

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19800043
 研究課題名（和文）BMP および LIF シグナリングを介した視神経グリア細胞の分化・成熟機構の制御
 研究課題名（英文）The regulation mechanisms of the glial development in the optic nerve via cytokine molecules, BMP and LIF
 研究代表者
 石橋 智子 (ISHIBASHI TOMOKO)
 東京薬科大学・薬学部・助教
 研究者番号：50453808

研究成果の概要：

私たちの脳は神経細胞の他にグリア細胞と呼ばれる細胞が多数存在し脳機能調節に重要な役割を担っている。グリア細胞の一つであるオリゴデンドロサイトは中枢神経系のミエリンを形成する。このオリゴデンドロサイトの増殖分化・成熟にサイトカインの一つ骨形成タンパク質 (BMP) が重要な役割を担っていることを、BMP 受容体 1b 欠損マウスの発達段階視神経を用いて明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,360,000	0	1,360,000
2008 年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,710,000	405,000	3,115,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：神経科学一般

キーワード：ミエリン, オリゴデンドロサイト, 視神経, BMP, サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

(1) ニューロンと2種類のグリア細胞 (アストロサイト、オリゴデンドロサイト) は中枢神経系を構成する主要細胞種であるが、これら3つの細胞系譜はいずれも神経幹細胞から分化する。その細胞系譜の制御は、細胞内在性のプログラムや細胞外来性のサイトカインシグナリングにより担われている。

(2) Interleukin-6 (IL-6)ファミリーサイトカインと骨形成蛋白質 (Bone morphogenetic protein (BMP)) ファミリー

サイトカインは全く異なるシグナル伝達様式をたどるサイトカインである。これら2つのファミリーそれぞれのメンバー白血球抑制因子(LIF)とBMP2が胎生期にマウス神経上皮細胞に相乗的に作用しグリア細胞への分化に関与することはよく知られている。

(3) 近年、IL-6ファミリーサイトカインメンバーのIL-11がオリゴデンドロサイトの成熟、ミエリン形成に関与していること、BMPシグナリングがオリゴデンドロサイトの発生を抑制している可能性があることが報告されている。しかしながら、グリア細胞へ運

命決定後におけるそれらシグナルの関与は未だ明らかではなく、また生後のアストロサイトとオリゴデンドロサイトの相互作用におけるサイトカインシグナリングの関わりに注目した研究はほとんど報告されていない。

2. 研究の目的

筆者は以前軸索の活動電位発生がアストロサイトからの LIF 放出を促し、オリゴデンドロサイト前駆細胞(OPC)からオリゴデンドロサイトの分化成熟を促進することを報告している。今研究ではオリゴデンドロサイト分化制御分子として BMP に焦点を当てた。中枢神経系、特に生後マウス視神経に存在するグリア細胞(オリゴデンドロサイトおよびアストロサイト)の分化・成熟における、(1) BMP シグナリングの制御機構、(2) BMP シグナリングと LIF シグナリングの相互制御機構を明らかにすることを目的に研究を行った。

3. 研究の方法

図1に示すように脊椎動物視神経は、網膜視神経細胞 (retinal ganglion cell) の軸索が伸長し形成される。つまり視神経内には神経細胞体は存在せず、グリア細胞(アストロサイト、オリゴデンドロサイト、マイクログリア)の細胞体のみ存在している。したがって視神経は神経軸索とグリア細胞の関係を調べて行く上で非常に適した組織であるため、全ての実験において視神経を使用した。

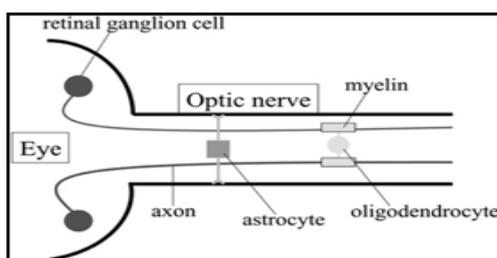


図1

(1) 胎生18日 (E18) から生後2週齢 (P14) および生後2ヶ月齢、4ヶ月齢、6ヶ月齢の BMPR1b 欠損マウスおよび正常コントロールマウスを各3個体ずつ 4%パラホルムアルデヒドで灌流固定後、視神経を摘出し凍結組織切片を作成した。作成した視神経切片を用いて以下の抗体を使用し免疫蛍光染色を行った後蛍光顕微鏡にて観察した。

(抗 Olig2 抗体、抗 MBP 抗体、抗 NG2 抗体、抗 Neurofilament 抗体、抗 GFAP 抗体、抗 PCNA 抗体、抗 Caspase3 抗体、抗 Nestin 抗体)

(2) マウス視神経における BMP シグナリングの有無を調べるために P10 正常マウス視神経から RNA を抽出し、BMPR1b、BMPR1a の mRNA レベルを調べると共に、BMP の下流に存在する Smad シグナルの有無をリン酸化 smad1/5/8 の抗体を用いて免疫染色した。

(3) BMPR1b 欠損マウス視神経の詳細な形態、特に髄鞘形成の程度、軸索内の変化の有無を調べるために、生後10日齢マウスを 4%パラホルムアルデヒド、2.5%グルタル、0.1%カコジル酸 (pH7.4) で還流固定後、2%緩衝四酸化オスミウム/カコジル酸で後固定後エポキシ樹脂包埋し、超薄切片を作製後、電子顕微鏡を用いて観察を行った。

4. 研究成果

(1) P10 視神経から精製した RNA を用いて RT-PCR を行ったところ、図2に示すように、網膜および視神経において共に BMPR1a、BMPR1b mRNA が豊富に存在することがわかった。さらにリン酸化 smad1/5/8 抗体を用いた免疫染色により、確かに BMP シグナルが視神経に存在することが分かった。

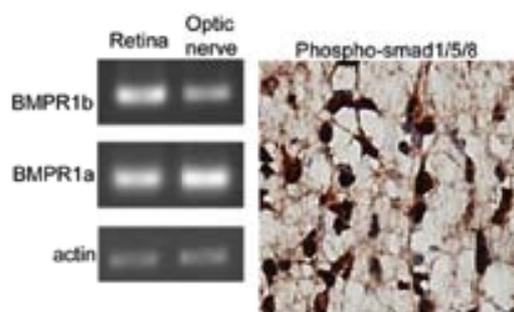


図2

(2) P10 マウス視神経ミエリン形成を調べた結果、予想に反して BMPR1b 欠損マウスのミエリン形成は正常であった。しかしながら非常に興味深いことに、視神経中心部に異常細胞塊が認められた(図3)。E18, P0, P3, P5, P7, P10, P14, P28, P56, および6ヶ月齢マウス視神経系を調べた結果、この異常細胞塊は、E18 では全く認められず、P0 から出現し6ヶ月齢でほぼ消失していた。細胞塊周囲部分は正常であった。

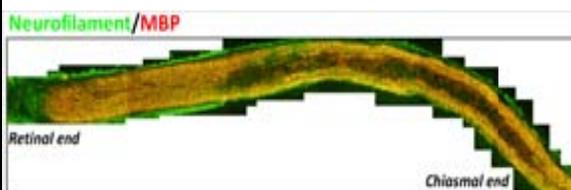


図3

(3) 視神経は網膜視神経細胞の軸索から形成される。先に述べたように視神経内には神経細胞の細胞体は存在しない。視神経内に存在する細胞体は全てグリア細胞である。視神経のオリゴデンドロサイトは生後直前に第三脳室から視交叉を通過して、視神経に侵入してくる。したがって、BMPRIb 欠損マウスで認められた異常細胞塊はオリゴデンドロサイト由来の細胞である可能性がある。由来細胞を調べるために、様々な抗体を用いて免疫染色を行った結果、P0 では多分化能を有する神経幹細胞の性質を呈していた。さらに日齢を追うごとに細胞塊細胞は Olig2 陽性オリゴデンドロサイトおよび GFAP 陽性アストロサイトに分化していることが明らかとなった。

(4) 異常細胞塊細胞の BMP シグナルをリン酸化 smad1/5/8 抗体を用いて免疫染色した結果、nestin 陽性神経幹細胞の性質を有している細胞では Psmad1/5/8 は細胞質に局限し、Olig2 陽性オリゴデンドロサイトあるいは GFAP 陽性アストロサイトに分化するに従い、Psmad1/5/8 陽性像が核に移行していた。

(5) 以上の結果より BMPRIb を介した BMP シグナルが視神経の正常な発達に関与していること、特にグリア細胞の分化因子として働いていることが明らかとなった。今回は視神経に焦点を絞り研究を行ったが、脳の他の部位では同様の変化は認められなかった。したがって、発達段階の視神経という微小環境のなかで BMPRIb を介したシグナルが重要であることが示唆された。

BMP レセプターには TypeI レセプターと TypeII レセプターが存在するが、TypeII レセプターの中に今回の BMPRIb 以外に BMPRIa が存在している。BMPRIa は生体内に広く発現し、BMPRIa 欠損マウスが胎生致死であることから、発達段階に非常に重要な分子であることが明らかとなっている。一方、BMPRIb 欠損マウスは四肢の指が短いという異常が認められる以外、正常に成長する。しかしながら、今回 BMPRIb 欠損マウス視神経において、極めて明らかな細胞増殖異常が生じることが明らかとなった。このような異常は脳、脊髄など他の中枢神経系の部位には認められない。

BMPRIa と BMPRIb は図4に示すように、その下流で共通のシグナルとして Smads シグナルを持つ。BMPRIa は Smad シグナル以外にも P38 および Erk を介したシグナル経路が存在することが報告されている。BMPRIa を介したシグナルは下流の CyclinD1 に働き細胞周期を増殖の方向に作用する。一方 BMPRIb は Smad シグナルを核に伝え標的遺伝子を活性化し、分化の方向へと作用すると考えられている。

今回の筆者の視神経の結果から、BMPRIb が無いことにより、BMPRIa のシグナルが抑制されずに細胞増殖をし続けている可能性が考えられた。この両者 BMPRIa と BMPRIb は互いに影響を及ぼし合い、適切なバランスを維持することが重要であるのではないかと考えられる。今後さらに下流のシグナルを含め BMP シグナリングの働きを明らかにすることが必須であると考えられる。

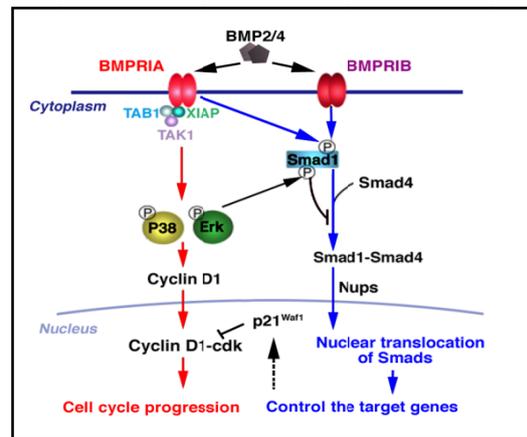


図4

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 1 件)

Ishibashi Tomoko, Lee Philip, Baba Hiroko, Fields R. Douglas "Leukemia inhibitory factor regulates the timing of oligodendrocyte development and myelination in the postnatal optic nerve" *Journal of Neuroscience Research* (2009年5月21日 accepted)

[学会発表] (計 2 件)

(1) 石橋智子 A Novel Function of Leukemia Inhibitory Factor in Myelination *Neuro2007* (第50回神経化学学会大会) 2007年9月10日~12日 パシフィコ横浜

(2) 石橋智子 BMP signaling through BMPRIb is essential for proper terminal differentiation in glial progenitor cells 第51回日本神経化学学会大会 平成20年9月11日~13日 富山国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石橋 智子 (ISHIBASHI TOMOKO)

東京薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：50453808

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者