

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860851

研究課題名(和文)脳室周囲白質軟化症における稀突起膠細胞の成熟抑制の機構解明と細胞移植療法への応用

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of arrested oligodendrocyte lineage progression in PVL model brain and application to cell transplantation

研究代表者

三角 吉代 (Misumi, Sachiyo)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70529148

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：稀突起膠細胞(OLGs)が傷害されている脳室周囲白質軟化症(PVL)への細胞療法に取り組むために、PVLモデルラット脳を用いて神経細胞傷害の解析と遺伝子発現変化の解析を行った。PVL脳では大脳皮質の興奮性・抑制性ニューロン数の減少は見られず、PVLモデルラットの運動障害がおもに髄鞘傷害により起こっていることが示された。また、網羅的遺伝子解析によりPVL脳の遺伝子発現変化を検討したところ、炎症反応や細胞死抑制などに関与する因子が変化していた。これらのことよりPVLラットがOLGs移植に適したモデルであること、遺伝子変化がニューロンの生存、OLGs細胞死や分化抑制に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：As selective loss of oligodendrocyte progenitor cells (OPCs) is reported in the Periventricular leukomalacia (PVL), OPC transplantation seems to be a hopeful treatment. To challenge OPC transplantation to PVL, we first checked neuronal damage and gene expression change in PVL model rat brain. After injury excitatory and inhibitory neuronal loss was not detected in ipsilateral cortex, suggesting that motor deficit in PVL was mainly caused by myelin disturbance but not neuronal loss in our model rat. Gene expression analysis revealed that genes involved in the biological processes such as inflammatory response and negative apoptosis regulators changed in the ipsilateral cortex. These data suggest that as oligo lineage cells are mainly damaged, our PVL model might be useful for cell-based therapy, and that many genes may be responsible for neuronal survival, myelin loss and differentiation in the PVL model brain.

研究分野：神経科学

キーワード：発達期白質傷害 オリゴデンドロサイト 低酸素虚血

1. 研究開始当初の背景

(1) 早産児における脳性麻痺の原因となる脳室周囲白質軟化症(PVL)において、細胞補充療法の可能性が示されている。PVLでは、脳内で髄鞘を形成する稀突起膠細胞(OLGs)が低酸素虚血により傷害され脱落する。そのため生涯にわたり続く運動・認知機能障害等を引き起こす。PVLにおける細胞補充療法では、脱落した OLGs を補うために幹細胞(iPS/ES など)由来の OLGs がドナー候補としてあげられる。幹細胞から分化させた OLGs を脳内に移植することで 障害された機能の回復が期待できる。これまでに私たちは、移植時の安全性が高い無血清培養条件下で iPS 細胞から OLGs を効率よく分化誘導する方法を確立し報告した。また、これらの細胞が PVL モデル動物脳内で生存可能であることを確認した。

(2) PVL の脳内では低酸素虚血により OLGs が脱落するが、生き残った OLGs もその後の成熟が抑制されることが報告されている。つまり、低酸素虚血後の PVL 脳内では OLGs が髄鞘形成細胞へと成熟するのを阻害する機構が働いていることが考えられる。このことは細胞補充療法において移植した細胞(OLGs)の髄鞘化を妨げる原因として大きな問題点となる。分化抑制メカニズムを解析することで移植 OLGs の分化促進につながることを示唆される。

(3) PVL の病態解析、細胞移植検討には適切なモデル動物が必要である。これまでに低酸素虚血等の負荷の程度により様々な障害パターンを示すモデル動物が報告されている。私たちは以前に後肢に軽微な障害を示し、髄鞘化が阻害された PVL モデルラットを報告した。これらの病態において、OLGs のみでなく神経細胞の傷害も関与しているのかを検討する必要性があげられる。

2. 研究の目的

(1) PVL モデルラットの脳内で、低酸素虚血による神経細胞死が誘導されているのかを評価し、運動機能障害において神経細胞の傷害が関与しているのかについて検討する。

(2) 低酸素虚血後の脳内では OLGs の成熟を抑制する機構が働いていると考えられる。よって、PVL 脳内で OLG の成熟/髄鞘化を阻害する因子を網羅的遺伝子解析により同定し作用メカニズムの解析を行う。得られた結果を効率的な細胞療法の確立へつなげることを目指す。

3. 研究の方法

(1) モデル動物作成

生後3日齢ラットの右総頸動脈を焼灼後、6%低酸素に1時間暴露した。

(2) 細胞死の評価

低酸素虚血 24 時間後、アポトーシスマーカー(active-caspase3 抗体)および各細胞種マーカー抗体(GFAP, NeuN, Olig2)による 2 重免疫染色を行い、細胞死の評価を行った。

(3) 神経細胞および髄鞘傷害の評価

皮質投射ニューロンマーカー抗体(SATB11, Ctip2)、抑制ニューロンマーカー抗体(パルプアルブミン、ソマトスタチン、カルレチニン)を用いて PVL モデルラット脳で免疫染色を行った。運動・感覚野の一定面積内の細胞数を計測し、健常側と比較した。成熟 OLGs 数を検討は PAC 抗体を用いた免疫染色により行った。また、MBP 抗体を用いて大脳皮質の髄鞘を免疫染色し、シグナル強度を ImageJ ソフトウェアにより定量化した。

(4) 皮質脊髄路傷害の評価

PVL モデル動物(20 日齢)の脊髄を露出し、逆行性トレーサのフルオロゴールドを注入した(頸髄3-4)。6日後、大脳皮質のフルオロゴールド陽性細胞数を計測した。

(5) Argyrophil-III 染色

低酸素虚血 24 時間~6 日後、脳を脱血灌流固定し、初期の傷害ニューロン染色である Argyrophil-III 染色を行った。

(6) 網羅的遺伝子解析

PVL モデルラット(5 日齢)の白質・大脳皮質(運動・感覚野)を含む領域から RNA を抽出し、網羅的遺伝子解析により低酸素虚血で発現変化している遺伝子を評価した。

4. 研究成果

(1) 細胞死評価

低酸素虚血による細胞死をみるために、PVL ラットの白質と大脳皮質において Active-caspase3 抗体を用いた 2 重免疫染色を行った。Olig2 陽性細胞と GFAP 陽性細胞では active-caspase3 の染色が見られた。一方、NeuN 陽性細胞と active-caspase3 の共染は見られなかった(図 1)。このことから、低酸素虚血により OLGs とアストロサイトでは細胞死が起きているが、ニューロンでは起きないことが示唆された。

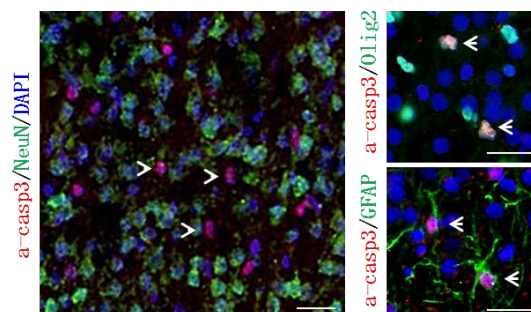


図1 Active-caspase3免疫染色

(2) Argyrophil-III 染色

PVL ラット脳内において Argyrophil-III 染色により初期の傷害ニューロンを検出した。その結果、低酸素虚血後 24 時間では明らかな陽性細胞は検出できなかった。また、傷害後 2, 3, 6 日の各時間で染色を行ったが、いずれも陽性細胞は認められず、PVL ラット脳内では低酸素虚血による明らかなニューロン傷害は起きていないことが分かった。

(3) 神経細胞数評価

低酸素虚血により、ニューロン数の減少が見られるのかについて免疫染色法により評価した。大脳皮質投射ニューロンのマーカーである SATB1 抗体と 5-6 層ニューロンのマーカーである Ctip2 抗体で染色したところ、傷害側と健常側の脳皮質（運動・感覚野）において細胞数の違いは見られなかった。また、パルプアルブミン、ソマトスタチン、カルレチニン各抗体を用いて抑制性ニューロン数を評価した。その結果、傷害側においていずれの陽性細胞数にも減少は認められなかった(図 2)。

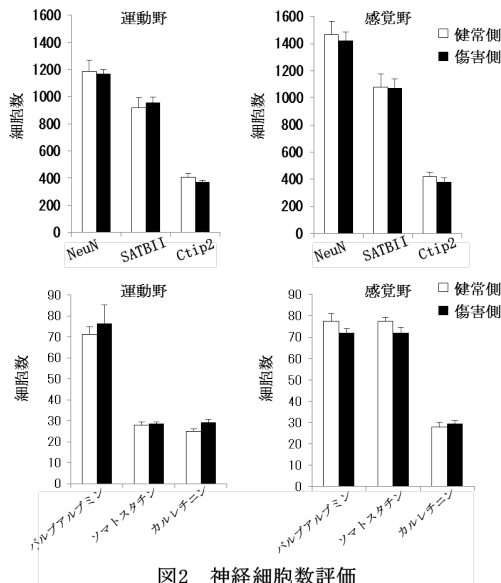


図2 神経細胞数評価

さらに、逆行性トレーサーであるフルオロゴールドを頸髄に注入し後肢運動に関係する皮質脊髄路を評価した。注入後 6 日目に大脳皮質 5 層のフルオロゴールド陽性細胞数を数えた結果、傷害側と健常側での変化は見られなかった(図 3)。これらの結果より、低酸素虚血による大脳皮質の投射ニューロンの脱落は起きていないことが示された(図 3)

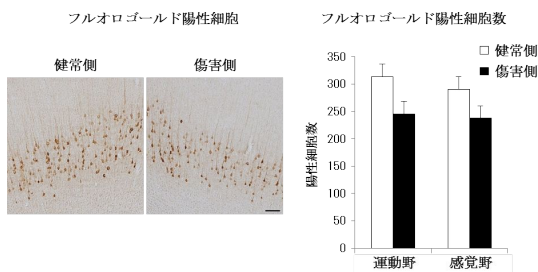


図3 フルオロゴールド陽性細胞

(4) 成熟 OLGs 減少と髄鞘傷害

PVL モデルラットの傷害側白質内では成熟 OLGs である APC 陽性細胞数が有意に減少していた。さらに髄鞘マーカーである MBP 抗体で PVL モデルラットの脳皮質を染色したところ、傷害側において染色性が落ちていることが分かった。ImageJ ソフトウェアにより MBP シグナル強度を測定した結果、感覚野の上層部(1-4 層)で有意にシグナルの低下が確認された。またこの減少は髄鞘発達期の 26 日齢、髄鞘形成後の 74 日齢どちらの時期においても同様に認められた(図 4)。これらのことより、PVL モデルラット脳では低酸素虚血によりニューロンの脱落は伴わず、OLGs の分化・髄鞘化抑制が起きていることが明らかになった。後肢にみられる運動機能障害は主に髄鞘化の傷害が原因であることが考えられる。

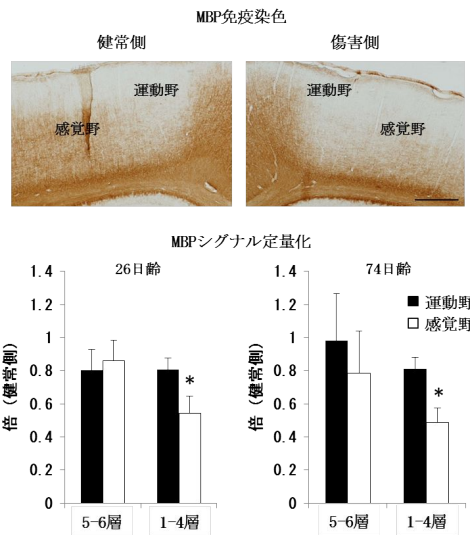


図4 MBP陽性細胞

(5) 網羅的遺伝子解析

成熟 OLGs 減少と髄鞘傷害に関与している因子を同定するために 5 日齢の PVL モデルラット脳で網羅的遺伝子解析を行った。結果、163 個の遺伝子が低酸素虚血により変動していた(発現上昇; 98 個、発現低下; 65 個)。遺伝子オントロジー解析を行ったところ、増加遺伝子では、炭水化物代謝、タンパク質分解、イオン輸送、細胞死制御、炎症反応、低酸素反応などに関与するものが変化していた。また、減少遺伝子ではイオン輸送、G タンパク共役型受容体シグナル経路などに関する遺伝子の変化が多く見られた。これらの遺伝子がニューロンの生存、OLGs 分化抑制に関与している可能性が示唆される。

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)

[雑誌論文](計 3 件)

Misumi S, Ueda Y, Nishigaki R, Suzuki S,

Ishida A, Jung CG, Hida H.
Dysfunction in motor coordination in
neonatal white matter injury model
without apparent neuron loss
Cell transplantation, in press
(査読有り)
dx.doi.org/10.3727/096368915X689893

Ishida A, Misumi S, Ueda Y, Shimizu S,
Jung C-G, Tamakoshi K, Ishida I, Hida H.
Early constraint-induced movement
therapy promotes functional recovery
and neuronal plasticity in a subcortical
hemorrhage model rat.
Behav Brain Res. 284, 158-66, 2015
(査読有り)
doi: 10.1016/j.bbr.2015.02.022.

Ueda Y, Masuda T, Ishida A, Misumi S,
Shimizu Y, Jung CG, Hida H
Enhanced electrical responsiveness in
the cerebral cortex with oral melatonin
administration after a small hemorrhage
near the internal capsule in rats
Journal of Neuroscience Research,
92(11):1499-508, 2014 (査読有り)
doi: 10.1002/jnr.23434.

[学会発表](計 5 件)

Sachiyo Misumi, Shino Ogawa, Mina Suzuki,
Yoshitomo Ueda, Akimasa Ishida,
Cha-Gyun Jung, Hideki Hida
Kir7.1 expression after neonatal
hypoxic-ischemia relates to the
inhibition of oligodendrocyte
differentiation: in vitro analysis
第93回日本生理学会 2016/3/22-24
札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

Ruriko Nishigaki, Sachiyo Misumi*, Mina
Suzuki, Yoshitomo Ueda, Shino Ogawa,

Cha-Gyun Jung, Hideki Hida
Weaker myelin expression in layer II-III
of the sensorimotor cortex in a neonatal
hypoxic-ischemia model that has
hindlimb motor dysfunction without
neuronal loss
北米神経科学大会 2015/10/17-21
シカゴ(アメリカ)

Sachiyo Misumi, Yoshitomo Ueda, Yuko
Shimizu, Akimasa Ishida, Cha-Gyun Jung,
Hideki Hida
Gene expression change in neonatal
hypoxic-ischemia model rat that show
hindlimb motor dysfunction without
neuronal loss in the cortex
第38回日本神経科学大会 2015/7/28-31
神戸コンベンションセンター(兵庫県神戸市)

Sachiyo Misumi, Yoshitomo Ueda, Yuko
Shimizu, Akimasa Ishida, Cha-Gyun Jung,
Hideki Hida
Cell death and arrest of lineage
progression to oligodendrocyte are
followed by indirect damage of
corticospinal neurons in the developing
white matter injury model rat
北米神経科学大会 2014/11/15-19
ワシントン,DC(アメリカ)

Sachiyo Misumi, Yoshitomo Ueda, Yuko
Shimizu, Akimasa Ishida, Cha-Gyun Jung,
Hideki Hida
Indirect minor damage in the
corticospinal neurons in the developing
white matter injury model rat
第37回日本神経科学大会 2014/9/11-13
パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三角 吉代 (Misumi Sachiyo)
名古屋市立大学・医学研究科・助教
研究者番号: 70529148