

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：32669

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18368

研究課題名(和文)腫瘍抑制因子Wwoxの中樞神経系構築過程における機能の解明

研究課題名(英文)The role of tumor suppressor Wwox in rat brain development after birth.

研究代表者

栃木 裕貴 (TOCHIGI, Yuki)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・講師

研究者番号：40571576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍抑制因子として知られるWwox遺伝子の中樞神経系構築過程における機能を明らかにすることを目的として、Wwox遺伝子に機能喪失変異をもち、特徴的な聴原性のもてんかんを呈するLDEラットの脳病変の発生メカニズムを解析した。生後成長期のLDEラットの脳では成熟オリゴデンドロサイトの細胞数の減少を伴う著しい髄鞘の低形成が観察された。加えて、オリゴデンドロサイト前駆細胞の増加が観察されたことは、Wwoxがオリゴデンドロサイト系譜細胞の正常な分化に関与していることを強く示唆する。これらの新たな知見は、Wwoxの中樞神経系の構築過程における新たな機能を提示するものとなるだろう。

研究成果の概要(英文)：WW domain containing oxidoreductase (Wwox) gene known as tumor suppressor expresses in the CNS and has been suggested that lack of Wwox affects the occurrence of some brain disorders such as Alzheimer's disease. However physiological role of Wwox in the CNS development is still largely unknown. To address the cellular role of Wwox in the brain development, LDE rats harbouring loss-of function mutation in Wwox gene and showing neurological disorders including sound-induced epileptic seizures were analyzed in this study. Remarkable reduction of myelination accompanied with decreasing cell number of mature oligodendrocytes was shown during postnatal growing phase in the LDE rat brain. In contrast, oligodendrocyte precursor cells (OPCs) were increased in LDE rat brain. Additionally, Wwox protein partially localized with OPCs. These new findings suggest that Wwox is one of key molecule in the faithful differentiation and proliferation from OPCs to mature oligodendrocytes.

研究分野：神経病理学

キーワード：髄鞘形成不全 オリゴデンドロサイト Wwox LDEラット

1. 研究開始当初の背景

腫瘍抑制因子として知られる Wwox containing oxidoreductase (Wwox) 遺伝子の機能については、これまでに株化細胞やモデル動物を用いた多くの検証がなされてきた。一方で、Wwox タンパク質は中枢神経系においてその発現が確認され、中枢神経系の発達やアルツハイマー病における神経原線維変化に Wwox が関与することが示唆されている。また、硬直性-間代性てんかんと精神遅滞ならびに機能障害を呈するヒトの遺伝病の原因遺伝子として Wwox 遺伝子の変異が同定された。これらの報告は Wwox が中枢神経系の発達や、脳疾患の発症メカニズムに関与することを強く印象づけるが、その細胞機能については未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

Wwox 遺伝子に機能喪失変異を有する Lethal Dwarfism with Epilepsy (LDE) ラットは、生後 16 日齢頃から特徴的な聴原性のもてんかん発作(突然ケージ内を走り回り、強直性けいれんに至る)を呈する。また、振戦や歩様異常などの神経症状の他、顕著な矮小を呈し、その多くが成熟に至るまでに死亡する。病理学的には脳の海馬 CA1 領域と扁桃体に空胞の形成が確認される。予備的な検討により LDE ラットの脳では軸索の減少や、著しい髄鞘の低形成が観察されているが、これらの異常がいつ始まるのか、またどのような細胞メカニズムに起因するのか不明である。そこで、本研究では LDE ラットの脳における病態発生メカニズムを解析することで、腫瘍抑制因子 Wwox の中枢神経系構築過程における機能の解明を目的とした。

3. 研究の方法

中枢神経系の構築に重要な生後初期から離乳に至るまでの期間で、LDE ラットの脳におけるニューロン、オリゴデンドロサイト、アストロサイト、ミクログリアの分布について調査した。特にオリゴデンドロサイトについては髄鞘化の程度についても併せて検討した。また、同時期における中枢神経系での Wwox の発現動態と局在について解析した。加えて、オリゴデンドロサイト系譜細胞の分布の経時的な変化を組織学的に比較検討した。

4. 研究成果

21 日齢の雄の +/+ ラットの中枢神経系を脳と脊髄に分け、脳はさらに嗅球、大脳皮質、海馬、間脳、小脳、脳幹の各部位に分けて同様にウェスタンブロット解析を行ったところ、すべての部位において Wwox タンパク質の発現が確認された。前脳における Wwox タンパク質の局在を調査するため、免疫組織化学による解析を行ったところ、前脳の全ての領域で陽性シグナルが認められたが、特に大脳皮質の第 1 層、第 2 層、第 3 層の深部 ~ 白質 (WM)、脳梁 (CC)、海馬、第三脳室

周囲の背側と腹側領域、および内包領域において強いシグナルが検出された。このとき、Wwox のシグナルはいずれも細胞質にのみ検出された。また、脳における Wwox タンパク質の発現量は日齢の進行に伴って増加していることが示された (図 1)。

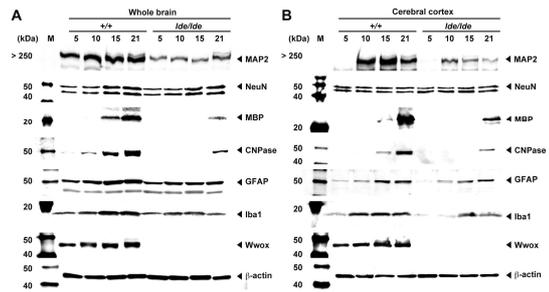


図 1 生後成長期の lde/lde ラットの脳全体ならびに大脳皮質における各種マーカータンパク質の発現動態 5、10、15、21 日齢の +/+ または lde/lde の雄ラットの脳全体 (A) または大脳皮質 (B) を用いたウェスタンブロット解析。

Wwox 欠損の生後成長期中の中枢神経系構築への影響を精査するため、中枢神経系構成細胞群の日齢変動をウェスタンブロット解析ならびに前脳の免疫組織化学により調査した。ニューロン(神経細胞)の細胞体マーカー NeuN を用いた免疫化学では、調査した全ての日齢において +/+ と lde/lde の間に顕著な差は認められなかった。また、同マーカーを用いたウェスタンブロット解析においても同様の結果が確認された(図 1)。これに対し、神経細胞体に加え、樹状突起ならびに軸索を認識することが出来る MAP2 抗体を用いた免疫化学ならびにウェスタンブロットでは、シグナルの減少が観察された(図 1)。これらの結果から、ニューロンでは、その細胞数に影響はないものの、樹状突起ならびに軸索の伸長不良が生じている可能性が示された。

髄鞘マーカー

であるミエリン塩基性タンパク質 (MBP) および CNPase を用いた免疫組織化学では、+/+ において 10 日齢から白質周囲に明瞭な陽性シグナルが観察され、それは日齢の進行に伴い大脳皮質全体へ広がっていった (図 2A 上段)。これに対し、lde/lde では 10、15、

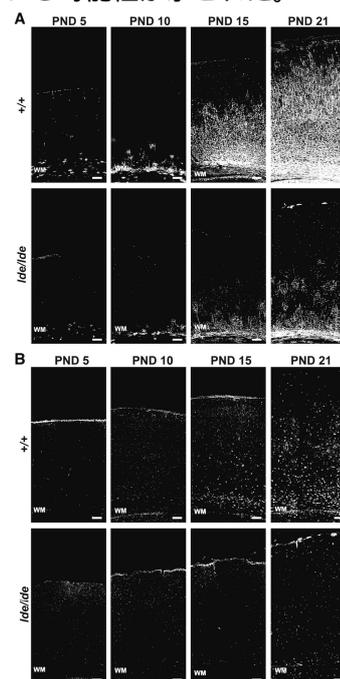


図 2 生後成長期の lde/lde ラット大脳皮質における MBP ならびに APC に対する免疫組織化学 5、10、15、21 日齢の +/+ または lde/lde の雄ラットより作製した組織標本における免疫組織化学の典型像を示した (A: MBP, B: APC)。スケールバーは 100μm を示す。

21 日齢において顕著なシグナルの減少が認められた(図 2A 下段)。同マーカーを用いたウェスタンブロット解析は、これらの結果と同様の傾向を示した(図 1)。オリゴデンドロサイトマーカーの1つである APC は、オリゴデンドロサイトの細胞体を検出することが出来る。APC 抗体を用いた免疫組織化学でも、MBP ならびに CNPase と同様、10、15、21 日齢において顕著なシグナルの減少が認められた(図 2B)。

アストロサイトマーカー GFAP またはミクログリアマーカー Iba1 を用いた免疫組織化学ならびにウェスタンブロット解析は、*Ide/Ide* における僅かなシグナルの減少を示した。

Ide/Ide において影響が確認されたこれら中枢神経系構成細胞群における *Wwox* タンパク質の局在を 21 日齢雄+/+の前脳において調査した。その結果、大脳皮質第 V 層の錐体細胞において、*NeuN* と *Wwox* の共局在が観察された(図 3A)。また、CC において、APC は *Wwox* と共局在した(図 3B)。GFAP は *Wwox* と部分的に共局在したが、Iba1 と *Wwox* の共局在は認められなかった(図 3C, D)。

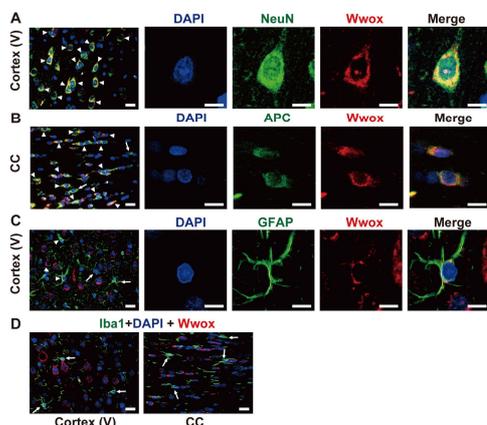


図 3 中枢神経系構成細胞における *Wwox* タンパク質の局在
21 日齢の正常雄ラット(+/+)の前脳の組織標本を用いた各種細胞マーカーと *Wwox* の共局在の典型像を示す。緑色のシグナルは (A) 神経細胞マーカー *NeuN*、(B) オリゴデンドロサイトマーカー APC、(C) アストロサイトマーカー GFAP、(D) ミクログリアマーカー Iba1 を示し、赤いシグナルは *Wwox* を示す。核は DAPI により青く染められている。矢頭は細胞マーカーと *Wwox* の二重陽性像を示し、矢印は細胞マーカーのみ陽性の細胞を示す。スケールバーは弱拡大像で 10μm、強拡大像で 20μm を示す。

Ide/Ide においてオリゴデンドロサイト細胞数の顕著な減少が確認されたことから、*Wwox* の欠損がオリゴデンドロサイトの分化・増殖過程に影響することが示唆された。そこで、オリゴデンドロサイト前駆細胞マーカーである NG2 を用いてさらなる解析を行った。その結果、免疫組織化学において、単位面積当たりの NG2 陽性細胞数は 15 日齢でピークに達し、全ての日齢の *Ide/Ide* において+/+に比べ陽性細胞数の増加が認められた(図 4A)。これとほぼ一致する結果が、脳全体ならびに大脳皮質を用いたウェスタンブロット解析において得られた(図 4B)。加えて、NG2 陽性細胞における、*Wwox* の共発現を調査したところ、大脳皮質ならびに CC の一部の NG2 陽性細胞において *Wwox* の共局在が確認された(図 4C)。これらの結果は LDE ラ

ットの脳において、オリゴデンドロサイト前駆細胞の正常な分化が阻害され、成熟オリゴデンドロサイトが生成されていないことを意味する。すなわち、*Wwox* はオリゴデンドロサイト系譜細胞の正常な分化・増殖に必須の因子である可能性が高い。

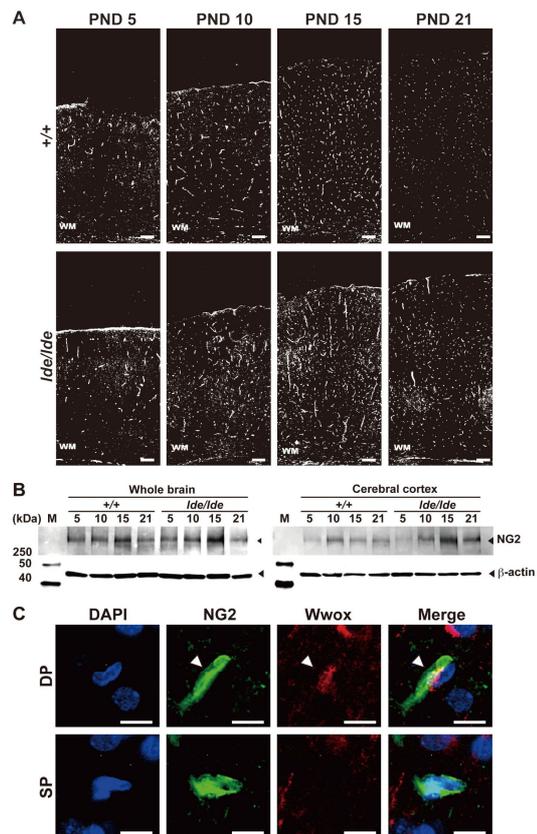


図 4 生後成長期の *Ide/Ide* ラット大脳皮質における OPCs マーカー NG2 を用いた免疫組織化学 (A) 5、10、15、21 日齢の+/+ならびに *Ide/Ide* ラットの脳の組織標本を用いた NG2 の免疫組織染色。図は大脳皮質領域の典型像を示す。スケールバーは 100 μm。(B) 同日齢の脳全体または大脳皮質を用いたウェスタンブロット解析。(C) 21 日齢+/+ラットの脳大脳皮質領域における NG2 と *Wwox* の共局在を示した (DP)、一部 *Wwox* との共局在を示さない細胞も確認された (SP)。NG2 は緑、*Wwox* は赤、核は DAPI により青く染められた。スケールバーは 10 μm。

中枢神経系における髄鞘の形成はオリゴデンドロサイトの増殖と、軸索の髄鞘化の 2 つの過程を要する。ラットにおいてオリゴデンドロサイトは出生後に旺盛な増殖を見せ、おおよそ 21 日齢までにその増殖を完了する。これに対し髄鞘化は 10~30 日齢の間に起こり、20 日齢のあたりにピークに達する。その後、髄鞘化は生涯を通じて低いレベルで維持される。これは *Ide/Ide* ラットにおいて矮小が顕著になり、てんかんが発症する時期と一致することから、*Ide/Ide* ラットの表現型の一部がオリゴデンドロサイトの増殖不良を伴う髄鞘の低形成に起因している可能性がある。また、軸索が髄鞘化された後も軸索と髄鞘はその相互作用によって、お互いが成熟していくと考えられているため、発生期における髄鞘の形成不全は、ニューロン数の減少や神経の伝達速度の低下、さらには知的障害

および運動障害などの原因となることが知られている。ヒトの髄鞘形成不全症には多様な疾患が含まれ、その多くは遺伝性疾患であるが原因遺伝子が不明なものも多く、根本的な治療法も確立されていない。また、後天的に髄鞘が崩壊する脱髄性疾患としてヒトの多発性硬化症が知られており、これら難治性疾患の治療や進行の抑制のためには、髄鞘の形成、維持、再生のメカニズムを解明することが重要である。本研究においてオリゴデンドロサイトの減少が観察されたことは、*Idc/Idc* ラットが髄鞘の形成不良を主徴とする脱髄性疾患の新たなモデル動物になり得ることを示唆する。

結論として、*Wwox* を欠損する LDE ラットの中枢神経系では神経細胞数の変化を伴わない軸索または樹状突起の伸張不良、アストロサイト、ミクログリアの減少、そしてオリゴデンドロサイト前駆細胞の増加とオリゴデンドロサイトの細胞数の減少を伴う著しい髄鞘の低形成が生ずる。そして正常動物の神経細胞、アストロサイト、一部前駆細胞を含むオリゴデンドロサイト系譜細胞には *Wwox* が局在する。これらの新たな事実は、*Wwox* が生後の中枢神経系構築期において重要な生理機能を担っていることを強く示唆する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

Tochigi Y, Iwasaki Y, Sano M, Yasuda H, Katayama K, Suzuki H, Critical roles of Astrin in the mitosis of immature rat Sertoli cells., *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有、13 巻、2017 年、958-964.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.03.137

Yasuda H, Tochigi Y, Katayama K, Suzuki H., Progression of renal fibrosis in congenital CKD model rats with reduced number of nephrons., *Exp Toxicol Pathol.*, 査読有、69 巻、2017 年、245-258.
DOI: 10.1016/j.etp.2017.01.007

Yasuda H, Amakasu K, Tochigi Y, Katayama K, Suzuki H., Renal function and hematology in hypoplastic kidney (HPK) rats with congenitally reduced number of nephrons. *Comparative Medicine*, 査読有、66 巻、2016 年、10-20.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4752031/>

Ebisawa M, Iwano H, Nishikawa M, Tochigi Y, Komatsu T, Endou Y, Hirayama K, Taniyama H, Kadosawa T, Yokota H., Significance of caveolin-1 and matrix metalloproteinase

14 gene expression in canine mammary tumours. *Vet J.*, 査読有、206 巻、2015 年 191-196.
DOI: 10.1016/j.tvjl.2015.07.020

[学会発表](計 1 件)

高松優、栃木裕貴、片山健太郎、鈴木浩悦 オリゴデンドロサイトの分化における腫瘍抑制因子 *Wwox* の役割 第 159 回日本獣医学会学術集会 2016 年 9 月 6 日 神奈川県・藤沢市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栃木 裕貴 (TOCHIGI Yuki)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・講師

研究者番号：40571576