

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18371

研究課題名(和文)新規オリゴデンドロサイト運命決定因子の探索と発生・再生への作用の解析

研究課題名(英文)The analysis of the regulation of cerebellar oligodendrocyte development

研究代表者

成瀬 雅衣 (Naruse, Masae)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：60455219

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)：発生期の神経幹細胞は、様々な因子によって時間・空間的に制御され、時期、領域特異的にニューロン、オリゴデンドロサイト、アストロサイトへの分化が運命づけられている。しかしながら、神経幹細胞からオリゴデンドロサイトへの運命決定メカニズムは未だ未解明な点が多い。本研究では、神経幹/前駆細胞からオリゴデンドロサイト前駆細胞への運命決定機構にFGF-2が関与していることを明らかにした。また、経時的な小脳の神経幹/前駆細胞の性質を解析し、オリゴデンドロサイトへの運命決定に関する転写因子の候補を解析した。

研究成果の概要(英文)：The developmental regulation of cerebellar oligodendrocytes are largely unknown. Neural stem cells exist in the white matter of postnatal cerebellum. We showed that cerebellar progenitor cells widely express CD44 at around postnatal day 3 (P3). Neurospheres formed from CD44+ cells differentiated mainly into oligodendrocytes and astrocytes. FGF-2 promoted survival and proliferation of CD44+ cells, and these cells differentiated into oligodendrocytes. Primary neurospheres generated from P8 cerebellum almost exclusively differentiated into astrocytes. To identify the candidate transcription factors involved in regulating this temporal change, we utilized DNA microarray analysis. The expression of zfp711, zfp618, barx1 and hoxb3 was higher in neurospheres generated from P3 cerebellum than from P8 by real-time quantitative PCR. Zfp618, barx1 or hoxb3 expressed in the WM of the cerebellum at P3, but these transcription factors were absent from the WM of the P8 cerebellum.

研究分野：発生生物学

キーワード：神経幹細胞 小脳 白質

1. 研究開始当初の背景

発生期の神経幹細胞は、様々な因子によって時間・空間的に制御され、時期・領域特異的にニューロン、オリゴデンドロサイト、アストロサイトへの分化が運命づけられている。神経幹細胞から発生初期にはニューロンが産生され、後期にアストロサイトが産生されるメカニズムや、ニューロンとアストロサイトへの運命決定因子はよく研究されている。しかしながら、オリゴデンドロサイトは産生領域が限定しており、培養下では神経幹細胞から産生されるオリゴデンドロサイトの割合の変化がニューロンやアストロサイトとは異なりはつきり検出できない、などといった理由により、神経幹細胞からオリゴデンドロサイトへの運命決定メカニズムは未だ未解明な点が多い。また、オリゴデンドロサイトの発生に関しては、前脳、脊髄を中心に研究がおこなわれてきた。一方で、小脳のオリゴデンドロサイト発生は、その起源、制御機構に、不明な点が多く、他の領域とは異なる可能性もある (Buffo et al., 2013, Prog Neurobio)。大脳では出生前にほとんどの細胞運命が決定されるが、小脳では出生後も白質に神経幹細胞が残り、これからもニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトが産生される事が示唆されているが (Lee et al., 2006, Nat Neurosci)、その制御機構はまったく未解明である。

我々はアストロサイト前駆細胞のマーカーとして知られる CD44 が小脳に強く発現しており、発達期においてはアストロサイト前駆細胞だけでなく、一過的に神経幹/前駆細胞、オリゴデンドロサイト前駆細胞に発現していることを明らかにしている (Naruse et al., 2013, PLOS One)。また哺乳 8 日齢のマウス小脳の神経幹/前駆細胞は CD133 を発現し、EGF (epidermal growth factor) によって増殖しほとんどがアストロサイトへ分化することを報告した (Okano-Uchida et al., 2013)。

2. 研究の目的

本研究では、マウス小脳の神経幹/前駆細胞の性質の経時的な変化を解析し、神経幹/前駆細胞からオリゴデンドロサイト前駆細胞への運命決定機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

Flow cytometry (FACS) または Magnetic-activated cell sorting (MACS) にて表面抗原をマーカーとし、神経幹/前駆細胞を哺乳 3 日齢と哺乳 8 日齢のマウス小脳より回収した。Neurosphere assay をおこない、その性質を解析した。

哺乳 3 日齢のマウスから単離した小脳の神経幹/前駆細胞、小脳の組織培養へ既知のオリゴデンドロサイト前駆細胞への分化誘導因

子を添加し、その作用を検討した。

また、哺乳 3 日齢と哺乳 8 日齢のマウス小脳から単離した Neurosphere はオリゴデンドロサイトの分化能が大きく異なったので、DNA マイクロアレイによりその遺伝子発現を比較した。

DNA マイクロアレイで発現変動がみられた転写因子について real time PCR で定量をおこない、哺乳 3 日齢のオリゴデンドロサイトへの分化能が高い neurosphere で発現が高い転写因子について *in situ hybridization* 法により発現解析をおこなった。

4. 研究成果

哺乳 3 日齢のマウス小脳より FACS を用い CD44 陽性/陰性区画をそれぞれ回収し、Neurosphere assay をおこなった。哺乳 3 日齢の小脳の神経幹/前駆細胞は CD44 陽性であった (図 1A)。CD44 陽性細胞群から作成した Neurosphere はアストロサイトとオリゴデンドロサイトへと分化したが、ほとんど神経細胞へは分化しなかった (図 1B)。

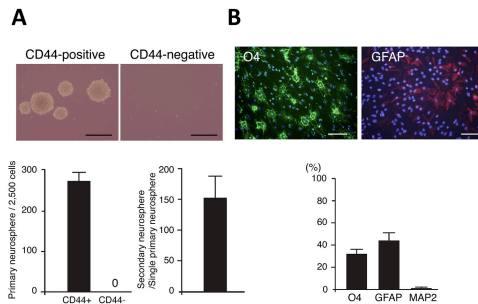


図 1

哺乳 3 日齢のマウス小脳より回収した CD44 陽性細胞に既知のオリゴデンドロサイト分化誘導因子を添加したところ、FGF-2 (fibroblast growth factor) のみがその生存を維持した (図 2A)。FGF-2 は CD44 陽性細胞

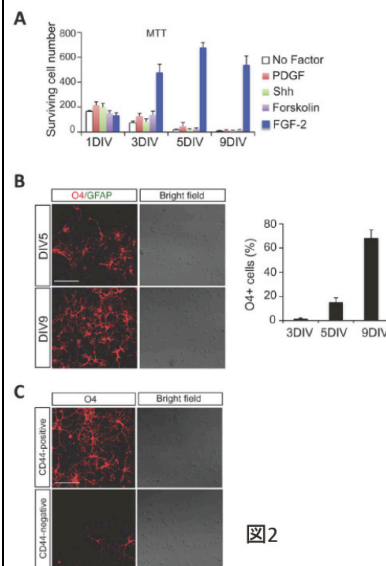


図 2

をオリゴデンドロサイトへと分化誘導した (図 2B,C)。一方で CD44 陰性細胞へ FGF-2 を添加してもオリゴデンドロサイト前駆細胞へは分化しなかった (図 2C)。

哺乳 3 日齢小脳のスライス培養に FGF-2 を添加したところ、オリゴデンドロサイト前駆

細胞の増殖を促進した。一方で PDGF (Platelet-Derived Growth Factor)にその作用は観察されなかった (図 3)。

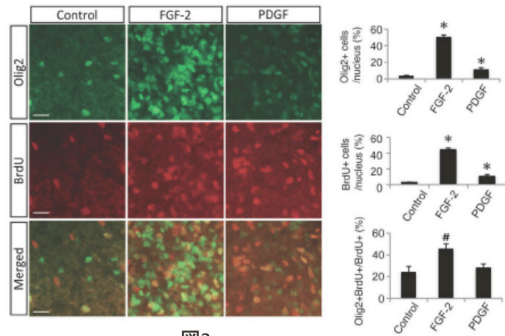


図3

また FGF-2 はオリゴデンドロサイトの分化を促進したが、アストロサイトの分化は促進しなかった (図 4)。

以上の結果より、哺乳 3 日齢の小脳白質の CD44 陽性前駆細胞は FGF-2 によってオリゴデンドロサイトへ分化誘導されることが示唆された。

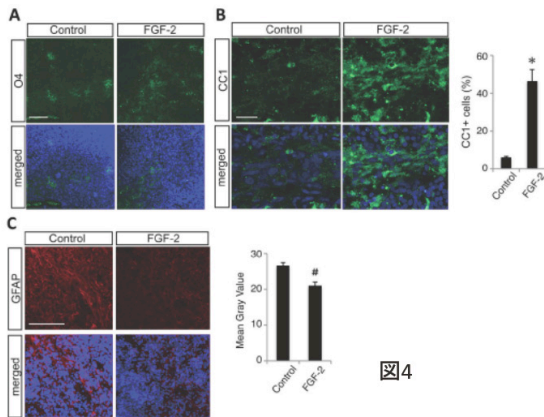


図4

次に、小脳の神経幹/前駆細胞の経時的な変化を検討した。生後 3 日齢のマウス小脳の神経幹細胞から形成された neurosphere (P3 neurosphere)はオリゴデンドロサイトとアストロサイトの両方へ分化したが (図 1, 図 5)、生後 8 日齢のマウス小脳の神経幹細胞から形成された neurosphere (P8 neurosphere)は、ほぼ全ての細胞がアストロサイトにのみ分化した (図 5)。

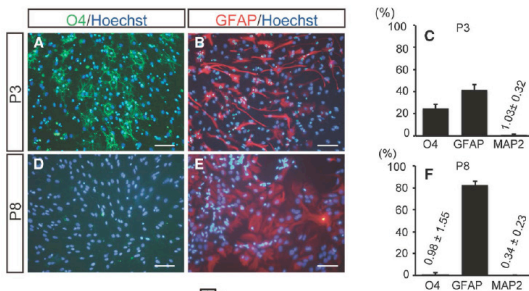


図5

神経幹/前駆細胞からオリゴデンドロサイトへの運命決定因子を探索するため、P3 neurosphere と P8 neurosphere 間で DNA マイクロアレイをおこない、P3 neurosphere で P8 neurosphere と比較し

て 3 倍以上高発現している転写因子をオリゴデンドロサイトへの運命決定を誘導する因子の候補として、スクリーニングした (図 6 A)。real time PCR によりその発現量を定量したところ、*zfp 711* (zinc finger protein 711)、*zfp 618*、*barx1*、*hoxb3* がオリゴデンドロサイトへ分化する P3 neurosphere で高発現していることが明らかになった (図 6 B)。

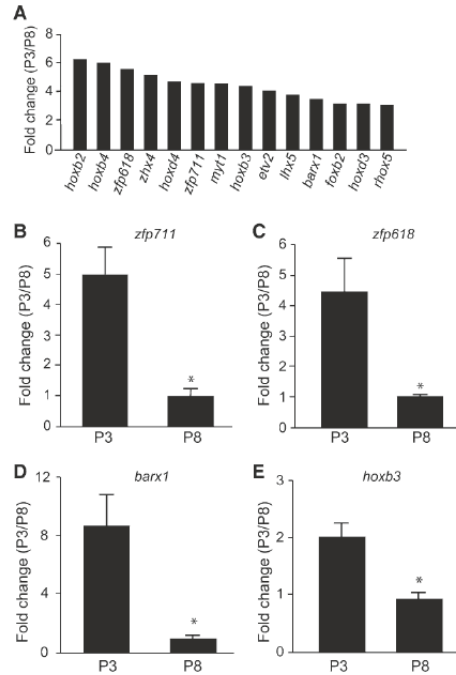


図6

これら 4 つの転写因子の哺乳 3 日齢と 8 日齢の小脳における発現パターンを *in situ hybridization* 法により解析した。*zfp711* は発現が検出できなかった。*zfp618*、*barx1*、*hoxb3* は、哺乳 3 日齢のマウス小脳の白質の細胞に発現が観察されたが、哺乳 8 日齢のマウス小脳の白質ではそれらの発現は消失していた。

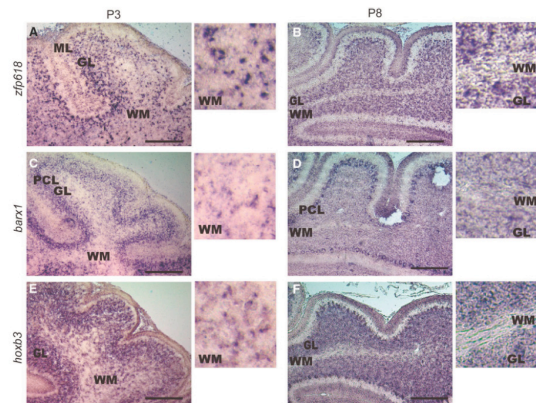


図7

以上の結果より *zfp618*、*barx1*、*hoxb3* は哺乳 3 日齢の小脳白質の前駆細胞に一過的に発現していることが明らかになり、その分化制御に関与している可能性が示唆された。

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 6 件）

- ① Naruse M, Shibasaki K, Ishizaki Y. Temporal changes in transcription factor expression associated with the differentiation state of cerebellar neural stem/progenitor cells during development. *Neurochem Res.* (2018) 43(1):205-211. 査読有 doi: 10.1007/s11064-017-2405-7.
- ② Naruse M, Ishizaki Y, Ikenaka K, Tanaka A, Hitoshi S. Origin of oligodendrocytes in mammalian forebrains: a revised perspective. *J Physiol Sci.* (2017) 67(1):63-70. 査読有 doi: 10.1007/s12576-016-0479-7.
- ③ Naruse M, Ishino Y, Kumar A, Ono K, Takebayashi H, Yamaguchi M, Ikenaka K, Hitoshi S. The dorsoventral boundary of the germinal zone is a specialized niche for the generation of the cortical oligodendrocytes during a restricted temporal window. *Cereb Cortex.* (2016) 26:2800-2810 査読有 doi: 10.1093/cercor/bhv141.
- ④ 成瀬雅衣、池田一裕、等誠司 大脳皮質オリゴデンドロサイトの起源 生体の科学 (2015) 66: 541-545 査読無 <http://medicalfinder.jp/doi/pdf/10.11477/mf.2425200346>
- ⑤ Iijima K, Kurachi M, Shibasaki K, Naruse M, Puentes S, Imai H, Yoshimoto Y, Mikuni M, Ishizaki Y. Transplanted microvascular endothelial cells promote oligodendrocyte precursor cells survival in ischemic demyelinating lesions. *J Neurochem.* (2015) 135:539-50 査読有 doi: 10.1111/jnc.13262.
- ⑥ Naruse M, Shibasaki K, Ishizaki Y. FGF-2 signal promotes proliferation of cerebellar progenitor cells and their oligodendrocytic differentiation at early postnatal stage. *BBRC.* (2015) 463: 1091-6 査読有 doi: 10.1016/j.bbrc.2015.06.063.

〔学会発表〕（計 3 件）

- ① 成瀬雅衣 柴崎貢志、島内寛也、石崎泰樹 「Microglial activation induces oligodendrogenesis from the subventricular zone after focal demyelination」第 60 回神経化学会 2017 年 9 月 7-9 日 仙台
- ② 成瀬雅衣 柴崎貢志、島内寛也、石崎泰樹 「局所脱髄によるミクログリアの活性化は神経幹細胞からのオリゴデンドロサイト前駆細胞産生を誘導する」第 40 回日本神経科学大会 2017 年 7 月 20-23 日 幕張

③ 成瀬雅衣 柴崎貢志、石崎泰樹 「FGF-2 signal promotes proliferation of cerebellar progenitor cells and their oligodendrocytic differentiation at early postnatal stage」*Neuroscience* 2015 年 10 月 17-21 日 Chicago, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

成瀬 雅衣 (NARUSE, Masae)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：60455219