

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18337

研究課題名(和文)光遺伝学的手法によるオリゴデンドロサイト分化の光制御

研究課題名(英文)Optogenetic control of differentiation into oligodendrocytes

研究代表者

小野 健治(Ono, Kenji)

名古屋大学・環境医学研究所・助教

研究者番号：80329698

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内イオン環境変化によってグリア前駆細胞から髄鞘を形成するオリゴデンドロサイトへ分化誘導できるかどうか検討するために、チャンネルロドプシン 2 を発現させたグリア前駆細胞に光刺激を行い、細胞の機能変化について解析した。光刺激したグリア前駆細胞は細胞内イオン環境変化を引き金として、PI3K/Akt/mTORシグナル伝達経路を活性化しオリゴデンドロサイトへと分化した。脱髄病変においても光刺激によってオリゴデンドロサイトへ分化誘導させることができ、脱髄の緩解と脱髄から生じる運動機能低下を回復させた。細胞内イオン環境を光操作することで細胞分化を制御できることが分かった。

研究成果の概要(英文)： We examined optogenetic control of oligodendrocyte differentiation from channelrhodopsin-2(ChR2)-expressing glial progenitors by photo-activation. When ChR2-expressing glial progenitors were exposed to blue light, the increases in intracellular Na⁺ and Ca²⁺ concentrations occurred. It triggered activation of PI3K/Akt/mTOR signaling and resulted in oligodendrocyte differentiation from glial progenitors. Moreover, when NG2-ChR2 mice, which NG2 glial progenitors expressed ChR2-EYFP, were induced demyelination using lysophosphatidylcholine treatment, photo-activated glial progenitors around demyelinated regions differentiated into oligodendrocytes, and deficits in motor function were reduced. These results suggest that ChR2-expressing glial progenitors have potential as a useful tool for therapeutic approaches to brain and spinal cord disorders associated with oligodendrocyte dysfunctions.

研究分野：神経科学

キーワード：オプトジェネティクス オリゴデンドロサイト NG2グリア前駆細胞 細胞分化 脱髄

1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症などの脱髄疾患は神経を覆っているミエリンが消失し、神経信号がうまく伝達できなくなるため四肢のしびれなど種々の神経症状が出る疾患である。脱髄疾患の治療にはミエリンの消失を抑制するだけでなく、再ミエリン化を促進することが鍵になると考えられている。この再ミエリン化の実体は、未成熟なグリア前駆細胞がミエリンを産生できる成熟したオリゴデンドロサイトへ分化することであるが、ミエリンの消失と再ミエリン化の制御機構には不明な点が多い。

オリゴデンドロサイトは、ATP などさまざまな液性因子で刺激することによってグリア前駆細胞から分化誘導できることが知られている。刺激を受けたグリア前駆細胞は、PI3K/Akt/mTOR シグナル伝達経路を経て、GalC や PLP といったオリゴデンドロサイト特異的なミエリン関連マーカー分子を発現する。一方、液性因子で刺激を受けたグリア前駆細胞の細胞内では Ca^{2+} の濃度上昇が見られるが、この細胞内イオン環境変化がオリゴデンドロサイトへの細胞分化にどのように関わっているのかはよくわかっていなかった。そこで申請者らは近年注目を浴びている光遺伝学的手法を用いて Na^+ や Ca^{2+} 細胞内イオン環境変化と細胞分化について解析を行ってきた。

クラミドモナス藻が発現するチャンネルロドプシン 2 (ChR2) は青色光照射に選択的に応答する陽イオンチャンネルであり、ChR2 を発現させた細胞に青色光を照射すると細胞内に Na^+ や Ca^{2+} を流入させることができる。細胞がさまざまな機能を発現する際には、細胞内イオン環境変化を伴う事例が多く知られている。ChR2 を光制御することにより細胞内イオン環境変化を誘導し、細胞の機能を変えられるのではないかと考え、申請者らは ChR2 を遺伝子導入したアストロサイトを用いて細胞内イオン環境変化と細胞機能について検討を行った (Ono K et al. J Neural Transm 2013)。ChR2 を発現したアストロサイトは青色光刺激により細胞内イオン環境変化が生じ、光刺激依存的なグルタミン酸放出が生じることがわかった。また、アストロサイトにもオリゴデンドロサイトにも分化させることができるグリア前駆細胞株 OS3 細胞に ChR2 を遺伝子導入した OS3ChR2 細胞を作製し、光刺激によって細胞内イオン環境を変化させた際のオリゴデンドロサイトへの細胞分化について解析した。その結果、OS3ChR2 細胞に青色光刺激を行うと、細胞内の Na^+ や Ca^{2+} 濃度上昇が見られ、GalC や PLP といったオリゴデンドロサイトの分化マーカーの発現が増大し、GFAP などのアストロサイトの分化マーカーの発現が減少した。また、これらの細胞を脱髄モデルマウスに移植すると運動機能の顕著な改善が見られた。これらのことから ChR2 を発現させた

グリア前駆細胞を光刺激することにより、オリゴデンドロサイトへの分化誘導できる可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、光刺激によって ChR2 発現グリア前駆細胞がオリゴデンドロサイトへ分化誘導される分子メカニズムについて解明する。また、ChR2 をグリア前駆細胞に発現させたマウスの脳脊髄に脱髄を作製した脱髄モデルマウスを用いて、光刺激によってオリゴデンドロサイトへ分化誘導や再ミエリン化が生じるかどうか、脱髄症状の緩解や運動機能の改善が見られるかについて検討する。

3. 研究の方法

(1) 細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇からオリゴデンドロサイト分化に至る分子経路の解析

光刺激を行った OS3ChR2 細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を可視化するために、細胞をカルシウムインジケータ Rhod-3 で標識し、タイムラップスイメージングを行った。 Na^+ フリーバッファや EGTA (100 μ M; 細胞外液中のカルシウムキレーター)、BAPTA-AM (10 μ M; 細胞内液中のカルシウムキレーター)、Ionomycin (1 μ M; カルシウムイオノフォア) 存在/非存在下において光刺激を行い、細胞内 Ca^{2+} 濃度変化について検討した。

光刺激を行った OS3ChR2 細胞の GalC の発現がどのようなシグナル伝達経路の活性化によるのかを調べるために、光刺激を行った細胞を用いて western blotting を行った。カルシウムイオンや PI3K/Akt/mTOR シグナル伝達経路に対する阻害剤の存在/非存在下において光刺激を行い、GalC の発現やシグナル伝達経路の活性化について検討した。

(2) 脱髄マウス脳脊髄内における ChR2 発現グリア前駆細胞からオリゴデンドロサイトへの細胞分化の光制御

NG2-CreER マウスと Ai32 (CAG-Floxed ChR2-EYFP) マウスを交配させ作製した NG2-CreER x Ai32 マウスにタモキシフェンを 5 日間連続で投与し、NG2 グリア前駆細胞に ChR2-EYFP を発現させたマウス (NG2-ChR2 マウス) を作製した。脳梁部や脊髄部にリゾホスファチジルコリン (LPC) を注入し脱髄を誘導した。LPC 投与後 7 日目から 5 日間連続で青色光刺激 (1 分毎に ON/OFF を 30 分間) を行った。LPC 投与後のマウスは、脳や脊髄における LPC 投与の影響を確認するために経時的な MRI 撮像を行った。また、運動機能を評価するために経時的にロータロッドテストを行った。LPC 投与後 0~21 日のさまざまな時点で脳や脊髄を採取し、免疫組織化学的な解析を行った。

4. 研究成果

(1) 光刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度変化の流入経路に関する解析

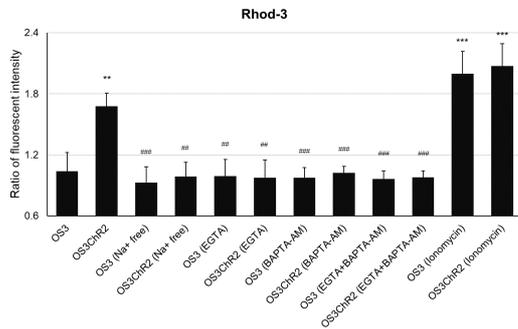


図1: 阻害剤存在下における細胞内 Ca²⁺濃度変化

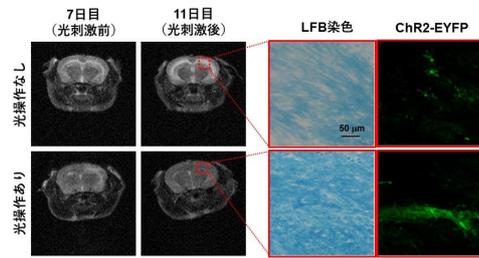
OS3ChR2 細胞を光刺激すると、細胞内 Ca²⁺濃度上昇が確認された。この時、EGTA や BAPTA-AM を用いて細胞外液中または細胞内液中の Ca²⁺をキレートすると、細胞内 Ca²⁺濃度上昇は確認されなくなった (図1)。これらのことから光刺激により細胞外液中からの Ca²⁺の細胞内への流入が生じていることがわかった。一方、Na⁺フリーバッファ中で光刺激を行うと、細胞内の Ca²⁺濃度上昇が確認されなかった。このことから、光刺激による ChR2 を介した Na⁺の細胞内への流入が引き金となり、Ca²⁺の細胞内流入が生じていると考えられた。

(2) Ca²⁺を阻害した際の ChR2 発現グリア前駆細胞の細胞分化

EGTA や BAPTA-AM 存在下において OS3ChR2 細胞を光刺激すると、光刺激による GalC の発現上昇が有意に抑制された。また、光刺激を行うと PI3K/Akt/mTOR シグナル伝達経路のリン酸化が確認されたが、EGTA や BAPTA-AM 存在下ではこれらのリン酸化が抑制された。さらに、PI3K の阻害剤 LY294002、PDK1 の阻害剤 BX-517、Akt 阻害剤 Triciribine、mTOR 阻害剤 Rapamycin 存在下において光刺激による GalC の発現上昇が抑制されることがわかった。これらのことから、光刺激による細胞内 Ca²⁺濃度上昇は PI3K/Akt/mTOR シグナル伝達経路を活性化しオリゴデンドロサイトへ分化誘導していることがわかった。

(3) 脳梁部に脱髄を起こした NG2-ChR2 マウス脳内の経時的変化

LPC 投与により脳梁部に脱髄を生じさせたマウス脳を経時的に MRI で観察すると、T2 強調画像において脱髄によって生じていると思われる信号増強 (白色) が確認された。この信号増強は 21 日後まで経時的に拡大していった。一方で、脱髄部位に対して 5 日間連続で光刺激を行ったマウス脳内では、信号増強が顕著に抑制された。LPC 投与後 14 日の脳切片を作製し、ルクソールファーストブルー (LFB) 染色で髄鞘の状態を確認してみると、LPC 投与し光刺激を行わなかったマウスの脳梁部分は脱髄によって髄鞘の密度が薄くなっていることがわかった (図2)。一方、光刺激を行ったマウスの脳梁部分では、



右側への薬物投与により脱髄を誘導したNG2-ChR2マウスは、経時的に脱髄が進行していくが、光操作を5日間行ったマウスでは脱髄が顕著に抑制された。元々脱髄が生じていた位置にはChR2-EYFPを発現した細胞が集積しており、これらの細胞はオリゴデンドロサイトのマーカーであるGalCやPLPの発現が確認できた。

図2: 光刺激の有無による脱髄部位の変化

髄鞘の密度が比較的保たれていることがわかった。LPC により脱髄を誘導した脳梁において ChR2-EYFP を発現した細胞の分布を調べてみると、光刺激を行わなかったマウスで ChR2-EYFP を発現した細胞の増加や集積が確認できた。一方、光刺激を行ったマウスでは光刺激を行わなかったマウスに比べて顕著な細胞数の増加や集積が確認された。また、それらの細胞は NG2 を発現する細胞だけでなく GalC や PLP といったオリゴデンドロサイトのマーカーを発現する細胞が多く確認できた。

(4) 脊髄に脱髄を起こした NG2-ChR2 マウスの光操作

NG2-ChR2 マウスの脊髄に LPC を投与し脱髄を誘導すると、下肢の麻痺が生じ顕著な運動機能低下が確認された。脱髄部位に照射を行うと、運動機能低下が回復することがわかった。また、脊髄を免疫組織化学的に解析すると、脱髄部位では ChR2 を発現した NG2 グリア前駆細胞やオリゴデンドロサイトが増加していることが分かった。

以上のことから、ChR2 を発現したグリア前駆細胞は光刺激により細胞内イオン環境の変動が引き金となり PI3K/Akt/mTOR シグナル伝達経路が活性化し、オリゴデンドロサイトへ分化することがわかった。また、脱髄部位においても光刺激によってオリゴデンドロサイトへ分化誘導させることが可能であり、脱髄症状の緩解や運動機能の改善が生じることが分かった。脱髄部位においては通常グリア前駆細胞からオリゴデンドロサイトへの分化誘導が阻害されているので、本機序をさらに解析することで阻害効果をどのように打ち消しているかを明らかにできる可能性がある。また本手法、これまでに知られている分化誘導因子を添加することなく、光操作のみによって細胞分化を誘導させられるので、生体内の細胞機能の制御に有用な手法であると考えられる。脱髄症状自体は多くの疾患と関連するので、さまざまな病態モデルに対しても応用できるのか今後検討していきたい。

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 7 件)

Takatani Y, Ono K, Suzuki H, Inaba M, Sawada M, Matsuda N: Inducible nitric oxide synthase during the late phase of sepsis is associated with hypothermia and immune cell migration. Lab Invest in press 2018 査読有 doi: 10.1038/s41374-018-0021-z.

Wu Q, Ono K, Suzuki H, Eguchi M, Yamaguchi S, Sawada M: Visualization of Arc promoter-driven neuronal activity by magnetic resonance imaging. Neurosci Lett 666:92-97 2018 査読有 doi: 10.1016/j.neulet.2017.12.041.

Lin H, Muramatsu R, Maedera N, Tsunematsu H, Hamaguchi M, Koyama Y, Kuroda M, Ono K, Sawada M, Yamashita T: Extracellular Lactate Dehydrogenase A Release From Damaged Neurons Drives Central Nervous System Angiogenesis. EBioMedicine 27:71-85 2018 査読有 doi: 10.1016/j.ebiom.2017.10.033.

Oya M, Suzuki H, Anas ARJ, Oishi K, Ono K, Yamaguchi S, Eguchi M, Sawada M: LC-MS/MS imaging with thermal film-based laser microdissection. Anal Bioanal Chem 410(2):491-499 2018 査読有 doi: 10.1007/s00216-017-0739-2.

Ono K, Suzuki H, Yamamoto R, Sahashi H, Takido Y, Sawada M: Optogenetic control of cell differentiation in channelrhodopsin-2-expressing OS3, a bipotential glial progenitor cell line. Neurochem Int 104:49-63 2017 査読有 doi: 10.1016/j.neuint.2016.12.022.

Matsumoto T, Takahashi N, Kojima T, Yoshioka Y, Ishikawa J, Furukawa K, Ono K, Sawada M, Ishiguro N, Yamamoto A: Soluble Siglec-9 suppresses arthritis in a collagen-induced arthritis mouse model and inhibits M1 activation of RAW264.7 macrophages. Arthritis Res Ther 18(1):133 2016 査読有 doi: 10.1186/s13075-016-1035-9.

Biju V, Hamada M, Ono K, Sugino S, Ohnishi T, Shibu ES, Yamamura S, Sawada M, Nakanishi S, Shigeri Y, Wakida S: Nanoparticles speckled by ready-to-conjugate lanthanide complexes for multimodal imaging. Nanoscale 7(36):14829-37 2015 査読有 doi: 10.1039/c5nr00959f.

[学会発表](計 9 件)

小野健治, 川嶋裕人, 鈴木弘美, 澤田

誠: 光感受性陽イオンチャンネル ChR2 を介した NG2 陽性グリア前駆細胞のオリゴデンドロサイトへの分化. ConBio2017, 2017.12 (神戸)

鈴木弘美, Anas Andrea, 大矢倫子, 小野健治, 大石幸一, 澤田 誠: MALDI MS イメージングでの生体高分子の検出や LC-MS/MS 分析でも質量イメージングを可能にする技術の確立. ConBio2017, 2017.12 (神戸)

小野健治, 鈴木弘美, 今野 歩, 石塚 徹, 平井宏和, 八尾 寛, 澤田 誠: 光感受性イオンチャンネル ChRGR を介したミクログリアの機能調節. 第 40 回日本神経科学大会, 2017.7 (千葉)

大矢倫子, 鈴木弘美, 大石幸一, 小野健治, 澤田 誠: LC-MS Imaging による脳内での薬物動態と神経伝達物質変化の同時解析. 第 2 回医薬系 3 部局交流シンポジウム 環境医学研究所・群馬大学生体調節研究所合同シンポジウム, 2017.6 (名古屋)

大矢倫子, 鈴木弘美, 大石幸一, 小野健治, 澤田 誠: LC-MS Imaging による脳内での薬物動態と神経伝達物質変化の同時解析. 第 65 回質量分析総合討論会, 2017.5 (つくば)

小野健治, 鈴木弘美, 今野 歩, 平井宏和, 八尾 寛, 澤田 誠: 光感受性イオンチャンネル ChRGR を介したミクログリアの機能調節に関する解析. 第 89 回日本生化学会大会, 2016.9 (仙台)

小野健治, 山本龍生, 佐橋秀紀, 滝戸悠平, 呉 起, 鈴木弘美, 澤田 誠: グリア前駆細胞株 OS3 細胞のチャンネルロドプシン 2 を介したオリゴデンドロサイトへの分化. 第 39 回日本神経科学大会, 2016.7 (横浜)

澤田誠, 鈴木弘美, 小野健治, 大石幸一: 3D 質量分析イメージングを実現する前処理技術. 第 64 回日本質量分析総合討論会, 2016.5 (吹田)

小野健治, 滝戸悠平, 山本龍生, 佐橋秀紀, 鈴木弘美, 澤田 誠: 光刺激したグリア前駆細胞株 OS3ChR2 細胞注入による脱髄疾患モデルマウスの運動機能改善. 第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会 合同大会, 2015.12 (神戸)

[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 1 件）

名称：蛍光プローブ及びその製造方法
発明者：小野健治，澤田 誠，淵 慎吾，竹
田美和
権利者：国立大学法人 名古屋大学
種類：特許
番号：特許第 6019535 号 (P6019535)
取得年月日：平成 28 年 10 月 14 日
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野 健治 (ONO, Kenji)
名古屋大学・環境医学研究所・助教
研究者番号：8 0 3 2 9 6 9 8

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()