

令和 2 年 6 月 28 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10100

研究課題名(和文) 周産期低酸素虚血性白質障害での稀突起膠細胞分化抑制機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of inhibitory action of oligodendrocyte progenitor cells in a neonatal white matter injury model

研究代表者

三角 吉代 (Misumi, Sachiyo)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員

研究者番号：70529148

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：新生児低酸素虚血性白質障害(NWMI) 脳内に発現増加する2型インスリン様神経栄養因子(IGF-2)が、*in vitro*でオリゴデンドロサイト(OLG)前駆細胞(OPC)の分化を促進するか否か、また*in vivo*で分化促進できるか否かについて検討し、NWMI 脳内のOLG 分化抑制の詳しいメカニズムの解明から脳内に移植されたOPCの分化促進を目指すことを目的とした。その結果、IGF-2単独でOPC分化を促進することを明らかにし、また*in vivo*においてはIGF-2の分化促進作用以上にNWMI脳内の分化抑制作用を解決することが、移植OPC細胞の生着・分化に重要であることが明らかになってきた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新生児低酸素虚血性白質障害(NWMI)の脳内に発現増加するインスリン様成長因子2型(IGF-2)が、オリゴデンドロサイト前駆細胞(OPC)の分化を促進することを証明した。またNWMI脳内ではIGF-2の作用よりも脳内の分化抑制作用が強いことが*in vivo*実験から明らかになり、移植されたOPCの脳内における成長を促進させるためには、この抑制機構の解明が優先される課題であることが明らかになった。ラットを用いた本研究からの課題を動物実験レベルから解明し、ヒトへの応用に繋げることを目指していきたい。また、免疫用剤の存在化における研究を展開し、更なる治療効果の展開へと繋げたい。

研究成果の概要(英文)：The effects of insulin-like growth factor type (IGF-2), which expression is enhanced in the brain of neonatal white matter injury (NWMI), on differentiation of oligodendrocyte progenitor cells (OPCs) *in vitro* and on the ability of OPCs to differentiate *in vivo* were investigated, aiming to clarify the mechanism of differentiation of grafted OPCs from overcoming inhibitory action of the brain in a NWMI model. We revealed that the treatment of IGF-2 alone can induce to differentiate OPCs to mature oligodendrocytes. We also reported that overcoming inhibitory effect in the brain of NWMI is rather important than trophic effect by IGF-2 to promote maturation of grafted OPCs *in vivo*: less number of grafted OPCs were differentiated to CC-1-positive mature OLs in a NWMI model compared to sham-operated control.

研究分野：神経科学

キーワード：低酸素虚血性白質障害 2型インスリン様神経栄養因子 オリゴデンドロサイト前駆細胞 分化 細胞移植

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胎生23-32週の低出生体重児における脳性麻痺の約80%は脳室周囲白質軟化症による。近年の新生児医療の発展により、MRI レベルでもcystが認められないタイプの新生児低酸素虚血性白質障害(NWMI)の割合が多くなっている。NWMI モデル動物では、低酸素虚血により髄鞘形成細胞のオリゴデンドロサイト(OLG)が傷害され細胞死をおこす(急性期障害)一方で、低酸素虚血後に残存するOLGの分化が抑制され未熟なまま成熟OLGに成長できない(慢性期傷害)。すなわちNWMI脳内は、残存するOLGの成熟抑制と髄鞘化障害とともに、移植OLGが生存できるものの成熟・成長できない脳内環境にあることが解明されてきた。しかし、NWMI脳内のOLG分化抑制の詳しいメカニズムについては分かっておらず、このメカニズムが解明されれば、移植されたOLGの脳内での成熟・成長の促進が期待できる。

近年、NWMI脳内のOLG分化抑制に関与する遺伝子を網羅的に探索し、NWMI脳内に特異的に発現が変化する163遺伝子(増加98、減少65)を明らかにした。その結果、傷害部位では内向き整流性カリウムチャンネルKir7.1とinsulin-like growth factor 2(IGF-2)の発現が顕著に増加していることが分かった。また、NWMI後のOLG傷害にIGF-1が関与すること(Sivakumar V et al. *Glia*, 2010)、IGF-2が成熟OLGの細胞死を抑制すること(Neusch C et al. *J. neuroimmunol.* 2002)などが知られている。以上より、NWMI脳で顕著な発現変化がみられるIGF-2が、NWMI後のOLG分化抑制に何らかの影響を及ぼしてと考えられた。この因子に注目し、NWMI脳内のOLG分化抑制の詳しいメカニズムを明らかにしていきたい。

2. 研究の目的

NWMI脳内に発現増加するIGF-2が、*in vitro*でOLG前駆細胞(OPC)の分化を促進するか否か、また*in vivo*で分化抑制を促進できるか否かについて検討し、NWMI脳内のOLG分化抑制の詳しいメカニズムの解明を目指す。さらに、移植され脳内で生存可能なOPCの分化促進への影響も解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) NWMIモデルにおけるIGF-2およびIGF-2受容体の発現

所属教室からの報告したこれまでの論文に従い(Misumi S et al., 2016)、イソフルラン吸入麻酔(1.5%)下にて生後3日齢ラット右総頸動脈閉塞動脈と6%の低酸素条件(1時間)を組み合わせた条件により作成した。

4%パラホルムアルデヒドにより灌流固定、前額断脳切片(40 μ m)を作製し、抗IGF-2抗体および抗IGF-2受容体抗体を用いて免疫染色を行い、共焦点顕微鏡にて観察した。

(2) 培養OPCに対するIGF-2作用の解析

生後1日齢(P1)ラットの大脳皮質から混合グリア培養を作製し、10-12日間後にOPCを調整した。ポリリジンコートした培養ディッシュ上に5,000細胞/cm²の低密度で細胞を播種し、FGF-2(10 ng/ml) + PDGF(10 ng/ml)存在下でOPCを4-5日間増殖培養した。

OPCからOLGへの分化誘導は、CNTF(10 ng/ml) + T3(20 nM)の存在化または非存在下で分化誘導した。IGF-2(100 ng/ml)を分化誘導初日から投与し、培養2日後または6日後に細胞固定した。OPCマーカーとしてPDGFRをOLGマーカーとしてCC-1を用い、免疫染色を行った。

(3) 細胞移植

GFP ラット(P1)の脳皮質から混合グリア培養を作製、10-12 日間後に OPC を調整した。免疫抑制剤の非投与下で NMMI ラットおよびコントロールラットの脳梁へ GFP-OPC (2×10^5)を移植し、GFP 陽性の移植細胞の生着・分化を免疫組織染色法により観察した。

4 . 研究成果

(1) IGF-2 および IGF-2 受容体の NMMI モデルラット脳における発現

NMMI 動物(P5)の脳梁において、IGF-2 は OLIG2 陽性細胞および GFAP 陽性細胞に共発現していた。しかし ED-1 陽性細胞および NeuN 陽性細胞において発現は認められなかった。

IGF-2 受容体の発現は、OLIG2 陽性細胞および GFAP 陽性細胞に発現が認められた。すなわち、IGF-2 は antocrine または paracrine 効果を示した。

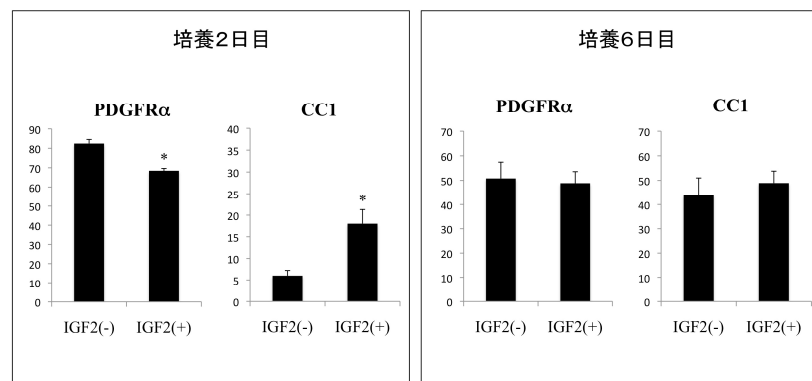
(2) 培養 OPC に対する IGF-2 の作用

調整した OPC 細胞に対し、CNTF(10 ng/ml) + T3(20 nM)を含有する分化誘導培養液に IGF-2 (100ng/ml) を追加投与した。その結果、IGF-2 の追加投与によって、PDGFR 陽性細胞数の減少と CC-1 陽性細胞の増加が観測された。すなわち、IGF-2 が分化誘導を促進させることが明らかになった。

IGF-2 単独投与による分化誘導作用を検討するため、CNTF(10 ng/ml) + T3(20 nM)の非含有培養液へ IGF-2(100ng/ml) を投与した。培養 2 日後において、IGF-2 非投与の対照群に比べ PDGFR 陽性細胞数の有意な減少と CC-1 陽性細胞の有意な増加が認められた。一方、培養 6 日後において CC-1 陽性細胞は有意な差は認められなかった。すなわち、IGF-2 が OPC 分化を促進する作用が示された。

培養OPCへのIGF-2単独投与による効果

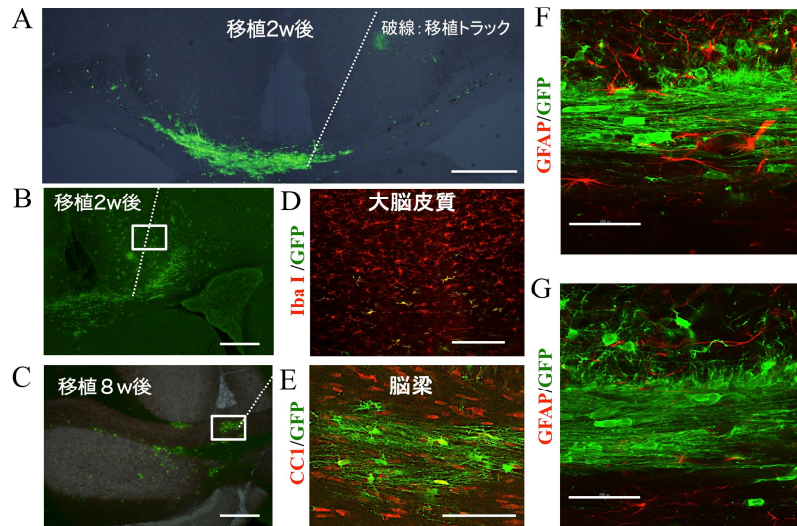
CNTFおよびT3の非存在下での分化誘導



(3) NMMI モデルラットへの OPC 移植

移植 GFP 陽性細胞は、脳梁において移植 3 週間まで生着していた (図 A&B)。その一部は髄鞘化様構造を示した (図 E&F)。また、移植 OPC 細胞は NMMI 脳内において移植後 8 週間まで観察された (図 C)。一方、大脳皮質内の GFP 陽性細胞の多くはミクログリアであった (図 D)。

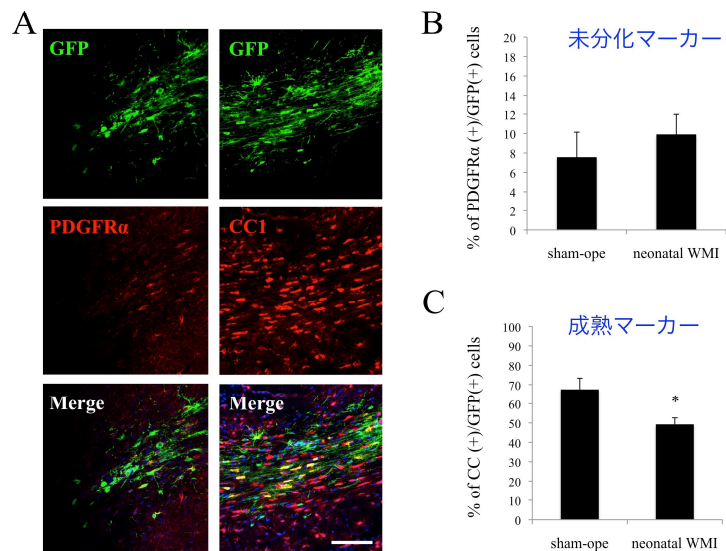
NWMIモデル動物へのGFP陽性OPC細胞移植



(4) NWMI 脳内における OPC 細胞の分化

免疫染色により、移植3週後に移植OPCはCC-1陽性の成熟OLGに分化していることが確認された。しかし、NWMIラットの白質では、sham対照ラットと比較して予想に反し成熟オリゴデンドロサイトの割合は低下していた。

NWMIモデル脳内におけるOPC分化抑制



参考文献

Misumi S, Ueda Y, Nishigaki R, Suzuki M, Ishida A, Jung CG, Hida H. Dysfunction in motor coordination in neonatal white matter injury model without apparent neuron loss: a rat model for cell-based therapy using oligodendrocyte progenitors. *Cell Transplantation*: 25, 2016, 1381-93.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ueda Y, Bando Y, Misumi S, Ogawa S, Ishida A, Jung CG, Shimizu T, Hida H	4. 巻 9
2. 論文標題 Alterations of both dendrite morphology and weaker electrical responsiveness in the cortex of hip area occur before rearrangement of the motor map in neonatal white matter injury model rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Neurology	6. 最初と最後の頁 443
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fneur.2018.00443	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nishigaki R, Yokoyama Y, Shimizu Y, Marumoto R, Misumi S, Ueda Y, Ishida A, Shibuya Y, Hida H	4. 巻 1690
2. 論文標題 Monosodium glutamate ingestion during the development period reduces aggression mediated by the vagus nerve in a rat model of attention deficit hyperactivity disorder	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 40-50
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainres.2018.04.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ueda Y, Misumi S, Suzuki M, Ogawa S, Nishigaki R, Ishida A, Cha-Gyun Jung, Hida H.	4. 巻 43(1)
2. 論文標題 Disorganization of oligodendrocyte development in the layer II/III of the sensorimotor cortex causes motor coordination dysfunction in a model of white matter injury in neonatal rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurochemical Research	6. 最初と最後の頁 127-37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1007/s11064-017-2352-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Misumi S, Ueda Y, Nishigaki R, Suzuki M, Ishida A, Jung CG, Hida H	4. 巻 25(7)
2. 論文標題 Dysfunction in motor coordination in neonatal white matter injury model without apparent neuron loss	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Cell Transplantation	6. 最初と最後の頁 1381-93
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3727/096368915X689893	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計11件(うち招待講演 0件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Ogawa S, Hagiwara M, Shimizu T, Ueda, Y, Misumi S, Ishida A, Hida H
2. 発表標題 Insulin-like growth factor-2, an increasing factor in neonatal white matter injury brain, promotes the differentiation of oligodendrocyte progenitor cells in vitro
3. 学会等名 ASNTR-25/INTR-15 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小川紫野、鈴森伸宏、杉浦真弓、飛田秀樹
2. 発表標題 低酸素虚血性白質障害モデルへのオリゴデンドロサイト前駆細胞移植におけるIGF-2の作
3. 学会等名 第54回日本周産期新生児学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 服部篤紀、田尻直輝、上田佳朋、小川紫野、石田章真、清水健史、飛田秀樹
2. 発表標題 発育期の豊かな環境飼育が新生児低酸素虚血性白質障害モデルラットに与える影響
3. 学会等名 中部日本生理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 近藤佐和、清水健史、石田章真、田尻直輝、飛田秀樹
2. 発表標題 グルタミン酸ナトリウム投与法の違いによるc-fos染色性変化
3. 学会等名 中部日本生理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tajiri N, Hattori A, Ueda Y, Ogawa S, Ishida, A, Shimizu T, Hida H
2. 発表標題 Enriched environment during the period of development attenuates hindlimb dysfunction in neonatal white matter injury model
3. 学会等名 第96回日本生理学会 / FAOPS 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hagiwara M, Ogawa S, Shimizu T, Misumi S, Hida H
2. 発表標題 Hypoxia-ischemia induced factor in the neonatal brain, insulin-like growth factor-2, promotes the differentiation of oligodendrocyte progenitor cells
3. 学会等名 第95回日本生理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ogawa S, Hagiwara M, Shimizu T, Ueda, Y, Misumi S, Ishida A, Hida H
2. 発表標題 Insulin-like growth factor-2, an increasing factor in neonatal white matter injury brain, promotes the differentiation of oligodendrocyte progenitor cells in vitro
3. 学会等名 ASNTR-25/INTR-15 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Misumi S, Ogawa S, Suzuki M, Ueda Y, Ishida A, Jung CG, Hida H
2. 発表標題 Increased expression of Kir7.1 in oligodendrocyte progenitor cells of the developmental white matter injury model rat
3. 学会等名 第39回日本神経科学大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Ueda Y, Ishida A, Nagai H, Misumi S, Hida H
2. 発表標題 The delay of motor map distribution in the developmental white matter injury model rat without neuronal loss
3. 学会等名 第39回日本神経科学大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Ueda Y, Bando Y, Misumi S, Ogawa S, Hida H
2. 発表標題 Alteration of Dendrite Morphology and Electric Responsibility in the Sensorymotor Cortex on the Developmental White Matter Injury Model Rat
3. 学会等名 Society for Neuroscience 2016 (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Ueda Y, Bando Y, Misumi S, Ogawa S, Ishida A, Jung CG, Hida H
2. 発表標題 Functional development deficit on the sensorimotor cortex after weaning of preterm brain injury model without neuronal loss
3. 学会等名 第94回日本神経科学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	飛田 秀樹 (Hida Hideki) (00305525)	名古屋市立大学・薬学総合研究院(医学)・教授 (23903)	