

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 9 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591126

研究課題名（和文） 脱髄疾患におけるオリゴデンドロサイト分化に関わるエピジェネティック機構解明

研究課題名（英文） Epigenetic mechanism during remyelination in genetic demyelinating mouse model, Twitcher.

研究代表者

毛利育子（MOHRI IKUKO）

大阪大学・連合小児発達学研究所・准教授

研究者番号：70399351

研究成果の概要（和文）：

オリゴデンドログリア(OLD)は中枢神経白質において髄鞘形成を担う細胞である。近年、脱髄からの再髄鞘化にはHDACが関与していることを報告している。本研究では、先天性脱髄疾患モデルマウス twitcher を用いて、OLDの分化・脱分化にエピジェネシスが関与しているかを検討した。DNMT3はいずれの日齢においても明らかな発現の変化は認められなかった。HDAC1の免疫染色では、脱髄、再髄鞘化が盛んな日齢30で、HDAC1陽性OLDの増加を確認した。

研究成果の概要（英文）：

Oligodendrocytes (OLs), the myelinating cell in the CNS, play an important role in brain development and neuronal function. It was revealed that histone deacetylases (HDACs) play a crucial role in the actual generation and differentiation of early oligodendrocytes. In this study, we examined whether the epigenetic program play a role in the genetic demyelinating mouse model, Twitcher. We conducted immunocytochemistry to know the expression of HDAC1 and DNA methyltransferase (DMNT) in the normal and Twitcher mouse brain at postnatal day 20, 30, and 40. HDAC1 positive OLs were increased in number in the brain of Twitcher at PND 30, in which demyelination and remyelination are obvious. HDAC1 positive OLs were seen especially in granular cell layer of cerebellum. Immunocytochemistry did not show any difference of DMNT3 positive cells in both mouse brains.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2010年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 2011年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2012年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：小児科

キーワード：エピジェネティックス, 髄鞘化, 神経発達, グリア, 神経変性疾患

1. 研究開始当初の背景

オリゴデンドログリア(OLD)は中枢神経

系において髄鞘形成を担う細胞であり、その変性・消失により脱髄が引き起こされる。髄鞘形成は胎児期後期からはじまり、前頭葉では最も遅く思春期から青年期早期までかかって髄鞘化が完成される (Giedd, 2004)。このように、髄鞘形成は生後の神経発達の主たる基盤である。

最近の研究では、軸索での活動電位により髄鞘化が促進すること (Zalk ad Fields, 2000)、シナプス伝達により OLD の分化が調節されること (Deng al. 2008)、OLD 前駆細胞 (OPC) はグルタミン作動性神経伝達により分化が調節されること (Magninet al. 2008) が報告された。申請者は GM1 gangliosidosis モデルマウスで軸索の発達が遅れるとともに髄鞘形成も遅れることを学会報告しているが (Mohri, in preparation)、神経からの刺激が髄鞘化を調節しているとのデータが蓄積されてきた。また、近年神経炎症による脱髄および再髄鞘化に Olig1 などの調節物質が関与すること (Arnett HA, et al. 2004)、さらには histone deacetylases (HDACs) の増減を介したエピジェネティックな機構による OLD の分化調節がなされることがわかってきた (Shen et al. 2008)。また、反対に OLD がニューロン様の電気的信号をだし、ニューロンとの間にシナプス様の伝達部位を持ち、神経興奮性を調節するということが発見され (Fields. 2008)、OLD と軸索との密接な相互作用が示されてきた。

申請者は長年遺伝性脱髄疾患クラッペ病のモデルマウスである twitcher を用いて OLD の変性、脱髄のメカニズムについて研究してきた。その過程で、脳内の主要なプロスタグランジンである PGD_2 の合成酵素であるリポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素 (L-PGDS) が、OLD に発現する蛋白質であることを発見した。髄膜に発現する

L-PGDS は睡眠誘発作用を持つとされている PGD_2 を合成すると同時に、レチノイド・甲状腺ホルモン・ビリルビン等の脂溶性低分子物質に結合/輸送するリポカリン作用を持つユニークな蛋白質である。OLD に発現する L-PGDS の生理機能は不明であったが、培養細胞を用いた実験により、L-PGDS は髄鞘化よりも後期に誘導されてくることがわかった (未発表データ)。我々は遺伝性脱髄疾患モデル twitcher や脳虚血モデルなど様々な動物モデルやヒト検体を用いて、L-PGDS は、①中枢神経系への刺激に呼応して早期に誘導されるストレス蛋白質であり、②神経の細胞体に近接する傍神経 OLD に特に発現が強いこと、③OLD のアポトーシスを抑制すること④神経保護作用を持つ蛋白質であるとことを発見した (Taniike et al. 1999, 2002, Kagitani-Shimono et al. 2006, Mohri et al., 2002, 2006, Taniguchi et al., 2007, 2007, Kanekiyo et al. 2007)。アストログリアとニューロンの相関については既に注目を集めていたが、OLD とニューロンの相関についてはこの時点で初めての報告であった。

OLD はヒストン蛋白質の脱アセチル化・メチル化などのエピジェネティックな機構を介し分化調節されている。ヒストン脱メチル化酵素 (HDAC) はアポトーシスにも関与している。一方、L-PGDS は HDAC のクロマチンとの結合を調節するレチノイド等を運搬するリポカリンと属であること、アポトーシスを抑制することから、L-PGDS が OLD のエピジェネシスに関与している可能性が高い。また、ストレス下での神経回路の可塑性における OLD の役割についてはまだほとんど知られていないが、さらにわれわれは成熟マウスを断眠させると海馬における OLD に L-PGDS の発現が増加するという preliminary なデータを得ている。

twitcher において成熟した OLD は消失して

いくが、OLD 前駆細胞がどのようにしているのか、脱髄がどのように軸索/神経障害を引き起こしてくるかのメカニズムはまだ不明であるため、OLD-ニューロン関連の観点から改めて調べる必要がある。さらに、我々はストレス反応として発現する L-PGDS が OLD-神経関連に何らかの影響を与えていると仮説をたて、これを検証するため、本研究を企画する。

2. 研究の目的

Shen 等は Cu のキレート剤である Cuprizon 投与による脱髄疾患モデルマウスにおいて再髄鞘化における OLD のエピジェネティック変化を報告している。しかしながら、cuprizon モデルは人工的なモデルであり、実際の脱髄の病理とは病態がかけ離れている。我々はヒトクラッペ病の脱髄モデルマウスである twitcher マウスを用い、脱髄/再髄鞘化における脳内オリゴデンドロサイトの脱髄過程、およびエピジェネティクスに関連する DNMT3 および HDAC の発現を免疫染色および OLD-ニューロン関連を調べた。twitcher において成熟した OLD は消失していくが、OLD 前駆細胞がどのようにしているのか、脱髄がどのように軸索/神経障害を引き起こしてくるかのメカニズムはまだ不明であるため、OLD-ニューロン関連の観点から改めて調べる必要がある。さらに、我々はストレス反応として発現する L-PGDS が OLD-神経関連に何らかの影響を与えていると仮説をたて、これを検証するため、本研究を企画した。

3. 研究の方法

日齢 5、10、20、30、35、40 の Tw およびおよびコントロールマウス脳を還流固定し、パラフィン切片を作成した。脱髄の程度は Luxor-Fast Blue 染色およびミクログリアのマーカーである F4/80 (serotec) で確認した。また、Histone Deacetylase (HDAC) および DNA (cytosine-5-)

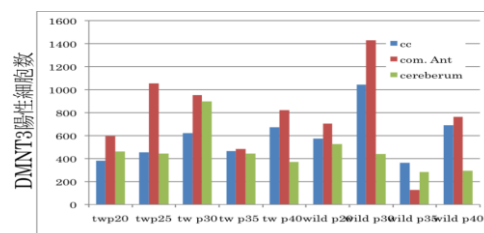
-methyltransferase (DNMT3) の発現を調べるため、免疫染色をおこない、局在を調べた。

4. 研究成果

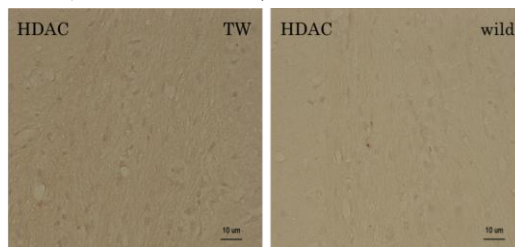
Tw マウスでどのような経過で OLD が減少するかを経時的に調べた。結果 Tw ではコントロールに比し日齢 35 以降 OLD の減少が著明に認められた。また、TUNEL 陽性の OLD は日齢 35 より Tw で著明な増加を認めた。

QuickTime[®] C[®]
© 1999 Apple Computer, Inc. All rights reserved.

DNMT3 免疫染色では Tw およびコントロール脳 で、脳梁、基底核白質、前交連、小脳白質に DNMT3 陽性細胞が散見された。が、細胞密度のカウントでは、コントロールと Tw では明かな差は認めなかった。



次に、HDAC1 の免疫染色を行った。HDAC 陽性細胞は特に脱髄が著明な日齢 40 の Tw 小脳顆粒細胞層で著明に認められた。また、形態から OLD であることが確認された。この日齢 40 は上記のデータより、OLD がアポトーシスに



陥っている時期である。さらに、このアポトーシス直前の OLD はリポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素 (L-PGDS) 陽性を活発に発現している OLD であることを我々はすでにみいだしているため、これら HDAC1 陽性細胞と

L-PGDS 細胞が同一の細胞であるかを、連続切片を用いた免疫染色で確認したところ、同一局在がしめされた。このことから、HDAC1 が関与するエピジェネティクス機構の調節にL-PGDS が関与している可能性が示された。近年、HDAC と Wnt シグナルの関連などの報告もなされているが、Wnt の発現部位と L-PGDS 発現部位は非常によくオーバーラップする (未発表データ)。このことから、Wnt と HDAC のシグナル伝達に L-PGDS が関与している可能性が示唆される。今後、L-PGDS 欠損 Tw の脳での HDAC の発現を調べ、L-PGDS の脱随抑制および神経保護作用が HDAC1 を介して起こるかどうかを検討する予定である。

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)

1. Hanaie R, Mohri I, Kagitani-Shimono K, Tachibana M, Azuma J, Matsuzaki J, Watanabe Y, Fujita N, Taniike T. Altered microstructural connectivity of the superior cerebellar peduncle affects motor functions in children with autistic spectrum disorders. *Cerebellum*. 2013 Apr 6. [Epub ahead of print]
2. Tachibana M, Kagitani-Shimono K, Mohri I, Yamamoto T, Sanefuji W, Nakamura A, Oishi M, Kimura T, Onaka T, Ozono K, Taniike M. Long-term administration of intranasal oxytocin is a safe and promising therapy for early adolescent boys with autism spectrum disorders. *J Child Adolesc Psychopharmacol*. 2013 Mar;23(2):123-7. doi: 10.1089/cap.2012.0048. Epub 2013 Mar 12.
3. Matsuzaki J, Kagitani-Shimono K, Goto T, Sanefuji W, Yamamoto T, Sakai S, Uchida H, Hirata M, Mohri I, Yorifuji S, Taniike M. Differential responses of primary auditory cortex in autistic spectrum disorder with auditory hypersensitivity. *Neuroreport*. 2012 Jan 25;23(2):113-8.
4. Iwatani Y, Kagitani-Shimono K, Tominaga K, Okinaga T, Mohri I, Kishima H, Kato A, Sanefuji W, Yamamoto T, Tatsumi A, Murata E, Taniike M, Nagai T, Ozono K. Long-term developmental outcome in patients with West syndrome after epilepsy surgery. *Brain Dev*. 2012 Oct;34(9):731-8.
5. Mohri I, Kato-Nishimura K, Kagitani-Shimono K, Kimura-Ohba S, Ozono K, Tachibana N, Taniike M. Evaluation of Oral Iron Treatment in Pediatric Restless Legs Syndrome (RLS). *Seep Medicine*. 2012 Apr;13(4):429-32.
6. Yasuda Y, Hashimoto R, Yamamori H, Ohi K, Fukumoto M, Umeda-Yano S, Mohri I, Ito A, Taniike M, Takeda M. Gene expression analysis in lymphoblasts derived from patients with autism spectrum disorder. *Molecular Autism* 2011 May 26;2(1):9.
7. Akagi M, Mohri I, Morita Y, Kagitani-Shimono K, Okinaga O, Sasai N, Ozono K, Taniike M. Clinicogenetical features of a Japanese patient with giant axonal neuropathy. *Brain and Develop*. 2012 Feb 34(2):156-62.
8. Redensek A, Rathore KI, Berard JL, Lopez-Vales R, Swayne LA, Bennett SAL, Mohri I, Taniike M, Urade Y, David S. Expression and Detrimental Role of Hematopoietic Prostaglandin D Synthase in Spinal Cord Contusion Injury. *GLIA* 2011 Apr; 59(4):603-14.

9. 自閉症剖検脳の前頭葉における造血器型
プロスタグランジンD合成酵素の発現 自
閉症の病態における神経炎症の関与. 橘
雅弥, 毛利 育子, 下野 九理子, 大藪 恵
一, 谷池 雅子. 第44回日本小児神経学
会総会 札幌

10. インフルエンザ脳症の剖検脳にみられ
る clasmatodendrosis の検討. 橘 雅弥,
毛利 育子, 下野 九理子, 大藪 恵一, 谷
池 雅子. 第43回日本小児神経学会総会
東京

11.

[雑誌論文] (計 8件)

[学会発表] (計 10件)

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

毛利 育子 (Mohri Ikuko)

大阪大学・連合小児発達学研究所・准教授
研究者番号: 70399351

(2) 研究分担者

谷池 雅子 (Taniike Masako)

大阪大学・連合小児発達学研究所・教授
研究者番号: 30263289

下野九理子 (Kagitani-Shimono Kuriko)
大阪大学・連合小児発達学研究所・講師
研究者番号: 60403185

(3) 連携研究者
()

研究者番号: