

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430077

研究課題名(和文) 質量顕微鏡によるオリゴデンドロサイト分化マーカーの可視化

研究課題名(英文) Visualisation of the marker for oligodendrocytes by imaging mass spectrometry

研究代表者

和田 幸恵(平原幸恵)(WADA-HIRAHARA, Yukie)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：70457969

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：スルファチドは、オリゴデンドロサイトの分化に関わるスフィンゴ糖脂質であるが、含まれる脂肪酸の種類が様々なので、分化過程において分子種を特定する必要があった。また、OLのマーカーとして確立されたO4抗体の抗原は、スルファチドと考えられてきたが、その合成が生化学的手法により確認できない幼若期のOLでも、O4陽性となることから、この時期のO4認識抗原は未同定のままであった。それらを解決するために、質量分析および質量顕微鏡にて分子種を同定した結果、幼若期のOLはC16やC18の脂肪酸を含むスルファチドを含有し、成熟・ミエリン形成過程においてC22やC24の脂肪酸を使うようになることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Sulfatide species comprise the major glycosphingolipid components of myelin. Although various sulfatides contain different fatty acids, it is unclear how these sulfatides affect myelination. The O4 antibody reaction with sulfatide has been widely used as a useful marker for oligodendrocytes/myelin. However, sulfatide synthesis during the pro-oligodendroblast stage has not been examined. Here, we identified a sulfatides from the pro-oligodendroblast to myelination stage by imaging mass spectrometry. The results demonstrated short-chain sulfatides with 16 carbon fatty acids (C16) and C18 existed in the area, where pro-oligodendroblasts initially appear. C22 sulfatide became predominant later in oligodendrocyte development and the longer C24 sulfatide was predominant in the adult brain. These findings indicated that O4 recognized sulfatides with short chain fatty acids in pro-oligodendroblasts and individual sulfatide species may have unique roles in oligodendrogenesis and myelination.

研究分野：神経化学

キーワード：スルファチド プロオリゴデンドロblast 質量顕微鏡 ミエリン 脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

(1)【O4 発見と OL マーカー】 1981 年、Schachner らは、ウシ脳梁由来の白質を免疫したマウス由来脾臓とマウスミエロームとの融合により、オリゴデンドロサイト (OL) 細胞特異的抗体 O シリーズ (O1, O2, O3, O4) を報告した。抗体特異性解析にて、O4 抗体は、OL 細胞へ運命決定された、移動性はなく、分裂能をもつプロオリゴデンドロプラストを認識する抗体として報告された。また、プロオリゴデンドロプラストは O4+/O1- を示し、OL 成熟後期には O4+/O1+ を示すことが明らかとなり、O1、O4 抗体共に、OL の研究に良く使われるマーカーとなった。Pfeiffer らは、OL 成熟後期では、O4 抗体認識抗原はスルファチドであるが、さらに未熟なプロオリゴデンドロプラストでは、生化学的解析によりスルファチドが検出されなかったことから、実態不明のまま pro-oligodendroblast antigen (POA) と名付けた。

(2)【質量顕微鏡と O4 抗原 POA の同定】スルファチドは、セレブロシド硫酸転移酵素 (CST) により合成される。以前に作製した CST 欠損マウス脳は、スルファチドを完全に欠損すると共に、ランビエ絞輪近傍のミエリン形成異常を示し、さらに脳全領域で O4 抗原性の消失が認められた。CST が O4 抗原の合成に関わっていることが明らかになり、プロオリゴデンドロプラスト POA がスルファチドである可能性が示唆された。この疑問を明らかにするため、POA の発生母地であるニワトリ胚 E8、神経管腹側に焦点をあて、顕微鏡による形態観察と質量分析による構造解析を一体化した質量顕微鏡を使い解析した。質量分析イメージング画像解析における結果、ニワトリ胚ステージ 32 の脊髄腹側部にスルファチドのピークが確認され、C16 スルファチドと C18 スルファチドの脂肪酸の短いスルファチドを示した。時期、場所共

に POA 発現領域で、スルファチドが存在する可能性が考えられた。

2. 研究の目的

OL 分化過程は、細胞表面に様々な脂質マーカーを発現する。OL 分化マーカー O4 抗体は、スルファチドを認識するのは明らかではあるが、その実態は未だ不明な部分が残されている。本研究は、発生過程における OL 分化臨界ポイントである O4 陽性領域に着目し、脂質検出を得意とする質量顕微鏡を用いて、スルファチドの局在を明らかにする。また、スルファチドは、様々な長さの脂肪酸をもつスフィンゴ脂質であるが、それらのスルファチドバリエーション (スルファチド類) が、どのように発現し、OL 成熟・ミエリン形成に関与しているのかを解析する。さらに、生体内での糖脂質各種の分布を詳細に解析するために、有効なツールである質量顕微鏡を駆使し、質量顕微鏡の発生学への応用を試みる。

3. 研究の方法

(1) 【OL 系譜マーカー O4 抗原決定方法】

スルファチド類標品の質量分析をおこない、得られる値の信頼性を評価した。さらに、スルファチド類を欠損している CST-null マウスを用い、それらの数値が正確なものかを検証した。また、質量顕微鏡 (iMScope-prototype, Shimadzu) での組織上でのシグナルをより良い条件でとらえるため、マトリックス 9-Aminoacridine (9AA) 等の噴霧・蒸着条件等を決定した。

ラット脳由来 OL 前駆体細胞の培養系を使い、各分化ステージ OL を回収した。それらの細胞はさらに、ステージ特異的抗体で分画した FACS ソーティング (BD FACS Aria III, BD Biosciences) によりさらに精製し、引き続き、質量分析を行った。

OL 前駆体の発生母地が確定しているステージ 32 ニワトリ胚の脊髄に焦点をあて、質量顕微鏡でターゲットスルファチド類の動

態が捉えられるかを検討した。

(2) 【OL系譜脂質マーカーを使ったOL発生・分化過程・ミエリン形成後の追跡】

胎生期マウスの脊髄～脳の組織を質量顕微鏡分析にかけ、ターゲットスルファチド分子の挙動をとらえる。さらに成獣マウス脳における各スルファチド類の局在を、高空間分解能をもつ Time-of-flight secondary ion mass spectrometry: SIMS (PHI nan TOF II, ULVAC-PHI) にて解析した。

4. 研究成果

(1) 【成獣マウスにおけるスルファチド類質量顕微鏡測定値とその局在】

成獣マウス脳に対して、質量顕微鏡を用いスルファチド類の測定を試みた結果、標準品と一致する測定値に8種類のスルファチド類マススペクトルが検出された(参考図1)。これらのピークは、スルファチド類を欠失している CST-null において完全に消失してい

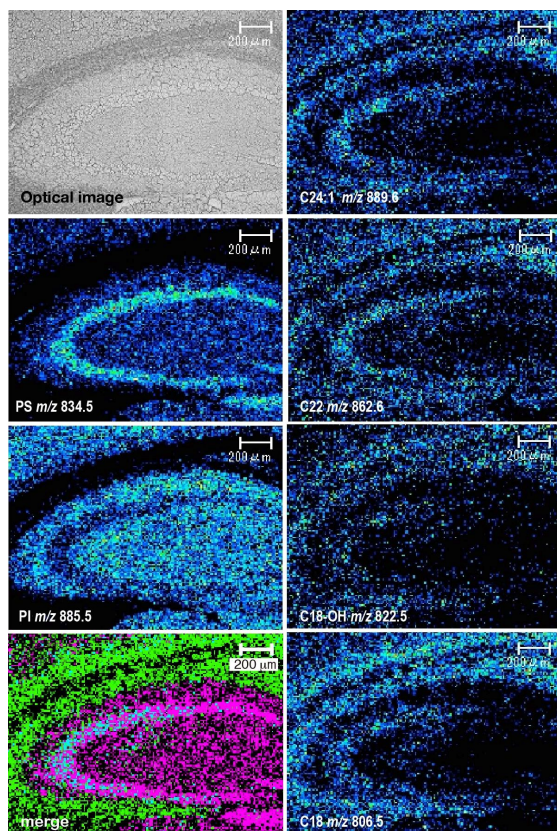


図1 マウス成獣脳におけるスルファチド類の質量顕微鏡イメージ像。髄鞘に豊富に存在していることがわかる。マージ像: C24:1 スルファチド(緑)、PI; Phosphatidylinositol (マゼンタ)、重なり(水色)

る。一方でホスファチジルセリン (PS) やホスファチジルイノシトール (PI) スペクトルには変化はなかった。従って、質量顕微鏡で検出するスルファチド類マススペクトルは、信頼性の高いものであると結論付けた。

(2) 【未熟 OL ステージにおけるスルファチド類の存在】

ステージ特異的抗体 O4 (または、同等の反応性をもつ抗スルファチド抗体 DI8) と O1 によるプロオリゴデンドロプラストステージの FACS ソーティング分画に対する質量分析の結果、プロオリゴデンドロプラストステージに脂肪酸の短い C18 スルファチド (m/z 806.5) と C18-OH スルファチド (m/z 822.5) が検出された。プロオリゴデンドロプラストステージの O4 抗原はスルファチドであると示唆された。

(3) 【ニワトリ胚 OL 前駆体発生母地におけるスルファチド類の局在】

ニワトリ胚ステージ 3 2 日目の脊髄組織切片の質量顕微鏡マスマイミゼイジング像は、PI (m/z 885.5) は組織全体に分布している一方で、ニワトリ胚脊髄腹側部に C16 スルファチド (m/z 778.5)、C18 スルファチド (m/z 806.5)、C18-OH スルファチド (m/z 822.5) の局在を示した(図2)。また、それらの局在パターンは、OL 前駆体マーカー Olig2 の組織免疫染色像と一致していた。

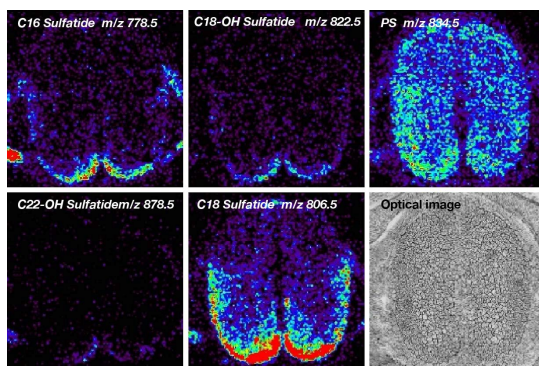


図2 ニワトリ胚、脊髄、プロオリゴデンドロプラスト発生母地のスルファチド類質量顕微鏡像。脊髄背側部に C16、C18 スルファチドの局在が確認できる。PS; Phosphatidylserine

(4) 【マウス胚におけるスルファチド類をマーカーとしたOLの可視化】

マウス胚 OL 発生過程を、スルファチド類をターゲットとした質量顕微鏡解析で追跡した。その結果、胎生 15 日で脊髄頸部正中線に沿って、C16 スルファチド (m/z 778.5)、C18 スルファチド (m/z 806.5)、C18-OH スルファチド (m/z 822.5)、C22-OH スルファチド (m/z 878.6) が検出された。また、延髄尾側部正中と橋腹側部でも C18-OH スルファチドが検出された。さらに胎生 18 日では、C18 スルファチドと C18-OH スルファチドが延髄中央部正中 (図 3)、橋尾側正中から外側へ広がる様子が検出された。しかし、同時期中の脳吻側部には何れのスルファチド類も検出されなかった。胎生 19 日の脊髄腹側では、C18-OH スルファチドと C22-OH スルファチドが検出された。しかし、成獣ミエ

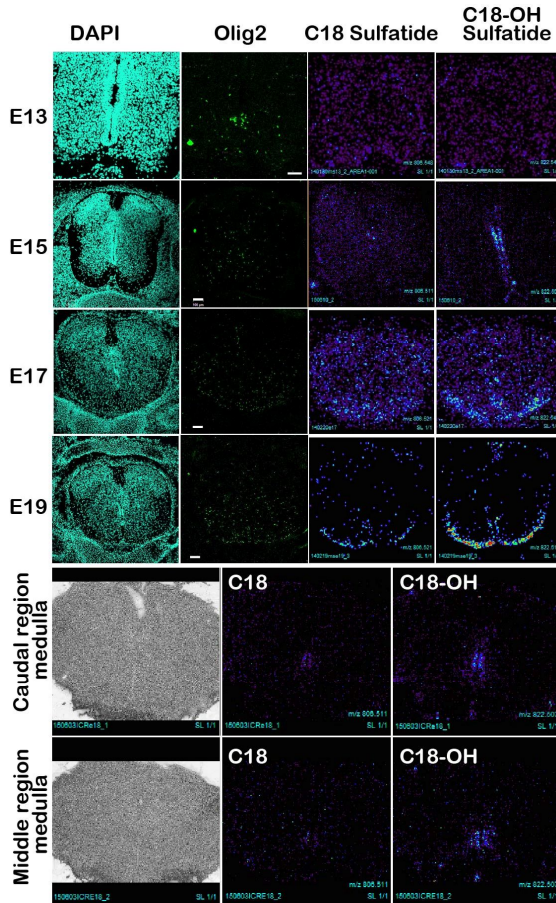


図 3 胎生期マウス脊髄におけるスルファチドの発現と OL 前駆体マーカー Olig2 の局在。胎生 15 日以降の発現パターンは一致する。胎生期 18 日マウス延髄では、C18 スルファチド類は、腹側正中に発現している。

リンで含有量の多い脂肪酸の長い C24:1 スルファチドは、いずれの領域でも検出されなかった。スルファチド類をターゲットとした OL 追跡が可能であることが確認された。

(5) 【高空間分解能をもつ質量顕微鏡を用いた成獣におけるスルファチド類の局在】

ターゲットとしたスルファチドは、胎生期 OL 前駆体細胞で産生されていた C18 スルファチド、C18-OH スルファチド、成熟過程に検出された C22 スルファチド、成獣マウスミエリン鞘で優位であった C24 スルファチドである。脳梁近傍領域では、コレステロールシグナルが髄鞘部に、ペプチド断片から得られた CNO イオンシグナルが、細胞体に捉えられた。一方で、スルファチド類は、コレステロールが検出された髄鞘がコンパクトに束ねられた領域ではなく、皮質から脳梁へむかう帯状束領域のやや髄鞘の粗になる部分に検出され、ドット状の局在を示し、それぞれは共存しなかった。個々のスルファチドバリエーションは、クラスターを形成し、それぞれ違う固有領域を支配していることを示唆する結果を得た。

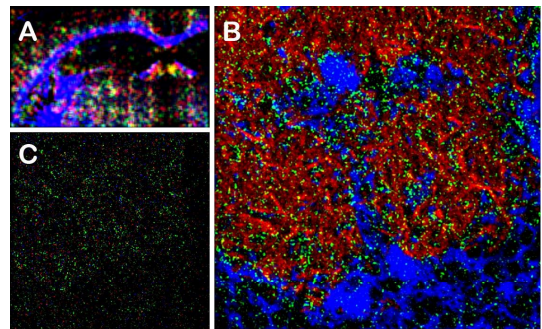


図 4 SIMS 解析画像。A, 5 mm X 3 mm ステージマップオーバーレイ。C18 スルファチド m/z 807 (赤)、C24:1 スルファチド m/z 889 (緑)、コレステロール m/z 385 (青)。B, 高解像度イメージ。コレステロール m/z 385 (赤)、スルファチド類: C24:1 (m/z 889)、C22 (m/z 863)、C18-OH (m/z 823)、C18 (m/z 807) (緑)、CNO イオン: 細胞体 (青)。C, スルファチド類のオーバーレイ。 m/z 807 (赤)、 m/z 889 (緑)、 m/z 823 (青)。

O4 モノクローナル抗体は、三十数年の歴史をもち、胎生期 OL 前駆体細胞から生後の髄鞘形成に至るまでの OL 分化・成熟過程を

認識する分化マーカーとして、現在も世界中で使われている。このような主要なマーカーの抗原の実態を明らかにしたことは、グリアの研究分野に大きく貢献し、その業績は、EDITORIAL HIGH LIGHT として Journal of Neurochem. に掲載された。さらに、胎生期から成獣のミエリン構築まで含有量の豊富なスルファチド類の各分化ステージにおける生理機能を解明することは、脱髄疾患等の効率的な OL 成熟・ミエリン形成促進誘導の研究を大きく発展させることとなるだろう。

<引用文献>

Sommer, I. and Schachner, M. (1981) Monoclonal antibodies (O1 to O4) to oligodendrocyte cell surfaces: an immunocytological study in the central nervous system. *Dev Biol*, **83**, 311-327.

Bansal, R., Warrington, A. E., Gard, A. L., Ranscht, B. and Pfeiffer, S. E. (1989) Multiple and novel specificities of monoclonal antibodies O1, O4, and R-mAb used in the analysis of oligodendrocyte development. *J Neurosci Res*, **24**, 548-557.

Bansal, R., Stefansson, K. and Pfeiffer, S. E. (1992) Prooligodendroblast antigen (POA), a developmental antigen expressed by A007/O4-positive oligodendrocyte progenitors prior to the appearance of sulfatide and galactocerebroside. *J Neurochem*, **58**, 2221-2229.

Honke, K., Hirahara, Y., Dupree, J. et al. (2002) Paranodal junction formation and spermatogenesis require sulfoglycolipids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 4227-4232.

Hirahara, Y., Bansal, R., Honke, K., Ikenaka, K. and Wada, Y. (2004) Sulfatide is a negative regulator of oligodendrocyte differentiation: development in sulfatide-null mice. *Glia*, **45**, 269-277.

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2件)

Hirahara Y, Wakabayashi T, Mori T, Koike T, Yao I, Tsuda M, Honke K, Gotoh H, Ono K, Yamada H. Sulfatide species with various fatty acid chains in oligodendrocytes at different developmental stages determined by imaging mass spectrometry. 【EDITORIAL HIGHLIGHT 対象論文】 *J Neurochem*, 140(3): 435-450, 2017, doi: 10.1111/jnc.13897 査読有

Koike T, Wakabayashi T, Mori T, Hirahara Y, Yamada H. Sox2 promotes survival of satellite glial cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 464(1): 269-274, 2015, doi: 10.1016/j.bbrc.2015.06.141 査読有

[学会発表](計7件)

平原幸恵、小池太郎、高森康晴、山田久夫: TOF-SIMS 法を用いたマウス成獣脳におけるスルファチドバリエーションの局在解析、第57回日本組織細胞化学会総会・学術集会、2016年9月3日、杏林大学・井の頭キャンパス (三鷹)

Hirahara Y, Wakabayashi T, Gotoh H, Mori T, Koike T, Ono K, Yamada H: A role for estrogen receptors in morphological changes in oligodendrocyte maturation. 第39回日本神経科学大会 (Neuroscience2016)、2016年7月20日、パシフィコ横浜 (横浜)

平原幸恵: モノクローナル抗体 O4 のエ
ピトープに迫る、第 56 回日本組織細胞化
学会総会・学術集会、2015 年 10 月 3 日、
関西医科大学・枚方キャンパス (枚方)

平原幸恵, 若林毅俊, 森徹自, 矢尾育子,
津田雅之, 本家孝一, 小池太郎, 後藤仁志,
小野勝彦, 山田久夫: 質量分析イメージ
ング法を用いたオリゴデンドロサイト分過
程の可視化、第 40 回日本医用マスペク
トル学会年会、2015 年 9 月 18 日、アク
トシティ浜松 (浜松)

Hirahara Y, Wakabayashi T, Konke K, Mori T,
Koike T, Takamori Y, Ono K: Role of
pro-oligodendroblast antigen in
oligodendrocyte differentiation. 第 120 回日
本解剖学会総会・全国学術集会、第 92 回
日本生理学会大会 合同大会、2015 年 3
月 23 日、神戸国際会議場・展示場 (神
戸)

平原幸恵, 若林毅俊、小池太郎、高森康
晴、矢尾育子、後藤仁志、小野勝彦、山田
久夫: オリゴデンドロサイト発生初期にお
けるスルファチド脂肪酸の変化、第 55 回
日本組織細胞化学会総会・学術集会、
2014 年 9 月 27 日、松本市中央公民館 (松
本)

Hirahara Y, Wakabayashi T, Mori T, Koike T,
Takamori Y, Yao I, Gotoh H, Honke K, Ono
K, Yamada H: The sulfatide with short chain
fatty acids is dominant in the
oligodendrogenesis region of the embryonic
spinal cord. 第 37 回日本神経科学大会
(Neuroscience2014) 2014 年 9 月 12 日、
パシフィコ横浜 (横浜)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 幸恵 (平原幸恵) (WADA Yukie
(HIRAHARA Yukie))
関西医科大学・医学部・講師
研究者番号: 70457969

(2) 研究協力者

矢尾 育子 (YAO Ikuko)
浜松医科大学・メディカルフォトンクス研
究センター 光イメージング研究室・准教授
研究者番号: 60399681

(3) 研究協力者

本家 孝一 (HONKE Koichi)
高知大学・医学部・教授
研究者番号: 80190263

(4) 研究協力者

小野 勝彦 (ONO Katsuhiko)
京都府立医科大学・医学部・教授
研究者番号: 30152523

(5) 研究協力者

山田 久夫 (YAMADA Hisao)
関西医科大学・医学部・教授
研究者番号: 00142373