

氏 名 だん たいん ちゆん
DANG THANH CHUNG

学位の種類 博士(医学)

学位記番号 富生命博甲第55号

学位授与年月日 平成26年3月21日

専攻名 認知・情動脳科学専攻

学位授与の要件 富山大学学位規則第3条第3項該当

学位論文題目 PDGFR- α regulates the dynamism of oligodendrocytes through recruitment of perivascular mesenchymal stem cells in the adult mouse brain
(血小板由来増殖因子受容体 α は、成体マウス脳において、間葉系幹細胞の動員を介して稀突起膠細胞の動態を制御する)

論文審査委員

(主査) 教授 西条 寿夫

(副査) 教授 稲寺 秀邦

(副査) 教授 戸邊 一之

(副査) 教授 嶋田 豊

指導教員 教授 笹原 正清

【学位論文内容の要旨】

[はじめに]稀突起膠細胞 (OL) は神経外胚葉に由来する細胞であり、成体脳において髄鞘の維持と修復を司る。OL の前駆細胞 (OPC) は成体脳の中で例外的に活発な細胞増殖を持続する細胞である。健康な脳には、幹細胞から分化した OPC が分化成熟し、古くなった OL を置換するという一定の細胞の循環が想定されており、外傷などによる髄鞘損傷を修復する高い能力を有するシステムであると考えられている。従って、多発性硬化症等の髄鞘破壊性疾患では幹細胞を用いた OL の補充療法に期待が寄せられている。脳には脳室下帯の神経幹細胞や血管周囲に分布する間葉系幹細胞 (MSC) が同定されており、*in vitro* ではこれらの細胞を OPC に分化誘導することが可能である。しかしながら、脳の中で、これらの幹細胞が OL 系統の細胞に分化するのか、あるいは OL の動態に関与するのか等については不明であり、これらの幹細胞を標的とした治療方法の確立には至っていない。一方で血小板由来増殖因子受容体 α (PDGFR- α) は OPC に高発現しており、培養実験や胎生期脳の研究から OPC の増殖や遊走を刺激する重要なシグナルを伝達すると推定されている。しかしながら PDGFR- α 遺伝子ノックアウトマウス (KO) は胎生致死であり成体脳における機能は不明である。本研究では、成体マウスに PDGFR- α 遺伝子 KO を誘導し、OL 系統の細胞の動態を調べた。

[材料と方法]

8~10 週齢の雄性マウスを用いた。マウスには、全身性に活性化するプロモーターの下流にタモキシフェン (TM) により活性化される Cre レコンビネース遺伝子 (*Cre-ER*)、Nestin プロモーター下流に挿入された活性型 Cre (*Nestin-Cre*)、Rosa26 に挿入された Cre が誘導する遺伝子改変のレポーター遺伝子 (*mCherry*)、および Cre により蛋白発現が抑制される *PDGFR- α^{flox}* 等が様々な組み合わせにて導入されている。一部の実験では GFP (Green fluorescence protein) または Cre を発現するウイルス (GFP-retrovirus、GFP-lentivirus、Cre-lentivirus) の感染実験で、細胞起源の探索と PDGFR- α 遺伝子の KO を行った。飲水に BrdU または EdU を投与し、増殖細胞を標識した。免疫蛍光染色では、未分化な OPC の指標として NG2 と PDGFR- α 、分化した OL の指標として CC1 と GST π 、成熟した OL の指標として MBP、OPC と OL に共通の指標として Olig2 と Sox10、MSC の指標として nestin、CD13、CD105、NG2 を用いた。

[結果]

(*Cre-ER^{+/-}*; *PDGFR- $\alpha^{flox/flox}$*) マウスに TM を投与し、PDGFR- α 発現を抑制したマウス (Esr-KO) における OL および OPC の動態を観察した。TM 投与の数日後に PDGFR- α および NG2 陽性の OPC は殆ど消失した。TM 投与前に BrdU により OPC を前標識することにより、PDGFR- α KO 後には殆どすべての OPC が速やかに CC1 や GST π を発現する様に分化し、一部は MBP 陽性細胞へと成熟したことを確認した。

(*PDGFR- $\alpha^{flox/flox}$*) のみを有する対照マウス (Floxed) に Esr-KO と同様の処置を行っ

たところ、前標識された BrdU 陽性の OPC の一定部分は OPC の状態にとどまり、BrdU 陽性細胞の成熟度は有意に Esr-KO より低いレベルにとどまった。

Esr-KO では、TM 投与により OPC が一旦消失した後に、脳の至る部分から同時に新たな OPC が再出現し始め、21 日目には投与前と同様に脳の広範囲でびまん性に OPC が分布するまでに回復した。GFP-retrovirus の感染実験によりこれらの OPC が髄膜や大脳皮質および線条体に由来することを同定した。一方、従来示されている脳室下帯 (SVZ) の神経幹細胞に OPC が由来する事を示す結果は GFP-retrovirus、および GFP-lentivirus を用いた感染実験では得られなかった。

Esr-KO に再出現した OPC は nestin、CD13 あるいは NG2 等の MSC の指標を発現しており、これらが陽性の OPC は髄膜や血管の近傍にも見られた。対照群の Flox マウスの OPC では、これらの MSC の指標の発現は見られない。Esr-KO の GFP-retrovirus 感染実験から MSC 指標陽性の OPC が髄膜に由来することを示した。また、*mCherry* を有する Esr-KO に再出現した OPC に *mCherry* 発現は見られないことより、これらの細胞は遺伝子改変を回避した細胞由来であると判断した。*Cre-ER* と *mCherry* を有するマウスでは、遺伝子改変を回避した MSC が血管周囲あるいは髄膜に存在しており、再出現した OPC の起源と推定した。さらに、PDGFR- α の中和抗体を脳室内に持続投与した実験では有意に OPC の再出現が抑制された。Esr-KO における OPC の再出現には PDGFR- α の OPC の増殖および遊走促進能が寄与していることが疑われた。

nestin-Cre と *mCherry* を有するマウス脳への GFP-lentivirus の感染実験により、PDGFR- α 発現が保存された正常マウス脳でも、髄膜の MSC に由来する OPC が存在することを示した。さらに PDGFR- α 発現が保存された *PDGFR- α ^{flox/flox}* と *mCherry* を有するマウスへの Cre-lentivirus の感染により、MSC は PDGFR- α に非依存的に、Olig2 あるいは Sox10 陽性の OL 細胞に分化しうることを示した。

[総括と考察]

稀突起膠細胞 (OL) は神経外胚葉に由来する細胞であり、成体脳において髄鞘の維持と修復を司る。PDGFR- α はその前駆細胞である OPC に発現しており、OPC の増殖の刺激や早熟の抑制に関与し、発達期の脳における髄鞘形成に必須である。本研究では、成体マウスに全身性の PDGFR- α 遺伝子ノックアウト (KO) を誘導し、その役割を検証した。遺伝子発現が KO されたマウス脳では、数日後より OPC がより成熟した OL 細胞の表現型を獲得したため、一過性に OPC がほぼ完全に消失した。PDGFR- α が KO された OPC は髄鞘形成細胞にまで分化することも確認された。この現象に平行して、およそ一か月の経過で脳全体に OPC が再分布した。ウイルスベクターを用いた細胞起源の探索から、再分布した OPC は、髄膜や血管に存在し、PDGFR- α KO を免れた間葉系幹細胞 (MSC) に由来するものであることを明らかにした。PDGFR- α 発現の保存された正常の成体脳においても、PDGFR- α KO 同様に、間葉系幹細胞に由来して OPC が出現する事実を Genetic mapping により同定した。

以上より、成体脳では、PDGFR- α が OPC 固有の一定の未熟な分化状態を保持すること、OPC の欠失は髄膜や血管周囲に存在する MSC が多量に動員されることにより補充されうること、また、この過程にも PDGFR- α が関与するという、全く新たな事実を見出した。成体脳における PDGFR- α の役割を示したことに加えて、脳に分布する MSC が脱髄疾患の幹細胞治療の標的となりうることを明らかにした。今後、MSC を脳に動員するシグナルの探索等の幹細胞を標的としたさらなる研究が必要である。

【論文審査の結果の要旨】

【はじめに】

稀突起膠細胞 (OL) は神経外胚葉に由来する細胞であり、成体脳において髄鞘の維持と修復を司り、その前駆細胞 (OPC) は成体脳の中で例外的に活発な細胞増殖を持続する細胞である。外傷などによる髄鞘損傷時には、幹細胞から分化した OPC が、分化成熟し、古くなった稀突起膠細胞を置換するという細胞動態が想定されている。しかし、神経幹細胞や間葉系幹細胞 (MSC) などの幹細胞から OPC ならびに稀突起膠細胞に分化する過程、また、とくに成体脳において血小板由来増殖因子受容体 α (PDGFR- α) がこれらの過程にどう関与しているかは不明である。Dang 氏は、成体脳における髄鞘形成の制御機構を解明するために、成体マウスにおいて PDGFR- α 遺伝子のノックアウト (KO) を誘導し、その後の OPC および稀突起膠細胞の細胞動態の解析、さらに、これらの過程に関与する幹細胞の同定を試みた。

【材料と方法】

8~10 週齢の雄性マウスを用いた。マウスには、全身性に活性化するプロモーターの下流にタモキシフェン (TM) により活性化される Cre レコンビネース遺伝子 (*Cre-ER*)、Nestin プロモーター下流に挿入された Cre (*Nestin-Cre*)、Rosa26 に挿入された遺伝子改変のレポーター遺伝子 (*mCherry*)、および Cre により蛋白発現が抑制される PDGFR- α^{floxed} が様々な組み合わせにて導入されている。一部の実験では GFP または Cre を発現するウイルス (GFP-retrovirus、GFP-lentivirus、Cre-lentivirus) の感染実験で、細胞起源の探索や PDGFR- α 遺伝子の KO を行った。飲水に BrdU または EdU を投与し、増殖細胞を標識した。免疫蛍光染色では、未分化な OPC の指標として NG2 と PDGFR- α 、成熟した OL の指標として CC1 と GST π 、より成熟した稀突起膠細胞の指標として MBP、OPC と稀突起膠細胞に共通の指標として Olig2 と Sox10、間葉系幹細胞の指標として nestin、CD13、CD105、NG2 を用いた。

【結果】

(*Cre-ER*^{+/-}; PDGFR- $\alpha^{floxed/floxed}$)マウスに TM を投与し、PDGFR- α 発現を抑制したマウス

(Esr-KO) では、TM 投与の数日後に PDGFR- α および NG2 陽性の OPC は殆ど消失した。

TM 投与前に BrdU により前標識された殆どの OPC は、PDGFR- α KO 後に速やかに CC1 や GST π を発現する細胞に分化し、一部は MBP 陽性細胞へと成熟した。Esr-KO と同様の処置を行った (PDGFR- $\alpha^{flox/flox}$) のみを有する対照マウス (Floxed) では、BrdU 陽性の OPC の成熟度は Esr-KO より有意に低いレベルにとどまった。

Esr-KO では、TM 投与により OPC が一旦消失した後に、脳の至る部分から同時に新たな OPC が再出現し、21 日目には投与前と同様に脳の広範囲でびまん性に OPC が分布するまでに回復した。GFP-retrovirus の感染実験では、これらの OPC が髄膜や大脳皮質および線条体等の脳実質に由来した。一方、脳室下帯 (SVZ) の神経幹細胞に OPC が由来する事を示す結果は GFP-retrovirus、および GFP-lentivirus を用いた感染実験では得られなかった。

Esr-KO に再出現した OPC は nestin、CD13 あるいは NG2 等の間葉系幹細胞の指標を発現しており、これらが陽性の OPC は髄膜や血管の近傍にも見られた。Floxed マウスの OPC ではこれらの間葉系幹細胞の指標の発現は見られない。Esr-KO の GFP-retrovirus 感染実験では、MSC 指標陽性の OPC が髄膜由来であった。これらの再出現した OPC は mCherry 陰性で、Cre による遺伝子改変を回避した細胞に由来した。レポーターマウスの解析より、再出現した OPC の起源は血管周囲あるいは髄膜に存在する遺伝子改変を回避した間葉系幹細胞であると推定した。PDGFR- α の中和抗体の脳室内への持続投与は有意に OPC の再出現を抑制した。Esr-KO における OPC の再出現には PDGFR- α の OPC の増殖および遊走促進能が寄与していることが疑われた。

nestin-Cre と mCherry を有するマウスへの GFP-lentivirus の感染実験により、PDGFR- α 発現が保存された正常マウス脳でも、髄膜の間葉系幹細胞に由来する OPC が存在することを示した。さらに PDGFR- α 発現が保存された PDGFR- $\alpha^{flox/flox}$ と mCherry を有するマウスへの Cre-lentivirus の感染により、間葉系幹細胞は PDGFR- α に非依存的に稀突起膠細胞に分化した。

【総括】

本研究では、成体マウスに全身性の血小板由来増殖因子受容体 α (PDGFR- α) 遺伝子ノックアウト (KO) を誘導し、その役割を検証した。遺伝子発現が KO されたマウス脳では、数日後より稀突起膠細胞の前駆細胞である OPC が成熟して稀突起膠細胞に移行したため、一過性に OPC が消失した。この後、およそ一か月の経過で脳全体に OPC が再出現した。ウイルスベクターを用いた細胞起源の探索から、再出現した OPC は、髄膜や血管に存在する間葉系幹細胞に由来するものであることが明らかになった。同様に、正常に PDGFR- α が発現している正常の成体マウス脳においても、KO マウスと同様に間葉系幹細胞から OPC に分化誘導される過程が機能していることを明らかになった。

以上より、成体脳では、PDGFR- α が OPC の動態制御に深くかかわり、さらに、PDGFR- α KO 後の OPC の欠失が髄膜や血管周囲に存在する間葉系幹細胞の動員により補充されることを初めて明らかにした点には新規性があり学術的重要性も高い。また、脳に分布する間葉系幹細胞が脱髄疾患治療の標的となりうることを明らかにした理由により臨床的発展性が期待できる。従って、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。