

令和元年6月21日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15168

研究課題名(和文) グリア細胞死に起因する脳内炎症の制御による脳機能改善

研究課題名(英文) Regulation of inflammation in brain induced by glial cell death.

研究代表者

竹林 浩秀 (Takebayashi, Hirohide)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：60353439

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究にて、ミエリン形成不全を示す jimpy マウスの変異アレルを C57BL/6 マウスに戻し交配をおこない、B6: jimpy マウスを作成した。また、免疫系細胞を検出する抗体マーカーによる染色条件の検討および各種サイトカインなどを単離する in situ プローブを作成し、様々な変異マウスの炎症について組織学的に解析できるようにした。jimpy マウスと翻訳開始因子の変異マウスとの交配により二重変異マウスを作成すると症状が悪化することがわかった。オリゴデンドロサイト系譜の新規病態として、dystonia musculorum マウスにおいて、オリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖低下を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で、グリア細胞に異常を示す jimpy マウスなどの遺伝子変異マウスを用いて、その神経病態を炎症反応を含めて明らかになった。さらに、脳内の炎症を制御することにより、神経症状および全身状態がどのように変化するかについて解析をおこない、ミエリン形成不全などグリア異常症の病態を明らかにするとともに、その治療戦略の基盤となる知見を得られた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we backcrossed jimpy mutant mice to C57BL/6 mice to generate B6: jimpy mouse. In addition, we established immunohistochemical staining to detect immune cells and in situ probes of various cytokines. Using these staining methods, we can detect brain inflammation on tissue sections. We also crossed jimpy mice with a mutant mice of translation initiation factor, and then, confirmed more severe phenotype than single mutant mice. Finally, we demonstrated a novel oligodendrocyte pathology in dystonia musculorum mice, in which proliferation of oligodendrocyte progenitor cells are reduced at 3 weeks old.

研究分野：神経化学

キーワード：ミエリン形成不全 脳内炎症 オリゴデンドロサイト

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

*Jimpy* マウスは、ミエリンタンパクをコードする *Plp* 遺伝子に変異があり、ミエリン形成不全の一つ、Pelizeus-Melzbacher 病 (PMD) の病態モデルマウスである。二重変異をもつ *Tabby-jimpy* マウスの脳内では、オリゴデンドロサイト細胞死がおこり、振戦や、音などに対する驚愕反応、早期の個体死がおこるが、脳内炎症がこれらの症状発現にどの程度影響しているのかは不明である。

## 2. 研究の目的

まず *Tabby-jimpy* マウスから *Tabby* マウスと *jimpy* マウスを分離して、*jimpy* マウスを C57BL/6 マウスに戻し交配を行う。B6: *Jimpy* マウスや、他のグリア細胞死を引き起こす病態を示すマウスを用いて、脳内炎症がグリア細胞起因性の神経症状にどのような影響を与えるのかを明らかにする。そのために、脳内炎症を変化させることにより、表現型がどのように変化するかについて調べる。

## 3. 研究の方法

まず *Tabby-jimpy* メスマウスと野生型の雄マウスを掛け合わせて、*Tabby* マウスと *jimpy* マウスを分離する。続いて *jimpy* マウスを始めとして、グリア異常を起こす変異マウスを用いて、マウス遺伝学や薬理学的手法により脳内炎症を変化させ、表現型の変化を調べる。

## 4. 研究成果

*Tabby-jimpy* マウスとして飼育していた二重変異マウスを *Tabby* 遺伝子座と *jimpy* 遺伝子座に分離した。変異アレルの検出のために、*Tabby* 変異アレルと野生型アレルを区別する PCR 遺伝子診断のプロトコルを確立した。*jimpy* は、これまで通り、PCR 法と restriction fragment length polymorphism (RFLP) を組み合わせた方法にて遺伝子診断を行った。*Jimpy* マウスを C57BL/6 系統へのバッククロスを行い 10 世代以上のバッククロスを完了させた。また、ICR マウスへのバッククロスも行い、こちらも 10 世代以上のバッククロスも完了させた。B6: *jimpy* マウスは、近交系コンジェニック系統であり、ICR: *jimpy* マウスは、非近郊系であるが子供の数が多く、目的に応じて使い分けることが可能である。*Tabby* マウス、B6: *jimpy* マウス、ICR: *jimpy* マウスの 3 系統のマウスについては、受精卵凍結を行った。バッククロスには時間がかかるために、まずは、*Tabby-jimpy* マウスの脳内病態をさまざまなグリア細胞のマーカーにて解析し、論文発表を行った (Ikeda et al., 2018)。さらに、T 細胞、B 細胞をはじめとする免疫系細胞をマーカー抗体を用いて組織学的に検出する染色法を確立した。これらの実験により、様々な脳疾患における免疫細胞の関与を調べられるようになった。また、様々なサイトカインの *in situ* hybridization による検出プローブを作成して、免疫系および炎症の関与を網羅的に調べられるようにした。*Tabby-jimpy* マウスにおいて観察されていた驚愕反応は、アレルの分離とともに *jimpy* マウスでは観察されなくなったので、*jimpy* マウスに対しては聴覚系の驚愕反応に関する生理学実験を行わないことにした。

オリゴデンドロサイトへの脆弱性を与えるために、翻訳開始因子に点突然変異を持ち、グリアに病変があることが知られている自然発生ミュータントマウスと交配を行い、*jimpy* マウスとの二重変異マウスを作成した。メスマウスの二重変異マウスでは、オリゴデンドロサイトの約半数が死滅するので、症状が悪化することが予想された。実際に、二重変異マウスの方がより重い症状が観察され、このマウスの病態の詳細については、継続して解析を行っている。

別の変異マウスの解析として、*dystonin* 遺伝子の変異により運動症状と感覚神経細胞死を引き起こす *dystonia musculorum* (*dt*) マウスにおけるオリゴデンドロサイト系譜細胞の病態について解析を行った (Hossain et al., 2018)。3 週齢の *dt* マウスの脳内においては、オリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖が低下しており、さらに、Olig2 陽性のオリゴデンドロサイト系譜細胞の数も低下していた。このオリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖低下という表現型は、初めて報告される表現型であり、*Dst* 遺伝子の細胞自律的影響によるものか、あるいは、細胞非自律的影響によるものか、今後、詳細に解析する予定である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

Deletion of exons encoding carboxypeptidase domain of *Nna1* results in Purkinje cell degeneration (*pcd*) phenotype. (2018) Zhou L, Hossain MI, Yamazaki M, Abe M, Natsume R, Konno K, Kageyama S, Komatsu M, Watanabe M, \*Sakimura K, \*Takebayashi H. **J Neurochem** 147: 557-572. doi: 10.1111/jnc.14591. (査読有)

Motoneuron degeneration in the trigeminal motor nucleus innervating masseter muscle in *dystonia musculorum* mice. (2018) Hossain MI, Horie M, Yoshioka N, Kurose M, Yamamura K, \*Takebayashi H. **Neurochem Int** 119: 159-170. doi: 10.1016/j.neuint.2017.10.009. (査読有)

Reduced proliferation of oligodendrocyte progenitor cells in the postnatal brain of *dystonia*

*musculorum* mice. (2018) Hossain MI, Horie M, \*[Takebayashi H](#). **Neurochem Res** 43: 92-100. doi: 10.1007/s11064-017-2342-5. (査読有)

Histological detection of dynamic glial responses in the dysmyelinating *Tabby-jimpy* mutant brain. (2018) Ikeda M, Hossain MI, Zhou L, Horie M, Ikenaka K, Horii A, \*[Takebayashi H](#). **Anat Sci Int** 93: 119-127. doi: 10.1007/s12565-016-0383-5. (査読有)

BPAG1 in muscles: structure and function in skeletal, cardiac and smooth muscle. (2017) Horie M, Yoshioka N, \*[Takebayashi H](#). **Semin Cell Dev Biol** 69: 26-33. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.07.016. (査読有)

単純性表皮水疱症モデルとしての新規 *Dystonin/Bpag1* 遺伝子変異マウスの解析 (2017) 栗山桃奈, 吉岡望, 加畑雄大, 牛木辰男, 吉木淳, Thomas J Sproule, 阿部理一郎, \*[竹林浩秀](#) **新潟医学会雑誌** 131: 655-663. (査読有)

ジストニア様の運動症状と感覚神経変性を示す *dystonia musculorum* マウスの病態解析 (2017) \*[竹林浩秀](#) **生化学** 89: 756-760. (査読無)

Characterization of novel *dystonia musculorum* mutant mice: implications for central nervous system abnormality. (2016) Horie M, Mekada K, Sano H, Kikkawa Y, Chiken S, Someya T, Saito K, Hossain MD, Nameta M, Abe K, Sakimura K, Ono K, Nambu A, Yoshiki A, \*[Takebayashi H](#). **Neurobiol Dis** 96: 271-283. doi: 10.1016/j.nbd.2016.09.016. (査読有)

[学会発表](計 17 件)

1. 新規 Olig2 結合因子によるオリゴデンドロサイト前駆細胞維持機構の解明  
備前典久、矢野真人、周麗、阿部学、崎村建司、[竹林浩秀](#)  
第 124 回日本解剖学会総会全国学術集会 2019.3.27-29.
2. Analysis of the effect of a novel Olig2-Binding Factor on the oligodendrocyte differentiation and myelination in central nervous system.  
Norihisa Bizen, Anna Simankova, Nobuhiro Ohno, Manabu Abe, Kenji Sakimura, [Hirohide Takebayashi](#)  
The 66th NIBB Conference ABiS International Symposium  
Cutting Edge Techniques of Bioimaging 2019.2.17-18.
3. Effects of a novel Olig2-binding protein 2 (Obp2) deficiency on the oligodendrocytes differentiation and myelination in murine spinal cord.  
Anna Simankova, Norihisa Bizen, Manabu Abe, Kenji Sakimura, [Hirohide Takebayashi](#)  
N-hybrid conference 2019.2.9.
4. Motoneuron degeneration in the trigeminal motor nucleus and atrophy of the masseter muscle in *Dystonia musculorum* mice.  
[Hirohide Takebayashi](#), MD Ibrahim Hossain, Masao Horie, Nozomu Yoshioka, Masayuki Kurose, Kensuke Yamamura  
FENS2018 2018.7.7.-11. Berlin, Germany
5. Neural and systemic pathogenesis of *dystonia musculorum* mice.  
[Hirohide Takebayashi](#)  
2018 Korea-Japan Joint Symposium on Neurodevelopment. 2018.6.8-10. Jeju-do, Korea  
Invited speaker
6. 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  
備前典久、周麗、崎村建司、[竹林浩秀](#)  
第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2018.3.28-30.
7. *Dystonin* 遺伝子変異マウスにおける腎病変の組織学的解析  
降旗敏熙、吉岡望、[竹林浩秀](#)  
第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2018.3.28-30.
8. 単純性表皮水疱症モデルとしての新規 *Dystonin/Bpag1* 遺伝子変異マウスの解析  
栗山桃奈、吉岡望、加畑雄大、牛木辰男、吉木淳、Thomas Sproule、阿部理一郎、[竹林浩秀](#)  
第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2018.3.28-30.
9. A novel Olig2-binding factor is indispensable for oligodendrocyte development in central nervous system.  
[Hirohide Takebayashi](#), Norihisa Bizen  
第 60 回日本神経化学学会大会 2017.9.7-9.
10. Identification and characterization of novel *dystonia musculorum* mutant mice.  
[Hirohide Takebayashi](#), Masao Horie, Kazuyuki Mekada, Hiromi Sano, Yoshiaki Kikkawa, Satomi Chiken, Takuro Someya, Keisuke Saito, M Ibrahim Hossain, Masaaki Nameta, Kuniya Abe, Kenji Sakimura, Katsuhiko Ono, Atsushi Nambu, Atsushi Yoshiki  
2017 ISN-ESN meeting 2017.8.20.-24. Le Palais des Congres de Paris, Paris, France
11. オリゴデンドロサイト最終分化におけるミエリン形成機構の解析  
松岡崇史、備前典久、池田正直、周麗、崎村建司、[竹林浩秀](#)  
第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2017.3.28-30.
12. 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  
備前典久、松岡崇史、Hossain MD Ibrahim、周麗、崎村建司、[竹林浩秀](#)

第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2017.3.28-30.

13. 新規自然発生 dystonia musculorum マウスの樹立と中枢神経系についての組織学的解析  
堀江正男、日加田和之、佐野裕美、吉川欣亮、知見聡美、染谷拓郎、斎藤慶介、ホサイン MD  
イブラヒム、行田正晃、阿部訓也、崎村建司、小野勝彦、南部篤、吉木淳、竹林浩秀

第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2017.3.28-30.

14. Preoptic area generates oligodendrocyte precursor cells in the mouse optic nerve.

Katsuhiko Ono, Kengo Yoshii, Hitoshi Gotoh, Tadashi Nomura, Hiroyuki Tominaga, Hirohide Takebayashi, Kazuhiro Ikenaka

Cold Spring Harbor Asia Conference 2016.12.5.-9. Dushu Lake Conference Hotel, Suzhou, China

15. Reactive astrocytes observed in the brain of *dystonia musculorum* mice.

ホサインイブラヒム、堀江正男、行田正晃、小野勝彦、竹林浩秀

第 59 回日本神経化学学会大会 2016.9.8-10.

16. Examination for possible involvement of the vestibular and reticular nuclei in the emergence for dystonia-like movements in Dystonin-deficient mice.

Masao Horie, Hiromi Sano, Satomi Chiken, Kenta Kobayashi, Katsuhiko Ono, Atsushi Nambu, Hirohide Takebayashi

第 39 回日本神経科学大会 2016.7.20-22.

17. Establishment of conditional *dystonin* allele for analysis of *dystonia musculorum* mice.

Hirohide Takebayashi, M Ibrahim Hossain, Hiromi Sano, Satomi Chiken, Kenta Kobayashi, Atsushi Nambu, Masao Horie

10<sup>th</sup> FENS 2016.7.2-6. Bella Center, Copenhagen, Denmark

〔図書〕(計 1 件)

脳神経化学 森泰生・尾藤晴彦 編

第 1 章 脳はどのようにできているか

竹林浩秀

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

受賞

第 70 回 新潟日報文化賞 (学術部門)

「グリア細胞の発生と機能に関する研究」

竹林浩秀

平成 29 年 11 月 1 日

アウトリーチ活動

青森高校 ドリーム講義

医学部医学科卒業後の多様なキャリアパス

平成 30 年 6 月 14 日

ホームページ等

新潟大学大学院 医歯学総合研究科 神経生物・解剖学

<https://www.med.niigata-u.ac.jp/an2/index.html>

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

堀江 正男

Masao Horie

鹿児島大学大学院 医歯学総合研究科・准教授

ホサイン MD イブラヒム

MD Ibrahim Hossain

新潟大学大学院 医歯学総合研究科・大学院生

ジャハンギルナガル大学・准教授

備前 典久  
Norihisa Bizen  
新潟大学大学院 医歯学総合研究科・助教

シマンコワ アンナ  
Anna Simankova  
新潟大学大学院 医歯学総合研究科・大学院生

周 麗  
Lei Zhou  
新潟大学大学院 医歯学総合研究科・特任助教

森-落合 由紀子  
Yukiko Mori-Ochiai  
新潟大学 医学部・研究補助員

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。