

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23590237

研究課題名(和文) 神経幹細胞の維持・分化制御に関わる転写機構の解析とその神経難病治療への応用

研究課題名(英文) Transcriptional mechanism for maintenance and differentiation of neural stem cells

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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：オリゴデンドロサイトは、神経幹細胞から産み出されるグリア細胞である。本研究では、オリゴデンドロサイトの発生に必須のOlig2転写因子と結合する新規分子をスクリーニングして同定したOBP1とOBP2について調べた。OBP2遺伝子をマウス胎児脳で強制発現すると、ミエリン関連遺伝子の発現が誘導された。また、OBP2遺伝子の中枢神経系特異的な遺伝子変異マウスを作成すると脳の発生異常が生じ、出生直後に致死となることが判明した。

研究成果の概要(英文)：Oligodendrocytes are glial cells in the central nervous system which are produced from neural stem cells during neural development. Olig2 is an essential transcription factor for oligodendrocyte development. In this study, we screened Olig2-binding proteins. We identified Olig2 binding proteins (OBP1 and OBP2). Overexpression experiment of OBP2 in embryonic mouse brain resulted in elevated expression of myelin-related genes. In addition, generation of central nervous system (CNS)-specific conditional knockout mice resulted in postnatal lethality with CNS abnormality.

研究分野：神経解剖学

キーワード：オリゴデンドロサイト 分化 ミエリン

### 1. 研究開始当初の背景

中枢神経系は神経細胞とグリア細胞で構成されている。中枢神経系のグリア細胞は、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリアに大別される。中枢神経系のグリア細胞の一つであるオリゴデンドロサイトは、神経細胞の軸索の周りに髄鞘(ミエリン)と呼ばれる脂質に富む絶縁体構造をつくり、電気信号がすばやく伝わる跳躍伝導の構造的基盤を形成する。

Olig 転写因子は、発生期脊髄腹側の pMN ドメインに領域特異的に発現する basic helix-loop-helix (bHLH) 型転写因子である。我々のグループは、Olig 転写因子ファミリーを初めて報告したグループの一つである (Takebayashi and Ikenaka, 2015)。我々のグループを含む複数のグループは、Olig2 転写因子の強制発現実験やノックアウトマウス作成による機能喪失実験により、Olig2 が運動ニューロン、オリゴデンドロサイトの発生に必須の因子であることを示した。しかし、Olig2 因子が転写因子として働く際、どのような分子と結合してその作用を発揮するのかについては未だ明らかではない。

### 2. 研究の目的

オリゴデンドロサイトの分化機構を調べることで、また、オリゴデンドロサイト前駆細胞から成熟オリゴデンドロサイトへの分化誘導法を開発することは、多発性硬化症などオリゴデンドロサイトの分化阻害による神経難病の病態を理解し、治療法を開発するためにも求められている研究である。本研究では、Olig2 転写因子に結合する因子のスクリーニングにて同定した新規の結合候補因子 Olig2 binding proteins (OBP1, OBP2) について、オリゴデンドロサイトや運動ニューロンの分化に関わるかについて、強制発現実験による機能発現実験、あるいは、遺伝子改変マウス作成による機能喪失実験などを行い検証する。さらに、本研究成果を用いて、神経幹細胞から、運動ニューロンやオリゴデンドロサイトを効率よく分化誘導するシステムを確立することを目指す。

### 3. 研究の方法

Olig2 結合因子の OBP1, OBP2 は、酵母 2 ハイブリッド法にて、全長のマウス Olig2 をベイトとして、胎児脳の cDNA ライブラリーをスクリーニングして同定したものである。それぞれの因子 (OBP1, OBP2) をコードする遺伝子断片を発現ベクターに挿入し、発現ベクターをエレクトロポレーション法により、ニワトリ、あるいは、マウス胚の中枢神経系に遺伝子導入し、運動ニューロン、あるいは、オリゴデンドロサイトのマーカーにて組織切片を染色する。また、マウスの胚性幹細胞 (ES 細胞) における遺伝子組換えにより、OBP1 あるいは OBP2 の遺伝子機能をなくした遺伝子組換えマウスの作成を行い、神

経細胞やオリゴデンドロサイトの発生に対する影響を観察する。

### 4. 研究成果

OBP1 の機能を調べるために、遺伝子改変マウス作成により、OBP1 の機能を欠失したマウスを作成した (図 1、熊本大学荒木喜美教授らとの共同研究)。

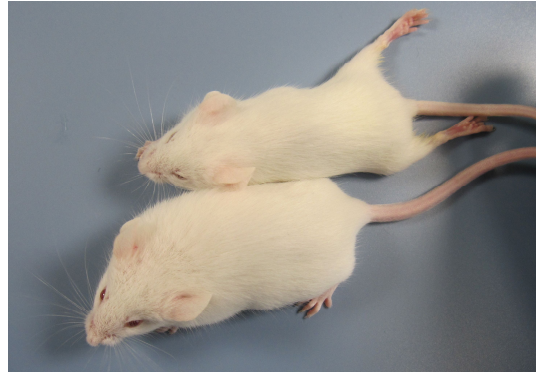


図 1 OBP1 ノックアウトマウスとコントロールマウス。OBP1 ノックアウトマウスは、同腹のコントロールマウスと比べて体が小さく、下肢が進展していることがわかる。

OBP1 ホモマウスは、生後 2 週齢ほどで小脳失調症などの運動障害を示す事がわかった。進行性の運動障害を示し 3 週齢ほどでマウスは死に始める。生後マウスの組織学的な解析では、脊髄運動ニューロンや成熟オリゴデンドロサイトの数については、残念ながら、大きな変化がなかった。OBP1 ホモマウスには運動障害があることから、運動ニューロンの活動の制御機構に異常があることが示唆されるので、今後は運動ニューロン活動の異常とそれを発生させる原因について検討していく。その際には、我々が作成して報告した神経活動依存的な遺伝子群の発現解析 (Bepari et al., 2012a, 2012b) も大いに役立つものと考えられる。

OBP2 の機能を調べるために、ニワトリ胚、および、マウス胚の中枢神経系において、エレクトロポレーション法により OBP2 遺伝子と緑色蛍光タンパク (GFP) の遺伝子導入を行った。遺伝子導入された緑色蛍光を発する部位の脳組織切片を作成し、in situ hybridization 法により分化マーカーの遺伝子発現を調べると、運動ニューロンマーカーの発現変化は観察されなかったが、proteolipid protein (PLP), myelin basic protein (MBP) などの複数のオリゴデンドロサイト分化マーカーの mRNA 発現の上昇が観察された。つまり、OBP2 は、強制発現によりオリゴデンドロサイトの分化を促進する因子であることが示唆された。続いて、OBP2 遺伝子の機能喪失実験を行う為に、OBP2 遺伝子の flox アリールを作成した (図 2、新潟大学脳研究所の崎村建司教授らとの共同研究)。

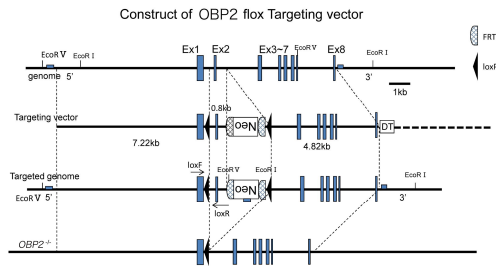


図2 OBP2 flox アリールの構造。FLP 組換え酵素を作用させて neo 遺伝子カセットを取り除くと flox アリールが完成する。また、Cre 組換え酵素を作用させると exon2 が欠失して null アリールができる。

OBP2 遺伝子の null マウスは、早期致死になるために中枢神経系における機能解析ができない。そこで、中枢神経系特異的に部位特異的遺伝子組み換えを引き起こす Nestin-Cre マウスと OBP2 flox マウスを掛け合わせるにより、OBP2 コンディショナル・ノックアウトマウス (Nestin-Cre; OBP2<sup>null/flox</sup> マウス) を作成した。本マウスは出生直後に致死となり、中枢神経系に明らかな異常があることがわかった。今後は、中枢神経系特異的 OBP2 コンディショナル・ノックアウトマウスの組織学的な解析を詳細に行い、運動ニューロン、および、オリゴデンドロサイト分化における OBP2 の機能の詳細を明らかにしていく。また、Cre ドライバーマウスを変更することにより、異なる細胞種や異なる時期にコンディショナル・ノックアウトマウスを作成し、OBP2 の細胞種、あるいは、時期特異的な機能についての解析も進めていく必要がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 13 件)

Takebayashi H., Ikenaka K. Oligodendrocyte Generation during Mouse Development. *Glia* 2015; 63: 1350-1356.

Kanaya E., Okano T., Yoshida A., Katsuno T., Takebayashi H., Ito J., Yamamoto N. Expression of the Olig gene family in the developing mouse inner ear. *Gene Expr Patterns* 2015; 17: 79-86.

竹林浩秀, 堀江正男 ジストニア症状を示す遺伝性神経難病モデルマウスの作製と解析 *新潟医学会雑誌* 2015; 129, 491-497.

Horie M., Watanabe K., Bepari A.K.,

Nashimoto J., Araki K., Sano H., Chiken S., Nambu A., Ono K., Ikenaka K., Kakita A., Yamamura K.-I., Takebayashi H. Disruption of actin-binding domain-containing dystonin protein causes dystonia musculorum in mice. *Eur J Neurosci* 2014; 40: 3458-3471.

Ono K., Clavairoly A., Nomura T., Gotoh H., Uno A., Armant O., Takebayashi H., Zhang Q., Shimamura K., Itohara S., Parras C.M., Ikenaka K. Development of the prethalamus is crucial for thalamocortical projection formation and is regulated by Olig2. *Development* 2014; 141: 2075-2084.

佐藤和彦, 堀江正男, 竹林浩秀, 高橋均, 柿田明美 ヒト脳病理切片における in situ hybridization 法を利用したニューロンおよびグリア細胞の同定 *新潟医学会雑誌* 2014; 128, 625-634.

竹林浩秀 グリア細胞発生・分化機構の解析と生体内細胞系譜追跡実験系の確立・応用 *神経化学* 2014; 53, 41-46.

Shimizu T., Tanaka K., Takebayashi H., Higashi M., Wisessmith W., Ono K., Hitoshi S., Ikenaka K. Olig2-lineage cells preferentially differentiate into oligodendrocytes but their processes degenerate at the chronic demyelinating stage of PLP-overexpressing mouse. *J Neurosci Res* 2013; 91: 178-186.

竹林浩秀, 堀江正男, Asim K Bepari, 渡辺啓介, 目黒玲子 *神経解剖学を基盤とした神経科学研究の展開* *新潟医学会雑誌* 2013; 127, 291-297.

Bepari A.K., Sano H., Tamamaki N., Tanaka K.F., Takebayashi H. Identification of optogenetically activated striatal medium spiny neurons by Npas4 expression. *PLoS One* 2012; 7: e52783.

Bepari A.K., Watanabe K., Yamaguchi M., Tamamaki N., Takebayashi H. Visualization of odor-induced neuronal activity by immediate early gene expression. *BMC Neurosci* 2012; 13: 140.

Usui N., Watanabe K., Ono K., Tomita K., Tamamaki N., Ikenaka K., Takebayashi H. Role of motoneuron-derived neurotrophin 3 in survival and axonal projection of sensory neurons during neural circuit formation. *Development* 2012; 139: 1125-1132.

Inamura N., Ono K., Takebayashi H., Zalc B., Ikenaka K. Olig2-lineage cells generate GABAergic neurons in the prethalamic nuclei, including the zona incerta, ventral lateral geniculate nucleus and reticular thalamic nucleus. Dev Neurosci 2011; 33: 118-129.

〔学会発表〕(計 10 件)

竹林浩秀 脳のできるしくみから学ぶ  
第16回日本早期認知症学会学術大会  
2015.10.10-11. 朱鷺メッセ(新潟県新潟市)

Hirohide Takebayashi Analyses of neuronal and glial cell phenotypes of dystonia musculorum mice. 第58回日本神経化学学会大会 2015.9.11.-13. 大宮ソニックシティー(埼玉県さいたま市)

Hirohide Takebayashi Mouse model of dystonia with sensory neuropathy. 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会 2015.3.21.-23. 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

竹林浩秀, 堀江正男、渡辺啓介、荒木喜美、佐野裕美、知見聡美、南部篤、小野勝彦、池中一裕、柿田明美、山村研一 ジストニア症状と感覚性ニューロパチーを示す新規遺伝子改変マウスの作製と解析 第57回日本神経化学学会大会 2014.9.29.-10.1. 奈良県文化会館・奈良県新公会堂(奈良県奈良市)

竹林浩秀 グリア細胞発生・分化機構の解析と生体内細胞系譜追跡実験系の確立・応用 [2014年度日本神経化学学会優秀賞受賞講演] 第57回日本神経化学学会大会 2014.9.30. 奈良県文化会館・奈良県新公会堂(奈良県奈良市)

竹林浩秀, ベパリ アシム、佐野裕美、玉巻伸章、南部篤、田中謙二 Npas4 mRNA expression can trace photoactivation of striatal medium spiny neurons at the cellular level. 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会 2013.3.28.-30. サンポートホール高松・かがわ国際会議場(香

川県高松市)

Asim K. Bepari, Keisuke Watanabe, Masahiro Yamaguchi, Nobuaki Tamamaki, Hirohide Takebayashi Sensitive detection of neuronal activity by immediate early gene expression. The 11th Biennial Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry / 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry Kobe, 2012 Sep 29.-Oct 2. Kobe (JAPAN)  
竹林浩秀 胎児期脳発生と生後脳発達について 第42回 新潟神経科学夏期セミナー 2012.8.3.-5. 新潟大学脳研究所(新潟県新潟市)

Hirohide Takebayashi Regulation of oligodendrogenesis by phosphoprotein Olig2 Gordon Research Conference: Myelin, 2012 Apr 29.-May 4. Lucca (Italy)

竹林浩秀 ニューロン・グリアの分化メカニズム研究と今後の研究展開 第5回 神経発生討論会 2012.3.15.-16. アオッサ(福井県福井市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

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・解剖学分野  
<http://www.med.niigata-u.ac.jp/an2/index.html>

アウトリーチ活動

新潟大学附属新潟中学校 模擬講義

「不思議な脳」

2014.7.9.(新潟県新潟市)

新潟大学附属長岡中学校 模擬講義

「不思議な器官、脳」

2013.9.25.(新潟県新潟市)

新潟大学附属新潟中学校 模擬講義

「不思議な器官、脳」

2013.7.10. (新潟県新潟市)

新潟大学オープンキャンパス模擬講義

「脳の発生と構造・機能」

2012.8.10. (新潟県新潟市)

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 研究協力者

臼井 紀好 (USUI Noriyoshi)

ベパリ オシム (BEPARI Asim)