

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月28日現在

機関番号：16401
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2011～2012
課題番号：23791605
研究課題名（和文）Olig2 陽性細胞から選択的に誘導したニューロンを用いた神経再生医療の基礎的検討
研究課題名（英文）Basic research of neurons specifically induced from Olig2 positive progenitors for neural regeneration medicine
研究代表者 政平 訓貴（MASAHIRA NORITAKA） 高知大学・教育研究部医療学系・講師 研究者番号：80444769

研究成果の概要（和文）：Olig2 の機能解析を目的として、Olig2 ノックアウトマウスと野生型マウスの胎児の脊髄における遺伝子発現を DNA subtraction 法を用いて網羅的に比較した。12 の遺伝子が同定され in situ hybridization にて発現パターンを調べた。Peroxisome oxidoreductin 1 は脊髄において運動ニューロンが存在する部位に特異的に発現が認められ、運動ニューロンへの分化に関与している可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：To elucidate function of bHLH transcriptional factor Olig2, gene expression pattern of fetal spinal cords between wild type mice and Olig2 knock-out mice was investigated with DNA subtraction method. Twelve genes were identified as candidates of downstream factors of Olig2 and expression patterns of these genes were examined. Peroxisome oxidoreductin 1 was expressed specifically in the location of motoneurons, and was presumed to concern with differentiation for motoneurons.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	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：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：再生医療、Olig2、神経分化、オリゴデンドロサイト、運動ニューロン

1. 研究開始当初の背景

脳卒中は年間140万例が罹患し、いまや成人で介護が必要になる原因の第1位となっている。その治療や、後遺症による経済的、社会的損失は計り知れない。移植医療により失われた神経細胞を供給して機能回復を図ることは今後の医療にとって急務である。再生医療に関しては多くの研究活動が行われているが、主な目的は幹細胞を調整し、生着させることに主眼が置かれている。しかし、幹細胞を多く調整し、良好な生着が得られたとしても、必要とされる細胞種が産生されなければ期待する治療効果は得られない。逆に、

産生される細胞種を制御できれば、移植効率を高め、安定した効果が期待できる。特に大脳皮質の運動や言語、視覚など機能制御に関与するニューロンは外傷や血管障害における機能障害に対して最も再生が望まれる細胞である。またグリア細胞の1種であるオリゴデンドロサイトは神経細胞軸索を取り巻き、跳躍伝導を可能にする再生医療には不可欠な細胞で、再生医療では重要な位置を占める細胞種である。

神経幹細胞（NSC）は胎生期中枢神経系の脳室層に存在する細胞で、自己複製を行いながら、ニューロンやグリア細胞（アストロサイ

ト、オリゴデンドロサイト)を生み出す。NSCが自己複製能を保ちつつ、これらの細胞種を生み出すメカニズムはいまだに十分解明されていない。発生段階では神経管に接する脳室層に背腹軸に沿って特定の転写因子が発現し、発現パターンによって規定されるドメイン構造から特定のニューロンとグリアに分化することが運命付けられた前駆細胞が生じ、それらが増殖、分化して中間ニューロンや運動ニューロン、アストロサイトやオリゴデンドロサイトといった特定の細胞が生みだされる。Olig2は当初運動ニューロンとオリゴデンドロサイトへの分化制御をおこなう転写因子として同定されたが、我々はOlig2の分化制御機構の解明を目的に研究を行い、時期特異的の遺伝子組み換え酵素CreER/loxPを用いたトランスジェニックマウスによるOlig2陽性細胞の細胞系譜解析を行い、これまで考えられていた以上に多様な細胞の分化制御に関与する可能性があることを証明した。Olig2はニューロン/グリアの分化制御に関わる転写因子であり、Olig2の機能解析を進めることによって両者の発生機構を解明する大きな手がかりになると考えられる。Olig2陽性細胞は成人神経細胞にも存在しており、これらは神経損傷に反応して増殖して癒痕化に関与することが示されている。このことは、Olig2陽性細胞の分化制御機構を解明することにより、移植に頼らず患者自身のOlig2陽性細胞から必要とするニューロン/グリアを供給できる可能性を示している。

この結果を発展させて、Olig2陽性細胞における運命決定のメカニズムをさらに詳しく解析し、最終的には神経幹細胞から特定の細胞種への分化誘導法を確立し、神経移植医療の効果を高めることを目的とする。

2. 研究の目的

脳梗塞や脳出血など脳卒中は機能的損失をもたらし、その後の人生に多大な困難を伴うこととなる。神経再生を目的に神経幹細胞移植が期待されているが、現在のところ移植された幹細胞がどのような神経細胞を生み出すかは移植された環境に左右されるため安定した効果が見込めない。Olig2は神経発生においてニューロン系とグリア系の特定のクラスへの分化を決定付けるユニークな転写因子である。この性質を利用し、神経幹細胞から目的とするニューロンおよびグリアを特異的に分化誘導させて移植医療を効率的に安定して行えることを目的とする。

3. 研究の方法

Olig2自身は他の転写因子と共同することによってニューロン/グリアのスイッチ

グを行い、さらにそれぞれ特定のサブクラスへの運命決定を行う転写因子の発現に関与している。つまりニューロン系前駆細胞とグリア系前駆細胞のそれぞれで誘導された下流因子がその後のニューロン/グリアのサブクラスへ分化させる直接的な決定因子であることが予想される。我々はまずこれら下流因子の同定を行い、強制発現実験で実際に期待した細胞種への分化誘導が起ることを確認する。次に、神経幹細胞にレトロウイルスベクターを用いてそれら下流因子を導入し、特定の細胞種への分化を誘導する。得られた神経細胞を脳梗塞モデルマウスに移植し、機能回復が得られるかどうかを評価する。最終的な目標はヒトの脳卒中症例での神経機能回復を目指す。

具体的には

(1) Olig2陽性細胞の単離

我々は時期特異的の遺伝子組み換え酵素CreER/loxPを用いたトランスジェニックマウスの解析から、Olig2陽性細胞が存在するpMNドメインからまず運動ニューロン(MN)が、ついでオリゴデンドロサイト前駆細胞(OPC)、そして最終的にpMNドメインに残った細胞がアストロサイト(AS)と上衣細胞へと分化していく可能性を示唆した(Masahira et al., 2006, Furusho et al., 2006)。しかしながら、単一のOlig2陽性細胞からMNとOPCの両方が産生されるのか、それぞれが別々のOlig2陽性細胞から産生されるのかは解明できていない。pMNドメインの細胞群はMNとOPCの両方を生み出すhomogeneousな集団なのか、MN、OPCという別々の細胞をのみを生み出すheterogeneousな集団なのかという点は今後の研究を進めていく上で重要な点である。それを明らかにするためにはまず単一のOlig2陽性細胞を採取し、個々のOlig2陽性細胞からどのような細胞が生み出されるのかを調べることが必要である。具体的にはOlig2の発現が始まる胎生9.5日(E9.5)の脊髄の腹側部分の組織を集め、ホモジネートする。すでに我々が独自に作成しているOlig2抗体を用いて、セルソーターでOlig2陽性細胞のみを採取する。得られた細胞集団を限界希釈法にて、1細胞/1 wellの状態に単離する。

(2) Olig2陽性細胞の分化能の検討

次にそれら単一のOlig2陽性細胞からどのような細胞が生み出されるかを調べる。Olig2陽性細胞を培養、分化させた後、ニューロン、オリゴデンドロサイト、アストロサイトなどに特異的なマーカーで抗体染色して調べる。どのOlig2陽性細胞からも同じパターンの細胞集団が得られれば(例えばMNとOLP)、Olig2陽性細胞はhomogeneousな集団と考えられる。逆に違ったパターンの細胞集団(例えばあるものはMNのみ、別のものはOLPのみ)が得られ

れば、Olig2陽性細胞はすでに様々な分化段階にあるheterogeneousな集団ということになる。

(3) 運動ニューロン(MN)への分化誘導因子のスクリーニング

Olig2陽性細胞が存在するpMNドメインからは、まずニューロンであるMNが産生され、MN産生が終了してからグリア細胞であるOPCの産生が始まるという時間的連続性がある。MN産生には神経細胞への分化因子であるNgn2の発現が神経細胞系への分化のスイッチに不可欠であることがわかっているが、その後、どのようなカスケードでMNへの分化が行われるのかは十分わかっていない。選択的にMNへの分化を促進するにはOlig2とNgn2により誘導される下流因子の同定が不可欠である。そこで、MNを産生する前のOlig2陽性細胞とMNを産生している時期のOlig2陽性細胞を前項で述べたようにセルソーターで採取し、それぞれの遺伝子発現プロファイルをDNA microtipで比較したり、subtraction法を用いることによって、MNへの分化に働く因子をスクリーニングする。

(4) オリゴデンドロサイト前駆細胞(OLP)への分化誘導因子のスクリーニング

OPC産生に関しても同様な手法で、MN産生前のOlig2陽性細胞と、OPC産生中の時期のOlig2陽性細胞をセルソーターで採取し、DNA microtipによるそれぞれの遺伝子発現の比較や、subtraction法による遺伝子発現の差などからOPCへの分化に関わる因子をスクリーニングする。

(5) 候補遺伝子の絞り込み

スクリーニングされた遺伝子をデータベースで検索し、分化誘導に関係する遺伝子を絞り込む。

4. 研究成果

オリゴデンドロサイトは中枢神経系において、ミエリンを形成し、跳躍伝導を可能にする細胞である。オリゴデンドロサイトは、マウスの脊髄では、E12.5頃に脳室壁層腹側の限局した部分より発生して実質全体に広がる。この部分からはE9からE11頃にかけて運動ニューロンが発生することからpMN-OLドメインと呼ばれ、オリゴデンドロサイトと運動ニューロンに共通の前駆細胞の存在が示唆されている。また前脳ではE12.5に主に前脳腹側にあるganglionic eminenceから生じ、tangential migrationにより、全体へ広がっていく。

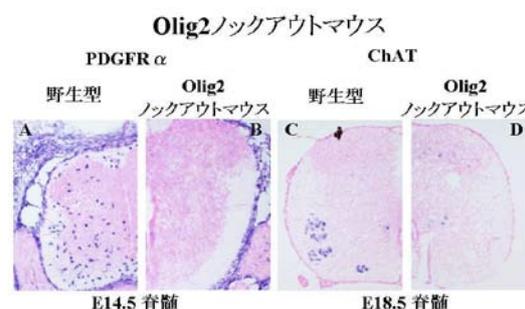
近年、pMN-OLドメインに発現している転写因子としてOlig1, Olig2が発見され、運動ニューロンとオリゴデンドロサイトの発生に関与すると考えられた。

実際Olig2ノックアウトマウスでは脊髄に

においてオリゴデンドロサイト前駆細胞と運動ニューロンが完全に消失し(図1)、前脳でもほとんどのオリゴデンドロサイト前駆細胞がなくなったため、Olig2がオリゴデンドロサイトと運動ニューロンの両方の発生に必須の転写因子であることがわかった。

Olig2は基板から分泌される腹側化因子であるソニックヘッジホッグにより誘導されることが分かっているが、Olig2の下流でどのような遺伝子が調節をうけているのかはよくわかっていない。

そこで我々はOlig2ノックアウトマウスと、野生型マウスの前脳および脊髄で発現している遺伝子の比較を行うことにより、Olig2により発現調節をうけている遺伝子を同定できると考えた。



(図1) A, B: 野生型では脊髄全体にオリゴデンドロサイト前駆細胞のマーカであるPDGFR α 陽性細胞が認められるが(A)、Olig2ノックアウトマウスではそれらが消失している(B)。C, D: 野生型では運動ニューロンのマーカであるChAT陽性細胞が脊髄全角に認められるが(C)、Olig2ノックアウトマウスでは陽性細胞がみられない(D)。

Olig2ノックアウトマウスではオリゴデンドロサイトと運動ニューロンの発生が著しく阻害されるので、Olig2で発現している遺伝子と、野生型で発現している遺伝子を比較することにより、Olig2の下流で働き、両者の分化に関わる遺伝子を同定すると予想される。そこで本研究では遺伝子の発現の比較をするために、Clontech PCR-Select cDNA Subtraction法を用いた。この方法では同一組織を比較して、一方でのみ特異的に発現しているmRNAを、発現量に関係なく、一定量のcDNAとして検出できる特徴がある。また得られたcDNAに関してはサブクローニングが可能であるので、それをもとにRNAプローブを作成し、in situ hybridizationを行い、実際にどのような発現パターンを示すのかを解析できる利点がある。

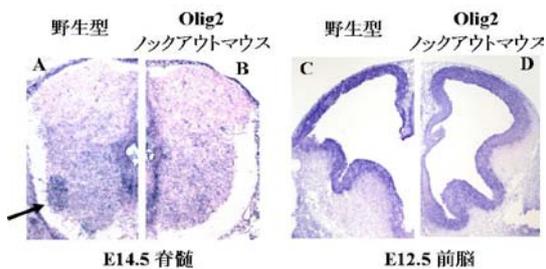
我々はE13.5のOlig2KOマウスと野生型マウスのwhole headと脊椎でそれぞれSubtractionを行い図2に示す12個の遺伝子を同定した。

sample	size	Homology search
1	600-700	Mus musculus Prkcl1, Atp1
2	600-700	Mus musculus Prdx1, MSP23, OSF3
3	600	Mus musculus gas5 (growth arrest specific gene)
12	322	Mus musculus Sox21
16	500	Mus musculus Nedd4, Ndfip1 (Nedd4 family interacting prot
18	800-2000	Mus musculus MARCKS-like protein (Mlp)
25	300	Mus musculus tripartite motif protein2 (Trim2)
34	504	Mus musculus SH3-binding domain glutamic acid-rich prot
40	222	Mus musculus neuron specific gene family member2 (Msg2)
43	509	Mus musculus sialyltransferase1 (Siat1)
61	600-700	Mus musculus heparan sulfate 6-O-sulfotransferase1 (Hs6s
64	557	Mus musculus Traf2 binding protein (T2bp-pending)

(図2) subtraction法で得られたOlig2下流候補因子

そして、得られた遺伝子について in situ hybridization を行い、発現パターンを比較した。

その1つの例として Peroxiredoxin 1 の発現パターンを示す(図3)。Peroxiredoxin 1 は antioxidant enzyme の一種であり Peroxiredoxin1 は野生型の脊髄では運動ニューロンが存在する部分に強く発現しており、Olig2 ノックアウトマウスではそれが認められないことから、運動ニューロンに関与する遺伝子であることが考えられた。



(図3) 候補遺伝子 Prdx-1 の in situ hybridization。脊髄においては脊髄前角に陽性細胞が認められ、運動ニューロンに発現している可能性が示唆された(A 矢印)。しかし前脳では染色パターンに差は認められなかった。

しかしながら、脳の部分で比較すると、厳密にみると、野生型とOlig2 ノックアウトマウスでは、染色の濃度の差があるものの、発現パターンに関しては明らかな差は認められなかった。また、他の遺伝子に関しても発現パターンを比較したが、Olig2に関連したと思われるような差は認められなかった。

この原因として考えられることは、Olig2の発現領域は狭い部分に限局しているため、その影響を受ける因子があっても、totalのRNA量に比べて微量で検出できない可能性が考えられる。また遺伝子は様々な働きを持つため、Olig2により影響を受ける因子が他の部分で発現していて、subtractionで差が得られない可能性などが考えられた。そのため、厳密なsubtractionのためには、Olig2陽性

細胞から派生した細胞が、どこに分布するかを同定する必要があり、その前段階としてOlig2陽性細胞から派生する細胞をラベルするシステムが必要と考えられた。

今後の研究の促進方策としては胎生9.5日の脊髄腹側部分の組織を集め、ホモジネートしOlig2抗体を用いて、セルソーターでOlig2陽性細胞のみを採取する。得られたら細胞を限界希釈法にて、1細胞/1wellの状態に単離して単一のOlig2陽性細胞からどのような細胞が生まれるかをニューロン、オリゴデンドロサイト、アストロサイトなどに特異的なマーカーで抗体染色して、単一の細胞集団へ分化するのか、ヘテロな集団として分化するのかを調べる。次の段階として、Olig2陽性細胞から運動ニューロンへと分化させる因子を同定するため様々な胎生期のOlig2陽性細胞を同様の手法で採取しそれぞれの遺伝子発現プロファイルをDNA microtipで比較したり、subtraction法を用いることによって、MNへの分化に働く因子をスクリーニングする。最終的には得られた候補の分化因子を強制発現サイトに導入したレトロウイルスベクターをOlig2陽性細胞に感染させて分化させる。細胞マーカーで免疫染色を行い、予想される細胞種への特異的分化が得られるかどうかを評価する予定である。

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)

[学会発表] (計7件)

- ① 政平訓貴、藤本康倫、中城登仁、中居永一、川西裕、野中大伸、竹村光広、清水恵司
高知大学医学部 脳神経外科
CEAにおける局所止血剤Arista AHの有用性
第38回日本脳卒中学会総会、2013/3/21-23、東京
- ② 政平訓貴、藤本康倫、中城登仁、中居永一、川西裕、野中大伸、竹村光広、清水恵司：
吸収性局所止血剤AristaAHの使用経験
第74回日本脳神経外科学会支部会、2012/12/1、岡山
- ③ 政平訓貴、藤本康倫、野中大伸、竹村光弘、中城登仁、清水恵司：
後大脳動脈閉塞部に生じた感染性動脈瘤に対してコイル塞栓を施した1例。
第28回NPO法人日本脳神経血管内治療学会学術総会、2012/11/15-17、宮城
- ④ 政平訓貴、小宮山雅樹、川西裕、竹村光広、藤本康倫、中城登仁、清水恵司：
椎骨脳底動脈系の多発性脳動脈からく

も膜下出血を繰り返した若年女性の1例
第21回中国四国血管内治療研究会抄録,
2012/9/1, 香川

- ⑤ 政平訓貴, 川西裕, 中林博道, 清水恵司:
閉塞性水頭症で発症した脳幹背側部転
移性腫瘍の一例.

第71回(社)日本脳神経外科学会中国四
国支部学術集会, 2011/4/2-3, 島根.

- ⑥ 政平訓貴, 中居永一, 井川直樹, 川西裕,
野中大伸, 清水恵司:
当院における高齢者良性脳腫瘍の治療
成績.

第24回日本老年脳神経外科学会,
2011/3/18, 愛知. (シンポジウム)

- ⑦ 政平訓貴, 中居永一, 川西裕, 田村雅一,
清水恵司:
ニューロナビゲーションガイド下生検
用ニードルの開発.

第50回日本定位・機能神経外科学会,
2011/1/21-22, 広島. (シンポジウム)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

政平 訓貴 (MASAHIRA NORITAKA)
高知大学・教育研究部医療学系・講師
研究者番号: 80444769