

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861281

研究課題名(和文) 脱髄性疾患治療への臨床応用を目指したオリゴデンドロサイト分化機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of differentiation mechanism of oligodendrocyte for clinical application of demyelinating disease therapy

研究代表者

政平 訓貴 (MASAHIRA, Noritaka)

高知大学・教育研究部医療学系・講師

研究者番号：80444769

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：脱髄疾患治療への臨床応用を目的として、オリゴデンドロサイトに着目した。オリゴデンドロサイトの分化に必須である転写因子Olig2の機能解析を目的として、Olig2ノックアウトマウスと野生型マウスの胎児の脊髄における遺伝子発現をDNA subtraction法を用いて網羅的に比較した。12の遺伝子が同定されin situ hybridizationにて発現パターンを調べた。Peroxioredoxin 1は脊髄において運動ニューロンが存在する部位に特異的に発現が認められ、運動ニューロンへの分化に関与している可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：To elucidate function of bHLH transcriptional factor Olig2, gene expression pattern of fetal spinal cords between wild type mice and Olig2 knock-out mice was investigated with DNA subtraction method. Twelve genes were identified as candidates of downstream factors of Olig2 and expression patterns of these genes were examined. Peroxioredoxin 1 was expressed specifically in the location of motoneurons, and was presumed to concern with differentiation for motoneurons.

研究分野：再生医療

キーワード：脱髄疾患 オリゴデンドロサイト Olig2

1. 研究開始当初の背景

脱髄疾患は原因不明の難治性疾患であり、慢性、進行性の経過を辿るため患者は長年様々な神経症状に苦しむことになる。治療に向けて様々な試みがなされているが、有効な治療に結びつく結果は出ていないのが現状である。Olig2 は神経発生において、髄鞘を形成するオリゴデンドロサイトの発生に必須の転写因子である。Olig2 は成体でも発現が認められており、脱髄の修復に関与すると考えられているが、その機能は十分解明されていない。本研究では、成体での Olig の機能解析を行い、その結果を元にオリゴデンドロサイト前駆細胞を成熟オリゴデンドロサイトに分化誘導し、脱髄疾患の治療を行うことを目的とする。

脱髄疾患の中でも多発性硬化症は若年者の神経疾患の代表的なものであり、日本でも約1万2千人が罹患しているといわれる。この疾患は慢性的に時間を違えて起こるため、筋力低下や運動失調、視力障害、尿失禁などの様々な神経症状が時間的・空間的に多発し、寛解・増悪を繰り返しながら、多くの患者では機能障害が悪化する過程をとる。病態解析も進んでおらず、予防的手段は今のところ存在しない。さらに、未だに有効な治療法はなく、ステロイドやインターフェロンなどの免疫抑制剤による対症療法が行われているのが現状である。多発性硬化症は30歳前後の若年成人に好発するため、画期的な治療方法の確立はそのような働き盛りの若い患者の社会復帰をもたらす、社会的、医療経済的にも大いに貢献すると予想される。

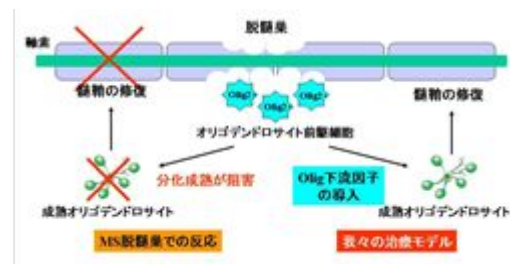
脱髄部分周辺にはオリゴデンドロサイトの発生に関わる転写因子 Olig2 を発現した細胞が集まっていることが観察されているが、再髄鞘化には結びつかない。この矛盾は何らかの影響で髄鞘化を形成する成熟オリゴデンドロサイトへの分化が阻害されていることが原因と予想される。我々は Olig2 の機能解析を行っており、オリゴデンドロサイト前駆細胞が成熟オリゴデンドロサイトへ分化誘導する機序が解明されれば、それを成体にも応用して患者自身の細胞で脱髄を修復できる可能性があると考えている。さらに我々は、中枢神経細胞に特異的に安定して遺伝子導入可能なレトロウイルスベクターの作成方法も確立しており (Tamura et al., 1998, Tamura et al., 2001, Sasaki et al., 2001)、Olig2 機能解析の結果をすぐに in vivo での実験に移行させることが可能である。ウイルスベクターを用いた遺伝子導入では、目的とする細胞に限定して遺伝子を導入できれば安全性が高い。レトロウイルスベクターは分裂細胞のみに遺伝子が組み込まれるため、基本的に非分裂細胞で構成されている正常な神経組織には導入されないが、脱髄巣で修復に関与するオリゴデンドロサイト前駆細胞は分裂能を有するため、特異的にオ

リゴデンドロサイトへの分化因子を導入できると期待できる。

転写因子 Olig2 に注目して、神経発生学的観点から生体本来の自己修復能を治療に応用する試みは未だに報告されておらず、画期的である。また、これまで研究が進められているアプローチとは異なる機序であり、他の治療方法との併用も可能で大きな効果を期待できる。さらに、多発性硬化症のみならず、様々な難治性の脱髄疾患の治療にも応用でき、これら難病に苦しむ人々に対して大きな恩恵を与えることができると考えられる。

2. 研究の目的

脱髄疾患は原因不明の難治性疾患であり、慢性、進行性の経過を辿るため患者は長年様々な神経症状に苦しむことになる。治療に向けて様々な試みがなされているが、有効な治療に結びつく結果は出ていないのが現状である。Olig2 は神経発生において、髄鞘を形成するオリゴデンドロサイトの発生に必須の転写因子である。Olig2 は成体でも発現が認められており、脱髄の修復に関与すると考えられているが、その機能は十分解明されていない。本研究では、成体での Olig の機能解析を行い、その結果を元にオリゴデンドロサイト前駆細胞を成熟オリゴデンドロサイトに分化誘導し、脱髄疾患の治療を行うことを目的とする。



(図1) 研究目的の概要

3. 研究の方法

Olig2 は発生期においてオリゴデンドロサイトの発生に大きな役割を果たす。成体の中枢神経組織でも Olig2 の発現が認められているが、その存在意義は十分解明されていない。脱髄を起こした病変部の周囲に Olig を発現した細胞が集簇することから、髄鞘形成に Olig が強く関与することが示唆される。発生期においてオリゴデンドロサイト前駆細胞はマウス脊髄腹側の pMN ドメインから特異的に発生し、複数のオリゴデンドロサイト前駆細胞に分裂増殖しつつ脊髄全体に遊走し、成熟オリゴデンドロサイトに分化していく。脱髄巣周辺に集まっている Olig2 陽性細胞はオリゴデンドロサイト前駆細胞と考えられ、発生

期のメカニズムと同様の過程で複数のオリゴデンドロサイト前駆細胞に分裂増殖した後、成熟オリゴデンドロサイトとなってミエリン修復に関与すると考えられる。我々は、オリゴデンドロサイトの発生過程が脱髄を起こした髄鞘を修復する過程に類似していることに注目し、オリゴデンドロサイト発生に必須の転写因子である Olig に焦点を当て、成体においてオリゴデンドロサイト前駆細胞を正常な成熟オリゴデンドロサイトに分化させる。その前段階として、まず Olig2 の下流因子を同定し、Olig2 の関与するオリゴデンドロサイト発生メカニズムの解析を行う。また、脱髄周辺部の Olig2 陽性細胞と発生期の Olig2 陽性細胞での転写因子発現の相違を解析し、脱髄疾患で再髄鞘化がどの段階で障害されているのかを明らかにする。さらに、脱髄モデルマウスにおいて、我々が開発している脳特異的高力価レトロウイルスベクターを用いて、脱髄部周辺の Olig2 陽性細胞に選択的に下流因子を導入し、成熟オリゴデンドロサイトへ分化させ、正常な髄鞘形成がなされるかどうかを調べると同時に、実際に機能回復が得られているかどうかを評価する。最終的な目標としてはヒトへの応用を目指す。

脱髄病変周囲には Olig2 陽性のオリゴデンドロサイト前駆細胞が集まることが確認されているが、成熟オリゴデンドロサイトには分化せず髄鞘修復が行われない。Olig2 はオリゴデンドロサイトへの分化スイッチであり、Olig2 以降の分化制御カスケードが障害されていると考えられる。成体でオリゴデンドロサイト前駆細胞を正常な成熟オリゴデンドロサイトに分化させ、脱髄の修復を促進させることを目的とする。前段階として Olig の下流因子を同定し、胎生期におけるオリゴデンドロサイト発生メカニズムの解析を行う。同時に脱髄周辺部の Olig 陽性細胞と胎生期 Olig 陽性細胞での転写因子発現の相違を解析し、分化がどの段階で障害されているのかを明らかにする。次に、脱髄モデルマウスにおいて我々が開発している脳特異的高力価レトロウイルスベクターを用いて脱髄部周辺の Olig 陽性細胞に選択的に下流因子を導入し、成熟オリゴデンドロサイトへ分化させ、正常な髄鞘形成がなされるかどうかを調べ機能回復を評価する。

具体的には以下の手順で計画した

(1) Olig2 下流因子の同定

オリゴデンドロサイトは、マウス胎生 12.5 日 (E12.5) 頃より脊髄腹側の pMN ドメイン脳室下層の Olig2 陽性細胞から生じる。E12.5 の Olig2 ノックアウトマウスと野生型マウスから脊髄を採取し、遺伝子の発現プロファイル DNA microtip や cDNA subtraction 法を用いて比較し、下流因子の候補をスクリーニングする。得られた候補遺伝子の中から転写因子に関わるものをデータベースで検索し、

分化誘導に関連する因子を絞り込む。Olig2 ノックアウトマウスと野生型マウスの脊髄において、絞り込んだ遺伝子を in situ hybridization やその遺伝子の生成産物に対する抗体で染色し、異なるパターンが認められるもの、つまり Olig2 に関連する可能性が高いものを選択する。培養細胞で可能性の高い転写因子を強制発現させ、オリゴデンドロサイトへの分化が誘導されるかどうかを確認する。

(2) 成体における Olig2 陽性オリゴデンドロサイト前駆細胞の機能解析

E12.5 のマウス脊髄を採取してホモジネートし、我々が独自で作成している Olig2 抗体を用いてセルソーターで Olig2 陽性細胞を採取する。同様の方法で成体マウスの脊髄からも Olig2 陽性細胞を選択的に採取する。それぞれで得られた細胞集団を限界希釈法で 1 細胞 / 1 well に単離し、培養して分化させ、背景の異なる Olig2 細胞からどのような細胞が生み出されるのかを調べることにより、分化能が異なるのかどうかを検討する。分化能が異なる場合、DNA microtip など網羅的解析を行い、これを上記で絞り込んだ転写因子と比較し同一のものがあれば、それが成体における成熟オリゴデンドロサイトの分化に必要な因子と考えることができる。

(3) オリゴデンドロサイトへの分化誘導因子のスクリーニング

上記の方法で有意な結果が得られない可能性を考えて並行して行う。Olig2 陽性細胞が存在する pMN ドメインからは E9.5 から運動ニューロンが産生され、続いて E12.5 からオリゴデンドロサイト前駆細胞が産生される。そこでオリゴデンドロサイト前駆細胞を産生する前の Olig2 陽性細胞とオリゴデンドロサイト前駆細胞を産生している時期の Olig2 陽性細胞を Olig2 抗体を用いたセルソーティングで収集し、それぞれの遺伝子発現プロファイルを比較して候補遺伝子をスクリーニングする。

(4) 転写因子の強制発現のためのレトロウイルスベクター作成

候補遺伝子を強制発現サイトに挿入したコンストラクトを作成する。レトロウイルスベクターは分裂細胞のみに遺伝子が導入されるため、非分裂細胞で構成される神経組織において正常組織に取り込まれる心配がなく、安全性が高いという点で神経細胞への導入に有利である。一方、高い力価まで濃縮することが難しく、神経細胞に感染させにくいという弱点があった。我々は 6000g で 16 時間の長時間遠心を 2 回繰り返すことで、 1×10^{12} cfu/ml という従来に比べて約 1 万倍も高力価のレトロウイルスベクターを調整する方法を確立している。

(5) ベクターを用いた候補因子の導入および強制発現

高力価ベクターを用いて候補因子を成体マウスから得られた Olig2 陽性細胞に感染させ、Olig2 下流因子を強制発現させる。細胞マーカーによる免疫染色を行いオリゴデンドロサイトへの分化が認められるかどうかを評価する。さらに、誘導されたオリゴデンドロサイトが機能できるような成熟した状態であるかどうかを、Myelin basic protein などの成熟オリゴデンドロサイトのマーカーで検討する。また、in vivo への使用を考慮してベクターの安全性や遺伝子導入に伴う腫瘍化などの異常が認められないかどうかも同時に判断する。

(6) 脱髄モデルマウスでの in vivo 実験

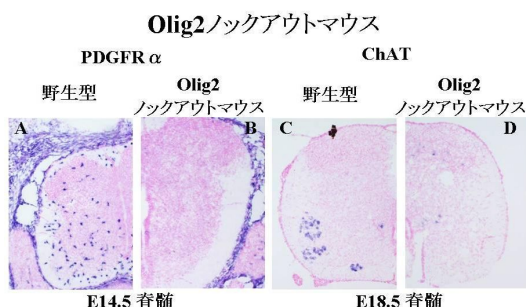
In vitro で成熟オリゴデンドロサイトへの分化誘導が認められたベクターを、実際に脱髄モデルマウスの脊髄に導入し、対照群と比べて運動機能の回復が得られるかどうかを評価する。しかる後に脊髄を採取し、ベクターに感染した細胞が成熟オリゴデンドロサイトへ分化誘導されたかどうか、また脱髄部分に対して髄鞘形成が認められるかを確認する。

4. 研究成果

オリゴデンドロサイトは中枢神経系において、ミエリンを形成し、跳躍伝導を可能にする細胞である。オリゴデンドロサイトは、マウスの脊髄では、E12.5 頃に脳室壁層腹側の限局した部分より発生して実質全体に広がる。この部分からは E9 から E11 頃にかけて運動ニューロンが発生することから pMN-OL ドメインと呼ばれ、オリゴデンドロサイトと運動ニューロンに共通の前駆細胞の存在が示唆されている。また前脳では E12.5 に主に前脳腹側にある ganglionic eminence から生じ、tangential migration により、全体へ広がっていく。

近年、pMN-OL ドメインに発現している転写因子として Olig1, Olig2 が発見され、運動ニューロンとオリゴデンドロサイトの発生に関与すると考えられた。

実際 Olig2 ノックアウトマウスでは脊髄においてオリゴデンドロサイト前駆細胞と運動ニューロンが完全に消失し(図1) 前脳でもほとんどのオリゴデンドロサイト前駆細胞がなくなったため、Olig2 がオリゴデンドロサイトと運動ニューロンの両方の発生に必須の転写因子であることがわかった。



(図1) A, B: 野生型では脊髄全体にオリゴデンドロサイト前駆細胞のマーカーである PDGFR 陽性細胞が認められるが(A)、Olig2 ノックアウトマウスではそれらが消失している(B)。C, D: 野生型では運動ニューロンのマーカーである ChAT 陽性細胞が脊髄全角に認められるが(C)、Olig2 ノックアウトマウスでは陽性細胞がみられない(D)

Olig2 は底板から分泌される腹側化因子であるソニグヘッジホッグにより誘導されることが分かっているが、Olig2 の下流でどのような遺伝子が調節をうけているのかはよく分かっていない。

そこで我々は Olig2 ノックアウトマウスと、野生型マウスの前脳および脊髄で発現している遺伝子の比較を行うことにより、Olig2 により発現調節をうけている遺伝子を同定できると考えた。

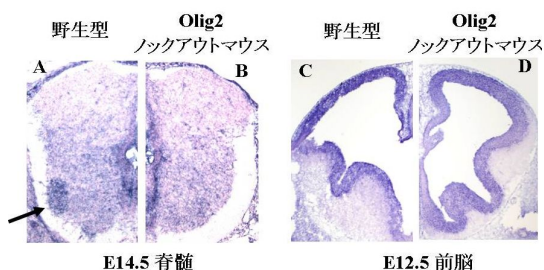
Olig2 ノックアウトマウスではオリゴデンドロサイトと運動ニューロンの発生が著しく阻害されるので、Olig2 で発現している遺伝子と、野生型で発現している遺伝子を比較することにより、Olig2 の下流で働き、両者の分化に関わる遺伝子を同定する予想される。そこで本研究では遺伝子の発現の比較をするために、Clontech PCR-Select cDNA Subtraction 法を用いた。この方法では同一組織を比較して、一方でのみ特異的に発現している mRNA を、発現量に関係なく、一定量の cDNA として検出できる特徴がある。また得られた cDNA に関してはサブクローニングが可能であるので、それをもとに RNA プローブを作成し、in situ hybridization を行い、実際にどのような発現パターンを示すのかを解析できる利点がある。

我々は E13.5 の Olig2KO マウスと野生型マウスの whole head と脊椎でそれぞれ Subtraction を行い図2に示す12個の遺伝子を同定した。

sample	size	Homology search
1	600-700	Mus musculus Prkcl1, Amp1
2	600-700	Mus musculus Prdx1, MSP23, OSF3
3	600	Mus musculus gas5(growth arrest specific gene)
12	322	Mus musculus Sox21
16	500	Mus musculus Medd4, Mdfip1(Medd4 family interacting prot)
18	800-200	Mus musculus MARCKS-like protein(Elp)
25	300	Mus musculus tripartite motif protein2(Trim2)
34	504	Mus musculus SH3-binding domain glutamic acid-rich prot
40	222	Mus musculus neuron specific gene family member2(Msg2)
43	509	Mus musculus sialyltransferase1(Siat1)
61	600-700	Mus musculus heparan sulfate 6-O-sulfotransferase1(Hs6s)
64	557	Mus musculus Traf2 binding protein(T2bp-pending)

(図2) subtraction 法で得られた Olig2 下流候補因子

そして、得られた遺伝子について in situ hybridization を行い、発現パターンを比較した。
その1つの例として Peroxiredoxin 1 の発現パターンを示す(図3)。



(図3) 候補遺伝子 Prdx-1 の in situ hybridization。脊髄においては脊髄前角に陽性細胞が認められ、運動ニューロンに発現している可能性が示唆された(A 矢印)。しかし前脳では染色パターンに差は認められなかった。

Peroxiredoxin 1 は antioxidant enzyme の一種であり Peroxiredoxin1 は野生型の脊髄では運動ニューロンが存在する部分に強く発現しており、Olig2 ノックアウトマウスではそれが認められないことから、運動ニューロンに關与する遺伝子であることが考えられた。

しかしながら、脳の部分で比較すると、厳密にみると、野生型と Olig2 ノックアウトマウスでは、染色の濃度の差があるものの、発現パターンに関しては明らかな差は認められなかった。また、他の遺伝子に関しても発現パターンを比較したが、Olig2 に關連したと思われるような差は認められなかった。

この原因として考えられることは、Olig2 の発現領域は狭い部分に局限しているため、その影響を受ける因子があっても、total の RNA 量に比べて微量で検出できない可能性が考えられる。また遺伝子は様々な働きを持つため、Olig2 により影響を受ける因子が他の部分で発現していて、subtraction で差が得られない可能性などが考えられた。そのため、厳密な subtraction のためには、Olig2 陽性細胞から派生した細胞が、どこに分布するかを同定する必要があり、その前段階として Olig2 陽性細胞から派生する細胞をラベルするシステムが必要と考えられた。

今後の研究の促進方策としては胎生 9.5 日の脊髄腹側部分の組織を集め、ホモジネートし Olig2 抗体を用いて、セルソーターで Olig2 陽性細胞のみを採取する。得られたら細胞を限界希釈法にて、1 細胞/1 well の状態に単離して単一の Olig2 陽性細胞からどのような細胞が生み出されるかをニューロン、オリゴデンドロサイト、アストロサイトなどに特異的なマーカーで抗体染色して、単一の細胞集団へ分化するのか、ヘテロな集団として分化するのかを調べる。次の段階として、Olig2

陽性細胞から運動ニューロンへと分化させる因子を同定するため様々な胎生期の Olig2 陽性細胞を同様の手法で採取しそれぞれの遺伝子発現プロファイルを DNA microtip で比較したり、subtraction 法を用いることによって、MN への分化に働く因子をスクリーニングする。最終的には得られた候補の分化因子を強制発現サイトに導入したレトロウイルスベクターを Olig2 陽性細胞に感染させて分化させる。細胞マーカーで免疫染色を行い、予想される細胞種への特異的分化が得られるかどうかを評価する予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Preoperative acetazolamide SPECT is useful for predicting outcome of shunt operation in idiopathic normal pressure hydrocephalus patients. Yamada SM, Masahira N, Kawanishi Y, Fujimoto Y, Shimizu K., Clin Nucl Med. 査読有, 2013 Sep;38(9):671-6
doi: 10.1097/RLU.0b013e31829959a9

Evaluation of two- and three-dimensional visualization for endoscopic endonasal surgery using a novel stereoendoscopic system in a novice: a comparison on a dry laboratory model., Kawanishi Y, Fujimoto Y, Kumagai N, Takemura M, Nonaka M, Nakai E, Masahira N, Nakajo T, Shimizu K., Acta Neurochir (Wien)., 査読有, 2013 Sep;155(9):1621-7
doi: 10.1007/s00701-013-1757-2

[学会発表](計4件)

政平訓晝、福井直樹、福田真紀、竹村光弘、帆足裕、濱田史泰、野中大伸、中居永一、上羽哲也 ワイドネック動脈瘤に対するマイクロガイドワイヤーアシストの有用性 第 40 回脳卒中学会総会(Stroke 2015), 2015/3/26-29, 広島、リーガロイヤルホテル広島他 3 会場

政平訓晝、福井直樹、福田真紀、竹村光弘、帆足裕、濱田史泰、野中大伸、中居永一、上羽哲也 ワイドネック動脈瘤に対するマイクロガイドワイヤーアシストの有用性 第 30 回日本脳神経血管内治療学会総会, 2014/12/4-6, 横浜、パシフィコ横浜

政平訓晝、小宮山雅樹、川西裕、竹村光弘、野中大伸、中居永一、上羽哲也 くも膜下出血を繰り返した多発性脳動脈瘤の 1 例 第 29 回日本脳神経血管内治療学会総会, 2013/11/21-23, 新潟、新潟コンベンションセンター

政平訓貴、小宮山雅樹、川西裕、竹村光広、
野中大伸、中居永一、上羽哲也 椎骨脳底
動脈系に限局した多発性脳動脈瘤の 1 例
日本脳神経外科学会第 72 回学術総会、
2013/10/16-18, 横浜、パシフィコ横浜

6 . 研究組織

(1)研究代表者

政平 訓貴 (MASAHIRA, Noritaka)
高知大学・教育研究部医療学系・講師
研究者番号：80444769