

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：82404

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300204

研究課題名(和文) 脊髄損傷後の機能回復における再髄鞘化の役割とその制御

研究課題名(英文) Remyelination strategy in treatment of injured spinal cord

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)・研究所 運動機能系障害研究部・研究部長

研究者番号：00392192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円、(間接経費) 3,660,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄損傷の治療介入の対象の一つと考えられている再髄鞘化について検討した。再髄鞘化を担うオリゴデンドロサイトの成熟過程は転写因子Ascl1-Hes5によって発生の段階では負に制御されているが、成体脊髄ではこの機構が働いていないことが明らかとなった。またマウス脊髄損傷モデルにおいて再髄鞘化を抑制することは運動機能回復の低下をもたらすことから、再髄鞘化は脊髄損傷後の機能回復において重要な要素であることが示された。今後、オリゴデンドロサイトの機能制御メカニズムに留意した治療法の開発が重要となる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the mechanisms of remyelination, which is one of therapeutic targets in spinal cord injury. We found that maturation of oligodendrocytes, myelin forming cells in spinal cord, is negatively regulated by Ascl1-Hes5 axis in developmental stage, but the progenitors in adult spinal cord do not express Hes5, indicating they are relatively mature progenitors. Suppression of remyelination in mouse spinal cord injury model leads to deficit in motor function recovery, which indicates the importance of remyelination processes. Taken together, to establish therapeutic approach to remyelination, we should consider the mechanisms governing oligodendrocyte functions.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：オリゴデンドロサイト 協調運動 細胞培養

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷は四肢に高度の麻痺を残し患者に重い障害を強いるのみでなく、それを支援する家族・医療・福祉の社会的コストも大きいため、治療法の開発が求められている。脊髄損傷では脱髄病変が含まれることが、これまで多数の研究施設より報告されてきた(Siegenthaler M et al. J. Neurotrauma 2007)。脱髄は神経回路の伝導障害を起こし、運動・感覚障害をもたらすと考えられ、脱髄病変への再髄鞘化を意図した治療アプローチがこれまで試みられ、実際に嗅覚神経の髄鞘形成細胞の移植(中国)や、中枢でその役割を担うオリゴデンドロサイトの前駆細胞移植(米国)が臨床現場で一部行われるようになっていく。

こうした体外からの移植細胞によって再髄鞘化を誘導する試みの一方で、脊髄の内部にも再髄鞘化の起点となる細胞ソースが存在することが分かっている。脱髄変性疾患の一つである多発性硬化症では、成人脊髄組織中に存在するオリゴデンドロサイト前駆細胞(Oligodendrocyte Progenitor Cell: 以下 OPC)が病変の再髄鞘化に寄与する。また、げっ歯類脊髄損傷モデルでは損傷部周囲で OPC や、後根神経節由来のシュワン細胞(末梢神経の髄鞘形成細胞)が増殖し、その一部は再髄鞘化を行っていることが報告されている(Tripathi R et al. Glia 2007)。しかし、OPC がどのようなメカニズムで成熟し髄鞘を形成するのか、また再髄鞘化が脊髄損傷の回復過程、治療経過においてどの程度の影響を及ぼすのかについての知見は限定的である。特に、こうした内在性の OPC を治療介入の対象と考えた際、細胞内の機能制御メカニズムの理解は極めて重要な知見となる。

2. 研究の目的

本研究では OPC の分化成熟の制御因子を明らかにするとともに、げっ歯類(胸髄)脊髄損傷

モデルを用い、再髄鞘化の制御を試みることで、機能回復における再髄鞘化の重要性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) オリゴデンドロサイト初代培養

胎生 15 日齢マウス的大脑皮質を採取し、栄養因子(bFGF, PDGF)存在下に培養した。分化誘導においては栄養因子を除去し、サイロイドホルモンの添加を行った。実験によってはレトロウイルスによる遺伝子導入にて目的の転写因子(Ascl1 など)の発現を誘導した。

(2) 株化細胞による検討

グリア系列の株化細胞として CG4-細胞と U87 細胞の実験を行った。CG4 細胞は接着条件で培養し、適宜液性因子の添加や遺伝子導入を行い、生化学的解析を行った。一方、U87 細胞は浮遊培養条件で Neurosphere 法の手法で培養を行った。

(3) マウス脊髄損傷モデルでの実験

成体マウス脊髄損傷モデルとして 8 週齢のマウスを用い、市販の脊髄損傷モデル作成機(IH インパクト)によって圧座損傷を作成した。再髄鞘化は受傷後に分裂して生まれた細胞(BrdU 陽性)であり、かつ成熟オリゴデンドロサイトのマーカーを発現(CC1 陽性)する細胞として同定した。運動機能は歩行機能を評価する BMS スコアを用いて評価した。

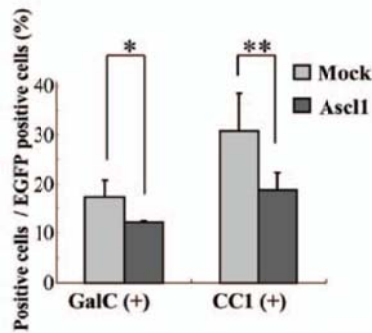
4. 研究成果

(1) オリゴデンドロサイトによる再髄鞘化の制御因子の検討

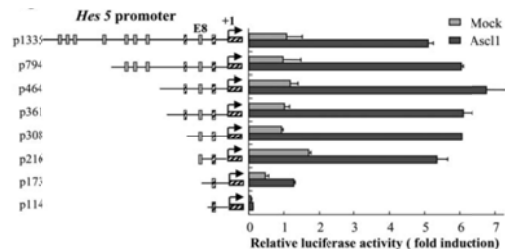
本研究ではこれまで機能が十分に分かっていなかった転写因子 Ascl1 に焦点をあて、オリゴデンドロサイトの成熟に対する機能とそのメカニズムを検討した。培養オリゴデンドロサイト(株化細胞である CG4-16 細胞を使用)に Ascl1 を過剰発現させ、

変動する遺伝子を DNA microarray 法と候補遺伝子の解析の両面から解析したところ、転写因子の一つである Hes5 が Ascl1 によって誘導される可能性が見出された。

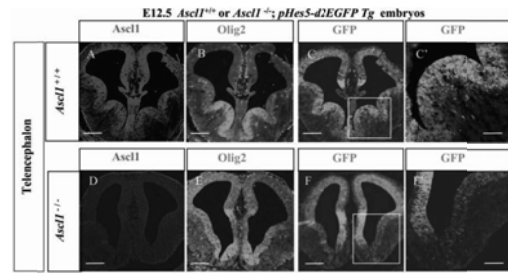
Hes5 はオリゴデンドロサイトの分化を抑制する因子として報告されており、実際に Ascl1 を細胞に導入すると、Hes5 の発現誘導とともに、分化が抑制される現象が観察された。



さらに Hes5 の発現調節領域の解析を行ったところ Ascl1 の結合モチーフである E-Box 配列が複数存在し、その中で転写開始点に最も近い部位が Ascl1 の結合部位であることをルシフェラーゼ解析とクロマチン免疫沈降法によって明らかにすることができた。



一方、動物個体の中での Ascl1 の作用を解析する為に、Hes5 の発現を同定することを可能にする pHes5-d2EGFP トランスジェニックマウスを京都大学影山教授より提供していただいた。発生段階の終脳を観察すると、将来的にオリゴデンドロサイトを産生する領域において Ascl1 の発現と Hes5 の発現が共局在することが確認された。さらに Ascl1 のノックアウトマウスを用いて、その発現を抑制したところ、Hes5 の発現が、終脳および脊髄において減弱することが確認された。すなわち、培養細胞における知見と同様に、Ascl1 が Hes5 の発現を誘導していることが個体レベルでも確認された。

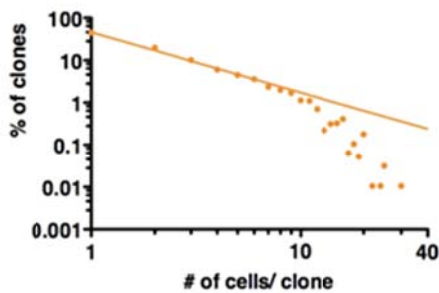


さらに、マウス脊髄損傷モデルにおいてこうした分子メカニズムがどのように機能しているかを確認する為に、pHes5-d2EGFP トランスジェニックマウスを用いて脊髄圧挫モデルを作成した。脊髄損傷に応じて脊髄内では NG2 陽性のオリゴデンドロサイト前駆細胞が増殖することが知られている。こうした前駆細胞で Hes5 の発現を観察したところ、明らかな発現は観察されなかった。オリゴデンドロサイトの分化過程の成熟期においては Ascl1 は成熟を促進する働きをもつと報告されており、この時点では Ascl1 が発現しても Hes5 が誘導されないような機構が働いているものと思われる。脊髄損傷後に増殖する前駆細胞においてもそうした Hes5 発現の抑制メカニズムが働いていると考えられ、これらの前駆細胞は発生期の前駆細胞と比較すると比較的成熟段階の進んだ状態にあることが示唆された。

(2) 髄鞘形成の起点となるグリア細胞は均一な集団であるのか、あるいは多様性を有しているのか

細胞集団においては、その種類と細胞数の豊かさが多様性を決定する。遺伝子発現解析などを駆使した細胞種類の表現型解析が行われる一方で、細胞集団における量的な多様性とその制御メカニズムに関しては、未解明である。その解明のためには、細胞集団における、i) 集団のサイズ、ii) 集団を生み出す未分化細胞のクローン数、iii) 各クローンにおける細胞数 (各クローンのサイズ) を明らかにする必要がある。本研究においては、まず in vitro において、未分化細胞集団の維持と自己複製過程において、i) クローン数、ii) クローン当たりの細胞数を定量し、iii) 細胞集団のサイズがどのように拡大し

て行くのかを、経時的に明らかにする事を試みた。浮遊培養系である Neurosphere 系を使用し、クローン当たりの細胞数を1つ1つ数えた。実験開始に際し細胞数の定量的しやすいグリオーマ細胞株(U87細胞株)を用いて、未分化のグリオーマ幹細胞の状態を維持した。グリオーマ幹細胞の集団が経時的に拡大する様子を、全てのクローンにおいて各クローンの細胞数を定量する事で明らかにした。すると、大変興味深い事にグリオーマ幹細胞のクローン集団は、様々な大きさのクローンを有して拡大した。横軸にクローン当たりの細胞数、縦軸にクローンの存在頻度を取りグラフにすると両側対数グラフにおいて直線となった。すなわち、グリオーマ幹細胞集団は、その集団維持・自己複製過程において、ベキ乗則を論理として多様なサイズのクローン集団を形成しながら維持をする事を示している。この様に、未分化細胞の維持の過程において多様なクローンサイズを表現する事で細胞集団に多様性を生み出す事が示唆された。今後、オリゴデンドロサイトを生み出す細胞集団において同様の実験を行い、グリアの多様性を生み出す細胞数制御プロセスの詳細とそのメカニズムを明らかにしたいと考えている。



グリオーマ幹細胞集団のクローン当たりの細胞数とその頻度の関係

(3) 動物モデルへの介入によって再髄鞘化を変化させた際、どのような変化が生じるのか。

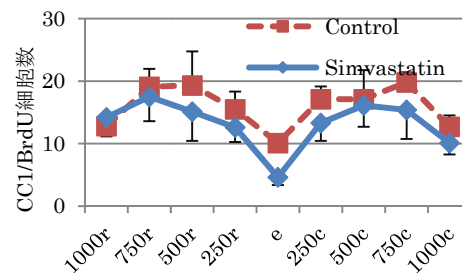
脊髄損傷後に脊髄内においてオリゴデンドロサイト前駆細胞が増殖し、その一部は再髄鞘化に寄与していることは広く知られているが、その一方で、実際にどの程度の再髄鞘化が生じているかを詳細に検討した報告は少ない。

マウス脊髄圧座損傷モデルにおいて増殖

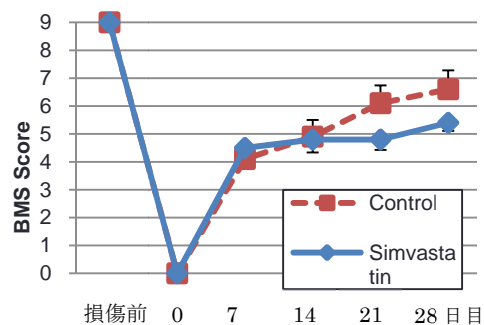
細胞をラベルするために受傷後翌日から10日目までBrdUを経口投与し、組織学的解析をする際にはオリゴデンドロサイトのマーカーであるOlig2、未成熟マーカーのNG2、成熟マーカーであるCC1との二重染色によって前駆細胞の挙動を解析した。

まず、自然経過での再髄鞘化を観察するため、脊髄損傷作成後4週間で脊髄組織の解析を行った。その結果BrdU陽性でかつCC1陽性となる細胞は損傷部の辺縁を中心に、やや腹側有意に観察された。また、末梢神経由来の細胞による髄鞘形成を示唆するP0陽性となる細胞も背側を中心に観察された。

ついで、この再髄鞘化を抑制した場合にどのような変化が生じるかを解析するため髄鞘形成に抑制的に働くことが報告されているSimvastatinの投与を損傷後7日目から21日目まで行った。受傷4週目でBrdUとCC1の二重陽性になる細胞を再髄鞘化した細胞としてカウントしたところ、損傷辺縁部を中心としてSimvastatin投与群において再髄鞘化細胞が減少していることが示された。



さらに、同時期にマウスの後肢運動機能を評価したところ、Simvastatin投与群において運動機能の回復が不良であることが示された。



(3) 考察

本研究は脊髄損傷に対する治療法開発の中で重要となる再髄鞘化について細胞レベルの知見を固めると同時に、個体レベルでの影響を検討したものとなった。

培養細胞を中心とした細胞内メカニズムの研究からは髄鞘形成の主体となるオリゴデンドロサイトの細胞内では *Ascl1* や *Hes5* といった転写因子が連動しながら成熟をコントロールしている事、また脊髄損傷後に観察されるオリゴデンドロサイト前駆細胞では *Hes5* が発現しないことから、発生期の前駆細胞とでは細胞内の状態が異なることが示唆された。おそらく、成体脊髄内に存在する前駆細胞の多くは胎児期の前駆細胞よりも成熟段階が進んだ細胞である可能性が考えられる。

前駆細胞の特性を考える上でもう一つ大事な点として多様性の問題がある。細胞集団にみられる多様性は結果として生じるものと捉えられることが一般的である。しかし、本研究では培養細胞における増殖能の多様性を解析対象として実験を行ったところ、細胞は集団としてその多様性を維持する機能があることが明らかとなった。成体脊髄内に存在するオリゴデンドロサイト前駆細胞においてもこのようなメカニズムが保持されているかは今後の課題となる。内在性の前駆細胞を脊髄損傷治療に利用することを考える際に細胞数の問題は最も大きいため、こうした増殖能に関する知見は今後の治療法検討において重要であると考えられる。

最後に、個体レベルで再髄鞘化を変化させた場合の影響をマウス脊髄圧座損傷モデルによって観察した。髄鞘形成に必要なコレステロール代謝を抑制する *simvastatin* の投与によって組織学的な再髄鞘化は抑制され、同時に後肢運動機能の回復が減弱する傾向が観察された。この所見は再髄鞘化が運動機能

の回復に寄与していることを裏付けるものと考えられる。したがって、再髄鞘化を増強することで、より良好な機能回復を得ることも期待され、本研究でも甲状腺ホルモンなど髄鞘形成を促進する因子の投与が検討された。しかし、培養細胞実験と *Simvastatin* 投与実験などに予想以上の解析期間を要したため、髄鞘形成促進因子の投与実験においては安定した結果を得るには至らず、今後の課題となった。

結語として、脊髄損傷の治療において再髄鞘化は機能回復にも影響しうる重要な介入ターゲットであり、オリゴデンドロサイトはその主体となる細胞である。成体脊髄に存在するオリゴデンドロサイト前駆細胞は発生期の細胞と比較すると、その成熟過程が進んでいることから、治療介入を検討する際には成熟を促進する因子だけではなく、未分化状態を維持して増殖能を保持できるように機能制御する因子も検討が必要であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Miyamoto Y, Ogata T, Yamauchi J(他 3 名 4 番目), Akt and PP2A reciprocally regulate the guanine nucleotide exchange factor Dock6 to control axon growth of sensory neurons. *Science signaling*, 査読有, 6(265), 2013, ra15.
- ② Uchida S, Ogata T, Kataoka K(他 6 名 5 番目), In vivo messenger RNA introduction into the central nervous system using polyplex nanomicelle. *PLoS One*, 査読有, 8(2), 2013, e56220.
- ③ Ueno T, Ito J, Hoshikawa S, Ogata T (他 8 名ラスト). The identification of transcriptional targets of *Ascl1* in

oligodendrocyte development. *Glia*,
査読有, 60(10), 2012, p.1495-1505.

[学会発表] (計7件)

- ① Okazaki R, Hayakawa K, Morioka K, Imamura O, Takishima K, Hamanoue M, Endo S, Tanaka S, Ogata T. Erk2 regulates proinflammatory gene expressions in demyelinating disorders *Neuroscience2012*, New Orleans, USA, 2012-10-13/10-17. *Proceedings*, 2012, 766.13/T15.
- ② 緒方徹, 岡崎廉太郎, 早川謙太郎, 森岡和仁, 瀧島邦夫, 今村宰, 田中栄. 中枢神経炎症におけるグリア間相互作用. 第35回日本神経科学大会, 名古屋, 2012-09-18/09-21. 抄録集, 2012, 抄録集, 2012, p.99.
- ③ Okazaki R, Hayakawa K, Morioka K, Imamura O, Takishima K, Tanaka S, Ogata T. Erk2 regulates proinflammatory gene expressions in demyelinating disorders. 8th FENS Forum of Neuroscience, Barcelona, Spain, 2012-07-14/07-18. *Proceedings*, 2012, p.405.
- ④ 藤田直己, 岡崎廉太郎, 早川謙太郎, 森岡和仁, 西村亮平, 緒方徹. 脊髄損傷亜急性期におけるスタチン製剤投与の効果. 第33回日本炎症再生学会, 福岡, 2012-07-05/07-06. 第33回日本炎症再生学会抄録集, 2012, p.162.
- ⑤ Morioka K, Tazoe T, Endo T, Hayakawa K, Okazaki R, Kawaguchi H, Nakamura K, Ogata T. Load-related afferents assume a critical role in the recovery of locomotor function after spinal cord injury. *Neuroscience* 2011, 2011-11-12/11-16, Washington DC,

Proceedings, 2011, Program
No.705.10/TT12.

- ⑥ 緒方徹, 森岡和仁, 岡崎廉太郎, 早川謙太郎, 上野高明, 中村耕三. オリゴデンドロサイト前駆細胞における Hes シグナルの制御と再髄鞘化誘導. 第30回日本運動器移植・再生医学研究会, 福岡, 2011-09-25. 抄録集, 2011, p.33.
- ⑦ 緒方徹, 伊藤順一, 森岡和仁, 岡崎廉太郎, 早川謙太郎, 中村耕三, 赤居正美. 脊髄損傷に対する髄鞘再生による治療アプローチ. 第84回日本整形外科学会学術総会 横浜 2011-05-12/05-15. 日整会誌, 85(2), 2011, S15.

[図書] (計1件)

- ① Ogata T., Springer, “Schwann Cell Development and Pathology.” Chapter6 Charcot-Marie-Tooth Disease, Sango K, Yamauchi J(ed), 2014, p.81-102. ISBN:978-4-431-54763-1.

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)
該当なし

○取得状況 (計0件)
該当なし

[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)・研究所 運動機能系障害研究部・部長

研究者番号: 00392192

(2) 研究分担者

杉森 道也 (SUGIMORI Michiya)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・助教

研究者番号: 20464026