

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：82404

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26282159

研究課題名(和文)慢性期脊髄障害における再髄鞘化誘導療法に関する研究

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of the remyelination in chronic phase of spinal cord injury

研究代表者

緒方 徹(OGATA, TORU)

国立障害者リハビリテーションセンター(研究所)・病院(併任研究所)障害者健康増進・運動医科学支援センター・センター長

研究者番号：00392192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,700,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄損傷後の再髄鞘化促進は、損傷脊髄の機能回復に向けた重要な治療戦略のひとつである。再髄鞘化を促進するためには、オリゴデンドロサイトの前駆細胞を活性化し、その増殖、分化、成熟を促進する必要があるが、この過程の分子メカニズムは未だ不明な点も多い。本研究では、チャージ症候群の原因遺伝子として知られているクロマチン再構成因子Chd7が、転写因子Sox2と協調して働き、脊髄損傷後の前駆細胞の活性化を制御することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Oligodendrocyte precursor cells (OPCs) act as a reservoir of new oligodendrocytes (OLs) in homeostatic and pathological conditions. OPCs are activated in response to spinal cord injury (SCI), to generate myelinating OLs. This OPC activation is the first step in the process of remyelination, and proper control of OPC activation is important for tissue repair following SCI. However, the molecular mechanisms underlying OPC activation, especially its epigenetic regulation, remain mostly unknown. In this study, we demonstrate that chromodomain helicase DNA binding protein 7 (Chd7), which is a member of the Chd family of chromatin remodelers and is a causative gene for human CHARGE syndrome, collaborates with Sox2 and regulates OPC activation following SCI.

研究分野：リハビリテーション医学

キーワード：再髄鞘化 エピジェネティクス オリゴデンドロサイト

1. 研究開始当初の背景

再髄鞘化とリハビリテーション

髄鞘は神経軸索を取り囲むことで活動電位伝搬を促進し、また軸索の安定性に寄与しており、その傷害は脱髄疾患などの変性疾患のみならず、脊髄損傷や頸椎症性脊髄症でも報告されている。特に脊髄白質を通る下降路の脱髄は脳からの随意指令の伝搬を障害し、四肢の麻痺や痙縮の原因となっている。

脱髄病変の回復には、髄鞘形成細胞であるオリゴデンドロサイトによる再髄鞘化が必要であり、申請者はこれまで脊髄損傷を中心に、内在性の前駆細胞による再髄鞘化の研究を展開してきた。他の報告も含めこれまで、成体脊髄にはオリゴデンドロサイト前駆細胞（以下、前駆細胞）が残存し、組織傷害に反応して活性化され、増殖・遊走を経て再髄鞘化を行うことが知られている。こうした反応は成体脊髄に残存する治癒起点の一つであり、この過程を分子レベルで解き明かし薬理的介入あるいは細胞移植によって再髄鞘化を促進する試みが脱髄疾患を中心に行われている。また一方で、髄鞘形成は活動している神経軸索に選択的に生じるという知見がある。すなわち再髄鞘化は神経活動の賦活化を伴うリハビリ訓練によって生じる神経の可塑性の一部と位置付けられる。

慢性期における再髄鞘化能

臨床応用を念頭においた観点からは、これまで再髄鞘化が観察されている疾患モデル研究の多くは急性病態（外傷後早期あるいは活発な炎症を呈する変性疾患モデル）であることに留意する必要がある。こうした病態では、炎症などの強い組織反応が前駆細胞の活性化に寄与していると予想されている。しかし、慢性期に至った脊髄損傷症例や、外科手術を受けて圧迫を解除された後の頸椎症性脊髄症症例など、実際の脊髄疾患の多くは組織反応が沈静化した後の慢性的な経過を呈し、急性期とは異なる病態になっていると考えられる。これまでこうした病態での前駆細胞の状態や再髄鞘化がどのような意義を持つかについては報告されていない。

そこで本研究では、慢性期の脊髄障害において再髄鞘化に関連する細胞メカニズムを明らかにすることと、神経活動を賦活化するリハビリ手法が再髄鞘化に及ぼす影響を探索することを計画した。

2. 研究の目的

中枢神経白質の脱髄病変に対する再髄鞘化はヒト脊髄組織においても観察される内在性の修復能であり、そのためには組織中のオリゴデンドロサイト前駆細胞が組織傷害に反応して増殖・分化（髄鞘形成）することと、リハビリによる神経活動の惹起が重要である。しかし、病的状態が長期に及んだ場合、オリゴデンドロサイト前駆細胞の細胞プールがどのように維持され、また疾患の影響を受けるかについての知見は乏しい。本研究は幹細胞研究の手法を取り入れ、この前駆細胞の維持メカニズムを分子レベルで明らかにし、介入によってその維持を可能にすることを目指す。薬理的介入による前駆細胞の維持・活性化とリハビリによる神経活動の惹起により、慢性期脊髄障害に対して再髄鞘化を効率よく誘導する治療法を開発することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 前駆細胞の維持・活性化、その後の再髄鞘化に至る過程を観察するために、2種類のマウス脱髄モデル（カプリゾン投与による脱髄誘発モデルと脊髄圧挫損傷モデル）の系を用いた。

(2) 前駆細胞をラベルすることのできる PDGFRa-CreER; CAG-CAT-EGFP マウスを用いて上記2つの病態モデルマウスを作製し、前駆細胞の活性化から再髄鞘化に至る過程で発現する分子を定量 PCR と免疫組織染色で探索した。特に転写因子とエピジェネティック制御因子に着目して遺伝子発現変化を解析した。

(3) 脊髄圧挫損傷モデルマウスの損傷脊髄において、活性化された前駆細胞で発現が上昇する新しいエピジェネティック制御因子としてクロマチン再構成因子 Chd7 を見出し、成体マウスの正常脊髄および損傷脊髄での Chd7 の発現パターンを免疫組織染色で解析した。前駆細胞、オリゴデンドロサイト、アストロサイトのマーカーとの共染色を行い、Chd7 がどの細胞に発現しているか詳細な解析を行った。

(4) 前駆細胞の増殖、生存、分化を詳細に検討するために、*in vitro* での前駆細胞培養系（オリゴスフェア培養）を用いた。

(5) 培養前駆細胞での、Chd7 の発現パターンを免疫細胞染色で解析した。前駆細胞、オリゴデンドロサイト、アストロサイトのマーカーとの共染色を行った。

(6) 脊髄損傷後の前駆細胞の活性化から再髄鞘化に至る過程における Chd7 の役割を明らかにするために、前駆細胞特異的 Chd7 欠

損マウス (PDGFRa-CreER;Chd7^{flox/flox}、以下、Chd7 cK0) を作製した。さらに、このマウスを用いて圧挫脊髄損傷モデルマウスを作製した。

(7) 上記マウスを用いて、損傷後の前駆細胞の増殖、分化、生存、再髄鞘化に対する Chd7 の役割を検討した。さらに、Chd7 cK0 マウスの脊髄損傷後の運動機能評価 (BMS スコアによる後肢運動機能回復評価) を行った。

(8) 前駆細胞培養系とレトロウイルスを使った発現系を用いて、Chd7 を培養前駆細胞でノックダウンし、前駆細胞の増殖、分化、生存に対する影響を検討した。

(9) 免疫沈降法を用いて、Chd7 と相互作用する分子を検討した。
(結合分子として、転写因子 Sox2 を同定)

(10) 前駆細胞培養系とレトロウイルスを使った発現系を用いて、Sox2 を培養前駆細胞でノックダウンし、前駆細胞の増殖、分化、生存に対する影響を検討した。

4. 研究成果

脊髄損傷後の再髄鞘化促進は、損傷脊髄の機能回復に向けた重要な治療戦略のひとつと考えられている。再髄鞘化を促進するためには、オリゴデンドロサイトの前駆細胞を活性化し、その増殖、分化、成熟を促進する必要があるが、この過程の分子メカニズムは未だ不明な点も多い。エピジェネティック制御因子はクロマチン制御など後天的な遺伝子発現制御を担い、癌治療領域を中心に創薬標的分子として注目されているが、再髄鞘化における役割は明らかにされていなかった。本研究では、クロマチン再構成因子 Chd7 が脊髄損傷後の前駆細胞の活性化を制御することを明らかにした。Chd7 は、成体脊髄において、一部の前駆細胞とオリゴデンドロサイトで発現し、アストロサイトでの発現は低かった。脊髄損傷後、前駆細胞は活性化して増殖する。その増殖している前駆細胞では転写因子 Sox2 や細胞増殖のマーカである Ki67 の発現が上昇し、それと共に Chd7 の発現も顕著に増加していた (図 1)。

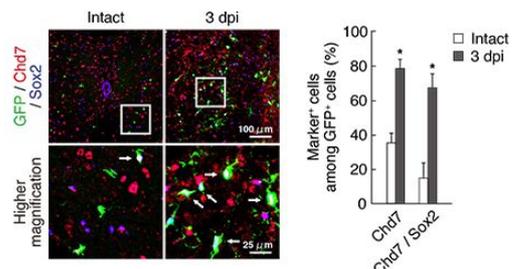


図1 脊髄損傷後の前駆細胞における Chd7 と Sox2 の発現

また、培養した前駆細胞において Chd7 の発現パターンを調べたところ、脊髄における発現パターンと同様に、Chd7 は増殖している前駆細胞とオリゴデンドロサイトで発現していた。一方、Sox2 は増殖している前駆細胞で高発現し、オリゴデンドロサイトへと分化するにつれその発現は低下した。このことから、Chd7 と Sox2 は増殖している前駆細胞で共発現し、分化したオリゴデンドロサイトでは Sox2 の発現が低下し、Chd7 のみが発現していることが明らかとなった。Chd7 の発現パターンから、Chd7 は前駆細胞の増殖や分化に関与する可能性が考えられ、次にそれを検討した。まずはじめに、脊髄損傷後の前駆細胞の増殖や分化における Chd7 の役割を調べた。前駆細胞特異的 Chd7 欠損マウス (Chd7 cK0 マウス) を用いて、圧挫脊髄損傷モデルマウスを作製し解析した。コントロールマウスでは、損傷後 3 日で多くの前駆細胞が増殖していたが (BrdU の取り込み、Ki67 の染色で評価)、Chd7 cK0 マウスでは、その増殖が顕著に抑制されていた (図 2)。

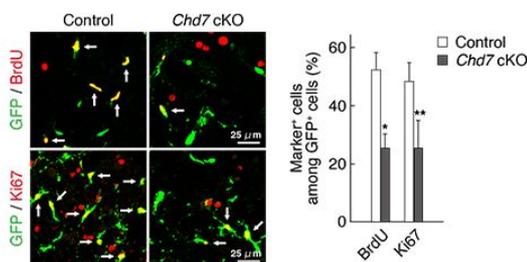


図2 前駆細胞の増殖における Chd7 の関与

一方、cleaved Caspase3 染色による細胞死の評価では、有意な差は観察されなかった。前駆細胞のマーカである NG2 や、Sox10 の発現を調べたところ、Chd7 cK0 マウスでは、コントロールと比較して NG2 陽性、または Sox10 陽性細胞の割合が減少していた。さらに、Chd7 KO 細胞の一部は、アストロサイトのマーカである GFAP を発現していた。これらの結果から、Chd7 は損傷後の前駆細胞の増殖と、前駆細胞のアイデンティティの維持に必要であることが示唆された。損傷後 42 日で、前駆細胞のオリゴデンドロサイトへの分化や再髄鞘化を観察したところ、Chd7 cK0 マウスで GSTp 陽性オリゴデンドロサイトの割合の減少および再髄鞘化の減少 (フルオロミエリンによる評価) がみられた (図 3)。

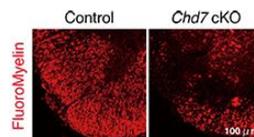


図3 再髄鞘化における Chd7 の関与

また、BMS スコアによる後肢運動機能回復評価を行ったところ、Chd7 cKO マウスでは、コントロールと比較して有意にその回復は不良であった (図 4)。

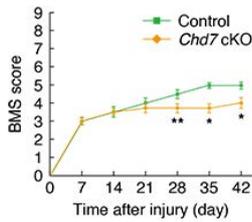


図4 後肢運動機能回復評価

このことから、Chd7 は前駆細胞のオリゴデンドロサイトへの分化やその後の再髄鞘化にも必要であることが示唆された。次に、前駆細胞の培養系を用いて、Chd7 を前駆細胞でノックダウンし、その増殖、分化、生存に対する影響を検討した。マウス個体での解析と一致して、Chd7 のノックダウンにより EdU および Ki67 陽性細胞の割合の低下、PDGFRa および Sox10 陽性細胞の割合の減少、GalC および MBP 陽性オリゴデンドロサイトの割合の減少、GFAP 陽性アストロサイトの割合の増加が観察された。これらの結果からも、Chd7 は前駆細胞の増殖、アイデンティティの維持、分化に必要であることが示唆された。増殖している前駆細胞において Chd7 は Sox2 と共発現しているため、次に、Sox2 のノックダウンの効果も検討した。Sox2 のノックダウン実験により、Sox2 も前駆細胞の増殖およびアイデンティティの維持に必要であることが明らかになった。さらに、免疫沈降法により Chd7 と Sox2 の相互作用を検討したところ、両分子は複合体を形成することが明らかとなった。以上の結果より、Chd7 と Sox2 は前駆細胞において複合体を形成し協調して標的分子の発現を誘導し、それにより、前駆細胞の増殖やアイデンティティを制御していると考えられる (図 5)。

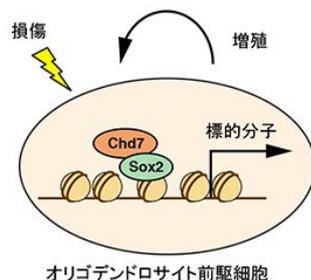


図 5 前駆細胞における Chd7 と Sox2 の役割

前駆細胞のオリゴデンドロサイトへの分化過程では、Sox2 の発現が減少するので、Chd7 は Sox2 以外のパートナー分子と結合し、分化過程を制御していると考えられる。最近、Chd7 が Sox10 と複合体を形成し、オリゴデンドロサイト分化を促進するということが報告された (He et al, Nat Neuosci 2016)。本研究とこの報告から、Chd7 は結合するパートナー分子を変えることによって、前駆細胞の増殖と分化の両方の過程を制御することが示唆された。今後は、Chd7 と Sox2 がどのように前駆細胞の増殖を促進するのか明らかにするために増殖制御に関わる標的分子の同定が必要である。

慢性期の損傷脊髄では多くの前駆細胞が増殖を停止し、静止状態にある。そのような前駆細胞では Chd7 の発現が減少していた。薬理的介入により静止状態にある前駆細胞での Chd7 の発現誘導、あるいはその活性化を誘導できれば、慢性期損傷脊髄で前駆細胞を活性化し、再髄鞘化を促進することができるかもしれない。今後、この点を検討する必要がある。また、リハビリにより惹起される神経活動とオリゴデンドロサイト系譜細胞に発現する Chd7 との関係性を明らかにしていくことは今後の課題である。

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)

[雑誌論文](計 5 件)

Ichihara Y, Doi T, Ryu Y, Nagao M, Sawada Y, Ogata T. Oligodendrocyte Progenitor Cells Directly Utilize Lactate for Promoting Cell Cycling and Differentiation. J Cell Physiol. 2017 232:986-995. 査読有

Okazaki R, Doi T, Hayakawa K, Morioka K, Imamura O, Takishima K, Hamanoue M, Sawada Y, Nagao M, Tanaka S, Ogata T. The crucial role of Erk2 in demyelinating inflammation in the central nervous system. J Neuroinflammation. 2016 Sep 5;13(1):235. 査読有

Ohya J, Chikuda H, Kato S, Hayakawa K, Oka H, Takeshita K, Tanaka S, Ogata T. Elevated Levels of Phosphorylated Neurofilament Heavy Subunit in the Cerebrospinal Fluid of Patients with Lumbar Spinal Stenosis: Preliminary Findings. Spine J. 15(7):1587-92, 2015. 査読有

Miyamoto Y, Torii T, Takada S, Ohno N, Saitoh Y, Nakamura K, Ito A, Ogata T, Terada N, Tanoue A, Yamauchi J. Involvement of the Tyro3 receptor and its intracellular partner Fyn signaling in Schwann cell myelination. Mol Biol Cell. 26(19):3489-503, 2015. 査読有

Sugimori M, Hayakawa Y, Boman BM, Fields JZ, Awaji M, Kozano H, Tamura R, Yamamoto S, Ogata T, Yamada M, Endo S, Kurimoto M, Kuroda S. Discovery of Power-Law Growth in the Self-Renewal of Heterogeneous Glioma Stem Cell Populations. PLoS One. 10(8):e0135760, 2015. 査読有

〔学会発表〕(計2件)

緒方徹、脊髄損傷後のコレステロール代謝阻害剤投与は髄鞘の再生を阻害する、第33回日本運動器移植・再生医学研究会、2014年9月27日、第一ホテル両国(東京・墨田区)

緒方徹、脊髄再生に関する取り組みの現状とリハビリテーションの役割、第11回神経理学療法学会、2014年12月6日、つくば国際会議場(茨城・つくば市)

〔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

緒方 徹 (OGATA, Toru)
国立障害者リハビリテーションセンター(研究所)・病院(併任研究所) 障害者健康増進・運動医科学支援センター・センター長
研究者番号：00392192

(2) 研究分担者

長尾 元史 (NAGAO, Motoshi)
国立障害者リハビリテーションセンター(研究所)・研究所 運動機能系障害研究部・研究室長
研究者番号：00359671

(3) 研究分担者

杉森 道也 (SUGIMORRI, Michiya)
富山大学・大学院医学薬学研究部(大学)・助教
研究者番号：20464026