

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07241

研究課題名(和文)オリゴデンドロサイト機能異常が惹起するp53誘導性神経変性機構の分子基盤解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular basis underlying p53-mediated neurodegeneration induced by oligodendrocyte dysfunction

研究代表者

備前 典久 (Bizen, Norihisa)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：40751053

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)：オリゴデンドロサイト(OL)は神経軸索にミエリンを形成し、神経伝達と軸索保護に寄与するが、近年ミエリンの構造的機能とは独立したニューロンとの相互作用が注目されている。我々が作製したOLにおけるRNA代謝調節因子Obp2欠損マウスでは、ニューロンでp53の核内蓄積や酸化ストレスが亢進し、神経変性や老化マーカーの発現亢進などが認められた。Obp2欠損マウス脳梁におけるRNAseqでは、細胞内代謝系に関連する遺伝子群の発現低下やスプライシング異常が認められたことから、Obp2はRNA代謝を介してOLの細胞内代謝を制御することで、ニューロンとの適切な相互作用に寄与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年オリゴデンドロサイト(OL)由来の細胞間シグナルによるニューロンの恒常性維持機構の存在が注目されている。本研究より、OL内のObp2がスプライシングを含むRNA代謝機構を介してOL内代謝を制御し、OLのみならずニューロンの恒常性維持にも寄与する可能性が示唆され、新たなOL-ニューロン間相互作用が見出された。また、複数の神経変性疾患ではニューロンでp53の蓄積が検出されており、OLの代謝異常がこれらの疾患に關与する可能性があることから、本研究の成果により神経変性疾患における新たな治療標的を見出す糸口になることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Oligodendrocytes (OLs) form myelin around axons and contribute to saltatory conduction and axonal protection. There has been recent interest in intercellular signaling from OLs involved in neuronal homeostasis. Mice lacking Obp2, a regulator of RNA metabolism, showed the induction of p53 stabilization and oxidative stress in neurons, resulting in neurodegeneration and neuronal senescence. RNA-seq analysis demonstrated the decreased expression and splicing dysregulation of cellular metabolism-related genes in Obp2 deficient corpus callosum. These results suggest that Obp2 contributes to neuronal survival and homeostasis by regulating RNA metabolism in OLs.

研究分野：神経発生学、神経解剖学

キーワード：オリゴデンドロサイト p53 グリア 神経変性 グリア-ニューロン相互作用

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

オリゴデンドロサイト(OL)は神経軸索にミエリンを巻きつけることで跳躍伝導と軸索保護に寄与することが知られている。中枢神経系の発達過程においては、OLとニューロンは相互作用を介してそれぞれの成熟を促進する。さらに、OLはニューロンのエネルギー産生の一部を担っていることも明らかになりつつあるが、ニューロンの恒常性維持を担うOLの細胞間シグナルの詳細は不明な点が多い。我々はこれまでOLの発生に必須の転写因子Olig2に結合する新規因子RNAヘリカーゼObp2(Olig2 binding protein 2)を同定し、この分子はOL前駆細胞の生存に必須であることを明らかにした。さらに、OLにおけるObp2欠損マウスを作製し、Obp2がミエリン関連遺伝子の発現維持とミエリン形成に必須であることを明らかにした。一方、このマウスはOLではなくニューロンでp53が顕著に蓄積し、神経変性が亢進していた。この現象はミエリン形成不全を呈するJimpyマウスでは生じないことから、ニューロンの生存と恒常性を維持するために、ミエリンの構造的機能とは独立した新たなOL-ニューロン間相互作用の存在が想定された。

2. 研究の目的

本研究は、OLにおけるRNA代謝調節因子Obp2欠損マウスを用いて、OLおよびニューロンの異常に根底にある分子的背景を明らかにし、ニューロンの生存と恒常性維持に寄与するOL-ニューロン間相互作用の分子基盤を明らかにすることを目的に行われた。

3. 研究の方法

(1) オリゴデンドロサイト(OL)特異的Obp2欠損マウスを作製するために、Mbp-CreおよびPlp-CreERマウスにObp2-floxマウスを掛け合わせて成熟OL特異的Obp2欠損マウス(Mbp-Cre;Obp2 cKOマウス、Plp-CreER;Obp2 cKOマウス)を作製した。PlpCreER;Obp2欠損マウスは出生後6日および7日目にタモキシフェン(75mg/kg)を腹腔内に導入し、4週後に解析した。

(2) Obp2欠損マウスにおけるOLおよびニューロンの表現型について、免疫組織化学、in situ hybridization法、Niss1染色、Luxol fast Blue染色、定量RT-PCR、ウエスタンブロッティング、電子顕微鏡を用いて解析した。

(3) 6週齢Mbp-Cre;Obp2欠損マウス脳梁を用いてRNA-seqを行い、遺伝子発現差解析(DEG解析)とAlternative splicingの変動を解析した(同腹のコントロールおよびObp2欠損マウスを3匹ずつ解析)。NovaSeq 6000で読んだシークエンスリードのアライメント、定量、エクソン含有率の算出はSTAR, RSEM, Olego, Quantasを用いて行った。

4. 研究成果

(1) Obp2欠損マウス脳におけるオリゴデンドロサイトとニューロンの表現型解析

Obp2欠損マウス脳において、免疫染色やin situ hybridizationを行ったところ、OLではDNA損傷が亢進していた(図A)。p53の蓄積は認められなかったが、p21の発現が顕著に亢進していた。このことから、p53経路非依存的なp21発現機構が示唆された。また、Obp2欠損OLではRNAスプライシングを担うSMNタンパクの著しい発現低下が認められたため、OLにおけるRNA代謝制御の破綻が示唆された。これらの表現型はPlpCreER;Obp2欠損マウスでも認められた。一方ニューロンでは、ミエリン構造に異常が認められない出生後早期よりp53の蓄積が認められた。また、脳の広範囲で軸索変性マーカーであるSMI-32のシグナル亢進や海馬ニューロンの顕著な脱落が生じており(図B,C)、大脳皮質ニューロンでは老化マーカーであるSA-βgalの著しいシグナル亢進が認められた。さらに、脂質酸化、DNA酸化およびp38のリン酸化などが検出され、酸化ストレスの亢進が示唆された。

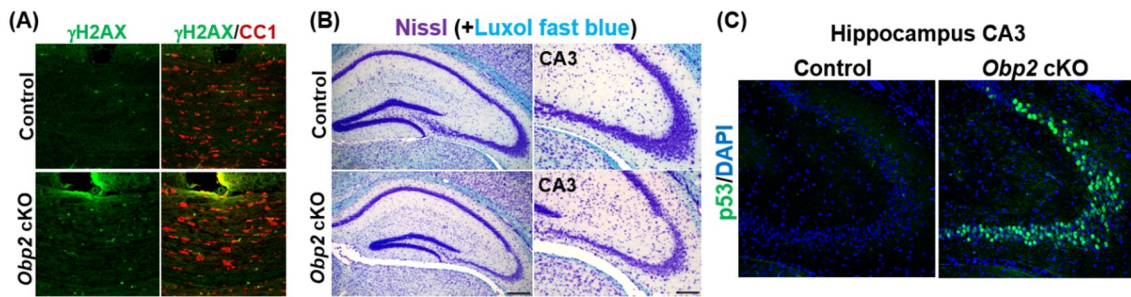


図: (A) 6週齢Obp2欠損マウス脳梁のオリゴデンドロサイト(CC1陽性)におけるDNA損傷(γH2AX陽性)の亢進 (B) 生後6週齢海馬におけるクリューパー・バレー染色(Nissle+Luxol fast blue染色)。Obp2欠損マウスではCA3ニューロンが減少していた。(C) Obp2欠損マウスではCA3ニューロンにおいてp53が顕著に蓄積していた。

(2) Obp2 欠損マウス脳梁における RNA-seq 解析

6週齢コントロールマウスおよびObp2欠損マウスにおいて、オリゴデンドロサイトが豊富に局在している脳梁からRNAを採取し、RNA-seqに供した。DEG解析、GO解析、Pathway解析を行ったところ、コレステロール合成系、脂質・脂肪酸代謝系、グルコース代謝系など、細胞代謝に関与する遺伝子群の顕著な発現低下が検出された。一方で、酸化ストレスおよびその応答に関与する遺伝子群の発現が上昇していた。興味深いことに、アルツハイマー病や多発性硬化症などの神経変性疾患および脱髄疾患などで同定されている疾患関連オリゴデンドロサイトに特徴づけられている遺伝子群の発現上昇も認められた。これらの結果は、免疫染色や定量PCRなどを用いて、遺伝子およびタンパクの発現変動を確認した。DEG解析に関連して、網羅的スプライシング変動解析を行ったところ、細胞代謝経路の制御因子のスプライシング異常が複数検出された。これらの異常は機能ドメインの喪失やフレームシフトによる異常タンパク産生などが含まれていた。また、細胞代謝異常に伴い産生されるストレス誘導候補分子を同定した。

以上の結果から、Obp2欠損OLにおいて、RNA代謝制御を担うSMN複合体が破綻に伴う細胞代謝関連遺伝子群のスプライシング異常と発現低下がOLにおける細胞代謝異常を引き起こし、ニューロンにおいてストレスの亢進とp53経路が活性化する可能性が考えられた。本研究により同定されたストレス誘導候補分子はミトコンドリアの機能低下やニューロンにおけるp53経路の活性化などが報告されているため、今後はObp2欠損マウスにおけるこれらの分子の機能解析を進めていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Bizen Norihisa, Bepari Asim K., Zhou Li, Abe Manabu, Sakimura Kenji, Ono Katsuhiko, Takebayashi Hirohide	4. 巻 29
2. 論文標題 Ddx20, an Olig2 binding factor, governs the survival of neural and oligodendrocyte progenitor cells via proper Mdm2 splicing and p53 suppression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Death and Differentiation	6. 最初と最後の頁 1028 ~ 1041
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41418-021-00915-8	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 該当する

1. 著者名 備前典久、竹林浩秀	4. 巻 -
2. 論文標題 RNA代謝調節因子Ddx20による神経前駆細胞およびオリゴデンドロサイト前駆細胞維持機構	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 神経化学トピックス	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11481/topics163	査読の有無 無
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 Simankova Anna, Bizen Norihisa, Saitoh Sei, Shibata Shinsuke, Ohno Nobuhiko, Abe Manabu, Sakimura Kenji, Takebayashi Hirohide	4. 巻 69
2. 論文標題 Ddx20, DEAD box helicase 20, is essential for the differentiation of oligodendrocyte and maintenance of myelin gene expression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Glia	6. 最初と最後の頁 2559 ~ 2574
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/glia.24058	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 Yoshioka Nozomu, Kabata Yudai, Kuriyama Momona, Bizen Norihisa, Zhou Li, Tran Dang M., Yano Masato, Yoshiki Atsushi, Ushiki Tatsuo, Sproule Thomas J., Abe Riichiro, Takebayashi Hirohide	4. 巻 13
2. 論文標題 Diverse dystonin gene mutations cause distinct patterns of Dst isoform deficiency and phenotypic heterogeneity in Dystonia musculorum mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Disease Models & Mechanisms	6. 最初と最後の頁 dmm.041608
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dmm.041608	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 該当する

1. 著者名 Wang Ya-Zhou, Fan Hong, Ji Yu, Reynolds Kurt, Gu Ran, Gan Qini, Yamagami Takashi, Zhao Tianyu, Hamad Salaheddin, Bizen Norihisa, Takebayashi Hirohide, Chen YiPing, Wu Shengxi, Pleasure David, Lam Kit, Zhou Chengji J.	4. 巻 77
2. 論文標題 Olig2 regulates terminal differentiation and maturation of peripheral olfactory sensory neurons	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Life Sciences	6. 最初と最後の頁 3597 ~ 3609
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00018-021-03870-2	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 該当する

1. 著者名 Terumitsu Tsujita Mika, Kitaura Hiroki, Miura Ikuo, Kiyama Yuji, Goto Fumiko, Muraki Yoshiko, Ominato Shiho, Hara Norikazu, Simankova Anna, Bizen Norihisa, Kashiwagi Kazuhiro, Ito Takuhiro, Toyoshima Yasuko, Kakita Akiyoshi, Manabe Toshiya, Wakana Shigeharu, Takebayashi Hirohide, Igarashi Hironaka	4. 巻 154
2. 論文標題 Glial pathology in a novel spontaneous mutant mouse of the Eif2b5 gene: a vanishing white matter disease model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 25 ~ 40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.14887	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10件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 備前典久, Anna Simankova, 竹林浩秀
2. 発表標題 オリゴデンドロサイト異常によるp53誘導性神経変性機構の解明
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 備前典久, Anna Simankova, 竹林浩秀
2. 発表標題 RNAヘリカーゼDdx20によるオリゴデンドロサイトの発生・分化制御およびオリゴデンドロサイト-ニューロン間相互作用機構の解明
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Norihisa Bizen, Anna Simankova, Hirohide Takebayashi
2. 発表標題 RNA helicase Ddx20 in oligodendrocytes contributes to neuronal survival in the central nervous system
3. 学会等名 Neuro2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Norihisa Bizen, Toshinobu Nakamura, Tetsuya Taga
2. 発表標題 5-methylcytosine hydroxylase Tet3 endows embryonic neural stem/precursor cells with astroglial competence
3. 学会等名 The 19th Stem Cell Research Symposium
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 備前典久, Anna Simankova, 竹林浩秀
2. 発表標題 発達期の中枢神経系におけるオリゴデンドロサイト-ニューロン間相互作用の解析
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 備前典久, Anna Simankova, 竹林浩秀
2. 発表標題 RNAヘリカーゼDdx20によるオリゴデンドロサイトの発生および分化・成熟機構の解明
3. 学会等名 第6回日本ミエリン研究会発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 備前典久, Anna Simankova, Asim K Bepari, 周麗, 阿部学, 崎村建司, 小野勝彦, 竹林浩秀
2. 発表標題 神経前駆細胞およびオリゴデンドロサイト前駆細胞の維持に関わる分子機構の解明
3. 学会等名 日本解剖学会第109回関東支部学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Norihisa Bizen, Asim K. Bepari, Masato Yano, Li Zhou, Manabu Abe, Kenji Sakimura, Katsuhiko Ono, Hirohide Takebayashi
2. 発表標題 A novel Olig2-binding factor is indispensable for survival of neural and oligodendrocyte progenitor cells in the central nervous system
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会 / 第1回CJK国際会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 備前典久, Asim K Bepari, 矢野真人, 周麗, 阿部学, 崎村建司, 小野勝彦, 竹林浩秀
2. 発表標題 中枢神経系における新規Olig2結合因子による神経前駆細胞およびオリゴデンドロサイト前駆細胞維持機構の解明
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 備前典久, 竹林浩秀
2. 発表標題 新規Olig2結合因子による神経前駆細胞およびオリゴデンドロサイト維持機構の解明
3. 学会等名 第14回神経発生討論会
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	UConn Health			