

氏名	はましま たける 濱島 丈
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	富生命博乙第9号
学位授与年月日	令和2年7月22日
学位授与の要件	富山大学学位規則第3条第4項該当
学位論文題目	Oligodendrogenesis and myelin formation in the forebrain require platelet-derived growth factor receptor- $\alpha$ (前脳における稀突起膠細胞の発生と髄鞘形成には 血小板由来増殖因子受容体- $\alpha$ が必要である。)
論文審査委員	
(主査)	教授 一條 裕之
(副査)	教授 黒田 敏
(副査)	教授 西条 寿夫
(副査)	教授 中辻 裕司
紹介教員	教授 笹原 正清



論 文 要 旨

論 文 題 目

前脳における稀突起膠細胞の発生と髄鞘形成には  
血小板由来増殖因子受容体-アルファが必要である。

Oligodendrogenesis and myelin formation in the forebrain require  
platelet-derived growth factor receptor-alpha

氏 名 濱 島 丈

---

- 備考 ① 論文要旨は，2,000字程度とする。  
② A4判とする。

#### 〔目的〕

血小板由来増殖因子受容体アルファ (PDGFR $\alpha$ ) は、オリゴデンドロサイト (OL) 前駆細胞の増殖、遊走及び分化の制御を仲介して、発達中の脊髄の OL の生成と髄鞘形成に関与していることが明らかになっている。PDGFR $\alpha$  のノックアウト (KO) マウスは胎児致死性であり、全脳の髄鞘形成は生後の脊髄よりもより遅れた時期に活発となる現象である。従って、発達中の前脳における PDGFR $\alpha$  の解析は困難で、その役割は不明なままである。そこで本研究では、*Nestin* プロモーター/エンハンサーにより発現が誘導される Cre レコンビナーゼ遺伝子を有するマウスを用いて、*Pdgfra* 遺伝子の条件付き KO マウス (N-PR $\alpha$ -KO) を確立した。これにより、胎児致死性を回避して、胎児期から生後の前脳の発達における OL 系譜細胞の動向と髄鞘形成を中心として解析した。

#### 〔方法〕

1. *Nestin promoter*により発現が誘導される Cre レコンビナーゼを導入遺伝子として有するマウスと *Pdgfra* 配列の二か所に LoxP 配列を挿入した遺伝子 (*Pdgfra-flox*) を有するマウスの系統交配実験を実施し、*Nestin promoter*<sup>+/-</sup>; *Pdgfra*<sup>flox/flox</sup> マウス (N-PR $\alpha$ -KO) を得た。N-PR $\alpha$ -KO では、*Nestin* が主として活性化される神経上皮部分で、胎児期の 10.5日 (E10.5) 以降選択的に *Pdgfra* が KO される。対照には C57BL/6 マウス (wild type, WT) を用いた。
2. Cre を介した *Pdgfra* 不活化に伴い *m-Cherry* をレポーター遺伝子として発現する N-PR $\alpha$ -KO-mCherry を作成した。*m-Cherry* の発現を単一細胞内の *Pdgfra* 遺伝子不活性化の間接的な指標として用いた。
3. Olig2 (OL 系列マーカー)、Sox10 (OL 分化マーカー)、Dlx2 (未熟な介在神経細胞マーカー)、MBP (髄鞘)、NeuN (神経細胞)、GFAP (アストロサイト)、Neurofilament (軸索) の免疫染色を行った。TUNEL 法にてアポトーシスを評価した。

#### 〔結果並びに考察〕

1. N-PR $\alpha$ -KO は生後平均 17日 (P17) まで生存した。N-PR $\alpha$ -KO の体重は WT と同様に P7 まで増加した。WT の体重は増加するが、N-PR $\alpha$ -KO では増加不良を認め P9 以降で有意に低値であった。WT の円滑で素早い運動に比較して N-PR $\alpha$ -KO で P11 から四肢のこわばりが出現し P14 で明らかに運動が障害された。
2. N-PR $\alpha$ -KO の Olig2<sup>+</sup> 細胞では、胎児期から生後にわたる全実験期間を通じて、PDGFR $\alpha$  の発現がほぼ抑制された。胎児期の N-PR $\alpha$ -KO の Olig2<sup>+</sup> 細胞は、WT と同様に細胞数が増加し、腹側から背側への遊走も保たれた。一方で N-PR $\alpha$ -KO の Olig2<sup>+</sup> 細胞では Sox10 発現が減少し、髄鞘形成性 OL への分化が大幅に抑制された。N-PR $\alpha$ -KO と WT の間に Dlx2<sup>+</sup>/Olig2<sup>+</sup> 細胞数に差はなく、*Pdgfra* の

不活性化された *Olig2*<sup>+</sup> 細胞の神経細胞への分化転換は示唆されなかった。これらの結果は *Pdgfra* の不活性化が脊髄の OL 細胞の数の増加と遊走を抑制し、早期成熟を来したとする以前の報告と全く異なっていた。

3. *Olig2*<sup>+</sup> 細胞は新生児初期まで WT と同様に N-PR $\alpha$ -KO の脳に広く分布する。しかしながら、N-PR $\alpha$ -KO の *Olig2*<sup>+</sup> 細胞は生後 2週で前脳において激減した。*Olig2*<sup>+</sup> 細胞が相当数残存する P7 において、TUNEL 染色を施行した。皮質、脳梁、線条体において、*Olig2*<sup>+</sup> 細胞中のTUNEL<sup>+</sup>/細胞の割合は、WTに比較して N-PR $\alpha$ -KO で増加した。これらはPDGFR $\alpha$  が生後の脳における *Olig2*<sup>+</sup> の OL 系列細胞の重要な生存因子であることを示した。生理的な発達経路で、生後 2-3 週で大脳皮質の多数の未熟な *Olig2*<sup>+</sup> 細胞がアポトーシスで選択的に適度に排除される。これと同様に *Pdgfra* が不活性化された *Olig2*<sup>+</sup> 細胞の成熟抑制が、N-PR $\alpha$ -KO 脳の *Olig2*<sup>+</sup> 細胞死の亢進と関連した可能性がある。N-PR $\alpha$ -KO-mCherry では、脳全体に mCherry<sup>+</sup> 細胞が見られた。多くの NeuN<sup>+</sup> 細胞と GFAP<sup>+</sup> 細胞は、大脳皮質と脳梁で mCherry<sup>+</sup> であった。*Pdgfra* 不活性化は、神経細胞やアストロサイトの生存と分布には大きな影響を及ぼさないことを示唆した。
4. P15ではN-PR $\alpha$ -KO の脳は肉眼的な異常は示さず、WTと同様であった。一方で MBP<sup>+</sup> の髄鞘の染色性は、脳梁、脊髄および小脳の灰白質において WT に比較して、N-PR $\alpha$ -KO で大幅に減弱した。髄鞘形成は N-PR $\alpha$ -KO で高度に抑制された。脳梁において Neurofilament<sup>+</sup> で示される軸索は WT では密な走行を認めるが、N-PR $\alpha$ -KO では軸索の数が減少し走行の乱れを認めた。*Pdgfra* の KOによる髄鞘形成不全が軸索障害を来し、運動障害の原因となったと考えられた。
5. OL の血管形成への関与が報告されており、N-PR $\alpha$ -KO の血管形成を解析した。胎児期から P3 までの血管構造や分布には WT との差はみられなかった。N-PR $\alpha$ -KO では P7 で脳表面からの貫通血管数が増加し、P13 で脳実質内での豊富な血管形成を認めた。OL の変化と関連した新しい異常血管新生であり、その発生機序の解明は今後の課題である。


[総括]

本研究は胎児期から生後早期にわたる PDGFR $\alpha$  の役割を前脳の OL の生成および髄鞘形成を中心に明らかにした。PDGFR $\alpha$  は全脳においても、脊髄同様に髄鞘形成に重要であった。脊髄とは異なり、*Pdgfra* の KO は胎児期の OL 系統細胞の成熟を妨げるが、細胞数の増加や遊走には影響せず早期早熟も誘導しなかった。

*Pdgfra* の KO は生後の OL 系統細胞の大量死、血管の異常形成、髄鞘の低形成、軸索変性などの形質を示した。いずれもが未報告の新たな知見である。前脳の発達機構を解明するためにさらなる研究が必要である。



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

報 告 番 号	富生命博甲第 号 富生命博乙第 号	氏 名	濱島 丈
論文審査委員	職 名 (主査) 教授 (副査) 教授 (副査) 教授 (副査) 教授	氏 名 一條 裕之 黒田 敏 西条 寿夫 中辻 裕司	
指導 (紹介) 教員	教授	笹原 正清	
(論文題目 英文の場合は和訳, 日本文の場合は英訳を付記すること) Oligodendrogenesis and myelin formation in the forebrain require platelet-derived growth factor receptor-alpha (前脳における稀突起膠細胞の発生と髄鞘形成には血小板由来増殖 因子受容体-アルファが必要である。)		(判定)  合格	
(論文審査の要旨)			
<p>【目的】 血小板由来増殖因子受容体-アルファ (PDGFR<math>\alpha</math>) は、オリゴデンドロサイト (OL) 前駆細胞の増殖、遊走及び分化の制御を仲介して、脊髄のOLの生成と髄鞘形成に関与することが<i>Pdgfra</i>遺伝子のノックアウト (KO) マウスで示されている。濱島氏は前脳におけるOL系譜細胞の髄鞘形成を調べるために、Nestinプロモーター/エンハンサーによって発現誘導されるCreレコンビナーゼ遺伝子を有するマウスを用いて、条件付き<i>Pdgfra</i>遺伝子KOマウスを作成し、前脳におけるOL系譜細胞の細胞動態と髄鞘形成と行動に及ぼす影響を解析した。</p> <p>【方法】 Nestinプロモーター/エンハンサーによって発現が誘導されるCreレコンビナーゼを導入した遺伝子改変マウスと、<i>Pdgfra</i> 配列を<i>LoxP</i> 配列で挟んだ遺伝子 (<i>Pdgfra-flox</i>) を有する遺伝子改変マウスを交配し、<i>Nestin promoter/enhancer Cre<sup>+/-</sup>; Pdgfra<sup>flox/flox</sup></i>マウス (N-PR<math>\alpha</math>-KO) を作成した。N-PR<math>\alpha</math>-KOにおいては、胎児期10.5日 (E10.5) 以降でNestinを発現する神経上皮細胞において<i>Pdgfra</i>遺伝子が選択的にKOされる。Creレコンビナーゼの発現による遺伝子のKOを確認するために、Creを発現した細胞で蛍光性タンパク質遺伝子 <i>mCherry</i>が発現する遺伝子改変マウス (N-PR<math>\alpha</math>-KO-mCherry) を作成し、<i>Pdgfra</i>遺伝子の条件付きKOを間接的に確認した。これらの遺伝子改変マウスにおいて、前脳におけるOL系譜細胞の細胞動態や髄鞘形成を調べるために、Olig2 (OL系譜細胞マーカー)、Sox10 (OL分化マーカー)、</p>			

Dlx2 (未熟な介在神経細胞マーカー)、MBP (髄鞘マーカー)、NeuN (神経細胞マーカー)、GFAP (アストロサイトマーカー)、Neurofilament (軸索マーカー)、CD31 (血管内皮細胞マーカー) 抗体を用いて免疫組織化学染色を行い、TUNEL法によってアポトーシスを評価した。対照としてC57BL/6マウス (*wild-type*, WT) を用い、比較した。

【結果並びに考察】 N-PR $\alpha$ -KOは生後9日 (P9) 以降の体重がWTに比して有意に小さかった。P11以降に四肢のこわばりが観察され、P14以降における運動障害が明瞭であった。ほとんどのOlig2陽性細胞はPDGFR $\alpha$ を発現せず、条件付きのKOが行われていることが確認された。N-PR $\alpha$ -KOのOlig2陽性細胞ではSox10の発現が減少し、分化が抑制された。他方で、WTと同様に胎児期におけるOlig2陽性細胞の細胞増加と、腹側から背側への遊走が観察された。Olig2陽性細胞におけるDlx2発現もWTと同様で、Olig2陽性細胞から神経細胞への分化転換の亢進を示唆する所見は見られなかった。これらの結果は、脊髄における従来の報告とは異なっていた。P7において線条体におけるOlig2陽性細胞のTUNEL陽性率がWTに比して有意に大きく、皮質と脳梁においても類似の傾向を示した。生後2週以降、前脳のこれらの領域におけるOlig2陽性細胞数はN-PR $\alpha$ -KOにおいて高度に減少した。N-PR $\alpha$ -KO-mCherryにおいて、前脳で広くNeuN陽性やGFAP陽性のmCherry陽性細胞が観察され、*Pdgfra*遺伝子KOは神経細胞とアストロサイトの生存と分布に影響を及ぼさなかった。これらの結果は、生後脳では*Pdgfra*遺伝子KOによるOL系譜細胞の成熟抑制がOlig2陽性細胞のアポトーシスの亢進と関連したことで、PDGFR $\alpha$ がOL系譜細胞の生存因子として重要であることを示唆した。P15のN-PR $\alpha$ -KOの脳梁と脊髄・小脳のMBPの染色が減弱しており、髄鞘形成不全が観察された。WTの脳梁においてはNeurofilament陽性軸索の密集した走行が観察されたが、N-PR $\alpha$ -KOの脳梁ではNeurofilament陽性軸索は少なく、走行の乱れを観察した。N-PR $\alpha$ -KOにおける髄鞘形成不全が運動障害に影響していると考えられた。P7以降に皮質表面から深部に侵入し貫通するCD31陽性の血管数がN-PR $\alpha$ -KOにおいて有意に多く、皮質内で豊富な血管形成を観察し、OLの変化と関連した異常血管形成を発見した。

【総括】 本研究において濱島氏は前脳において、胎児期から生後にわたりPDGFR $\alpha$ がOL系譜細胞の細胞動態と髄鞘形成に及ぼす影響を調べ、脊髄で報告されているこれらにおける役割との違いを明らかにした。*Pdgfra*のKOは前脳において胎児期のOL系譜細胞の成熟を妨げ、新生児期のアポトーシスの増加、髄鞘形成不全、および軸索変性を導いたが、脊髄において報告されている細胞数の減少、遊走の異常、および髄鞘の早期形成は引き起こさなかった。さらに、*Pdgfra*のKOの生後前脳でみられた異常な血管形成、軸索変性および運動障害はPDGFR $\alpha$ の欠失と関連する全く新しい形質として見出された。本研究はOL系譜細胞の分化・成熟と髄鞘形成の中樞神経の部位による違い、およびこれらが血管形成や軸索に及ぼす影響を明らかにした点で、新規性が高く、この現象に*Pdgfra*が関わる細胞内シグナル伝達の重要性を示唆した点で学術的重要性が大きい。以上より本審査会は本論文を博士 (医学) の学位に十分値すると判断した。