

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500448

研究課題名(和文)Sema4Dによるオリゴデンドロサイトの分化、髄鞘形成能制御機構の解析

研究課題名(英文)Involvement of Sema4D in differentiation/maturation of myelinating oligodendrocytes

研究代表者

稲垣 忍 (InagakiS, shinobu)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90151571

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：オリゴデンドロサイト前駆細胞(OPC)は成体脳でも増殖性を有し髄鞘形成オリゴデンドロサイトに分化できるので、脳傷害による白質障害からの修復に重要な役割を果たすと期待される。本研究では1)Sema4Dが脳発達期の髄鞘形成期のオリゴデンドロサイトに発現し、分化や髄鞘形成を抑制的に制御すること、2)虚血性脳傷害における成体動物の組織再生/修復にSema4Dが抑制性に関与し、Sema4D欠失の脳梗塞モデルでは細胞新生や髄鞘形成オリゴデンドロサイトの回復の促進がみられた。以上の結果からSema4Dが生後発達期の髄鞘形成制御ならびに血管性脳疾患における脳修復に関与することが示された。

研究成果の概要(英文)：Oligodendrocyte (OL) precursor cells (OPCs) that can proliferate and generate OLs, and serve as the primary source of remyelinating cells, are contained in the adult brain. In this study, we showed that Sema4D, found as an axon guidance regulator, plays a role as a negative regulator of OL development. Sema4D-deficiency increased in number of OLs, but not OPCs, suggesting that Sema4D enhances OL survival and promotes OL development. OLs as well as neurons are quite vulnerable to ischemic stress but shows powerful restorative ability after brain injury. Recent studies show that adult brain has the capability to self-repair in response to stroke, suggesting that proliferation and differentiation into myelinating OLs are important in regeneration and repair after brain injury. Sema4D-deficiency enhanced cell proliferation and the number of OLs in the peri-infarct area, suggesting that counteracting inhibitors of Sema4D are possible to improve brain repair in response to cerebral ischemia.

研究分野：脳神経科学

科研費の分科・細目：脳神経科学 神経化学・神経薬理学

キーワード：glia oligodendrocyte development myelin brain semaphorin regeneration repair

1. 研究開始当初の背景

(1) 脳は興奮性伝達物質、活性酸素、虚血や炎症などのストレスにさらされ、脆弱な神経細胞は常に生存がおびやかされている。成体脳における脳組織の維持には神経細胞の保護や神経ネットワークの伝導に重要なグリア細胞が重要な役割を担っている。グリアのうち、中枢神経系の髄鞘形成細胞であるオリゴデンドロサイトは神経細胞と同様に虚血や傷害、炎症に脆弱であるが(Peito et al., 1998)、再性能を有する前駆細胞が脳全体に分布し、髄鞘の修復・維持に寄与すると考えられている。しかしながらその詳細は不明である。

(2) 生後から成体の中枢神経系では神経細胞は増殖性を失い新たな神経細胞の新生は無いと考えられてきたが、近年、健康な成人の中枢神経系においても歯状回や側脳室下層などに限局して神経幹細胞が分布することが明らかになった。しかしながら、その他の領域では神経細胞の新生はほとんど無い。従って、脳傷害後の組織修復の鍵を握るのはグリア細胞であり、支持組織として神経機能の修復に重要な役割を果たす。特に神経伝導に重要な役割をはたすオリゴデンドロサイトはストレスに脆弱なグリアである一方で、オリゴデンドロサイトの前駆細胞(OPC)は、傷害やストレスに応答して増殖・分化することができる。その結果、傷害を受け減少したオリゴデンドロサイトは回復し、脳傷害からの修復に重要な役割を果たすと考えられている。しかしながら、成体脳においてはストレスにより増殖した OPC のうちオリゴデンドロサイトに分化し生存して髄鞘形成するものはわずかであり、オリゴデンドロサイトの増殖・分化・髄鞘形成の制御機構は不明な点が多い。

(3) セマフォリン分子は軸索ガイダンス分子として機能する他、細胞間シグナルとして血管や神経などの細胞間接着を介して細胞増殖、移動、分化に関与する(Pasterkamp et al, 2009; Larrivée et al, 2009)。私達はオリゴデンドロサイトの分化・髄鞘形成能制御機構を解析するため、オリゴデンドロサイト特異的に発現するセマフォリン分子である Sema4D に注目し、ノックアウトマウスを作製した(Taniguchi et al, 2009)。Sema4D は膜型セマフォリン分子であるが、切り出されて分泌型セマフォリンとしても機能する。中枢神経系では、細胞分化後に髄鞘形成能を獲得始めたオリゴデンドロサイトに特異的に発現し始め、成体脳でも発現が維持されることから、胎生期のガイダンス分子としてばかりでなく髄鞘形成期や成体脳の脳機能維持に関与していると考えられる。しかしながら、成体脳における役割については不明である。

2. 研究の目的

私達はこれまでに、Sema4D が脳では髄鞘形成能を獲得始めたオリゴデンドロサイトに特異的に発現すること、Sema4D 欠失マウスでは OPC 数には差がないが、分化したオリゴデンドロサイトの数が野生型より多いことを報告した。この結果から、本研究ではオリゴデンドロサイトの分化や髄鞘形成制御への Sema4D の関与とそのメカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

- 1) 生後発達期のマウス前脳あるいは大脳皮質における Sema4D 発現変化を immunoblot 法と免疫組織化学染色法などを用いて解析した。
- 2) 生後発達期のマウス大脳皮質と初代培養細胞を用いて、OPC ならびに分化した

オリゴデンドロサイト数を調べ、Sema4D のオリゴデンドロサイトの分化制御への関与を解析した。

- 3) Sema4D 欠失マウス大脳皮質で観察された髄鞘形成亢進の原因について、OPC/オリゴデンドロサイトの増殖や生存の亢進によるものか、個体ならびに培養系を用いて解析した。
- 4) 生後発達期の Sema4D 欠失マウス視神経や脳梁の髄鞘形成を微細形態学的に解析した。
- 5) 神経系での Sema4D 受容体は PlexinB1 である。PlexinB1-KO マウスを用いて Sema4D 作用の受容体を特定した。
- 7) Sema4D の傷害後の組織修復への関与を調べるため、脳虚血後のオリゴデンドロサイトの回復に及ぼす Sema4D 作用について個体を用いて解析した。

4. 研究成果

1) 生後発達に伴う Sema4D の発現の変化

生後発達期における前脳の Sema4D 発現を immunoblot 法により検出した結果、生後 7 日から発現が増加し始め生後 28 日まで強く発現した。一方、大脳皮質標本を用いたレポーター遺伝子や免疫組織染色法による Sema4D 発現細胞は生後 7 日ではほとんど発現がみられず、生後 10 日あるいは 14 日以降に著しく発現細胞が増加し生後 28 日でピークとなり、成熟マウスでは発現細胞は減少するもの維持された。

2) Sema4D 欠失マウスにおけるオリゴデンドロサイトの分化・成熟(髄鞘形成能)の解析

A オリゴデンドロサイト分化・成熟(髄鞘形成能)の解析

マウス大脳皮質での髄鞘形成は主に生後に始まるので、生後の各発達段階の Sema4D 欠失マウス大脳皮質の前駆細胞 OPC と分化し

たオリゴデンドロサイト数を免疫組織化学的に検出解析した。Sema4D 欠失では生後 10 日ではオリゴデンドロサイトの数は野生型と差がみられなかったが、14 日以降で増加していた。一方、OPC 数には差がなかった。また、Sema4D 欠失マウスの初代培養系においても O4 あるいは MAG(分化したオリゴデンドロサイトのマーカー)陽性の細胞の割合がヘテロ型マウス由来の細胞に比べ増加していたが、この増加は Sema4D の添加により消失した。これらの結果は、上記大脳皮質の結果とよく一致する。以上の結果から、Sema4D 欠失はオリゴデンドロサイトの分化を抑制的に制御していることが示唆された。

B オリゴデンドロサイトの細胞死への解析

Sema4D 欠失によるオリゴデンドロサイトの増加の原因が、オリゴデンドロサイトの生存亢進である可能性を検討した。各発達期マウスの大脳皮質で TUNEL 染色や active caspase-3 抗体と各マーカーとの 2 重染色を行い、アポトーシスによる細胞死をおこしている細胞を同定した。大脳皮質ならびに初代培養細胞系において Sema4D 欠失はアポトーシスを低下させ、Sema4D 添加はアポトーシスを亢進したことから、Sema4D はアポトーシスを亢進することによりオリゴデンドロサイト数を抑制することが示唆された。

C 前駆細胞 OPC 増殖能の解析

Sema4D 欠失による髄鞘形成亢進の原因が、OPC の増殖亢進による可能性も考えられる。生後発達期における大脳皮質において BrdU 取込や Ki67 抗体を用いて、OPC の増殖能を解析したが Sema4D 欠失や添加による影響はみられなかった。

D 髄鞘形成能の解析

生後 56 日齢マウスの視神経あるいは脳梁のエポン超薄切片を作製し、有髄線維を数、軸索径、髄鞘の厚さを測定し、Sema4D 欠失による髄鞘形成への影響を解析した。欠失型の脳梁では有髄線維の増加と径の小さい

軸索の増加し、視神経では髄鞘の過形成がみられた。以上の結果から Sema4D 欠失が髄鞘形成のみならず軸索の有髄化に關与することが示唆された。

3) オリゴデンドロサイト分化制御に關与する Sema4D 作用受容体の特定

神経系での Sema4D 受容体として PlexinB1 が想定されるので(Tamagnone et al., 1999)、PlexinB1 欠失マウスを用いて Sema4D 作用の受容体の特定を試みた。生後発達期 PlexinB1 欠失マウスの大脳皮質でオリゴデンドロサイトの数の変化、アポトーシスのオリゴデンドロサイトを解析したが、報告できる十分な結果がまだ得られていない。今後同研究を継続し、結論を出したいと考えている。

4) 虚血傷害モデルにおける Sema4D のオリゴデンドロサイトや髄鞘回復への關与の解析

中大脳動脈結紮による脳虚血傷害からのオリゴデンドロサイトの回復に及ぼす Sema4D 欠失の影響を解析した。Sema4D 欠失により、細胞増殖が増加し、細胞死が減少した。さらに分化生存するオリゴデンドロサイトが増加した。Sema4D 欠失の細胞死減少効果は生後発達期の大脳皮質の解析と一致したが、細胞増殖に及ぼす効果は発達期の解析ではかんさつされなかったものである。以上の結果から、Sema4D の機能は生後発達期と脳梗塞モデルのオリゴデンドロサイトの増殖・分化に及ぼす効果が必ずしも同じではないことが明らかになった。

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 1 件)

Tsuji M, Ohshima M, Taguchi A, Kasahara Y, Ikeda T, Matsuyama T. A novel reproducible model of neonatal stroke in mice: comparison with a hypoxia-ischemia model. *Exp Neurol*. 2013, 247:218-25.

Takata M, Nakagomi T, Kashiwamura S, Nakano-Doi A, Saino O, Nakagomi N, Okamura H, Mimura O, Taguchi A, Matsuyama T. Glucocorticoid-induced TNF receptor-triggered T cells are key modulators for survival/death of neural stem/progenitor cells induced by ischemic stroke. *Cell Death Differ*. 2012 May;19(5):756-67.

Yamaguchi W, Tamai R, Kageura M, Furuyama T, Inagaki S. Sema4D as an inhibitory regulator in oligodendrocyte development, *Mol Cell Neurosci*. 2012, 49(3): 290-299.

[学会発表](計 8 件)

澤野俊憲ら「脳梗塞時における microglia 機能に対する Sema4D の關与」日本解剖学会第 89 回近畿支部学術集会、奈良先端大 2013.11.30

澤野俊憲ら「脳梗塞後ミクログリア活性に対する Sema4D の影響」第 86 回日本生化学会大会 2P-452 & 1T18a-10 2013.9.11&9.12 パシフィコ横浜

中田茉佑ら「PlexinB1 を介した Sema4D のオリゴデンドロサイト分化成熟制御作用の検討」第 8 回日本臨床検査学教育学会学術大会 大阪、2013.8.27

澤野俊憲ら「脳梗塞時におけるミクログリア活性化に対する Sema4D 機能の解明」第 8 回日本臨床検査学教育学会学術大会 2013.8.27

Ishiguchi M et al, 「Sema4D deficiency protects oligodendrocytes from ischemia-induced apoptosis.」Neuro2013 The 36th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, The 56th Annual Meeting of Japanese Society for Neurochemistry, The 23rd Annual Conference of the Japanese Neural Network Society, 2013.6.20-23 国立京都国際会館

石口満津子ら「Sema4D 欠失による脳虚血周辺組織の神経修復に与える影響」第 67 回日本口腔科学会学術集会 栃木県総合文化センター2013.5.23

Wataru Yamaguchi et al, 「Sema4D-PlexinB1

act as an inhibitory regulator in oligodendrocyte development」第118回日本解剖学会全国学術集会 サポートホール高松・かがわ国際会議場 2013.3.28-30
Ishiguchi M et al, 「A study on apoptosis and proliferation of cells following cerebral ischemic injury of Sema4D deficient mice.」 11th Biennial Meeting of the Asian Pacific Society for Neurochemistry #6675, Kobe International Conference Center 2012.9.30- 10.2 P02-3, J. Neurochemistry 123 suppl 1, 61-62, October 2012.

〔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 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲垣 忍 (INAGAKI, Shinobu)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 90151571

(2) 研究分担者

松山知弘 (MATSUYAMA, Tomohiro)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号: 10219529

研究分担者

古山達雄 (FURUYAMA, Tatsuo)

香川県立保健医療大学・教養部・教授

研究者番号: 20238702