

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18373

研究課題名(和文)新規Olig2結合候補因子によるオリゴデンドロサイト分化促進機構の解明とその応用

研究課題名(英文)Elucidation of molecular mechanisms underlying a novel Olig2 binding factor-mediated oligodendrocyte differentiation

研究代表者

備前 典久 (Bizen, Norihisa)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：40751053

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)：オリゴデンドロサイト(OL)発生に必須の転写因子であるOlig2の新規結合分子として同定したObp2の中枢神経系特異的ノックアウトマウスの解析から、Obp2がDNA損傷-p53経路の制御を介して、神経前駆細胞およびOL前駆細胞の維持に必須であること、Obp2のtruncated formであるOIFがOL関連遺伝子の転写を促進することでOL分化を強力に誘導することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We identified a novel Olig2 binding factor, Obp2 and analyzed central nervous system-specific Obp2 mutant mice. These mice exhibited severe loss of oligodendrocyte differentiation without motor neuron defects. We further found that Obp2 contributed to the maintenance of Olig2-positive neural precursor cells and oligodendrocyte progenitor cells through the regulation of DNA damage-p53 axis in central nervous system. We also demonstrated that OIF, which is a truncated form of Obp2 strongly induced the transcriptional activity of oligodendrocyte related genes such as PLP and MBP, and promoted oligodendrocyte differentiation in dysmyelinating mice. In conclusion, we suggest that Obp2 is indispensable for oligodendrocyte development and OIF could be useful for the therapy of demyelinating diseases.

研究分野：神経解剖学・神経発生学

キーワード：オリゴデンドロサイト Olig2 転写因子 p53 神経幹細胞 ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

オリゴデンドロサイト(OL)は中枢神経系における神経軸索にミエリンを形成することで跳躍伝導を可能にするほか、軸索保護などにも寄与する。ミエリン構造の破綻は重篤な神経異常をきたし、多発性硬化症やペリツェウス・メルツバッハー病などの脱髄疾患およびミエリン形成不全症の原因となる(Seitelberger F et al. Brain Pathol, 1995; Franklin RJ, Nat Rev Neurosci, 2002)。したがって、オリゴデンドロサイト分化機構やミエリン形成機構を明らかにすることは、これらの難治神経疾患の原因解明と、その治療法開発に繋がるのが期待されている。OL分化およびミエリン形成は Olig2、Olig1、Sox10、Mrf などの転写因子群と Shh、EGF、TH、NT-3 などの細胞外来性因子や神経軸索からのシグナルが密にクロストークすることで促進される。これらの因子は OL 発生に必須であることが報告されているが、脱髄疾患モデル動物や ES 細胞および iPS 細胞を用いた gain-of-function 実験では効率的な OL 分化誘導が実現されているとはいえない状況である(Goldman SA and Kuypers NJ et al. Development 2015)。このような背景から、OL 分化およびミエリン形成を効率的に誘導する新規分子の同定とそのメカニズムの解明が求められていた。我々は予備実験として、マウス胎仔脳における酵母ツーハイブリッドスクリーニングを行い、Olig2 と結合する新規分子の探索を試みた結果、複数の候補分子を同定することに成功した。その一つである Obp2 (Olig2-binding protein 2)は RNA プロセッシングや転写調節に関与する分子として知られている。興味深いことに、Obp2 のスクリーニングで同定された領域を発生期ニワトリ胚および胎仔マウス脳に導入したところ、多くのミエリン関連遺伝子の発現が顕著に誘導された。胎生期は成熟 OL が産生されない時期であるため、Obp2 あるいは OIF (oligodendrocyte inducing factor) と名づけた Obp2 の一部領域が OL 分化を強力かつ効率的に誘導する有用な分子となる可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究は Obp2 および OIF が生体レベルで OL 分化およびミエリン形成を制御することを明らかにし、その分子メカニズムを解明すること、これらの分子がミエリン形成不全症および脱髄疾患においても有力な標的候補分子であると示すことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) Obp2 の全身ノックアウトマウスは初期胚の段階で致死となるため、Obp2-flox マウスと Nestin-Cre マウスを掛け合わせることで、

中枢神経系特異的 Obp2 コンディショナルノックアウト(cKO)マウスを作製し、OL 発生への影響を組織学および分子生物学的手法により解析した。

(2) Obp2 cKO マウスにおける OL 発生異常の原因となる分子動態を特定するために、RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行った。胎生 14.5 日目対照マウス、Obp2 cKO マウスそれぞれ 2 匹の脊髄から mRNA を抽出し、ライブラリーを作製後、Illumina HiSeq 4000 でシーケンスを行った。

(3) OIF による OL 分化促進作用が OL 分化異常を呈するマウスにおいても発揮されるか検討した。OL 分化異常マウスとして Olig2 ノックアウト(KO)マウスと、ミエリン形成不全マウスとして知られる Shiverer マウスを使用した。Olig2 KO マウスでは、胎生 14.5 日目に子宮内エレクトロポレーション法を用いて大脳皮質に OIF プラスミドと GFP プラスミドを共導入し、胎生 17.5 日目に脳を固定して凍結切片を作製後、in situ hybridization 法により、OL 関連遺伝子群の発現を確認した。また、6-7 週齢の Shiverer マウスの脳梁内の OL 前駆細胞にアデノ随伴ウイルス (AAV5-IRES-GFP および AAV5-OIF-IRES-GFP)を感染させた。5 日後、脳を固定して凍結切片を作製後、OL 関連マーカーと GFP 抗体による二重免疫染色を行った。

(4) OIF による OL 分化促進が、関連遺伝子の直接的な転写活性化によるものか検討するため、OL 関連遺伝子であるマウス PLP および MBP プロモーターにルシフェラーゼ遺伝子を連結したコンストラクトと OIF プラスミドを COS7 細胞株に導入し、レポーターアッセイを行った。

(5) OIF の OL 分化を促進する責任領域の絞込みを行った。予備実験より、マウス OIF がニワトリ胚脊髄における OL 関連遺伝子発現を誘導したことを踏まえ、ニワトリ由来の OIF に相当する Obp2 の C 末端領域を子宮内エレクトロポレーション法により胎生期マウス大脳皮質に導入した。さらに、マウス OIF のうち、ニワトリ OIF と相同性の高い領域の C 末端側から 60 アミノ酸をコードする領域(cOIF)および相同性の低い N 末端側から 44 アミノ酸をコードする領域(nOIF)を選定し、それぞれを胎生期マウス大脳皮質に導入した。

4. 研究成果

(1) 中枢神経系特異的 Obp2 cKO マウスにおける OL 発生異常の解析

中枢神経系における Obp2 の発現パターンを in situ hybridization 法により解析した。

胎生 11.5 日目の大脳および脊髄において、Obp2 は脳室帯周囲すなわち未分化な神経前駆細胞で高い発現が認められた。

Obp2 は広範囲に発現しているため、中枢神経系特異的 Obp2 コンディショナルノックアウト (Nestin-Cre:Obp2 cK0) マウスを作製した。このマウスは生後まもなく死亡した。出産直前である胎生 18.5 日目のマウス脳では、広範囲の出血と、大脳皮質の希薄化および大脳基底核原基の欠損が認められた。一方、脊髄では全体的な萎縮が認められたが、組織構造は保たれていた。

Obp2 cK0 マウスの OL 発生への影響について検討するため、胎生 17.5 日目脊髄の OL 関連遺伝子の発現を in situ hybridization 法を用いて確認したところ、Olig2, Olig1, Pdgfr, Cnp などの OL 関連遺伝子群が顕著に低下していた(図 1)。

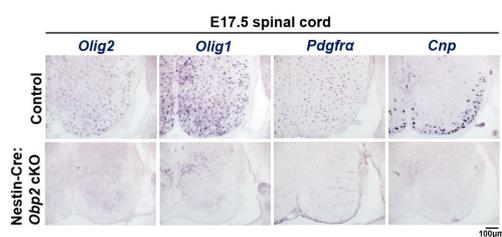


図1 胎生17.5日目中脳神経系特異的Obp2欠損マウス脊髄におけるオリゴデンドロサイト発生異常

OL 発生異常が生じる時期を特定するため、マウス脊髄において OL 発生が始まる直前の胎生 11.5 日目から胎生 17.5 日目で、Olig2 および Pdgfr の発現を免疫染色および in situ hybridization 法を用いて検討した。その結果、Obp2 cK0 マウスの脊髄では、OL 発生開始後の胎生 13.5 日目から Olig2 および Pdgfr の発現が有意に減少した。一方、胎生 11.5 日目から 14.5 日目にかけて、運動ニューロンマーカーである HB9 および Islet1/2 陽性細胞数に有意な差はなかった。

OL 前駆細胞が減少した原因を細胞死あるいは細胞周期の停止であると考え、胎生 14 日目脊髄を用いて細胞死マーカーである Cleaved caspase-3 あるいは細胞周期マーカーである Ki67 を、Olig2 と二重免疫染色したところ、Olig2 陽性細胞における Cleaved caspase-3/Olig2 共陽性細胞率が Obp2 欠損脊髄で有意に増加した。一方、Ki67/Olig2 共陽性細胞率に顕著な変化は認められなかった。

Obp2 欠損マウスにおける OL 発生異常の分子的背景を特定するため、RNA シークエンスによるトランスクリプトーム解析を行った。対照マウス群と比較し、Obp2 欠損マウス群で発現が有意に減少していた遺伝子は 61 個、増加していた遺伝子は 64 個であった。Gene ontology 解析の結果、同定した遺伝子のうち、発現が減少した遺伝子群は OL 関連遺伝

子が最上位にランクされ、発現が増加した遺伝子群は DNA 損傷-p53 経路の下流遺伝子が最上位にランクされた。これらの遺伝子群の変動はリアルタイム PCR でも確認した。

の結果を踏まえ、Obp2cK0 マウスにおける OL 前駆細胞の顕著な減少は、DNA 損傷-p53 経路の活性化による細胞死が主たる原因であることが推測されたため、DNA 損傷マーカーである H2AX または p53 と Olig2 との二重免疫染色を行ったところ、胎生 13.5 日目 Obp2 cK0 マウス脊髄において、Olig2 陽性細胞における H2AX/Olig2 共陽性率、p53/Olig2 共陽性率ともに有意に増加していた。さらに、p53 経路の下流遺伝子である p21 および Bax の発現が顕著に上昇していることも in situ hybridization 法により確認した。

(2) OIF による OL 分化促進機構の解析

OIF による OL 分化促進作用が OL 分化異常マウスでも発揮するかを検討した。OIF を胎生期 Olig2 KO マウスの大脳皮質に強制発現させたところ、野生型マウスの結果と同様に、PLP や MBP などのミエリン関連遺伝子群の顕著な発現上昇が認められた。次に、ミエリン形成不全マウスである 6-7 週齢 Shiverer マウスの脳梁および大脳皮質に OIF を導入したところ、CC-1 陽性オリゴデンドロサイトの数の増加が確認された。

OIF によるミエリン関連遺伝子の発現促進が直接的な転写活性によるものかを検討するため、マウス MBP および PLP プロモーター連結ルシフェラーゼ遺伝子を用いたレポーターアッセイを行った。その結果、OIF 強制発現により、PLP および MBP プロモーターの活性が有意に上昇した(図 2)。

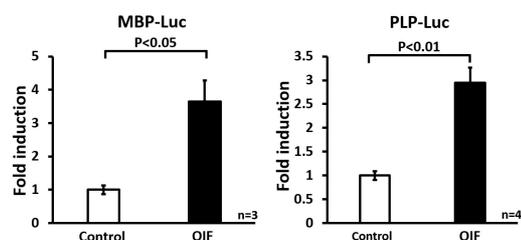


図2 ミエリン関連遺伝子プロモーターにおけるルシフェラーゼアッセイ。Cos-7細胞にOIFを導入すると、各ミエリン関連遺伝子プロモーター活性が有意に増強した。

ニワトリ由来 Obp2 の C 末端(96 アミノ酸)をコードする領域を胎生期マウス大脳皮質に導入したところ、OIF と同様にミエリン関連遺伝子群の顕著な発現亢進が認められた。このことから、マウス由来 OIF とニワトリ由来 OIF には OL 分化促進に関与する共通のドメインが存在することが示唆された。そこでマウス OIF を、ニワトリ OIF と相同性の高い領域(C 末端側から 60 アミノ酸; cOIF)と低い領域(N 末端側から 44 アミノ酸; nOIF)に分け、それぞれを胎生期マウス大脳皮質に強制発

現させた。その結果、c01F はミエリン関連遺伝子の発現が顕著に亢進したが、n01F では認められなかった。

以上の結果より、中枢神経系における OL 発生に必須の転写因子 Olig2 に結合する新規分子 Obp2 は DNA 損傷-p53 経路を制御することで Olig2 陽性神経前駆細胞および OL 前駆細胞の増殖または維持に寄与していることが示唆された。近年、Olig2 は神経前駆細胞およびグリオーマにおける p53 の活性化を抑制することで増殖を維持することが報告されている (Sun Y et al. Neuron 2011; Mehta S et al. Cancer Cell 2011)。よって、Obp2 も Olig2 による p53 活性化抑制機構に協調している可能性がある。

Obp2 の truncated form である 01F は、少なくとも一部のミエリン関連遺伝子においては、それらのプロモーターを活性化することで転写を促進することがわかった。さらに、01F は OL 前駆細胞から OL への分化を顕著に促進することを細胞レベルでも示された。Obp2 欠損マウスにおけるトランスクリプトーム解析で、OL 分化促進に関与する遺伝子群の低下も検出されたことから、01F が Obp2 の OL 分化に関する責任領域であることが考えられる。今後は、種々のミエリン形成不全マウスおよび脱髄疾患モデルマウスを用いて、01F の OL 分化促進効果を評価することを計画している。また、01F の OL 分化関連ドメインの絞込みと、01F 分子の最小化を計ることで、脱髄性難治神経疾患のペプチド医薬開発に向けた足がかりとしたい。

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 3 件)

Watanabe K, Bizen N, Sato N, Takebayashi H. Endoplasmic Reticulum-Localized Transmembrane Protein Dpy19L1 Is Required for Neurite Outgrowth. PLoS One, 11(12), 2016. 査読有

Muona M, Ishimura R, Laari A, Ichimura Y, Linnankivi T, Keski-Filppula R, Herva R, Rantala H, Paetau A, Pöyhönen M, Obata M, Uemura T, Karhu T, Bizen N, Takebayashi H, McKee S, Parker MJ,

Akawi N, McRae J, Hurles ME; DDD Study, Kuismin O, Kurki MI, Anttonen AK, Tanaka K, Palotie A, Waguri S, Lehesjoki AE, Komatsu M. Biallelic Variants in UBA5 Link Dysfunctional UFM1 Ubiquitin-like Modifier Pathway to Severe Infantile-Onset Encephalopathy. Am J Hum Genet., 99(3):683-694, 2016. 査読有

Tabu K, Muramatsu N, Mangani C, Wu M, Zhang R, Kimura T, Terashima K, Bizen N, Kimura R, Wang W, Murota Y, Kokubu Y, Nobuhisa I, Kagawa T, Kitabayashi I, Bradley M, Taga T. A Synthetic Polymer Scaffold Reveals the Self-Maintenance Strategies of Rat Glioma Stem Cells by Organization of the Advantageous Niche. Stem Cells, 34(5):1151-62, 2016. 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

備前典久、矢野真人、周麗、崎村建司、竹林浩秀。新規 Olig2 結合因子によるオリゴデンドロサイト発生機構の解明。第 123 回日本解剖学会総会全国学術集会 日本医科大学/日本獣医生命科学大学(東京都武蔵野市) 2018 年 3 月 28-30 日。

備前典久、矢野真人、周麗、崎村建司、竹林浩秀。新規 Olig2 結合因子によるオリゴデンドロサイト発生機構の解析。第 23 回グリアクラブ 小樽朝里クラッセホテル (北海道小樽市) 2018 年 1 月 30 日-2 月 1 日。

Norihisa Bizen, Masato Yano, Li Zhou, Manabu Abe, Kenji Sakimura, Hirohide Takebayashi. Identification of a novel Olig2-binding factor indispensable for oligodendrogenesis in central nervous system. 2017 年度次世代脳プロジェクト 冬のシンポジウム 一橋大学 一橋講堂 学術総合センター(東京都千代田区) 2017 年 12 月 19 日-21 日。

備前典久、松岡 崇史、Hossain MD Ibrahim、周麗、崎村 建司、竹林 浩秀。

新規Olig2結合因子によるオリゴデンドロサイト分化機構の解析. 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会 長崎大学医学部(長崎県長崎市) 2017年3月28-30日.

6. 研究組織

(1)研究代表者

備前 典久 (BIZEN, Norihisa)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号：40751053