドロサイト前駆細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

グリア細胞は、神経細胞の隙間を埋める細胞と考えられてきたが、巨大なネットワーク(グリアアセンブリ)を形成し、脳機能発現を積極的に制御していることが近年明らかになってきている。オリゴデンドロサイトの成熟は、ヒト大脳皮質の各領域で異なり、臨界期に対応して完成することが示唆されている。オリゴデンドロサイト前駆細胞は、成体の脳でも存在し、増殖および最終分化を継続していること、そしてシナプス入力を受けていることが示されている。しかしながら、オリゴデンドロサイト前駆細胞が、神経細胞の活動や脳機能の発現にどのように影響するのかについては明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、オリゴデンドロサイト前駆細胞の分化に関わる分子メカニズムを明らかにするとともに、オリゴデンドロサイト前駆細胞と神経回路の相互作用を明らかにすることを目的とする。そのために、オリゴデンドロサイト前駆細胞およびオリゴデンドロサイト系譜細胞の増殖、数、分化などを人為的に操作できる遺伝子改変マウスを作成し、そのマウスの神経機能について、多角的な解析を行う。

3. 研究の方法

まず、生後脳におけるオリゴデンドロサイト前駆細胞の分化を詳細に明らかにするために、生後脳のオリゴデンドロサイト系譜において Cre 組み換え酵素による DNA 組換えを起こすマウスの実験系を確立し、詳細な細胞系譜追跡実験を行う。続いて、タモキシフェン誘導性にジフテリア毒素などを発現させてオリゴデンドロサイト系譜細胞を除去しマウスの表現型を解析する。オリゴデンドロサイトの分化に関わる因子を同定し、そのコンディショナルノックアウト(cKO)用の flox 変異アレルを作成する。中枢神経系特異的 cKO ノックアウトマウスを作成するため *Nestin-Cre* マウス、ミエリン形成細胞特異的 cKO マウスを作成するために、*Mbp-Cre* マウスと掛け合わせる。そして、これらのマウスの表現型の解析を行う。研究分担者の榎戸靖博士(神経発達研究所)らは、オリゴデンドロサイト前駆細胞の初代培養系を確立し、オリゴデンドロサイト分化を培養系で解析する。

4. 研究成果

タモキシフェン誘導性 Cre マウスとして、*Olig2-CreER* マウスや *Pip-CreER* マウスを用いて、生後脳において Cre 組換えを起こす実験系を確立した。*Pip-CreER*;ジフテリア毒素マウスを用いて他グループからも報告されたものと同様に(Traka et al., Nat Neurosci 2016)、免疫系を介したオリゴデンドロサイトの異常を示すモデルを樹立した(榎戸博士)。本実験系は免疫系を介したオリゴデンドロサイト細胞死を引き起こすユニークな実験系である。

オリゴデンドロサイトの分化に必須の転写因子である *Olig2* に結合する因子を酵母 2 ハイブリッドスクリーニングを行い、*Olig2* binding factor 2 (*Obp2*)を同定した。*Obp2^{flox}* マウスを作成した。*Nestin-Cre* マウスや *Mbp-Cre* マウスを用いて、コンディショナルノックアウトマウスを作成した。*Nestin-Cre*; *Obp2* cKO マウスは、出生直後に死亡した。その組織学的な解析を行うと、オリゴデンドロサイト前駆細胞は産生されるが、細胞死を起こして数が減少していることが判明した。*Mbp-Cre*; *Obp2* cKO マウスを作成すると、生後数週で死亡した。組織学的な解析より、ミエリンの形態に異常のあることが判明した。これらの実験により、*Obp2* はオリゴデンドロサイト前駆細胞や成熟オリゴデンドロサイトの維持に必須の因子であることがわかった。さらには、Cre 組換えにより、生後の脳でオリゴデンドロサイトの数や機能を変化させる実験系を作製することができたと考えている。今後は、データの解析数をきちんと揃え、その分子メカニズムの解析データを加えて論文として発表予定である。

また、*dystonia musculorum (dt)* マウスと名付けられた *dystonin (Dst)* 遺伝子に変異を持つマウスにおいて、予想外にもオリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖が低下していることが判明した(Hossain et al., Neurochem Res 2018)。本マウスにおけるオリゴデンドロサイト前駆細胞の異常は、細胞自律的な影響か、細胞非自律的な影響か、さらに検討を加える予定である。

研究分担者の榎戸博士らは、マウスの脳からオリゴデンドロサイト前駆細胞を効率よく初代培養する実験系を確立した。この培養系を用いて、ガラクトセレブロシダーゼの欠損によりミエリン形成細胞に異常をきたす Krabbe 病のモデルマウスを解析し、サイコシンの蓄積を明らかにして、その病態の一端を明らかにした(Inamura et al., Neurobiol Dis 2018)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 17 件)

Deletion of exons encoding carboxypeptidase domain of *Nna1* results in Purkinje cell degeneration (pcd) phenotype. (2018) Zhou L, Hossain MI, Yamazaki M, Abe M, Natsume R, Konno K, Kageyama S, Komatsu M, Watanabe M, *Sakimura K, *Takebayashi H. **J Neurochem** 147: 557-572. doi: 10.1111/jnc.14591. (査読有)

Developmental defects and aberrant accumulation of endogenous psychosine in oligodendrocytes in

a murine model of Krabbe disease. (2018) Inamura N, Kito M, Go S, Kishi S, Hosokawa M, Asai K, Takakura N, [Takebayashi H](#), Matsuda J, [*Enokido Y](#). **Neurobiol Dis** 120: 51-62. doi: 10.1016/j.nbd.2018.08.023. (査読有)

Motoneuron degeneration in the trigeminal motor nucleus innervating masseter muscle in *dystonia musculorum* mice. (2018) Hossain MI, Horie M, Yoshioka N, Kurose M, Yamamura K, [*Takebayashi H](#). **Neurochem Int** 119: 159-170. doi: 10.1016/j.neuint.2017.10.009. (査読有)

Diencephalic progenitors contribute to the posterior septum through rostral migration along the hippocampal axonal pathway. (2018) [*Watanabe K](#), Irie K, Hanashima C, [Takebayashi H](#), Sato N. **Sci Rep** 8: 11728. doi: 10.1038/s41598-018-30020-9. (査読有)

Reduced proliferation of oligodendrocyte progenitor cells in the postnatal brain of *dystonia musculorum* mice. (2018) Hossain MI, Horie M, [*Takebayashi H](#). **Neurochem Res** 43: 92-100. doi: 10.1007/s11064-017-2342-5. (査読有)

Histological detection of dynamic glial responses in the dysmyelinating *Tabby-jimpy* mutant brain. (2018) Ikeda M, Hossain MI, Zhou L, Horie M, Ikenaka K, Horii A, [*Takebayashi H](#). **Anat Sci Int** 93: 119-127. doi: 10.1007/s12565-016-0383-5. (査読有)

BPAG1 in muscles: structure and function in skeletal, cardiac and smooth muscle. (2017) Horie M, Yoshioka N, [*Takebayashi H](#). **Semin Cell Dev Biol** 69: 26-33. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.07.016. (査読有)

The effect of rapamycin, NVP-BEZ235, aspirin, and metformin on PI3K/AKT/mTOR signaling pathway of PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS). (2017) Suzuki Y, [Enokido Y](#), Yamada K, Inaba M, Kuwata K, Hanada N, Morishita T, Mizuno S, [*Wakamatsu N](#). **Oncotarget** 8: 45470-45483. doi: 10.18632/oncotarget. (査読有)

単純性表皮水疱症モデルとしての新規 *Dystonin/Bpag1* 遺伝子変異マウスの解析(2017) 栗山桃奈, 吉岡望, 加畑雄大, 牛木辰男, 吉木淳, Thomas J Sproule, 阿部理一郎, [*竹林浩秀](#) **新潟医学会雑誌** 131: 655-663. (査読有)

ジストニア様の運動症状と感覚神経変性を示す *dystonia musculorum* マウスの病態解析 (2017) [*竹林浩秀](#) **生化学** 89: 756-760. (査読無)

Characterization of novel *dystonia musculorum* mutant mice: implications for central nervous system abnormality. (2016) Horie M, Mekada K, Sano H, Kikkawa Y, Chiken S, Someya T, Saito K, Hossain MD, Nameta M, Abe K, Sakimura K, Ono K, Nambu A, Yoshiki A, [*Takebayashi H](#). **Neurobiol Dis** 96: 271-283. doi: 10.1016/j.nbd.2016.09.016. (査読有)

Oligodendrogenesis in the fornix of adult mouse brain; the effect of LPS-induced inflammatory stimulation. (2015) Fukushima S, Nishikawa K, Furube E, Muneoka S, Ono K, [Takebayashi H](#), [*Miyata S](#). **Brain Res** 1627: 52-69. doi: 10.1016/j.brainres.2015.09.011. (査読有)

ジストニア症状を示す遺伝性神経難病モデルマウスの作製と解析(2015) [*竹林浩秀](#), 堀江正男 **新潟医学会雑誌** 129: 491-497. (査読有)

Disruption of actin-binding domain-containing dystonin protein causes *dystonia musculorum* in mice. (2014) Horie M, Watanabe K, Bepari A K, Nashimoto J, Araki K, Sano H, Chiken S, Nambu A, Ono K, Ikenaka K, Kakita A, Yamamura K, [*Takebayashi H](#). **Eur J Neurosci** 40: 3458-3471. doi: 10.1111/ejn.12711. (査読有)

Niemann-Pick disease type C1 predominantly involving the frontotemporal region, with cortical and brainstem Lewy bodies: an autopsy case. (2014) Chiba Y, Komori H, Takei S, Hasegawa-Ishii S, Kawamura N, Adachi K, Nanba E, Hosokawa M, [Enokido Y](#), Kouchi Z, Yoshida F, [*Shimada A](#). **Neuropathology** 34: 49-57. doi: 10.1111/neup.12047. (査読有)

グリア細胞発生・分化機構の解析と生体内細胞系譜追跡実験系の確立・応用 (2014) [*竹林浩秀](#) **神経化学** 53: 41-46. (査読無)

ヒト脳病理切片における in situ hybridization 法を利用したニューロンおよびグリア細胞の同定 (2014) 佐藤和彦, 堀江正男, [*竹林浩秀](#), 高橋均, 柿田明美 **新潟医学会雑誌** 128: 625-634. (査読有)

[学会発表](計40件、以下に抜粋を掲載)

1. 新規 Olig2 結合因子によるオリゴデンドロサイト前駆細胞維持機構の解明. 備前典久, 矢野真人, 周麗, 阿部学, 崎村建司, [竹林浩秀](#). 第124回日本解剖学会総会全国学術集会 2019.3.27-29.
2. Analysis of the effect of a novel Olig2-Binding Factor on the oligodendrocyte differentiation and myelination in central nervous system. Norihisa Bizen, Anna Simankova, Nobuhiro Ohno, Manabu Abe, Kenji Sakimura, [Hirohide Takebayashi](#). The 66th NIBB Conference ABiS International Symposium - Cutting Edge Techniques of Bioimaging 2019.2.17-18.
3. Effects of a novel Olig2-binding protein 2 (Obp2) deficiency on the oligodendrocytes differentiation and myelination in murine spinal cord. Anna Simankova, Norihisa Bizen, Manabu Abe, Kenji Sakimura, [Hirohide Takebayashi](#). N-hybrid conference 2019.2.9.
4. Myelin lipid 分解経路の破綻がもたらす脳白質脳症の病態解析とその治療応用. 榎戸靖, 鬼頭もも子, 郷慎司, 細川昌則, 浅井清文, [竹林浩秀](#), 松田純子, 稲村直子. 第61回日本神

- 経化学会大会 2018.9.6-8.
5. Motoneuron degeneration in the trigeminal motor nucleus and atrophy of the masseter muscle in Dystonia musculorum mice. Hirohide Takebayashi, MD Ibrahim Hossain, Masao Horie, Nozomu Yoshioka, Masayuki Kurose, Kensuke Yamamura. FENS2018 2018.7.7-11. Berlin (Germany)
 6. Neural and systemic pathogenesis of *dystonia musculorum* mice. Hirohide Takebayashi. 2018 Korea-Japan Joint Symposium on Neurodevelopment. 2018.6.8-10. Jeju-do, Korea, Invited speaker
 7. 新規 Olig2 結合因子によるオリゴデンドロサイト発生機構の解明. 備前典久、周麗、崎村建司、竹林浩秀. 第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2018.3.28.-30.
 8. *Dystonin* 遺伝子変異マウスにおける腎病変の組織学的解析. 降籟敏熙、吉岡望、竹林浩秀. 第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2018.3.28-30.
 9. 単純性表皮水疱症モデルとしての新規 *Dystonin/Bpag1* 遺伝子変異マウスの解析. 栗山桃奈、吉岡望、加畑雄大、牛木辰男、吉木淳、Thomas Sproule、阿部理一郎、竹林浩秀. 第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2018.3.28-30.
 10. A novel Olig2-binding factor is indispensable for oligodendrocyte development in central nervous system. Hirohide Takebayashi, Norihisa Bizen. 第 60 回日本神経化学会大会 2017.9.7-9.
 11. Identification and characterization of novel *dystonia musculorum* mutant mice. Hirohide Takebayashi, Masao Horie, Kazuyuki Mekada, Hiromi Sano, Yoshiaki Kikkawa, Satomi Chiken, Takuro Someya, Keisuke Saito, M Ibrahim Hossain, Masaaki Nameta, Kuniya Abe, Kenji Sakimura, Katsuhiko Ono, Atsushi Nambu, Atsushi Yoshiki. 2017 ISN-ESN meeting 2017.8.20.-24. Le Palais des Congres de Paris (フランス パリ)
 12. オリゴデンドロサイト最終分化におけるミエリン形成機構の解析. 松岡崇史、備前典久、池田正直、周麗、崎村建司、竹林浩秀. 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2017.3.28-30.
 13. 新規 Olig2 結合因子によるオリゴデンドロサイト分化機構の解析. 備前典久、松岡崇史、Hossain MD Ibrahim、周麗、崎村建司、竹林浩秀. 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2017.3.28-30.
 14. 新規自然発生 *dystonia musculorum* マウスの樹立と中枢神経系についての組織学的解析. 堀江正男、日加田和之、佐野裕美、吉川欣亮、知見聡美、染谷拓郎、斎藤慶介、ホサイン MD イブラヒム、行田正晃、阿部訓也、崎村建司、小野勝彦、南部篤、吉木淳、竹林浩秀. 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2017.3.28-30.
 15. Molecular pathogenesis of dysmyelination in lysosomal storage disease, Niemann-Pick disease type C. 岸宗一郎、稲村直子、竹林浩秀、細川昌則、榎戸靖. 第 59 回日本神経化学会大会 2016.9.8-10.
 16. Reactive astrocytes observed in the brain of *dystonia musculorum* mice. ホサインイブラヒム、堀江正男、行田正晃、小野勝彦、竹林浩秀. 第 59 回日本神経化学会大会 2016.9.8-10.
 17. Examination for possible involvement of the vestibular and reticular nuclei in the emergence for dystonia-like movements in *Dystonin*-deficient mice. Masao Horie, Hiromi Sano, Satomi Chiken, Kenta Kobayashi, Katsuhiko Ono, Atsushi Nambu, Hirohide Takebayashi. 第 39 回日本神経科学大会 2016.7.20-22.
 18. Establishment of conditional *dystonin* allele for analysis of *dystonia musculorum* mice. Hirohide Takebayashi, M Ibrahim Hossain, Hiromi Sano, Satomi Chiken, Kenta Kobayashi, Atsushi Nambu, Masao Horie. 10th FENS 2016.7.2-6. Bella Center (Copenhagen, Denmark)
 19. *Dystonia musculorum* マウスにおける姿勢制御異常に関わる神経回路の解析. 竹林浩秀、Ibrahim Hossain、染谷拓郎、小林憲太、堀江正男. 第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2016.3.28-30.
 20. 新規自然発生ジストニン変異マウスの神経系における異常ニューロフィラメントの分布解析. 染谷拓郎、堀江正男、目加田和之、吉木淳、竹林浩秀. 第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2016.3.28-30.
 21. Impaired late endosomal/lysosomal lipid trafficking attenuates oligodendrocyte differentiation and myelination in Niemann-Pick disease type C. Soichiro Kishi, Zen Kouchi, Naoko Inamura, Yoichi Chiba, Makoto Michikawa, Hirohide Takebayashi, Masanori Hosokawa, Yasushi Enokido. 第 58 回日本神経化学会大会 2015.9.11-13.
 22. Analyses of neuronal and glial cell phenotypes of *dystonia musculorum* mice. Hirohide Takebayashi. 第 58 回日本神経化学会大会 2015.9.11-13.
 23. Histological analysis of the brain in *Dystonin*-deficient mice. Masao Horie, Keisuke Watanabe, Ibrahim MD Hossain, Hiromi Sano, Satomi Chiken, Atsushi Nambu, Katsuhiko Ono, Hirohide Takebayashi. 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会・第 92 回日本生理学会大会 2015.3.21-23.
 24. The new spontaneous mutant mouse allele for *dystonia musculorum*. Keisuke Saito, Masao Horie, Kazuyuki Mekada, Atsushi Yoshiki, Hirohide Takebayashi. 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会・第 92 回日本生理学会大会 2015.3.21-23.
 25. Mouse model of dystonia with sensory neuropathy. Hirohide Takebayashi. 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会・第 92 回日本生理学会大会 2015.3.21-23.

26. ジストニア症状と感覚性ニューロパチーを示す新規遺伝子改変マウスの作製と解析. 竹林浩秀、堀江正男、渡辺啓介、荒木喜美、佐野裕美、知見聡美、南部篤、小野勝彦、池中一裕、柿田明美、山村研一. 第57回日本神経化学学会大会 2014.9.29.-10.1.
27. *dystonin* 遺伝子改変ジストニアモデルマウスにおける脊髄後索および中脳黒質ニューロンの定量化. 梨本淳一郎、堀江正男、渡辺啓介、佐野裕美、知見聡美、小野勝彦、南部篤、竹林浩秀. 第119回日本解剖学会総会・全国学術集会 2014.3.28-30.
28. *dystonin* 変異ジストニアモデルマウス脳の組織学的解析. 堀江正男、渡辺啓介、佐野裕美、梨本淳一郎、知見聡美、南部篤、小野勝彦、柿田明美、竹林浩秀. 第119回日本解剖学会総会・全国学術集会 2014.3.28-30.

〔図書〕(計1件)

脳神経化学 森泰生・尾藤晴彦 編
第1章 脳はどのようにできているか
竹林浩秀

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)
取得状況(計 0件)

〔その他〕

受賞
第70回新潟日報文化賞(学術部門)
「グリア細胞の発生と機能に関する研究」
竹林浩秀 平成29年11月1日

アウトリーチ活動

青森高校 ドリーム講義

医学部医学科卒業後の多様なキャリアパス 平成30年6月14日

ホームページ等

新潟大学大学院 医歯学総合研究科 神経生物・解剖学
<https://www.med.niigata-u.ac.jp/an2/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 榎戸 靖
ローマ字氏名: Yasushi Enokido
所属研究機関名: 愛知県心身障害者コロニー
部局名: 発達障害研究所 病理学部
職名: 室長
研究者番号(8桁): 90263326

(2) 研究協力者

堀江 正男
Masao Horie
鹿児島大学大学院 医歯学総合研究科 形態科学・准教授

吉岡 望

Nozomu Yoshioka
新潟大学超域大学院・助教

千葉 陽一

Yoichi Chiba
香川大学大学院 医学系研究科 炎症病理学・准教授

周 麗

Lei Zhou
新潟大学大学院 医歯学総合研究科・特任助教

ホサイン MD イブラヒム

MD Ibrahim Hossain

新潟大学大学院 医歯学総合研究科・大学院生
ジャハンギルナガル大学・准教授

シマンコワ アンナ

Anna Simankova

新潟大学大学院 医歯学総合研究科・大学院生

森-落合 由紀子

Yukiko Mori-Ochiai

新潟大学 医学部・研究補助員

今田 夕焼

Yuya Imada

新潟大学 医学部・研究補助員

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。