

学内グラント 報告書

平成28年度 学内グラント報告書

アダルト型オリゴデンドロサイト前駆細胞の分化タイミング決定機構の解析

研究代表者 徳元 康人 (アドミッションセンター)

緒言

アダルト型オリゴデンドロサイト前駆細胞 (Adult oligodendrocyte precursor cell, アダルト OPC) は中枢神経系の体性幹細胞 (somatic stem cell) である¹⁾。中枢神経系の軸索を被覆するミエリン鞘が損傷を受けた時、アダルト OPC はオリゴデンドロサイトに分化して損傷部位を修復する。多くの体性幹細胞と同じく、アダルト OPC は通常ほとんど増殖せず動物の一生を通じて未分化状態のまま維持される²⁾。こうした休眠状態にあるアダルト OPC は胎児期の、活発に自己増殖する増殖期型 OPC から時間依存的に分化してくる。出生直後のラットやマウスの中枢神経系では、ほぼ全ての OPC が増殖期型 OPC であるが生後2週目からアダルト OPC が出現し、その後は時を追うごとにアダルト OPC の存在比率が増してゆき、生後6週目以降になると全ての OPC はアダルト OPC となる。増殖期型 OPC からアダルト OPC への分化がどのようにして起こるのかは謎であったが、研究代表者らはラットやマウスから採取した増殖期型 OPC を低酸素環境下で培養し、同時に甲状腺ホルモンやレチノイン酸などのホルモンで刺激することによりアダルト OPC へ誘導分化させることに成功した³⁾。このとき、単細胞レベルまでバラバラにされた無血清培地中の希薄密度培養という条件にありながら、培養ディッシュ平面上の個々の OPC は生体内と同じ時間タイミングでアダルト OPC に分化する。同じような時間依存的な現象は OPC からオリゴデンドロサイトへの分化でも観察されていて、個々の OPC には適切な分化タイミングを感知する何らかの細胞内在性分子タイマーが存在するのではないかと考えられてきた⁴⁾。研究代表者らは網羅的なトランスクリプトーム解析を行い、増殖期型 OPC からアダルト OPC への分化に関わる6種類の転写因子を同定した (Runx1, Klf9, Hif2a, Csrp1, Nkx6.2, Rev-erbA)。これらのうち最も重要な転写因子は Runx1 である。Runx1 を増殖期型 OPC に過剰発現させると、低酸素環境も、経過時間も、ホルモン刺激さえも関係なくアダルト OPC へ強制的に分化誘導することが出来る³⁾。Klf9 は甲状腺ホルモンのシグナル伝達に、Hif2a は低酸素応答にそれぞれ関わり Runx1 遺伝子の発現を誘導するが、どちらの遺伝子発現も培養時間に影響されることはない³⁾。のこり3種類の転写因子、Csrp1, Nkx6.2, Rev-erbA は、酸素濃度に関わりなく増殖期型 OPC

の培養開始時から時間依存的に遺伝子発現量が増大するが Runx1 遺伝子発現との関係は定かではなかった。もしこれらの時間依存的な発現量の増大を示す転写因子が Runx1 の遺伝子発現コントロールに関与しているのならば、それこそがアダルト OPC の分化タイミングを決定している因子である。そこで、この3種の転写因子の内のどれが Runx1 の遺伝子発現に関わるのか調べた。

材料と方法

生後7日齢の Sprague Dawley ラットの視神経より採取した増殖期型 OPC を、甲状腺ホルモンを含まない無血清培地中で通常酸素濃度条件下で培養した。5日後、Csrp1, Nkx6.2, Rev-erbA それぞれの遺伝子発現を阻害する siRNA (コントロールは non-target siRNA, NT) を GFP 発現レポータープラスミド pMaxGFP と一緒に OPC へ導入した後に、甲状腺ホルモンを含有する無血清培地に移し低酸素環境 (培養気層酸素濃度 1.5%) で更に培養した。4日後 (培養開始後9日目)、FACS を用いて GFP 陽性 OPC を精製し total RNA を抽出して cDNA を作成した。これらをサンプルとしてリアルタイム PCR を行い Csrp1, Nkx6.2, Rev-erbA それぞれの遺伝子発現を阻害した場合における Runx1 遺伝子の発現量を比較した。

結果

図1に示すように、転写因子 Csrp1, Nkx6.2, Rev-erbA の遺伝子発現を阻害した全ての場合において Runx1 遺伝子の発現が抑制されることが分かった。

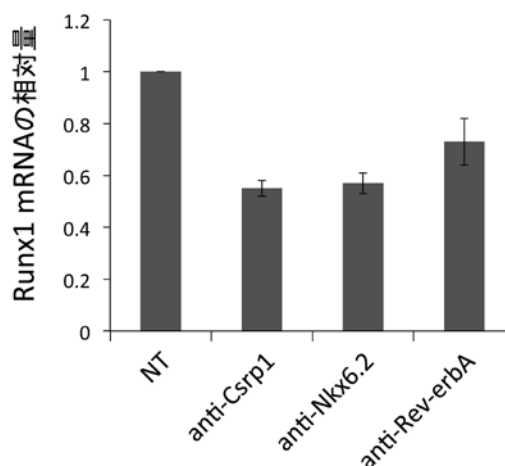


図1.

考 察

酸素濃度に関わりなく時間依存的に発現量が増大する転写因子Csrp1, Nkx6.2, Rev-erbAは全てRunx1遺伝子の発現上昇に関わる事が証明された。つまり増殖期型OPCからアダルトOPCへの変換に関与する6種類の転写因子のうち、Runx1こそがOPCの休眠を決定するマスター因子であり、他の5種類の転写因子はすべてRunx1の遺伝子発現に関わることで間接的にアダルトOPCの分化に寄与するということが明らかとなった。それぞれの関係を図2に示す。アダルトOPCの分化タイミングを決めている3種類の転写因子のうち特に注目すべきはRev-erbAである。Rev-erbAは核内小分子受容体型転写因子であり、そのリガンドはヘムである。またRev-erbAはBmal1の遺伝子発現を直接コントロールすることにより概日時計の補助ループを形成する時計遺伝子でもある⁵⁾。本研究で得られた結果は、数週間にわたる哺乳類の個体発生の分化タイミングの決定に概日時計が寄与する可能性を示唆する。

甲状腺ホルモン+低酸素+時間＝アダルトOPC

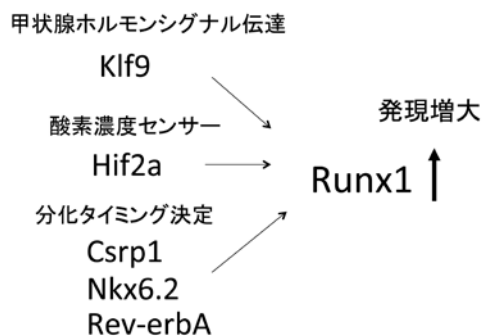


図 2.

謝 辞

研究の実施にあたり実験機器を借用させて頂いた末松誠先生に篤く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Richardson WD, Young KM, Tripathi RB, McKenzie I. NG2-glia as multipotent neural stem cells: fact or fantasy? *Neuron* 2011; 70: 661-73.
- 2) ffrench-Constant C, Raff MC. Proliferating bipotential glial progenitor cells in adult rat optic nerve. *Nature* 1986; 319: 499-502.
- 3) Tokumoto Y, Tamaki S, Kabe Y, Takubo K, Suematsu M. Quiescence of adult oligodendrocyte precursor cells requires thyroid hormone and hypoxia to activate Runx1. *Scientific Reports* 2017; 7: 1019.
- 4) Raff M. Intracellular developmental timers. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2007; 72: 431-5.
- 5) Butler AA, Burris TP. Segregation of Clock and Non-Clock Regulatory Functions of REV-ERB. *Cell Metab* 2015; 22: 197-8.

研究成果リスト

学会発表

- 1) 徳元康人, 玉置親平, 加部泰明, 田久保圭誉, 末松誠. 低酸素環境下で甲状腺ホルモン依存的に発現する転写因子Runx1はオリゴデンドロサイト前駆細胞のアダルト型体性幹細胞化を誘導する, 第69回日本細胞生物学会大会, 平成29年6月13～15日, 仙台
- 2) 徳元康人, 玉置親平, 加部泰明, 田久保圭誉, 末松誠. The somatic stemness of oligodendrocyte precursor cells requires thyroid hormone and hypoxia to activate Runx1, 第60回日本神経化学学会大会, 平成29年9月7～9日, 仙台
- 3) 徳元康人, 玉置親平, 加部泰明, 田久保圭誉, 末松誠. 低酸素環境下で甲状腺ホルモン刺激によって発現誘導される転写因子Runx1はオリゴデンドロサイト前駆細胞を体性幹細胞化させる, ConBio 2017 (2017年度 生命科学系学会合同年次大会), 平成29年12月6～9日, 神戸