

博士論文

脊髄損傷後の再髄鞘化制御における
クロマチンリモデリング因子 Chd7 に関する研究

土肥 透

脊髄損傷後の再髄鞘化制御における
クロマチンリモデリング因子 Chd7 に関する研究

所属 医学系研究科外科学専攻整形外科学

指導教員 田中栄 教授

土肥 透

目次

	頁
1. 要旨	5
2. 略語	6
3. 序論	11
4. 実験材料および方法	25
4-1. 動物	
4-2. マウス圧挫脊髄損傷モデルの作成	
4-3. 行動学的解析	
4-4. タモキシフェン及び BrdU 投与	
4-5. 脊髄サンプル採取と免疫組織及び細胞化学染色	
4-6. プラスミド及びレトロウイルスの作成	
4-7. 培養 OPC とレトロウイルス感染	
4-8. 細胞培養とトランスフェクション	

4-9. 定量 RT-PCR

4-10. クロマチン免疫沈降 (chromatin immunoprecipitation, ChIP)

4-11. 共免疫沈降及びウエスタンブロッティング

4-12. Proximity ligation assay (PLA)

4-13. マイクロアレイ解析

4-14. 抗体及び希釈濃度

4-15. 実験結果の解析手法及び統計学的解析法

5. 結果

46

5-1. Chd7 は発生期及び成体正常脊髄の OL 系譜細胞に発現する

5-2. 脊髄損傷後急性期の活性化 OPC に Chd7 と Sox2 が共発現する

5-3. Chd7 は脊髄損傷後の OPC 活性化に必要である

5-4. Chd7 は発生期及び成体正常脊髄の OPC 増殖、系譜維持に必要である

5-5. *in vitro* で Chd7 と Sox2 は OPC 増殖と系譜維持を制御する

5-6. Chd7 と Sox2 は OL 関連遺伝子群の発現を制御する

5-7. Rgcc 及び PKC θ は Chd7 - Sox2 複合体の直接の標的分子である

5-8. Rgcc 及び PKC θ は OPC 増殖と系譜維持を制御する

6. 考察	96
7. 結語	105
8. 謝辞	106
9. 引用文献	107

1. 要旨

脊髄損傷後のオリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC)活性化における Chd7 の役割を解析した。OPC 特異的 Chd7 ノックアウトマウスでは脊髄損傷後の OPC の増殖、分化が抑制され、再髄鞘化の減少により、運動機能回復が有意に不良であった。このことから、Chd7 が脊髄損傷後の再髄鞘化による運動機能回復に重要な役割を担っていることが示された。さらに OPC において Chd7 と Sox2 は複合体を形成し、その増殖に関与する新規分子 Rgcc 及び PKCθ の発現を直接制御することが示された。Chd7、Rgcc 及び PKCθ は脊髄損傷治療の新規創薬標的分子となる可能性が示唆された。

2. 略語

Ab: antibody

aCSF: artificial cerebrospinal fluid

bFGF: basic fibroblast growth factor

BMP: bone morphogenetic protein

BMS: Basso Mouse Scale

BRD: bromodomain

BrdU: 5-bromo-2'-deoxyuridine

CHD: chromodomain helicase DNA-binding protein

ChIP: chromatin immunoprecipitation

cl-Casp3: cleaved caspase 3

CSPG4: chondroitin sulfate proteoglycan 4

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

DNMT: DNA methyltransferase

dpi: days post injury

DSP: dithiobis succinimidyl propionate

EdU: 5-ethynyl-2'-deoxyuridine

ES cells: embryonic stem cells

Ex: exon

4-OHT: 4-hydroxytamoxifen

FPKM: fragments per kilobase of exon per million reads mapped

GalC: galactocerebroside

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GBM: glioblastoma multiforme

G-CSF: granulocyte-colony stimulation factor

GEO: Gene Expression Omnibus

GFAP: glial fibrillary acidic protein

GIST: gastrointestinal stromal tumor

GM: gray matter

GO: gene ontology

GST π : glutathione S-transferase π

Gt: goat

HDAC: histone deacetylase

HGF: hepatocyte growth factor

IgG: immunoglobulin G

IP: immunoprecipitation

iPS cells: induced pluripotent stem cells

MAG: myelin-associated glycoprotein

MBP: myelin basic protein

NASCIS: National Acute Spinal Cord Injury Study

NG2: neural/glial antigen 2

NPC: neural progenitor cells

NS: non-significant

OL: oligodendrocytes

OPC: oligodendrocyte precursor cells

PBS: phosphate buffered saline

pCAGIG: pCAG-IRES-EGFP

PDGFR α : platelet-derived growth factor receptor α

PDL: poly-D-lysine

PEI: polyethyleneimine

PFA: paraformaldehyde

PGK: phosphoglycerate kinase

PKC θ : protein kinase C θ

PLA: proximity ligation assay

pMXIG: pMX-IRES-EGFP

Rb: rabbit

Rgcc: regulator of cell cycle

Shh: sonic hedgehog

shRNA: short hairpin RNA

TET: ten-eleven translocation

TRH: thyrotropin-releasing hormone

T3: triiodothyronine

Tx: tamoxifen

WCL: whole cell lysate

WM: white matter

3. 序論

脊髄損傷は転落や交通事故などの外傷により脊髄が損傷されることで、四肢、体幹の運動知覚障害、膀胱直腸障害などの重篤な後遺障害を引き起こす代表的な中枢神経系外傷のひとつである。脊髄損傷新規患者発生数は、我が国では年間約 5000 人 (人口 100 万人あたり約 40 人) [1]、世界では約 25 – 50 万人 (WHO 2013 年報告)とされており、急性期治療を終えた後も残存する神経機能障害による麻痺や痙縮、疼痛により、重篤な身体的、心理的苦痛をもたらすのみならず、長期間のケアの必要性から患者家族、地域社会に多大な社会的、経済的損失をもたらす。

脊髄損傷の治療には、主に脊髄除圧手術などの外科的手術や、残存神経機能回復を目指したリハビリテーションの実施、薬剤治療としてはステロイド薬の使用などが行われている。手術的治療に関しては有効性に関する報告も認められるが [2]、統計学的解析に多くの症例数が必要とされることから、有効性を確認するためのランダム化比較試験の実施が困難な現状である。ステロイド大量療法 (メチルプレドニゾロン大量療法)は 1990 年に National Acute Spinal Cord Injury Study (NASCIS)が有効性を報告して以来 [2]、わが国で唯一保険適応が認められている脊髄損傷治療薬であるが、近年その有効性に疑問を呈する報告

[3-5]が散見されるようになり、さらに2013年のアメリカ脳神経外科学会が発表した急性期脊髄損傷治療ガイドラインでその有害事象に関する報告が示され、ステロイド投与を推奨しないことが明記された [6]。

こういった現状から、脊髄損傷の病態に応じた新たな治療法や薬剤が試みられるようになってきている。脊髄損傷の一般的な病態経過として、直達外力による脊髄組織の挫滅損傷 (一次損傷)の後に、数日から数週間かけて炎症による損傷拡大 (二次損傷)が誘導され、軸索損傷やニューロン細胞死、脱髄などが引き起こされる。その後、炎症の沈静化や、脱髄した神経軸索への新たな髓鞘形成 (再髓鞘化)、部分的な神経軸索の再生により一定の神経機能の回復が認められるが、損傷瘢痕部周囲に反応性アストロサイトによるグリア瘢痕が形成されることで、軸索再生が阻害され、恒久的な神経機能障害が残存すると言われている [7, 8]。そこで脊髄損傷の病態に応じた新たな治療の取り組みとしては、二次損傷の原因となる炎症の抑制や、ニューロン細胞死の抑制 (神経保護)、軸索再生の促進などの効果を有する新規薬剤の検討が進められている。現在まで報告されている代表的な薬剤として、GM-1 ガングリオシド [9]、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (thyrotropin-releasing hormone, TRH) [10, 11]、ミノサイクリン [12, 13]、リルゾール [14]、エリスロポイエチン [15]などが知られている。他にサイトカ

インや成長因子も検討されており、代表的なものとして顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte-colony stimulation factor, G-CSF) [16]、肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor, HGF) [17]、塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) [18]があり、いずれも国内での臨床治験が進行中である。

上記新規薬剤に加え、近年では損傷脊髄への細胞移植治療についての研究が急速に進んでいる [19, 20]。特に 2006 年には、分化した体細胞への特定の遺伝子導入による人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells, iPS 細胞)への初期化 (リプログラミング)技術が樹立され [21]、脊髄再生治療への応用が期待されている。移植細胞として代表的なものでは、神経幹細胞 (胎児由来、embryonic stem cells [ES 細胞] 由来、iPS 細胞由来) [22-24]、嗅神経鞘細胞 [25, 26]、間葉系幹細胞 [19, 27, 28]、シュワン細胞 [29]、活性化マクロファージ [30]などがあり、国内でも臨床治験の実施が進められている。細胞移植治療で期待される効果として、損傷により失われたニューロンなどの神経系細胞補充による効果や、移植細胞由来液性因子による炎症抑制、神経保護、軸索再生効果などが挙げられる。実際に動物モデルでの検討や臨床治験において細胞移植治療の有効性に関する報告は数多く認められる [19, 20]。その一方で倫理的問題 (特に胎児由来、ES 細胞由来移植細胞)、細胞移植による感染症や腫瘍化の危険性 (特に iPS 細胞

由来移植細胞) [31, 32]、移植細胞の準備にかかる期間の長さや、移植細胞を均一に保つ技術、コストの問題などが挙げられており、脊髄損傷治療での実用化のためには未だ多くの問題点が残されている。

細胞移植治療に変わる脊髄再生治療として、中枢神経系に内在する神経幹細胞や前駆細胞の活性化により、損傷脊髄の機能回復を図る方法が考えられている [20]。神経幹細胞は成体脳では主に側脳室下帯、海馬歯状回顆粒下層に存在し、生涯にわたってニューロン新生に関与することが知られている [33-35]。脳梗塞後には修復のメカニズムのひとつとして、内在性の神経幹細胞が増殖し、梗塞巣周囲に遊走、一部は新生ニューロンになり、既存のニューロンとシナプス形成することが知られている [36, 37]。こういった病態時に起こる一連の内在性の修復反応は、成体哺乳類では非常に効率の低いものであるが、この効率を高めるような治療法や薬剤の開発が重要であると考えられている [38]。

神経幹細胞以外の前駆細胞として、脊髄組織においても比較的多く認められるのが、オリゴデンドロサイト前駆細胞 (oligodendrocyte precursor cells, OPC) である。オリゴデンドロサイト (oligodendrocytes, OL) は、アストロサイト (中間径フィラメントである glial fibrillary acidic protein [GFAP] を発現する) とともに中枢神経系のグリア細胞の一種であり、神経軸索周囲に髓鞘を形成することで、跳

躍伝導による速やかな神経伝導を可能とし、ニューロンへの栄養供給、軸索保護などの機能を果たしている [39]。OL の前駆細胞である OPC は、マウス脊髄では胎齢 12.5 日 (embryonic day 12.5, E12.5) に運動ニューロンが発生する pMN ドメインと呼ばれる腹側の Olig2 発現領域より発生し、E15.5 ごろから背側の dp3, 4, 5, 6 ドメインの Olig2⁺ 前駆細胞からも発生する (図 1)。発生した OPC は細胞表面マーカーとして platelet-derived growth factor receptor α (PDGFR α) [40] や neural/glial antigen 2 (NG2, chondroitin sulfate proteoglycan 4 [CSPG4] としても知られる) [41, 42] を発現し、増殖をしながら、前駆細胞ドメインから遊走、発生期脊髄全体に広がっていく [43-45]。成体においても OPC は脊髄を含む中枢神経系に広く存在し、静止状態を保ちながら、一部緩徐に増殖し、成熟 OL (マーカーとして CC1、glutathione S-transferase π [GST π]、myelin basic protein [MBP]、myelin-associated glycoprotein [MAG]、galactocerebroside [GalC] などを発現する) に分化することで、中枢神経系の髄鞘恒常性の維持に寄与している [46-50]。また OPC は多発性硬化症などの脱髄性疾患や脊髄損傷などの中枢神経系外傷において、静止状態から速やかに活性化、増殖することが知られている [51-53]。活性化した成体内在性 OPC は新生 OL に分化、成熟し、脱髄した神経軸索を再髄鞘化することで、神経機能回復に寄与すると考えられている [54-56]。以上のこ

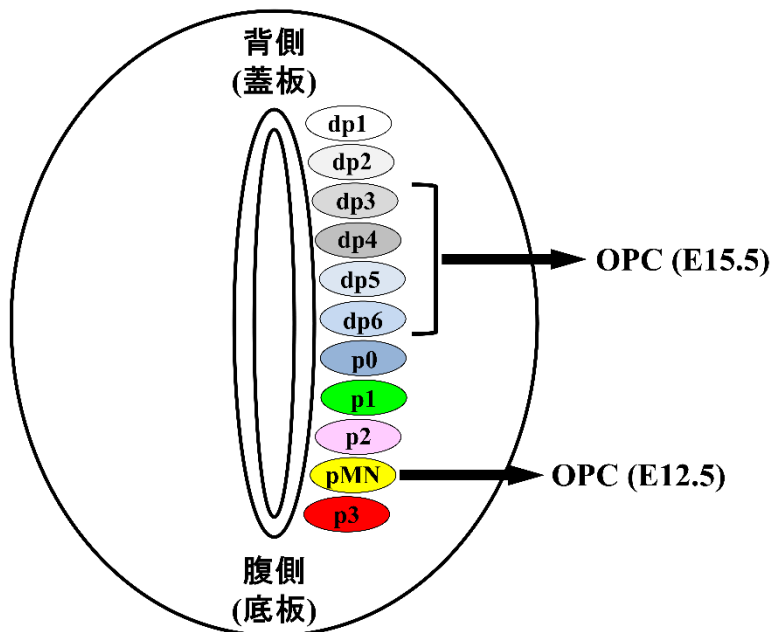


図1 マウス発生期脊髄における OPC 発生の模式図

マウス発生期脊髄の脳室帯における各前駆細胞ドメインを示す。OPC は E12.5 に腹側の pMN ドメインより発生し、E15.5 ごろから背側の dp3, 4, 5, 6 ドメインから発生する。

とから損傷脊髄における再髄鞘化の促進は脊髄損傷に対する重要な治療戦略のひとつであり、その細胞供給源となる成体内在性 OPC の活性化を制御する分子は、新たな脊髄損傷治療の創薬標的分子となる可能性があると考えられる。

OL 発生の制御因子として細胞外来性シグナル因子及び細胞内因性制御因子がある。代表的な細胞外来性シグナル因子として、FGF、PDGF、Sonic hedgehog (Shh)、bone morphogenetic protein (BMP)、Wnt、Notch、ニューロンの活動電位などが知られている [57]。OL 発生の細胞内因性制御因子としては転写因子による制御及び、エピジェネティック因子による制御がある [58-60]。OL 発生を制御する転写因子として代表的なものでは、Sox9 [61]、Ascl1 [62, 63]、Olig2 [64, 65]、Sox10 [66, 67]、Olig1 [68]などが知られている (図 2A)。また損傷後の OPC 活性化においては iPS 細胞へのリプログラミングに必要な山中 4 因子 [21]のひとつ、Sox2 が関与すると言われている [69, 70]。Sox2 は神経系前駆細胞 (neural progenitor cells, NPC) マーカーとしてよく知られている [71]が、発生期及び成体中枢神経系の OPC にも発現し、脊髄損傷後の活性化した OPC でその発現が増加することが報告されている (図 2A) [69, 70, 72, 73]。

OL 発生を制御する細胞内因性制御因子として転写因子以外にエピジェネティック因子による制御が知られている [58-60]。エピジェネティクスは「DNA 塩

基配列変化によらない後天的な遺伝子発現を制御・伝達するシステム及びその学術分野」と一般的に定義され、主なエピジェネティックな制御メカニズムとして、様々なヒストンの翻訳後修飾 (メチル化、アセチル化、リン酸化、ユビキチン化、SUMO 化)や DNA メチル化、クロマチンリモデリングなどが知られている [74]。エピジェネティックな制御は細胞の発生・分化の過程や、生体恒常性維持に必須のものであるが、その制御メカニズムの異常は、癌や神経変性疾患などの病態と関連することも知られている [75, 76]。近年では主に癌治療領域等においてエピジェネティック創薬の臨床応用に関する研究が進んでおり、主なものでは DNA メチル化酵素 (DNA methyltransferase, DNMT)阻害剤、ヒストン脱アセチル化酵素 (histone deacetylase, HDAC)阻害剤、ブロモドメイン (bromodomain, BRD)阻害剤などの癌治療での臨床治験が進められている [77]。脊髄損傷治療においてもエピジェネティック因子を利用した治療法開発に関する基礎研究報告が散見される [78-80]。以上のことから脊髄損傷後の再髄鞘化を制御するエピジェネティック因子は、脊髄損傷治療の新たな創薬標的分子となり得る可能性があると考えられる。

OL 発生に関与するエピジェネティック因子 (図 2B)としてはヒストン修飾酵素として HDAC1 及び 2 が OL 分化を制御するという報告 [69, 81, 82]や、HDAC3

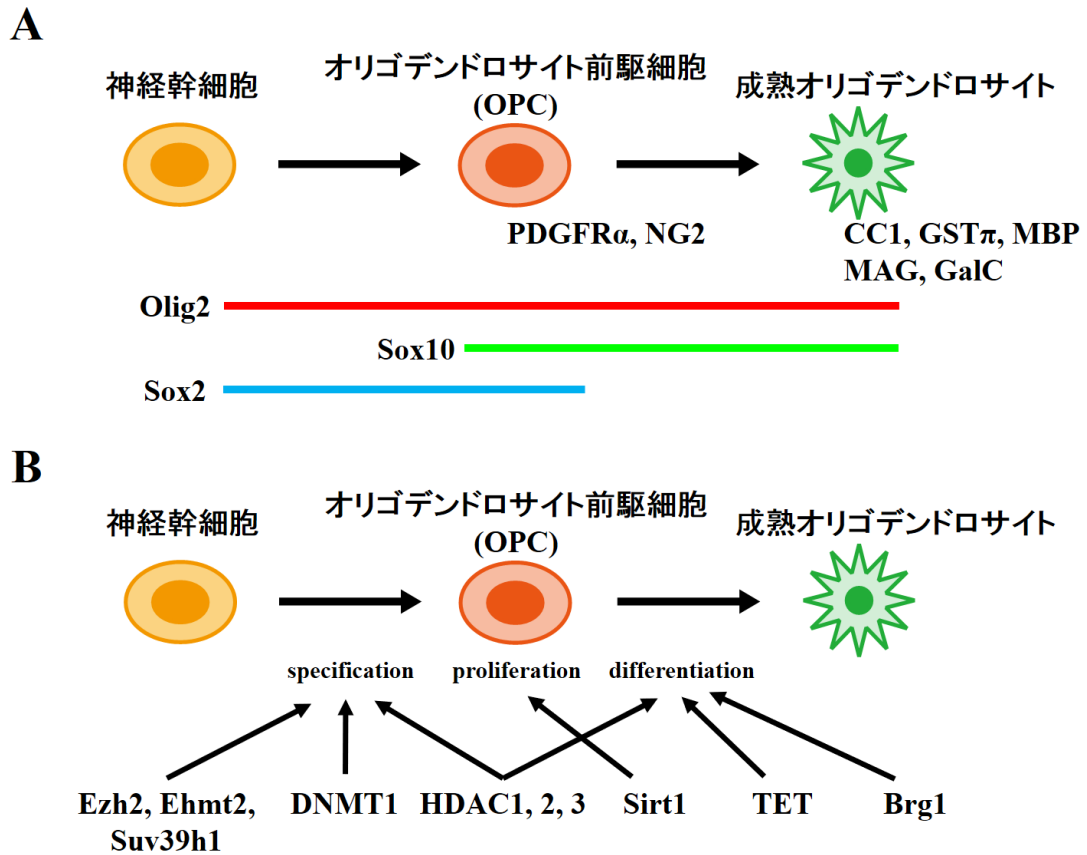


図 2 OL 発生を制御する転写因子及びエピジェネティック因子

A: OL 発生を制御する転写因子 Olig2, Sox10, Sox2 の OL 系譜細胞における発現パターン模式図。

B: OL 発生を制御するエピジェネティック因子の模式図。

が OL の細胞系譜維持に働くという報告 [83]、Sirtuin 1 が OPC 増殖を制御するという報告がある [84, 85]。またヒストンメチル化酵素では Ezh2 及び Ehmt2、Suv39h1 が OL 発生を制御することが示されている [86-88]。ヒストン修飾に加えて DNA メチル化では DNMT1 が OPC 発生や分化に関与するという報告や DNA 脱メチル化酵素の ten-eleven translocation (TET)ファミリー分子が OL 分化に必要であるなどの報告がある [89, 90]。

エピジェネティックな制御には上記ヒストン修飾やDNAメチル化以外にクロマチンリモデリング因子による制御がある。クロマチンリモデリング因子は9~12個のサブユニットからなる巨大な複合体を形成し、ATPaseドメインによって産生されるATP加水分解エネルギーを利用して、ヌクレオソーム上でのDNAのスライド (nucleosome sliding)、DNAとヒストン分子の解離 (nucleosome unwrapping)、ヒストン分子の除去 (histone eviction)、ヒストンバリエントの置換 (exchange of histone variants)などにより、ヌクレオソーム内のDNAへのaccessibilityが変化することで、遺伝子発現を調節している [91] (図3A)。クロマチンリモデリング因子は、触媒サブユニットの違いにより、SWI/SNF、ISWI、INO80、CHDの4つのサブファミリーに大別されている [92, 93] (図3B)。クロマチンリモデリング因子による制御は神経系の発生に必須であるとされており

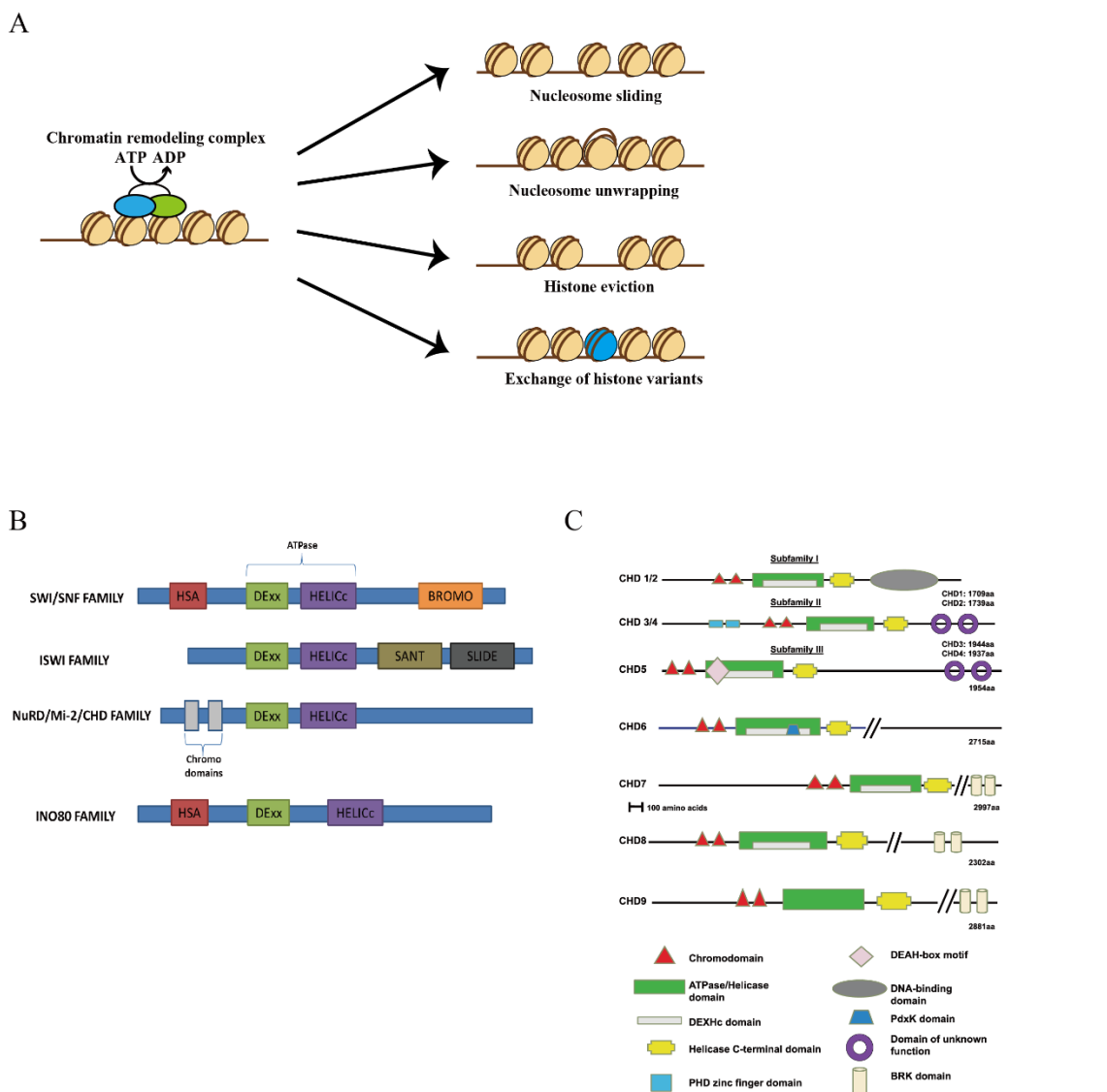


図3 クロマチンリモデリング因子

A : クロマチンリモデリング因子による DNA への accessibility 制御メカニズムの概要図。

B : クロマチンリモデリング因子のサブファミリータンパク質模式図。(文献番号 [91] Xu *et al.*, 2013 より抜粋)

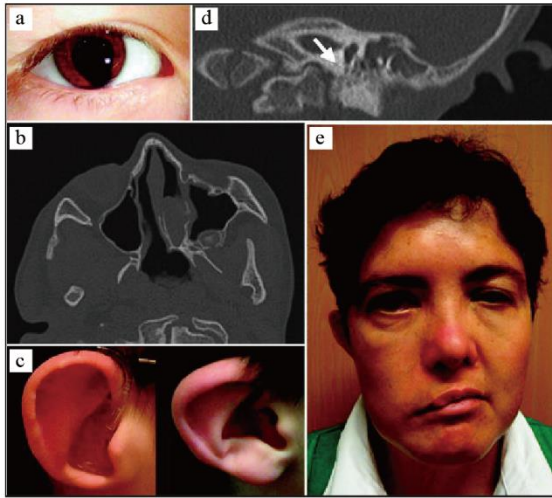
C : CHD ファミリー分子のタンパク質模式図。(文献番号 [98] Hall and Georgel, 2007 より抜粋)

[94]、近年では SWI/SNF 複合体の 1 つである Brg1 が OL 分化、成熟に必要であることが報告された [95-97]。

クロマチンリモデリング因子のサブファミリーのひとつ、Chromodomain Helicase DNA-binding protein (CHD)ファミリーは Chd1 から Chd9 の 9 種類が存在する [98] (図 3C)。そのうちのひとつ、Chd7 は 38 エクソンで構成される全長 188 kb の分子であり、そのヘテロ接合体変異が先天性多発奇形症候群のひとつである CHARGE 症候群の発症に関与するとされている [99, 100]。CHARGE 症候群は出生児 10000 人に 1 人程度に発症する比較的稀な疾患で、虹彩欠損 (coloboma of the eye)、心奇形 (heart defects)、後鼻孔閉鎖 (atresia of the choanae)、成長障害・発達遅滞 (retardation of growth and development)、性腺発育異常 (genital abnormalities)、耳介奇形 (ear abnormalities)の主徴候の頭文字の組み合わせにより命名されている [99, 100] (図 4A)。CHARGE 症候群患者は顔面神経麻痺などの神経系異常 (図 4A-e)の他に、MRI による検討では髄鞘が豊富な白質の形成異常を示すことが報告されている [101] (図 4B)。

Chd7 は転写因子と複合体を形成し、active histone mark (H3K4 メチル化や H3K27 アセチル化など)のエンハンサー領域や転写開始点近傍領域にリクルートされ結合し、クロマチン構造のリモデリングを起こすことで遺伝子発現を調節

A



B

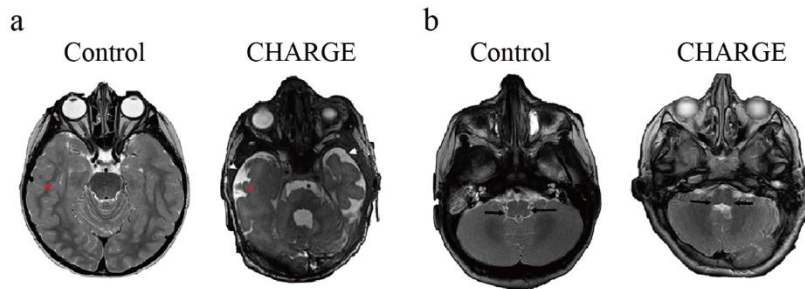


図 4 CHARGE 症候群

A: CHARGE 症候群患者で認められる徴候。a: 虹彩欠損、b: 後鼻孔閉鎖、c: 耳介奇形、d: 三半規管の低形成、e: 顔面神経麻痺。(文献番号 [100] Bergman *et al.*, 2011 より抜粋、改変)

B: CHARGE 症候群患者 (3 歳男児、*Chd7* nonsense truncation mutation あり)と同年齢健常児の脳 MRI T2 強調画像水平断。a: 大脳皮質レベル。左: 健常児, *は正常白質部を示す。右: CHARGE 症候群患者、矢頭は白質低形成により脳脊髄液範囲が拡大していることを示す。 b: 脳幹部、小脳レベル。左: 健常児、右: CHARGE 症候群患者。矢印は白質構造を示し、CHARGE 症候群患者では形成異常が認められる。(文献番号 [101] He *et al.*, 2016 より抜粋、改変)

している [102, 103]。Chd7 ノックアウトマウスに関する報告では、Chd7 ホモ接合体ノックアウトマウスが E10.5 で胎生致死となり、ヘテロ接合体ノックアウトマウスでは CHARGE 症候群と類似した表現型を示すことが報告されており [104, 105]、また神経堤細胞特異的 (*Wnt1-Cre*)や神経外胚葉特異的 (*Foxg1-Cre*) Chd7 コンディショナルノックアウトマウスが、頭蓋顔面骨格形成異常の表現型を示すことが報告されている [106, 107]。神経系においては神経幹細胞の増殖、静止状態の維持、ニューロン新生を制御することや [108-113]、NPC において Chd7 は Sox2 と協調して標的遺伝子発現を制御することが報告されている [114]。またごく近年において、*Olig1-Cre* マウスを用いた解析で、Chd7 は Sox10 と協調して OL 分化及び髄鞘化を制御していることが報告された [101]。しかしながら、脊髄損傷後の OPC 活性化における Chd7 の役割は十分に明らかにされていない。

そこで本研究では脊髄損傷治療の新たな創薬標的分子として Chd7 に着目し、脊髄損傷後の OPC の活性化における役割について解析することとした。

4. 実験材料および方法

4-1. 動物

Chd7^{lox/lox} マウス (EMMA ID, EM:04817)は EMMA mouse repository より購入した。*PDGFR α -CreER* マウス [47] (ストック番号 018280)は Jackson Laboratory より購入した。*CAG-CAT-EGFP* マウス [115]は宮崎 純一教授 (大阪大学)より供与頂いた。これら遺伝子改変マウスは C57BL/6J 系統マウスとして維持した。マウスの遺伝子型の同定 (Genotyping)は以下の通り行った。離乳期の生後 21 日から 28 日の間に、尾を約 0.5 cm 切断した。尾断片に 50 mM NaOH (Wako)を加えて 95°Cで 10 分加熱処理後、1 M Tris-HCl (pH 8.0)を加えることによりゲノム DNA を抽出、以下のプライマーを用いて PCR を行った。1%アガロースゲル電気泳動により PCR 産物を確認し、遺伝子型を同定した。

Chd7^{lox/lox}; Forward (wild, mutant); 5'-TGCAGATGGGACGTTTTTCAG-3'

Reverse (wild); 5'-CTGCAAGAACACAGGGCAAG-3'

Reverse (mutant); 5'-TCGTGGTATCGTTATGCGCC-3'

PDGFR α -CreER; Forward; 5'-TCAGCCTTAAGCTGGGACAT-3'

Reverse; 5'-ATGTTTAGCTGGCCCAAATG-3'

EGFP; Forward; 5'-CCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGC-3'

Reverse; 5'-CGGCGAGCTGCACGCTGCGTCCTC-3'

PCR 条件

1. 95°C (3 min)
2. 95°C (15 sec) , 60°C (15 sec) , 72°C (15 sec) × 35 cycles
3. 72°C (10 min)

8 ~ 10 週齢 C57BL/6J 雄雌マウス及び ICR 妊娠マウスはオリエンタル酵母工業株式会社より購入した。飼育ケージ内の移動は自由とし、飼料及び飲料水は常時摂取可能な状態で、12 時間ごとの明暗サイクルで飼育した。全ての動物実験は「動物の保護及び管理に関する法律」、「動物実験の飼養及び保管などに関する基準（総理府告示）」、「東京大学医学部動物実験指針」および「国立障害者リハビリテーションセンター動物実験指針」に従って行った。

4-2. マウス圧挫脊髄損傷モデルの作成

メデトミジン (0.3 mg/kg)、ミダゾラム (4 mg/kg)、ブトルファノール (5 mg/kg) の 3 種混合麻酔薬をマウスに腹腔内注射し、全身麻酔をかけた。背部を剃毛した後、皮膚切開し、皮下脂肪および傍脊柱筋を正中より分けて第 8 胸椎から第

10 胸椎部の椎弓を露出し、第 9 胸椎の椎弓切除を行い、脊髄を露出させた。第 8 胸椎及び第 10 胸椎を撮子固定し、コンピューター制御下に圧挫脊髄損傷モデルを作成する専用のデバイス(Infinite Horizons Impactor, Precision Systems and Instrumentation, Fairfax Station, VA) を用いて 60 kdyn の力で脊髄に圧挫損傷を加えた。皮膚を縫合し、麻酔からの早期覚醒のためメデトミジンの拮抗薬であるアチパメゾール (0.3 mg/kg)を腹腔内投与し、元のケージに戻した。その後ケージ内で健康状態及び動作、膀胱炎や創感染、麻痺した肢部の自食の有無などを毎日確認し、尿閉による膀胱炎予防目的に脊髄損傷後 1 週間は 1 日 2 回、1 週以降は必要に応じて 1 日 1 回の用手的膀胱圧迫による排尿補助を行った。創部感染や膀胱炎を発症したマウスは解析から除外した。

4-3. 行動学的解析

Basso Mouse Scale (BMS)による 9 点満点 (後肢の完全麻痺が 0 点、正常運動が 9 点)の scoring で脊髄損傷後のマウス後肢運動機能を評価した。原著論文に沿って、マウスの運動は open field での自由歩行とし、少なくとも 5 分間観察を行った [116]。

BMS スコア

0 点: 足関節が動かない

1 点: わずかに足関節が動く (可動域の 50%未満)

2 点: 広く足関節が動く (可動域の 50%以上)

3 点: 足底が接地する または足背でステップを踏むことがある

4 点: しばしば足底でステップを踏み、体幹支持が可能である (前進時の 50%未満)

5 点: ほぼ足底でステップを踏み (前進時の 50%以上)、四肢の協調運動がない

6 点: 四肢の協調運動はたまにあり (50%未満)、後肢は接地時に体と平行になるが、離地時には外旋

7 点: 四肢の協調運動は多く見られ (50%以上)、後肢は接地時に体と平行となり、体幹が非常に不安定

8 点: 後肢は接地時、離地時ともに体と平行で、体幹はやや不安定で、尾部が接地することがある

9 点: 体幹は安定し、尾部が常時浮いている

4-4. タモキシフェン及び BrdU 投与

タモキシフェン (Sigma-Aldrich)は sunflower seed oil (Sigma-Aldrich)で 20 mg/ml の濃度で溶解し、成体マウスに対しては 50 µg/g で 5 日間連続、腹腔内投与した。圧挫脊髄損傷モデルマウスでは脊髄損傷後 3 日目に、5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, 50 mg/kg)を 2 時間おきに 4 回腹腔内投与、最終投与 2 時間後に脊髄サンプルを採取した。正常成体マウスでの解析では、BrdU (1 mg/ml)及び 1% ショ糖含有滅菌蒸留水の飲水 (2 日ごとに飲料水を交換)と BrdU 腹腔内投与 (50 mg/kg)を 8 日間実施し、最終腹腔内投与 2 時間後に脊髄サンプルを採取した。発生期脊髄の解析においては、E13.5 で妊娠マウスにタモキシフェン (80 µg/g)を腹腔内投与し、E15.5 で妊娠マウスに BrdU (50 mg/kg)を腹腔内投与後 2 時間で胎仔脊髄サンプルを採取した。

4-5. 脊髄サンプル採取と免疫組織及び細胞化学染色

ペントバルビタール (50 mg/kg)で深麻酔したマウスを 1x phosphate buffered saline (PBS, NaCl, KCl, Na₂HPO₄ · 12H₂O, KH₂PO₄)及び 4% paraformaldehyde (PFA, TAAB Laboratories Equipment)で還流固定した。成体マウス脊髄採取後は 4% PFA

に 4°Cで overnight 浸漬固定、胎仔脊髄採取後は 4% PFA に 4°Cで 10 時間浸漬固定した。その後 20% ショ糖液に overnight、さらに 30% ショ糖液に overnight 4°Cにて浸漬し、最終的に凍結切片作成用包埋剤 OCT compound (SAKURA FINETEK)で包埋、試料凍結器 (東京理科器械社)を用いて急速凍結した。凍結標本の冠状断切片は、クライオスタット Leica CM3050S (Leica Microsystems)で成体脊髄は 16 μm 厚に、胎仔脊髄は 14 μm 厚のスライスで作成した。切片は 4% Donkey Serum (Millipore)含有 TBS/T (Tween 0.01%)で、2 時間室温にてブロッキングした後、1 次抗体を室温で overnight、2 次抗体は室温で 2 時間反応させた。BrdU 染色は BrdU Immunohistochemistry Kit (Exalpa Biologicals)を使用し、FluoroMyelin Red (ThermoFisher Scientific)染色は製造元の使用説明書に従い、1:200 の希釈濃度で行った。核染色は Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich)を用いた。スライドは ProLong Gold 退色防止剤 (ThermoFisher Scientific)を用いてマウントした。染色した標本の観察には、BZ-9000 蛍光顕微鏡 (Keyence)を用いた。免疫細胞化学染色は、培養細胞を 4% PFA で室温 20 分固定後、10% fetal bovine serum (FBS, Thermo Scientific)で室温 30 分ブロッキングを行った。1 次抗体は室温で 3 時間、その後 2 次抗体は室温で 1 時間反応させた。EdU 染色は Click-iT EdU Imaging Kit (Thermo Scientific)を用いて行った。

4-6. プラスミド及びレトロウイルスの作成

レトロウイルスベクター pcUXIE 及び pMX-IRES-EGFP (pMXIG) [117]は Hongjun Song 教授 (Johns Hopkins University)、北村 俊雄教授 (東京大学)よりそれぞれ供与頂いた。プラスミド pCAG-IRES-EGFP (pCAGIG)は Constance L. Cepko 教授 (Harvard University)と松田 孝彦博士 (京都大学) より供与頂いた。Human Chd7 cDNA は Promega より購入した。Human Sox2、Mouse regulator of cell cycle (Rgcc)、Mouse protein kinase C θ (PKC θ) cDNA は transOMIC Technologies より購入した。Cre 及び CreERT2 cDNA は Anjen Chenn 教授 (University of Illinois, Addgene plasmid # 26647)と Constance L. Cepko 教授 (Addgene plasmid # 14797)よりそれぞれ供与頂いた。これら cDNA は pcUXIE、pMXIG、pCAGIG のそれぞれのベクターに組み込んだ。pSIREN-short hairpin (sh) Luc (control shRNA)、pSIREN-shChd7 (Chd7 shRNA)、 pSIREN-shSox2 (Sox2 shRNA)、 pSIREN-shRgcc (Rgcc shRNA)、 pSIREN-shPKC θ (PKC θ shRNA)発現レトロウイルスベクターは Clontech 社の使用説明書に従って作成した。Phosphoglycerate kinase (PGK) 遺伝子プロモーター制御下に GFP が発現するように、pSIREN shRNA ベクターの puromycin 耐性遺伝子を GFP 遺伝子に変換した。用いた shRNA 配列は以下の通

りである。

Chd7 shRNA #1; 5'-GCTGATGACTGGAAGAAATCG-3'

Sox2 shRNAs #1; 5'-GACGCTCATGAAGAAGGATAA-3'

#2; 5'-GCTTAAATTTAGGACCGTTAC-3'

Rgcc shRNAs #1; 5'-GCGCCACTTCCACTATGAGGA-3'

#2; 5'-GCAAATCGGCTACTAGAATCT-3'

PKCθ shRNAs #1; 5'-GCAGTGATCGCCTGTTATAGA-3'

#2; 5'-GCGACTTAATGTACCACATCC-3'

全てのウイルスベクター及び pVSV-G は polyethyleneimine (PEI) (Polyscience)によるトランスフェクションによりパッケージング細胞である Plat-GP に導入した。トランスフェクション 3 日後に培養細胞の上清を採取し、室温で 5 分、3000 回転で遠心分離した後、0.45 μm 孔径のフィルター (Corning) で濾過して細胞残屑を除去した。ウイルス溶液を 4°C で 2 時間、25000 回転の超遠心分離にて濃縮し、得られたウイルスペレットを Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (ThermoFisher Scientific) にて再懸濁した。

4-7. 培養 OPC とレトロウイルス感染

OPC (オリゴスフェア) [118, 119]の培養をいくつかの改変を加えて実施した (図 5)。E15.5 マウス胎仔を妊娠マウスより無菌的に取り出し、DMEM/F-12 HAM (Sigma-Aldrich)に入れ、解剖用顕微鏡 (Zeiss)下に胎仔前脳を採取した。採取した前脳組織は低 Ca^{2+} 高 Mg^{2+} 濃度の人工脳脊髄液 (artificial cerebrospinal fluid, aCSF) [124 mM NaCl, 5 mM KCl, 3.2 mM MgCl_2 , 0.1 mM CaCl_2 , 26 mM NaHCO_3 , 10 mM D-グルコース, 100 units/ml ペニシリン, 100 $\mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシン (ThermoFisher Scientific)]に 0.05% (w/v) トリプシン (Sigma-Aldrich)、0.67 mg/ml ヒアルロニダーゼ (Sigma-Aldrich)、0.1 mg/ml デオキシリボヌクレアーゼ I (Roche)を含有した混合液で 37°C10 分インキュベートし、細胞を分離した。次に 0.7 mg/ml オボムコイド (Sigma-Aldrich)でトリプシンを中和し、得られた組織懸濁液をピペッティングで機械的に破碎し、単細胞浮遊液とした。細胞はナイロンメッシュのフィルター (孔径 40 μm , Corning)で濾過し、DMEM/F-12 (ThermoFisher Scientific)で 2 回洗浄した後、B-27 サプリメント (ThermoFisher Scientific)、FGF2 (20 ng/ml) (Peprotech)、EGF (20 ng/ml) (Roche)及び ヘパリン (2 $\mu\text{g/ml}$) (Sigma-Aldrich)を添加した DMEM/F-12 で培養した。一次培養スフェアは

まき直し後 2 日目に細胞分離し、ディッシュに再播種し、B-27 サプリメント、FGF2 (10 ng/ml)、PDGF-AA (10 ng/ml) (Peprotech)及びヘパリン (2 µg/ml)を添加した DMEM/F-12 で培養した。二次培養スフェアは 4 日目に細胞分離し、 5×10^4 cells/ml の細胞密度で播種し、B-27 サプリメント、FGF2、PDGF-AA、N2 サプリメント (ThermoFisher Scientific)添加 DMEM/F-12 で培養した。その後 8 日間は隔日でメディウムの半量を交換し続けた。三次培養スフェア (オリゴスフェア)を細胞分離し、poly-D-lysine (PDL, 100 µg/ml) (Sigma-Aldrich)でコートした培養ディッシュもしくはガラス製チャンバーに播種、B-27 サプリメント、FGF2、PDGF-AA、N2 サプリメント添加 DMEM/F-12 で培養した。培養 OPC にレトロウイルスを 8 時間インキュベートした後、メディウムで洗浄した。感染後 2 日目に培養 OPC を増殖条件及び分化条件にわけた。増殖条件では 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU, 4 µM) (ThermoFisher Scientific)を増殖細胞に 2 時間取り込ませ標識した。分化条件では FGF2 及び PDGF-AA を除去して B-27 サプリメント、N2 サプリメント及び triiodothyronine (T3, 40 ng/ml) (Sigma-Aldrich)を添加した DMEM/F-12 で 5 日間培養した。培養 OPC に Cre 酵素による組み換えを誘導するため、4-hydroxytamoxifen (4-OHT, 1 µM) (Sigma-Aldrich)を添加した。

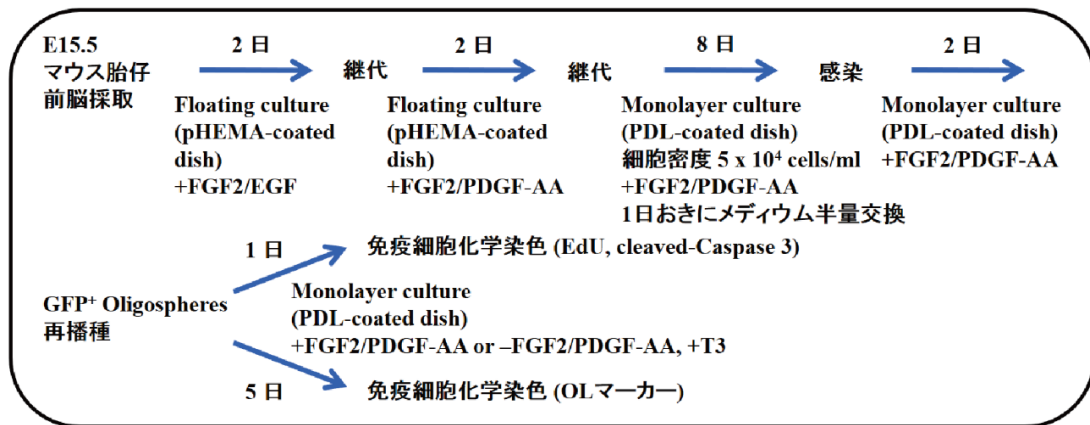


図5 培養 OPC 実験の手順模式図

4-8. 細胞培養とトランスフェクション

293T 細胞 (ATCC)は 10% FBS 添加 DMEM (Wako)にて培養した。細胞に PEI を用いてトランスフェクションを行い、その 6 時間後にメディアウムを交換、48 時間後に細胞を採取した。

4-9. 定量 RT-PCR

RNA を RNeasy Mini Kit (Qiagen)を用いて抽出精製し、うち 1 μ g を ReverTra Ace qPCR RT Kit (TOYOBO)を用いて逆転写した。逆転写により合成された cDNA を Power SYBR Green PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific)を用いて Applied

Biosystems 7500 Real Time PCR System で Real-time PCR を行った。Internal control (内部標準)として Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA を使用した。使用したプライマーは以下の通りである。

mouse Chd7, Forward; 5'-AGAAAAGCCTTGTGCAAAGCC-3'

Reverse; 5'-CCAGCCGTAAACCAGCAGATT-3'

mouse Sox2, Forward; 5'-AACGCCTTCATGGTATGGTCC-3',

Reverse; 5'-GGACAAAAGTTTCCACTCCGC-3'

mouse PDGFR α , Forward; 5'-CATTTGGAAGCAGAAACCACG-3'

Reverse; 5'-AGTCGTAAGGCAACTGCATGG-3'

mouse Myt1, Forward; 5'-TCATCACCCACAGACAGCTGA-3'

Reverse; 5'-AAGTTGCAATGATCCCCTGG-3'

mouse CSPG4, Forward; 5'-ATTCCCCATCCACATTGGTG-3'

Reverse; 5'-AGCCAACCTTGCCATGGTGA-3'

mouse Hes5, Forward; 5'-ACCGCATCAACAGCAGCATAG-3'

Reverse; 5'-CGAAGGCTTTGCTGTGTTTCA-3'

mouse Sox9, Forward; 5'-CCAACATTGAGACCTTCGACGT-3'

Reverse; 5'-ATGCCGTAAGTCCAGTGTAGG-3'

mouse Id2, Forward; 5'-CCCAGAACAAGAAGGTGACCA-3'

Reverse; 5'-TGATGCAGGCTGACGATAGTG-3'

mouse Sox10, Forward; 5'-TCTCACGACCCCAGTTTGACT-3'

Reverse; 5'-GCCCCATGTAAGAAAAGGCTG-3'

mouse Olig2, Forward; 5'-CCACGTCTTCCACCAAGAAAG-3'

Reverse; 5'-ATCTTGGAGAGCTTGCGCA-3'

mouse Rgcc, Forward; 5'-TCTCCAACCAACTCCTCTCCA-3'

Reverse; 5'-TGTCCAGATCGGCAATGAAG-3'

mouse PKC θ , Forward; 5'-AAATAAATCGGCCGGTCCTC-3'

Reverse; 5'-TCCCAACATCTTGTGCAGGAT-3'

mouse GAPDH, Forward; 5'-GCAAAGTGGAGATTGTTGCCAT-3'

Reverse; 5'-CCTTGACTGTGCCGTTGAATTT-3'

4-10. クロマチン免疫沈降 (chromatin immunoprecipitation, ChIP)

OPC は PDL でコートされたディッシュにて B-27 サプリメント、FGF2、PDGF-AA、N2 サプリメント添加 DMEM/F-12 で培養した。クロマチン免疫沈降は ChIP-IT Express Enzymatic Kit (Active Motif)を用いて行った。細胞を 1% ホルムアルデヒドで固定し、グリシン添加により架橋反応を停止させた。架橋され

たクロマチンを 37°C 10 分の酵素消化により断片化し、断片化クロマチンに抗 Chd7 抗体 (Abcam, rabbit, 2 μ g)、抗 Sox2 抗体 (R&D Systems, goat, 2 μ g)、抗 H3K27ac 抗体 (Abcam, rabbit, 2 μ g)、正常 rabbit IgG 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, 2 μ g) もしくは正常 goat IgG 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, 2 μ g) を加えて 4°C で overnight インキュベートさせた。Dynabeads Protein G (ThermoFisher Scientific) を添加した後、混合液を 3 時間ローテーターで攪拌した。抗体結合ビーズを単離し、低塩濃度溶液 (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl [pH 8.1], 150 mM NaCl)、高塩濃度溶液 (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl [pH 8.1], 500 mM NaCl)、LiCl 溶液 (0.25 M LiCl, 1% Nonidet P-40, 1% sodium deoxycholate, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl [pH 8.1]) で洗浄した後、Tris-EDTA 溶液 (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA) で 2 回洗浄した。10 mM dithiothreitol、1% SDS、0.1 M NaHCO₃ 含有溶液にてビーズから免疫複合体を溶出し、その後最終濃度が 0.2 M になるよう NaCl を加え、溶出した免疫複合体を 65°C で overnight インキュベートした。プロテイナーゼ K (ThermoFisher Scientific) を 45°C で 1 時間反応させてタンパク質を除去後、DNA を QIAquick spin column (Qiagen) を用いて精製した。得られた DNA は Power SYBR Green PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific) を用いて Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System

で Real-time PCR を行った。標的ゲノム DNA 量はインプットの DNA 量で標準化した。PCR で用いたプライマーは以下の通りである (それぞれセンス鎖、アンチセンス鎖を表す)。

Rgcc 遺伝子

R1; 5'-ACACCGTGTGGTCTGGCCT-3', 5'-TCTCCGGTCTGTGGAAGTGC-3'

R2; 5'-TGGGTGCACTCATCATCAGG-3', 5'-TGCTTTGCCCAGGGTCTTT-3'

R3; 5'-ACGCTGTGAGCTGCCATGTA-3', 5'-GTCAGAGGACCTGGGTTTGG-3'

R4; 5'-AAGATGCTGGGCACTATGGC-3', 5'-TTCACCTGTCCTGCACTGGA-3'

R5; 5'-TTGCGGCTCTTGGCATATC-3', 5'-CAATTAGCAGCGATGATGGCT-3'

R6; 5'-TTTCCTAGTGGGACAGGCTCC-3', 5'-ACAGCACATGGGATGCTCAC-3'

PKCθ 遺伝子

R1; 5'-TGTGGCCATTTAAAGATGATGTATG-3',

5'-CTCCTCAGCAGGCTTCTGGT-3'

R2; 5'-TCTGGCCTTCCTGTAAGTCA-3',

5'-TCGCGCACTTAATAAAATTACATTTT-3'

R3; 5'-CGAAAAGTTGCTGCCGAAAT-3',

5'-TGATGTTTTGAACTGCTGTAAACTGT-3'

R4; 5'-TTCAGCTAAGCAAGAAGAGACTGC-3',

5'-GCCTGAGTGCCAGAAAGGG-3'

R5; 5'-TGGAGGTGCCAAAGATCAGG-3', 5'-TTGCAAGAGACATTCGGGTG-3'

R6; 5'-AAGGCTCGCTGATCCCATTA-3', 5'-AAGATCCTTCGAGCGTGCTG-3'

R7; 5'-AGGTCCTCATTGGGCCTGAT-3', 5'-CCTCAGAAGGCTGGGATTCC-3'

R8; 5'-TCCATGGAAGCCTTTTGTGC-3', 5'-CCCAACACATGGTGAGCCA-3'

4-11. 共免疫沈降及びウエスタンブロッティング

トランスフェクションした 293T 細胞は細胞溶解液 (50 mM HEPES-NaOH [pH 7.5], 50 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.5% protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich), 1 mM Na₃VO₄, 10 mM NaF, and 20 mM β-glycerophosphate)で溶解し、細胞溶解液を 4°C10 分、15000 回転で遠心した。上清に抗 Sox2 抗体 (Santa

Cruz Biotechnology, goat)及び抗 Chd7 抗体 (Cell Signaling Technology, rabbit)を加え 4°Cで overnight インキュベートした。Dynabeads Protein G (ThermoFisher Scientific)を添加した後、混合液を 3 時間ローテーターで攪拌した。免疫沈降物を細胞溶解液にて 4 回洗浄し、抗 Chd7 抗体 (Cell Signaling Technology, rabbit, 1:1000)及び抗 Sox2 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, goat, 1:200)を用いてウエスタンブロットティングを行った。バンドの検出には secondary horseradish peroxidase 結合抗体 (Promega, rabbit, 1:4000; Promega, goat, 1:5000)及び Chemi-Lumi One (Nacalai Tesque) もしくは ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare)を用いた。内在性の Chd7 及び Sox2 の免疫沈降では、オリゴスフェアに 2 mM の架橋剤 dithiobis succinimidyl propionate (DSP) (ThermoFisher Scientific)を加えて 4°C2 時間インキュベートし、室温で 20 mM Tris-HCl (pH 8.0)を添加して架橋反応を停止させた。免疫沈降は Nuclear Complex Co-IP Kit (Active Motif)を用いて行った。

4-12. Proximity ligation assay (PLA)

OPC は PDL でコートされたディッシュにて B-27 サプリメント、FGF2、PDGF-AA、N2 サプリメント添加 DMEM/F-12 で培養した。PLA は Duolink in situ

red starter kit (Sigma-Aldrich)を用いて行った。細胞を 4% PFA で室温 20 分固定し、ブロッッキング溶液 (Sigma-Aldrich)で 37°C30 分インキュベートした。細胞に抗 Sox2 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, goat, 1:200)、抗 Chd7 抗体 (OriGene, rabbit, 1:500)、正常 rabbit IgG 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, 1:400)、正常 goat IgG 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, 1:400) を 37°C3 時間インキュベートし、オリゴヌクレオチド標識二次抗体(Sigma-Aldrich, PLA probe anti-rabbit PLUS, DUO92002; PLA probe anti-goat MINUS, DUO92006)を 37°C1 時間インキュベート、ライゲーション酵素を 37°C30 分添加した後、Amplification-Polymerase solution で 37°C100 分インキュベートした。スライドは DAPI (Sigma-Aldrich)含有 mounting medium でマウントした。

4-13. マイクロアレイ解析

E15.5 胎仔由来培養 OPC に control 及び Chd7 ノックダウンレトロウイルスを感染させ、感染後 3 日で細胞を回収した。RNA を RNeasy Mini Kit (Qiagen)を用いて抽出精製した。マイクロアレイ解析は 3D-Gene Mouse Oligo chip 24k (Toray Industries)を用いて行った。マイクロアレイ解析データは Gene Expression Omnibus (GEO) database (accession number GSE95347)に登録した。Gene ontology

(GO)解析は ToppFun (ToppGene Suite; <https://toppgene.cchmc.org>)を用いて行った。

4-14. 抗体及び希釈濃度

用いた抗体及び希釈濃度は以下の通りである。抗 Chd7 抗体 (Abcam, rabbit, 1:500; Origene, rabbit, 1:500; Abcam, goat, 1:200; Santa Cruz Biotechnology, mouse, 1:200)、抗 Olig2 抗体 (Millipore, rabbit, 1:1000; Millipore, mouse, 1:500)、抗 Sox10 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, goat, 1:500; Abcam, mouse, 1:5000)、抗 Sox2 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, goat, 1:200)、抗 CC1 抗体 (Millipore, mouse, 1:500)、抗 GST π 抗体 (BD Biosciences, mouse, 1:1000)、抗 GFAP 抗体 (Millipore, mouse, 1:1000; Millipore, rabbit, 1:1000; Abcam, chicken, 1:2000)、抗 NG2 抗体 (Millipore, rabbit, 1:200)、抗 PDGFR α 抗体 (BD Biosciences, rat, 1:200)、抗 MAG 抗体 (Millipore, mouse, 1:400)、抗 NFIA 抗体 (Sigma-Aldrich, rabbit, 1:200)、抗 MBP 抗体 (Bio-Rad, rat, 1:200)、抗 GalC 抗体 (Millipore, mouse, 1:500)、抗 Ki67 抗体 (Abcam, rabbit, 1:1000)、抗 cleaved caspase 3 抗体 (Cell Signaling Technology, rabbit, 1:1000)、抗 Rgcc 抗体 (Sigma-Aldrich, rabbit, 1:200)、抗 PKC θ 抗体 (Abcam, rabbit, 1:200)、抗 NeuN 抗体 (Millipore, mouse, 1:200)、抗 β III-tubulin (TuJ1) 抗体 (Covance, MMS-435P, mouse, 1:5000)、抗 GFP 抗体 (MBL, rabbit, 1:2000; Abcam,

chicken, 1:2000)。二次抗体は Alexa Fluor 350, 488, 568, 594, 633, 647 標識抗体 (ThermoFisher Scientific, 1:400)を用いた。本論文で用いた各細胞種のマーカーは表 1 の通りである。

細胞種名	マーカー
オリゴデンドロサイト系譜細胞 (OL系譜細胞)	Olig2、Sox10
オリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC)	PDGFR α 、NG2
成熟オリゴデンドロサイト (成熟OL)	CC1、GST π 、 MBP、MAG、GalC
アストロサイト	GFAP
ニューロン	NeuN、 β III-tubulin (TuJ1)

表 1 本論文で用いた各細胞種のマーカー一覧

4-15. 実験結果の解析手法及び統計学的解析法

正常脊髄の免疫組織化学染色による解析では E12.5、E14.5、E16.5、E18.5 の胎仔及び 8~10 週齢の成体雌マウスを用いた。胎仔、成体正常脊髄では最低 3 ヶ所の冠状断切片で細胞数のカウントを行った。OPC 特異的 Chd7 ノックアウト

マウスの解析では、8~10 週齢の成体雌及び雄マウスと、E15.5 の胎仔マウスを用いた。損傷脊髄では、損傷中心から頭側及び尾側 600 μm の範囲で、1 サンプルあたり最低 3 ヶ所の冠状断切片で細胞数をカウントした。培養 OPC による解析は、最低 3 回の独立した実験を行って評価した。それぞれの定量解析の結果は、平均値 \pm 標準偏差 (s.d.) として表記し、有意差の検定には Student's *t* 検定を行った。BMS スコアによる行動学的評価では、後肢の体幹支持を正確に評価するため、外性器が目立たない成体雌マウスのみで行った。BMS スコアの結果は中央値 \pm 標準誤差 (s.e.m) として表記し、有意差の検定には Mann-Whitney U 検定を用いた。 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

5. 結果

5-1. Chd7 は発生期及び成体正常脊髄の OL 系譜細胞に発現する

まずマウス正常脊髄における Chd7 の発現パターンを解析した。E12.5 から E18.5 の発生期脊髄において、Olig2⁺または Sox10⁺ OL 系譜細胞 (OPC と成熟 OL を含む OL 系譜に運命づけられた細胞)の多くで Chd7 が発現していた (図 6A, B)。成体脊髄では白質 (white matter, WM)及び灰白質 (gray matter, GM)の Olig2⁺または Sox10⁺ OL 系譜細胞及び Sox2⁺ 細胞において Chd7 が発現していた (図 7A, B)。過去の報告 [101]に一致して、CC1⁺または GSTπ⁺ 成熟 OL に Chd7 が発現していた (図 7A, B)。OPC における Chd7 発現を調べるため、*PDGFRα-CreER* マウスと *CAG-CAT-EGFP* マウスを交配させ、*PDGFRα-CreER;CAG-CAT-EGFP* マウスを作製した [47, 115] (図 8)。同マウスはタモキシフェン投与により *PDGFRα* 遺伝子プロモーター制御下に GFP が発現することで、*PDGFRα*⁺ OPC を特異的に標識するレポーターマウスである。成体脊髄 WM 及び GM の *PDGFRα-GFP*⁺ OPC の多くで Chd7 が発現しており、その Chd7 発現レベルは CC1⁺ 成熟 OL よりわずかに低かった (図 7A-C)。OL と異なるもうひとつのグリア細胞である、GFAP⁺ アストロサイトでは Chd7 発現はごくわずかであった (図 7D)。また成体脊髄 GM では NeuN⁺ ニューロンに Chd7 発現を認めていた (図 7E)。以上の結果から、発

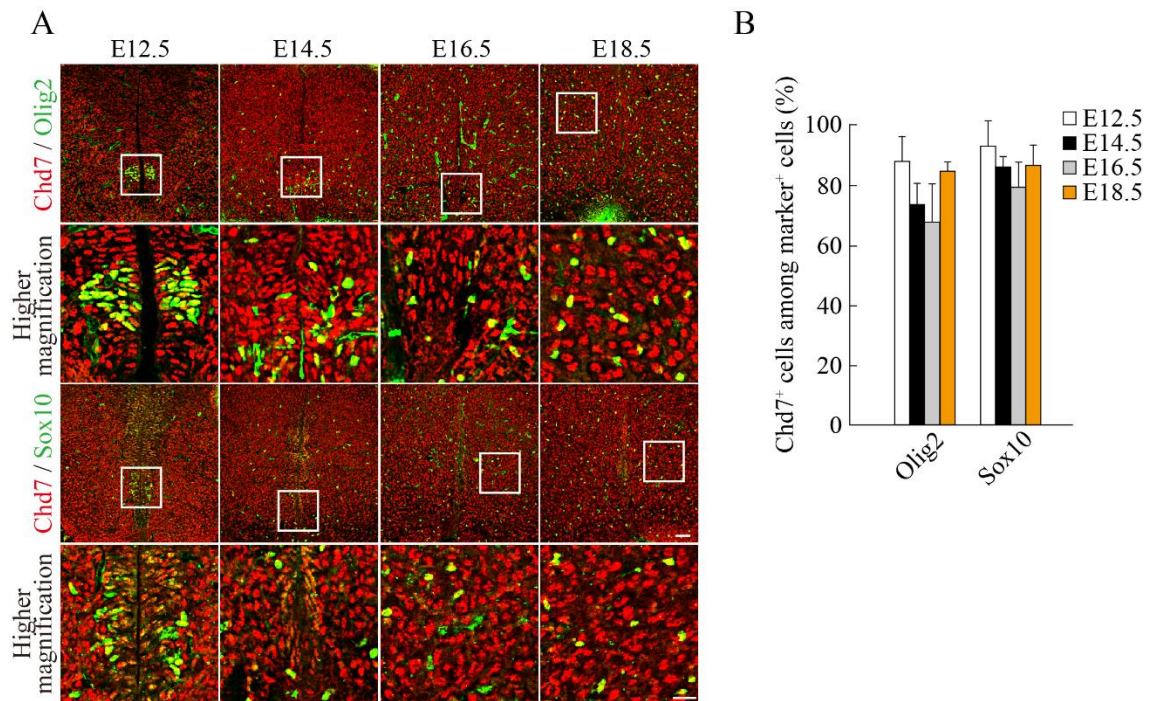


図 6 マウス発生期脊髄において Chd7 は OL 系譜細胞に発現する

A : E12.5、E14.5、E16.5、E18.5 発生期脊髄における Chd7 と Olig2、Sox10 との免疫組織化学 2 重染色像。上の弱拡大像のボックス範囲を下の強拡大像に示す。Scale bars; 弱拡大像: 100 μ m、強拡大像: 50 μ m。

B : 写真 A の各マーカー陽性細胞での Chd7⁺ 細胞の割合を定量。平均値 \pm 標準偏差 (s.d.) で示す (n= 3)。

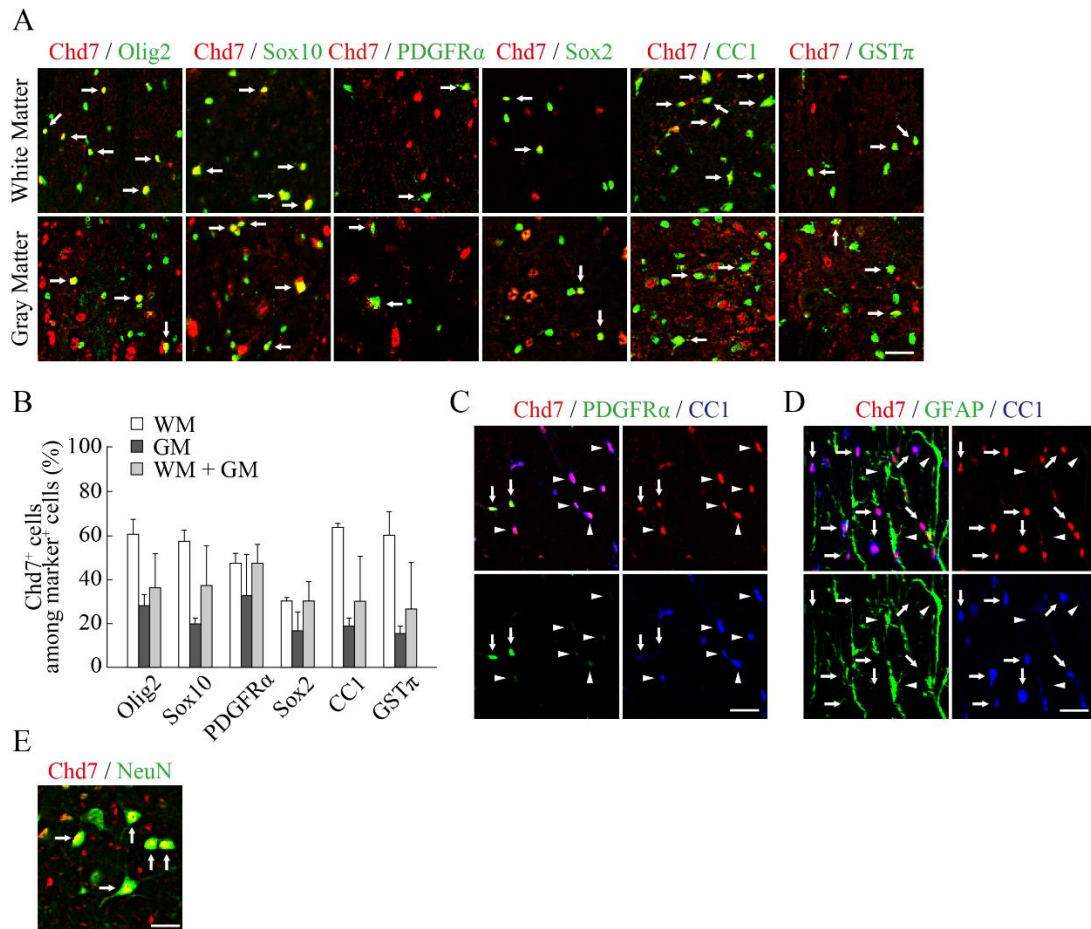


図7 マウス成体正常脊髄において Chd7 は OL 系譜細胞に発現する

A : 成体脊髄白質 (上列)及び灰白質 (下列)における Chd7 と Olig2、Sox10、PDGFR α -GFP、Sox2、CC1、GST π のそれぞれのマーカーとの免疫組織化学 2 重染色像。矢印は 2 重陽性細胞。Scale bar; 50 μ m。

B : 写真 A の各マーカー陽性細胞での Chd7⁺ 細胞の割合を定量。平均値 \pm 標準偏差 (s.d.) で示す (n= 3)。WM; white matter、GM; gray matter。

C : 成体正常脊髄での Chd7⁺ PDGFR α -GFP⁺ CC1⁻ 細胞 (矢印)及び Chd7⁺ PDGFR α -GFP⁻ CC1⁺ 細胞 (矢頭)。Scale bar; 50 μ m。

D : 成体正常脊髄での Chd7⁺ GFAP⁻ CC1⁺ 細胞 (矢印)及び Chd7⁻ GFAP⁺ CC1⁻ 細胞 (矢頭)。Scale bar; 50 μ m

E : 成体正常脊髄灰白質での Chd7 と NeuN との免疫組織化学 2 重染色像。矢印は 2 重陽性細胞。Scale bar; 50 μ m。

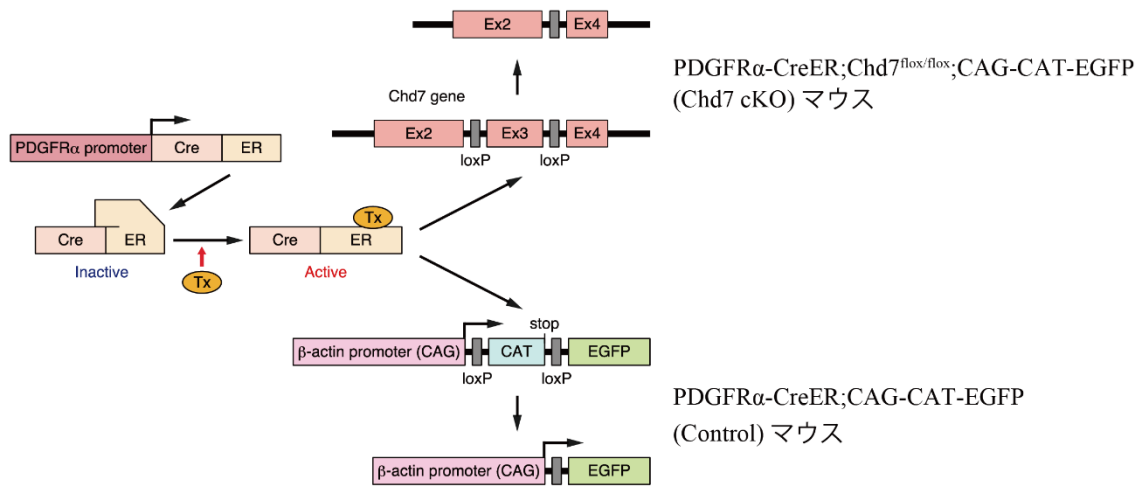


図 8 *PDGFRα-CreER;CAG-CAT-EGFP* マウス (Control マウス) 及び *PDGFRα-CreER;Chd7^{lox/lox};CAG-CAT-EGFP* マウス (*Chd7* cKO マウス)の作製模式図

Tx; tamoxifen、Ex; exon。

生期及び成体正常脊髄の OL 系譜細胞に Chd7 が発現していることがわかった。

また成体正常脊髄では、成熟 OL 同様、OPC に Chd7 が発現していることがわかった。

次に培養 OPC (図 9A)における Chd7 発現を解析した。FGF2 及び PDGF-AA 存在下 (増殖条件)で培養した OPC の大多数が OL 系譜細胞マーカーの Olig2 (95.7%)、OPC マーカーの NG2 (82.6%)、PDGFR α (70.6%)を発現していた (図 9B, C)。OPC は *in vitro* において、OL 及びアストロサイトに分化することが報告されている [120]。これに一致して、本研究の培養 OPC では少数の GFAP⁺ アストロサイトが含まれていた (図 9B, C)。一方で TuJ1⁺ ニューロンはほとんど認められなかった (図 9B, C)。Olig2⁺、NG2⁺、PDGFR α ⁺ OPC のほとんどで Chd7 が発現している (図 10A, B)一方で、GFAP⁺ アストロサイトでの Chd7 発現は低かった (図 10C)。成熟 OL での Chd7 発現を調べるため、培養 OPC を FGF2、PDGF-AA 除去、T3 存在下 (分化条件)で 5 日間培養し、分化誘導をかけた。GalC⁺、MAG⁺、MBP⁺ 成熟 OL や Olig2⁺、Sox10⁺ OL 系譜細胞で Chd7 が発現していた (図 10D, E)。また *in vivo* 同様、PDGFR α ⁺ OPC での Chd7 発現レベルは GalC⁺または MAG⁺ 成熟 OL よりやや低かった (図 10F)。以上の *in vitro* での発現パターンから、Chd7 が OPC 及び分化した成熟 OL に発現していることがわかった。

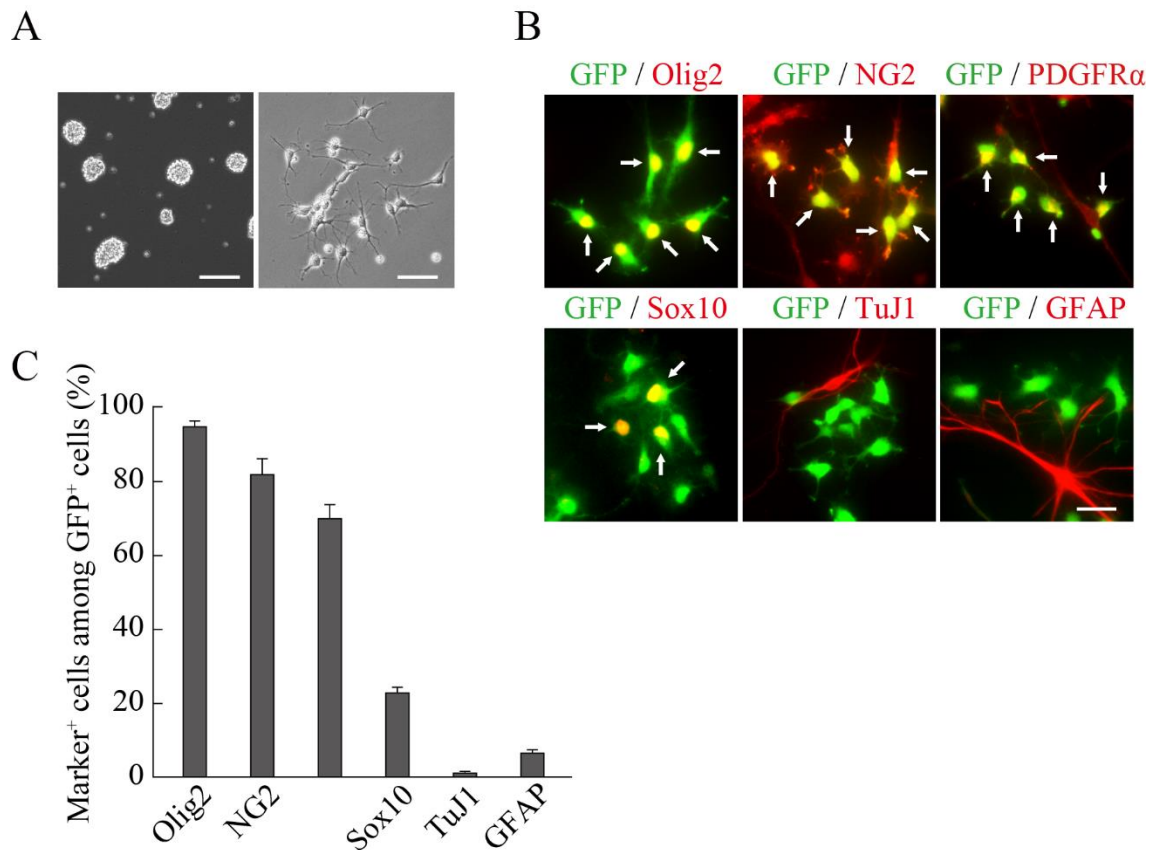


図9 培養 OPC の多くは OL 系譜細胞である

A: E15.5 マウス胎仔前脳由来の OPC を増殖条件で培養。左写真: オリゴスフェアの位相差観察像。右写真: PDL コートしたディッシュ上の培養 OPC の位相差観察像。Scale bars; 100 μm (左写真)、50 μm (右写真)。

B: 培養 OPC に GFP 発現レトロウイルスを感染させ増殖条件で培養し、感染 3 日後に GFP と Olig2、NG2、PDGFR α 、Sox10、TuJ1、GFAP のそれぞれのマーカーで免疫細胞化学 2 重染色した。矢印は 2 重陽性細胞。Scale bar; 25 μm 。

C: 全 GFP⁺ 細胞あたりの各マーカー陽性細胞の割合を定量。平均値 \pm 標準偏差 (s.d.) で示す (n = 3)。

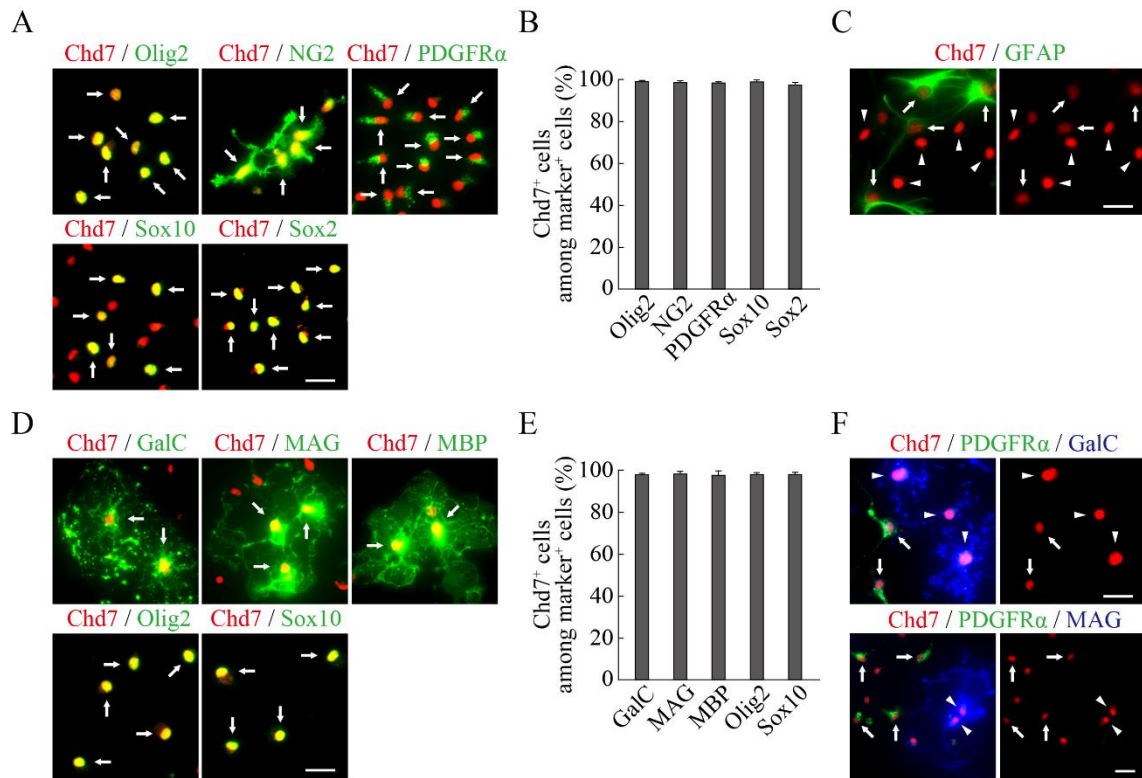


図 10 培養 OPC において Chd7 は OPC 及び OL 系譜細胞に発現する

A: 培養 OPC を増殖条件で培養。Chd7 と Olig2、NG2、PDGFR α 、Sox10、Sox2 のそれぞれのマーカーとの免疫細胞化学 2 重染色像。

B: 写真 A の各マーカー陽性細胞での Chd7⁺ 細胞の割合を定量。

C: 培養 OPC における Chd7^{low} GFAP⁺ 細胞 (矢印) と Chd7^{high} GFAP⁻ 細胞 (矢頭)。

D: 培養 OPC を 5 日間分化条件で培養。Chd7 と GalC、MAG、MBP、Olig2、Sox10 のそれぞれのマーカーとの免疫細胞化学 2 重染色像。

E: 写真 D の各マーカー陽性細胞での Chd7⁺ 細胞の割合を定量。

F: 培養 OPC での Chd7⁺ PDGFR α ⁺ GalC⁻ 細胞 (矢印) 及び Chd7⁺ PDGFR α ⁻ GalC⁺ 細胞 (矢頭)。

(A, D) 矢印は 2 重陽性細胞を示す。Scale bars; 25 μ m (A, C, D, F)。

(B, E) 平均値 \pm 標準偏差 (s.d.) で示す (n = 3)。

5-2. 脊髄損傷後急性期の活性化 OPC に Chd7 と Sox2 が共発現する

Sox2 は発生期及び成体中枢神経系の OPC に発現し、脊髄損傷後の活性化した OPC でその発現が上昇することが知られている [69, 70, 72, 73]。そこで成体正常脊髄及び培養 OPC での Sox2 発現パターンについて解析した。成体脊髄 WM 及び GM の Sox10⁺ OL 系譜細胞及び、PDGFR α -GFP⁺ または NG2⁺ OPC の一部で Sox2 が発現していたが、CC1⁺ または GST π ⁺ OL には発現を認めなかった (図 11A)。一方で、成体脊髄の GFAP⁺ アストロサイトのほとんどで Sox2 が発現していた (図 11A)。アストロサイトのほとんどが Sox2 を発現している一方で Chd7 の発現は低いため、少なくとも Sox2⁺ Chd7⁺ 細胞の一部は OPC と考えられた。実際に成体正常脊髄の PDGFR α ⁺ OPC では Sox2 と Chd7 が共発現していた (図 11B)。またアストロサイトを含むグリア細胞発生制御に関わる転写因子である NF1A の発現解析では、成体脊髄の OPC で Sox10 と共発現していた (図 11C)。培養 OPC では増殖条件において、Sox10⁺、Olig2⁺ OL 系譜細胞や PDGFR α ⁺、NG2⁺ OPC の多くで Sox2 が発現していた (図 12A, B)。分化条件において、PDGFR α ⁺、NG2⁺ OPC では引き続き Sox2 を発現していたが、GalC⁺、MBP⁺、MAG⁺ 成熟 OL のほとんどで Sox2 発現が消失していた (図 12C, D)。このことから、OPC では Sox2 発現を多く認めるが、OPC から成熟 OL への分化過程でその発現レベルが

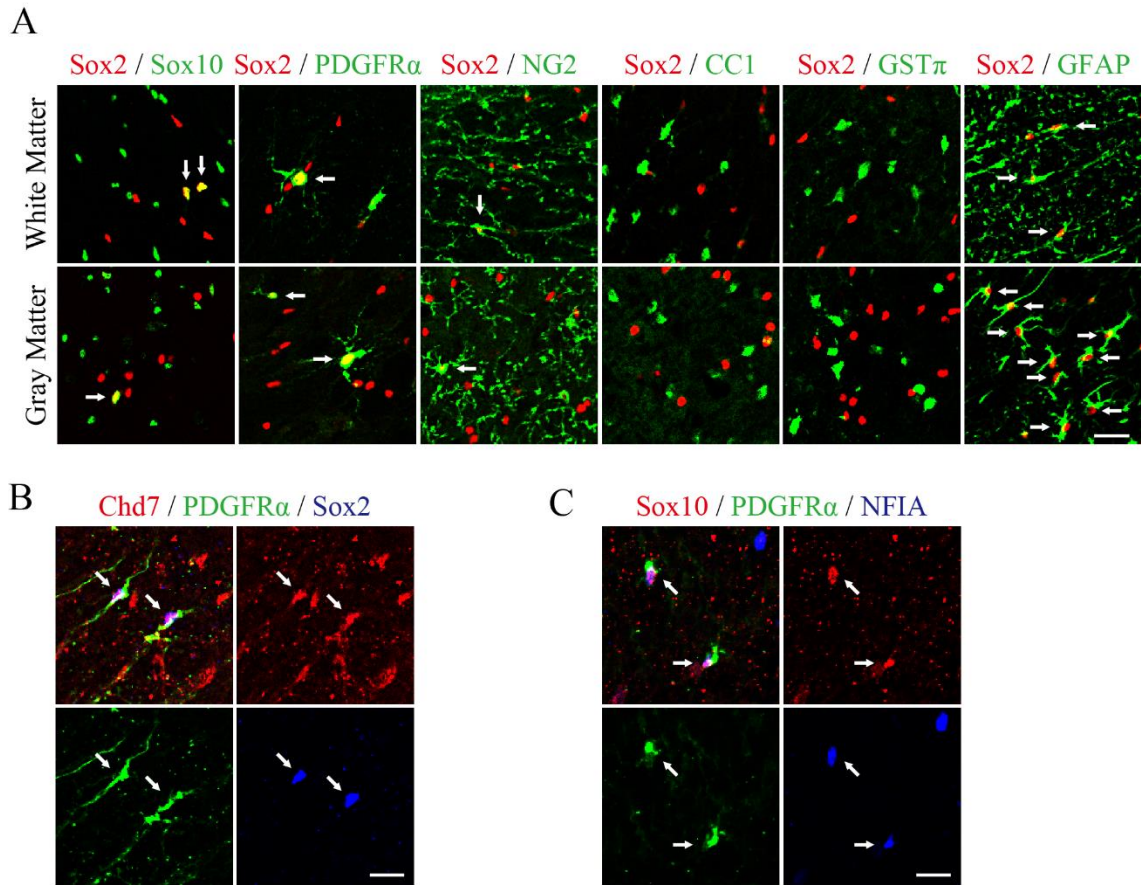


図 11 マウス成体正常脊髄において Sox2 は OPC とアストロサイトで発現する

A : 脊髄白質及び灰白質における Sox2 と Sox10、PDGFR α -GFP、NG2、CC1、GST π 、GFAP のそれぞれのマーカーとの免疫組織化学 2 重染色像。矢印は 2 重陽性細胞。

B : 成体脊髄における Chd7、PDGFR α 、Sox2 の免疫組織化学 3 重染色像。矢印は 3 重陽性細胞。

C : 成体脊髄における Sox10、PDGFR α 、NF1A の免疫組織化学 3 重染色像。矢印は 3 重陽性細胞を示す。

Scale bars; 50 μ m (A - C)。

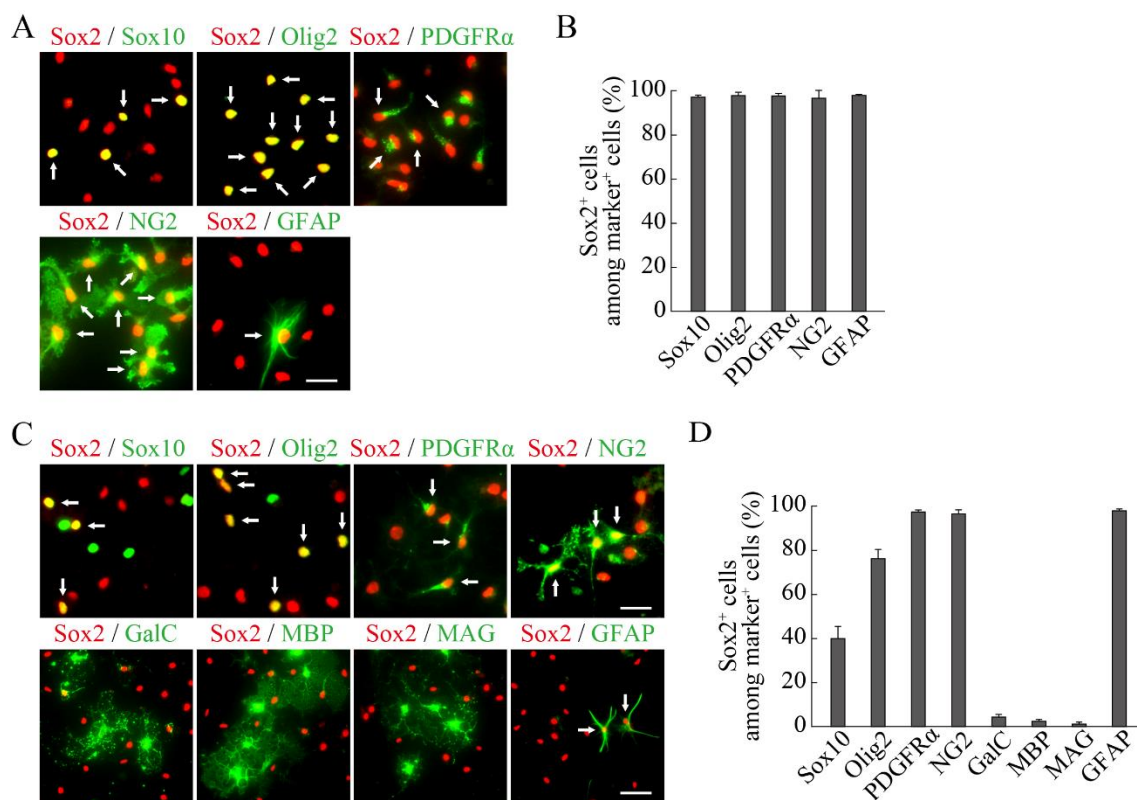


図 12 培養 OPC において Sox2 は OPC とアストロサイトで発現する

A: 培養 OPC を増殖条件で培養。Sox2 と Sox10、Olig2、PDGFR α 、NG2、GFAP のそれぞれのマーカーとの免疫細胞化学 2 重染色像。

B: 写真 A の各マーカー陽性細胞での Sox2⁺ 細胞の割合を定量。

C: 培養 OPC を 5 日間分化条件で培養。Sox2 と Sox10、Olig2、PDGFR α 、NG2、GalC、MBP、MAG、GFAP のそれぞれのマーカーとの免疫細胞化学 2 重染色像。

D: 写真 C の各マーカー陽性細胞での Sox2⁺ 細胞の割合を定量。

(A, C) 矢印は 2 重陽性細胞を示す。Scale bars; 25 μ m (A, C)。

(B, D) 平均値 \pm 標準偏差 (s.d.) で示す (n = 3)。

減少することがわかった。さらに増殖条件において Sox2⁺ 細胞の多くで Chd7 が発現していた (図 10A, B)ことから *in vitro* において Sox2 と Chd7 が OPC で共発現していることがわかった。

増殖している培養 OPC で Chd7 と Sox2 が共発現していたことから、脊髄損傷後に活性化、増殖する Sox2⁺ OPC [73]で Chd7 が発現している可能性が考えられた。このことを検証するため、OPC 特異的レポーターマウスである *PDGFRα-CreER;CAG-CAT-EGFP* マウス [47, 115] (図 8)で圧挫脊髄損傷モデルを作成して解析を行うこととした。1日1回のタモキシフェン腹腔内投与 (50 μg/g) を5日間連続で行い、最後のタモキシフェン投与3日後に圧挫脊髄損傷モデルを作成し、脊髄損傷後3日 (3 days post injury, 3 dpi)で GFP⁺ 細胞の表現型を解析した (図 13)。成体正常脊髄では OPC のごく少数で増殖マーカーである Ki67 及び Sox2 が共発現していた (図 14A, B)ことから、正常状態では OPC の多くが静止状態か、もしくは一部が非増殖性の成熟 OL に分化していることが示された。成体正常脊髄では Sox2⁺/ GFP⁺ 細胞の割合は Ki67⁺ Sox2⁺/ GFP⁺ 細胞の割合よりも多く (図 14B)、過去の報告 [72]にあるように、細胞周期停止後の OL 系譜細胞においても Sox2 発現が残っていることが示唆された。3 dpi の損傷脊髄において、GFP⁺ 細胞が顕著に増加し、細胞体の肥大や突起数の増加などの形態的变化

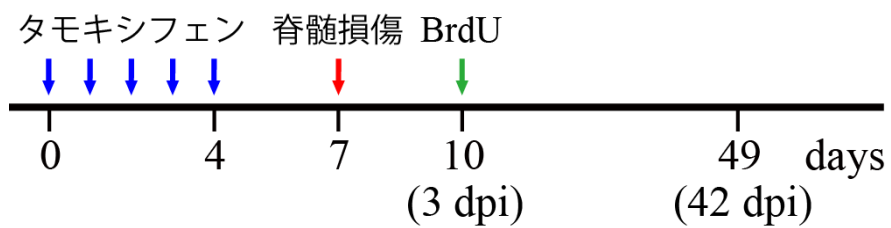


図 13 脊髄損傷実験計画の模式図 (図 14, 16-19)

タモキシフェン投与を 5 日間連続で行い (青矢印)、最終タモキシフェン投与後 3 日に圧挫脊髄損傷モデルを作成 (赤矢印)し、3 dpi で BrdU を投与した (緑矢印)。損傷脊髄は 3 dpi と 42 dpi で解析した。dpi: days post injury。

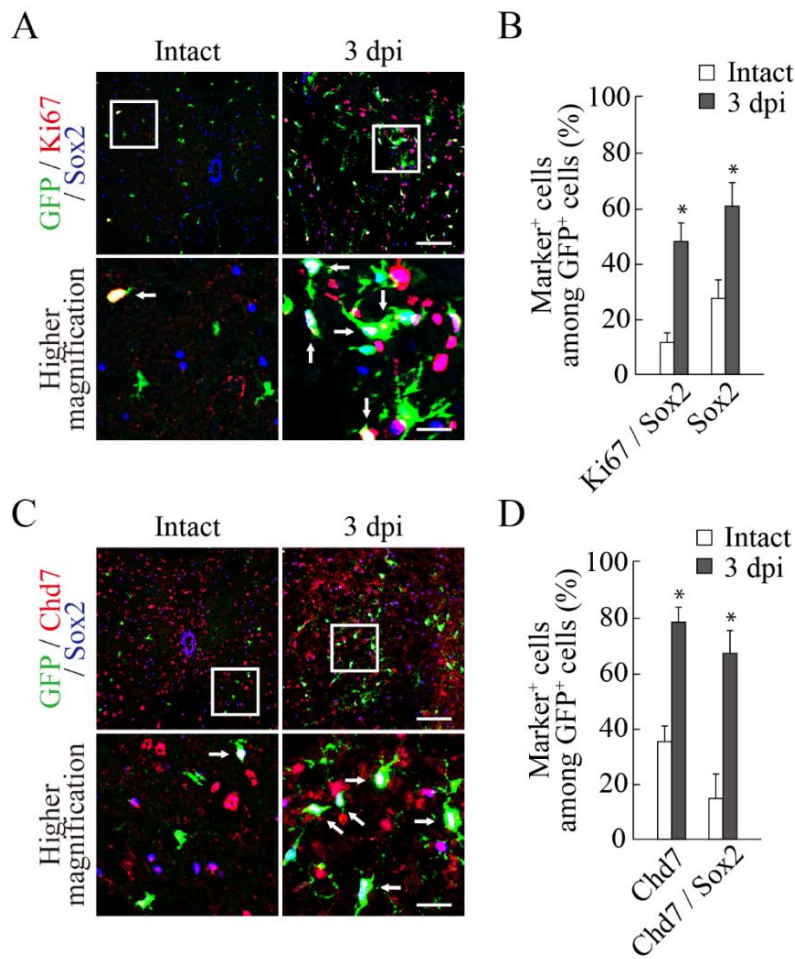


図 14 脊髄損傷後の活性化 OPC に Chd7 と Sox2 が共発現する

A : *PDGFR α -CreER*;*CAG-CAT-EGFP* マウス正常脊髄 (Intact)及び損傷後 3 日脊髄 (3 dpi)における GFP、Ki67、Sox2 の免疫組織化学 3 重染色像。

B : 写真 A の GFP⁺ 細胞における Ki67⁺ Sox2⁺ 細胞及び Sox2⁺ 細胞の割合の定量。

C : *PDGFR α -CreER*;*CAG-CAT-EGFP* マウス正常脊髄 (Intact)及び損傷後 3 日脊髄 (3 dpi)における GFP、Chd7、Sox2 の免疫組織化学 3 重染色像。

D : 写真 C の GFP⁺ 細胞における Chd7⁺ 細胞及び Chd7⁺ Sox2⁺ 細胞の割合の定量。

(A, C) 写真上の弱拡大像のボックス範囲を下の強拡大像に示す。矢印は 3 重陽性細胞を示す。Scale bars; 弱拡大像: 100 μ m、強拡大像: 25 μ m (A, C)。

(B, D) 平均値 \pm 標準偏差 (s.d.) で示す (n = 3 / group)。* $p < 0.01$ 。

を示していた (図 14A)。さらに正常脊髄と比べて、損傷脊髄の GFP⁺ 細胞では Ki67 及び Sox2 発現の割合が著明に上昇しており(図 14A, B)、このことから脊髄損傷後の増殖する活性化 OPC において Sox2 発現が増加することがわかった。さらに損傷脊髄の GFP⁺ 細胞で、Chd7⁺ 細胞の割合や Chd7⁺ Sox2⁺ 細胞の割合が正常脊髄と比べて顕著に増加することがわかった (図 14C, D)。これらの結果から、脊髄損傷後の増殖する Sox2⁺ OPC において Chd7 発現が増加することが示され、Chd7 が脊髄損傷後の OPC 活性化に関与する可能性が考えられた。

5-3. Chd7 は脊髄損傷後の OPC 活性化に必要である

Chd7 が脊髄損傷後急性期の OPC 活性化を制御している可能性が考えられたことから、次に OPC 特異的 Chd7 ノックアウトマウスでの解析を行うこととした。OPC 特異的に Chd7 をノックアウトするため、*PDGFRa-CreER;CAG-CAT-EGFP* マウスに *Chd7^{lox/lox}* マウスを交配し、*PDGFRa-CreER;Chd7^{lox/lox};CAG-CAT-EGFP* マウス (*Chd7* cKO マウス)を作製した (図 8)。タモキシフェン投与後の正常脊髄の免疫組織化学染色により、*PDGFRa-CreER;Chd7^{+/+};CAG-CAT-EGFP* マウス (Control マウス)では GFP⁺ 細胞に Chd7 が発現していたが、*Chd7* cKO マウスではその発現を認めず、

PDGFR α -GFP⁺ OPC 特異的に Chd7 発現がノックアウトされていることが確認された (図 15)。本研究の実験条件では、Control マウス正常脊髄で NG2⁺ OPC の 57.8%が GFP を発現しており、Chd7 cKO マウス正常脊髄の GFP⁺ 細胞における Chd7 ノックアウト効率は 89.7%だった。脊髄損傷後の OPC 増殖に対する Chd7 ノックアウトの影響を調べるため、Control 及び Chd7 cKO マウスにタモキシフェン投与後脊髄損傷モデルを作成し、3 dpi で BrdU を投与した後、損傷脊髄を採取、免疫組織化学染色による解析を行った (図 13)。Chd7 cKO マウスでは Control マウスと比較して、3 dpi の損傷脊髄での GFP⁺ 細胞における BrdU の取り込み及び Ki67⁺ 増殖細胞の割合が有意に減少し、OPC 増殖が抑制されていることがわかった (図 16A - C)。Chd7 cKO マウスと Control マウスでアポトーシスマーカーである cleaved caspase 3⁺ 細胞の割合に有意な違いがなかった (図 16D, E)ことから、Chd7 cKO マウスでの OPC 増殖抑制の結果は細胞死の増加によるものではないことが示された。さらに Chd7 cKO マウスでは GFP⁺ 細胞における NG2⁺ OPC や Sox10⁺ OL 系譜細胞の割合が Control と比べて有意に減少していることがわかり (図 17A - C)、Chd7 cKO 細胞の一部で OL 系譜の維持が損なわれていることが示唆された。

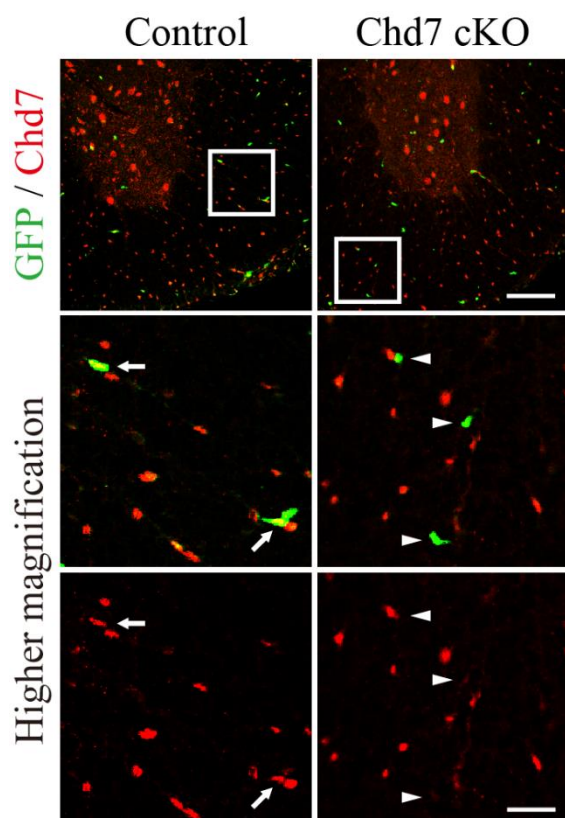


図 15 *Chd7* cKO マウスでの OPC 特異的 *Chd7* ノックアウトの確認

PDGFR α -CreER;Chd7^{+/+};CAG-CAT-EGFP マウス (Control マウス) 及び *PDGFR α -CreER;Chd7^{lox/lox};CAG-CAT-EGFP* マウス (*Chd7* cKO マウス) にタモキシフェン 5 日間連続投与し、最終タモキシフェン投与 3 日後にそれぞれのマウス脊髄を採取、*Chd7* と GFP の免疫組織化学 2 重染色を行った。矢印は *Chd7*⁺ GFP⁺ 細胞、矢頭は *Chd7*⁻ GFP⁺ 細胞を示す。上の弱拡大像のボックス範囲を下の強拡大像に示す。Scale bars; 弱拡大像: 100 μ m、強拡大像: 25 μ m。

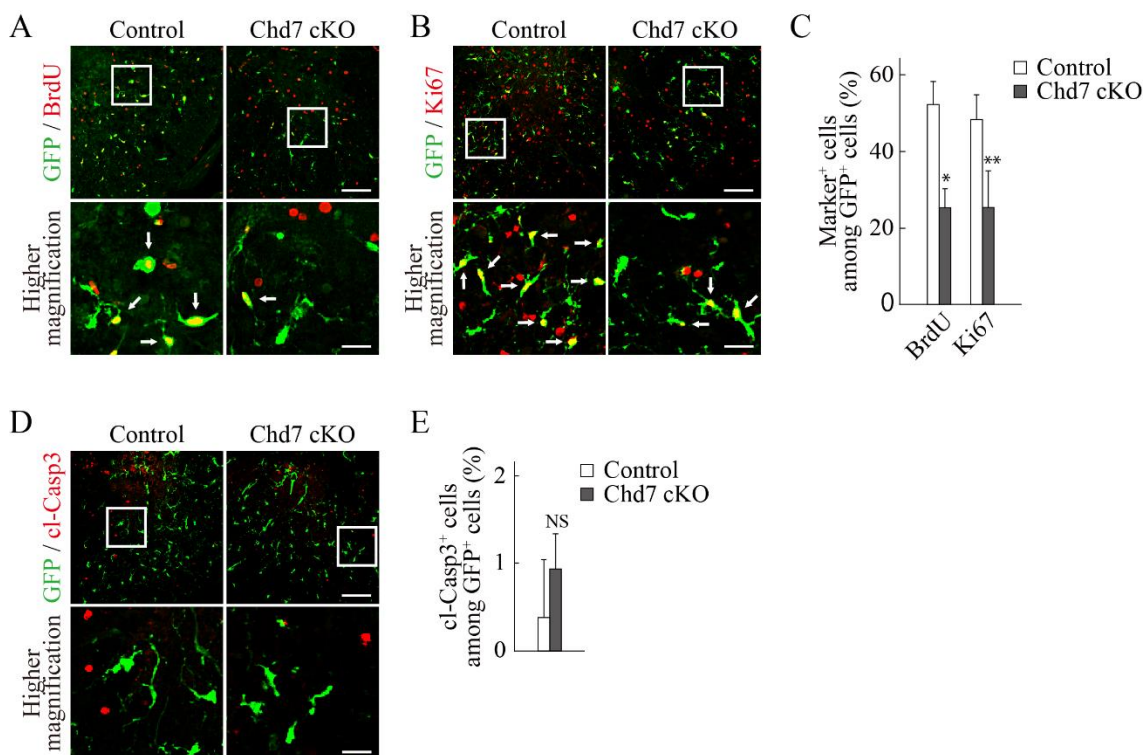


図 16 Chd7 は脊髄損傷後の OPC 増殖に必要である

A, B : Control マウス及び *Chd7* cKO マウスの 3 dpi 損傷脊髄における GFP と BrdU (A)または Ki67 (B)の免疫組織化学 2 重染色像。

C : 写真 A, B の GFP⁺ 細胞における BrdU、Ki67 発現の割合の定量。

D : Control マウス及び *Chd7* cKO マウスの 3 dpi 損傷脊髄における GFP、cleaved caspase 3 (cl-Casp3)の免疫組織化学 2 重染色像。

E : 写真 D の GFP⁺ 細胞における cl-Casp3 発現の割合の定量。

(A, B, D) 写真上の弱拡大像のボックス範囲を下の強拡大像に示す。矢印は 2 重陽性細胞を示す。Scale bars; 弱拡大像: 100 μ m、強拡大像: 25 μ m。

(C, E) 平均値 \pm 標準偏差 (s.d.) で示す (n = 3 / group)。* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$ 。NS: non-significant。

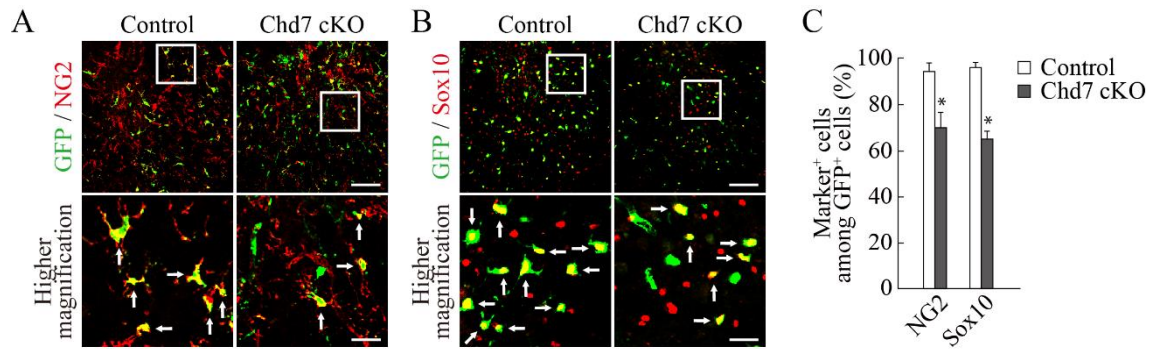


図 17 Chd7 は脊髄損傷後の OPC 系譜維持に必要である

A, B : Control マウス及び *Chd7* cKO マウスの 3 dpi 損傷脊髄における GFP と NG2 (A) または Sox10 (B) の免疫組織化学 2 重染色像。写真上の弱拡大像のボックス範囲を下の強拡大像に示す。矢印は 2 重陽性細胞を示す。Scale bars; 弱拡大像: 100 μm 、強拡大像: 25 μm 。

C : 写真 A の GFP⁺ 細胞における NG2、Sox10 発現の割合の定量。平均値 \pm 標準偏差 (s.d.) で示す (n = 3 / group)。* $p < 0.01$ 。

次に脊髄損傷後 42 日 (42 dpi)の慢性期損傷脊髄での Control 及び *Chd7* cKO マウスの表現型を解析した (図 13)。42 dpi の損傷脊髄において、*Chd7* cKO マウスでは GFP⁺ 細胞における GSTπ⁺ 成熟 OL や Sox10⁺ OL 系譜細胞の割合が減少しており、損傷後慢性期の OPC から成熟 OL への分化も抑制されていることが示された (図 18A - C)。また FluoroMyelin による髄鞘染色では、Control マウスに比べて *Chd7* cKO マウスで髄鞘染色陽性面積の割合が有意に減少しており、脊髄損傷後の再髄鞘化も抑制されていることがわかった (図 19A, B)。*Chd7* cKO 細胞の一部が Sox10⁺ OL 系譜細胞ではなかったことから、アストロサイトへの細胞系譜転換の可能性が考慮された。実際に 42 dpi 損傷脊髄の *Chd7* cKO 細胞の一部が GFAP⁺ アストロサイトであり、OL 系譜からアストロサイトへの系譜転換が示唆された (図 19C, D)。次に行動学的評価として脊髄損傷後 1 週おきに BMS スコアによるマウス後肢運動機能の評価を行ったところ、*Chd7* cKO マウスでは 28 dpi、35 dpi、42 dpi において有意に BMS スコアが低く、運動機能回復が不良であることがわかった (図 19E)。以上の結果より *Chd7* は脊髄損傷後の OPC 増殖及び系譜維持、成熟 OL への分化に必要であり、再髄鞘化による運動機能回復に寄与することがわかった。

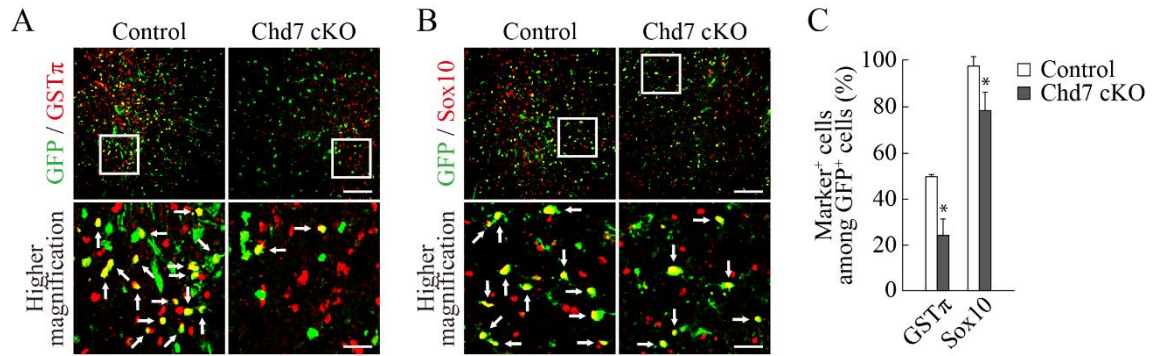


図 18 Chd7 は脊髄損傷後の成熟 OL への分化に必要である

A, B : Control マウス及び *Chd7* cKO マウスの 42 dpi 損傷脊髄における GFP と GSTπ (A) または Sox10 (B) の免疫組織化学 2 重染色像。写真上の弱拡大像のボックス範囲を下の強拡大像に示す。矢印は 2 重陽性細胞を示す。Scale bars; 弱拡大像: 100 μm、強拡大像: 25 μm。

C : 写真 A, B の GFP⁺ 細胞における GSTπ、Sox10 発現の割合の定量。平均値 ± 標準偏差 (s.d.) で示す (n = 3 / group)。* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$ 。

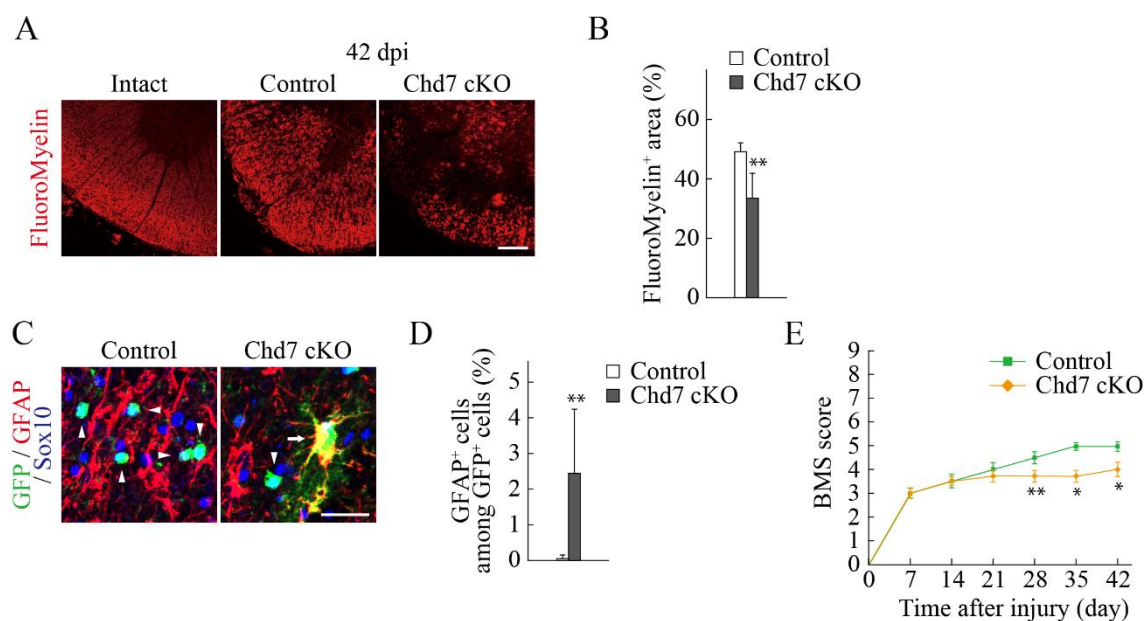


図 19 Chd7 は脊髄損傷後の再髄鞘化や運動機能回復に必要である

A: 野生型マウス正常脊髄と、Control マウス及び *Chd7* cKO マウスの 42 dpi 損傷脊髄における FluoroMyelin による髄鞘染色像。

B: 写真 A の髄鞘染色陽性面積の割合 (髄鞘染色陽性面積 / 全脊髄横断面積) の定量。

C: *Chd7* cKO マウスの 42 dpi 損傷脊髄における GFP、GFAP、Sox10 の免疫組織化学 3 重染色像。矢頭は GFP⁺GFAP⁻Sox10⁺ 細胞、矢印は GFP⁺GFAP⁺Sox10⁻ 細胞を示す。

D: 写真 C の GFP⁺ 細胞における GFAP 発現の割合の定量。

E: Control マウス及び *Chd7* cKO マウスの脊髄損傷後 1 週おきの BMS スコアによるマウス後肢運動機能評価。中央値 ± 標準誤差 (s.e.m) で示す (Control: n = 5、*Chd7* cKO: n = 6)。* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$ 。

Scale bars; 100 μ m (A)、25 μ m (C)。

(B, D) 平均値 ± 標準偏差 (s.d.) で示す (n = 3 / group)。** $p < 0.05$ 。

5-4. Chd7 は発生期及び成体正常脊髄の OPC 増殖、系譜維持に必要である

脊髄損傷の病態モデルにおいて Chd7 が OPC 活性化を制御していたことから、次に正常脊髄 (発生期及び成体)での OPC 増殖や系譜維持における Chd7 の役割についても解析した。

まず発生期脊髄における OPC 増殖や系譜維持に Chd7 が必要であるかについて調べることにした。前述の通り、マウス発生期脊髄において、OPC は E12.5 ごろから腹側の pMN ドメインより発生する (図 1) [43-45]。そこで発生期脊髄の OPC 特異的に Chd7 をノックアウトするため、E13.5 で妊娠マウスにタモキシフェン腹腔内投与し、E15.5 で BrdU 投与後に胎仔脊髄を採取し、免疫組織化学染色で解析した (図 20A)。Chd7 cKO マウスでは Control マウスと比べて BrdU⁺ 細胞及び Ki67⁺ 細胞の割合が有意に減少しており、OPC 増殖が抑制されていることがわかった (図 20B - D)。細胞死に関しては Chd7 cKO マウス及び Control マウス双方で GFP⁺ 細胞中に cleaved caspase 3⁺ 細胞は認められなかった (図 21A) (Control, 0%, n = 3; Chd7 cKO, 0%, n = 3)。さらに Chd7 cKO マウスでは、PDGFR α ⁺ 及び NG2⁺ OPC、Sox10⁺ OL 系譜細胞の割合が減少していた (図 21B, C)。以上の結果から Chd7 は発生期脊髄における OPC 増殖や系譜維持に必要であることが示された。

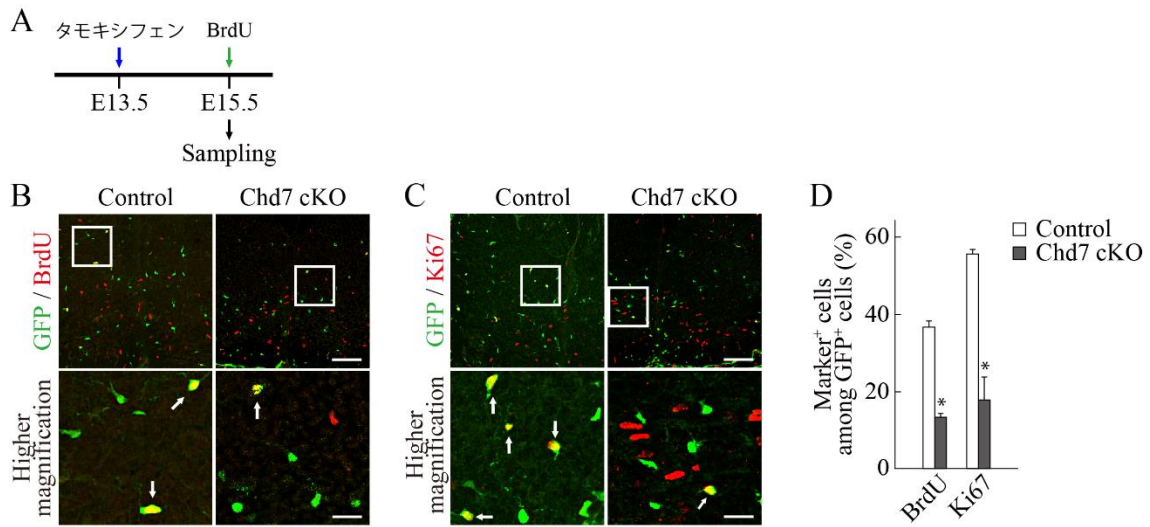


図 20 Chd7 は発生期脊髄の OPC 増殖に必要である

A: 発生期脊髄解析における実験計画模式図。E13.5 で妊娠マウスにタモキシフェン投与 (青矢印)を行い、E15.5 で妊娠マウスに BrdU 投与 (緑矢印)後 2 時間で胎仔脊髄を解析。

B, C: Control マウス及び *Chd7* cKO マウス胎仔脊髄における GFP と BrdU (B)または Ki67 (C)の免疫組織化学 2 重染色像。写真上の弱拡大像のボックス範囲を下の強拡大像に示す。矢印は 2 重陽性細胞を示す。Scale bars; 弱拡大像: 100 μ m、強拡大像: 25 μ m。

D: 写真 B, C の GFP⁺ 細胞における BrdU、Ki67 発現の割合の定量。平均値 \pm 標準偏差 (s.d.) で示す (n = 3 / group)。* $p < 0.01$ 。

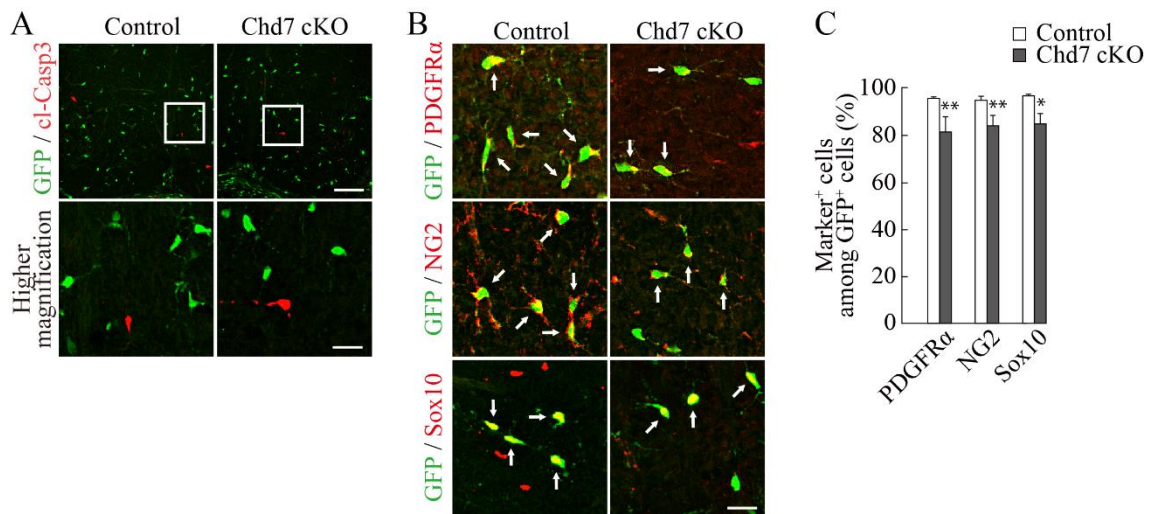


図 21 Chd7 は発生期脊髄の OPC 系譜維持に必要である

A: Control マウス及び *Chd7* cKO マウス胎仔脊髄における GFP と cleaved caspase3 (cl-Casp3) の免疫組織化学 2 重染色像。写真上の弱拡大像のボックス範囲を下の強拡大像に示す。矢印は 2 重陽性細胞を示す。Scale bars; 弱拡大像: 100 μm、強拡大像: 25 μm。Control, 0%, n = 3; *Chd7* cKO, 0%, n = 3。

B: Control マウス及び *Chd7* cKO マウス胎仔脊髄における GFP と PDGFRα、NG2、Sox10 の免疫組織化学 2 重染色像。矢印は 2 重陽性細胞を示す。Scale bar; 25 μm。

C: 写真 B の GFP⁺ 細胞における PDGFRα、NG2、Sox10 発現の割合の定量。平均値 ± 標準偏差 (s.d.) で示す (n = 3 / group)。* p < 0.01、** p < 0.05。

次に成体正常脊髄の OPC 増殖や系譜維持における *Chd7* ノックアウトの影響について解析した。タモキシフェンを 5 日間連続投与し、最終投与 3 日後から BrdU 腹腔内投与及び BrdU 含有飲料水による投与を 8 日間行い、緩徐に増殖する OPC を標識した (図 22A)。*Chd7* cKO マウスでは発生期脊髄と同様に OPC 増殖が抑制され (図 22B - D)、OPC 生存には影響が見られず (図 23A, B)、OL 系譜維持が損なわれていた (図 23C, D)。さらに *Chd7* cKO マウスでは分化した $\text{GST}\pi^+$ 成熟 OL の割合も減少し、一方で一部の GFP^+ 細胞が GFAP^+ アストロサイトに系譜転換していることがわかった (図 23E, F)。損傷脊髄での解析結果とあわせてまとめると、*Chd7* は脊髄損傷などの病態モデルや、発生期及び成体正常モデルにおいて、OPC 増殖や系譜維持を制御していることが明らかとなった。

A

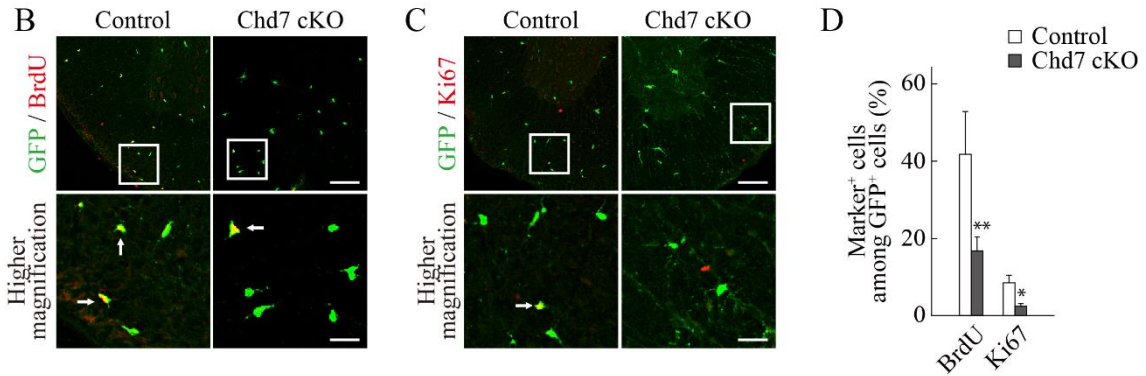
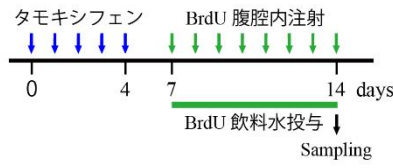


図 22 Chd7 は成体正常脊髄の OPC 増殖に必要である

A: 成体正常脊髄解析における実験計画模式図。Control マウス、*Chd7* cKO マウスに 5 日間連続タモキシフェン投与 (青矢印) し、最終タモキシフェン投与 3 日後から BrdU 腹腔内注射 (緑矢印) 及び BrdU 含有飲料水投与 (緑ライン) を 8 日間継続。最終 BrdU 投与 2 時間後にそれぞれのマウスの脊髄を採取。

B, C: Control マウス及び *Chd7* cKO マウス成体正常脊髄における GFP と BrdU (B) または Ki67 (C) の免疫組織化学 2 重染色像。写真上の弱拡大像のボックス範囲を下の強拡大像に示す。矢印は 2 重陽性細胞を示す。Scale bars; 弱拡大像: 100 μ m、強拡大像: 25 μ m。

D: 写真 B, C の GFP⁺ 細胞における BrdU、Ki67 発現の割合の定量。平均値 \pm 標準偏差 (s.d.) で示す (n = 3 / group)。* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$ 。

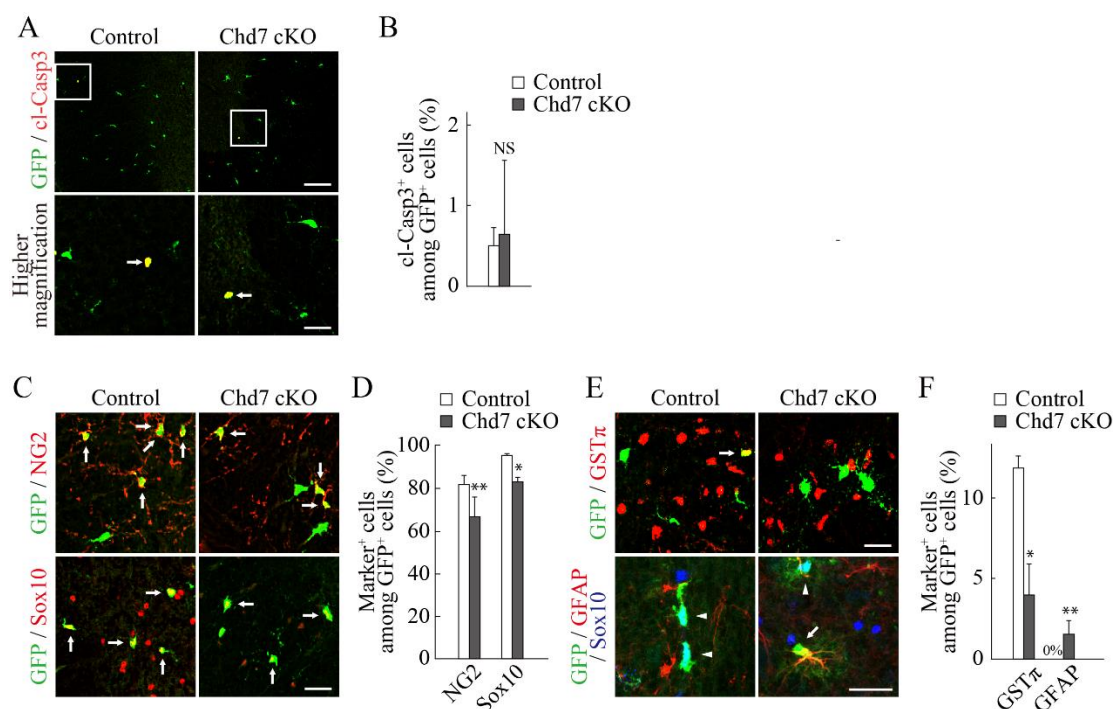


図 23 Chd7 は成体正常脊髄の OPC 系譜維持、成熟 OL への分化に必要である

A : Control マウス及び *Chd7* cKO マウス成体正常脊髄における GFP と cleaved caspase3 (cl-Casp3)の免疫組織化学 2 重染色像。写真上の弱拡大像のボックス範囲を下の強拡大像に示す。矢印は 2 重陽性細胞を示す。

B : 写真 A の GFP⁺ 細胞における cl-Casp3⁺ 細胞の割合の定量。

C : Control マウス及び *Chd7* cKO マウス成体正常脊髄における GFP と NG2、Sox10 の免疫組織化学 2 重染色像。矢印は 2 重陽性細胞を示す。

D : 写真 C の GFP⁺ 細胞における NG2、Sox10 発現の割合の定量。

E : Control マウス及び *Chd7* cKO マウス成体正常脊髄における GFP と GSTπ の免疫組織化学 2 重染色像 (上写真、矢印は 2 重陽性細胞)及び GFP、GFAP、Sox10 の免疫組織化学 3 重染色像 (下写真、矢頭は GFP⁺ GFAP⁻ Sox10⁺ 細胞、矢印は GFP⁺ GFAP⁺ Sox10⁻ 細胞)。

F : 写真 E の GFP⁺ 細胞における GSTπ、GFAP 発現の割合の定量。

Scale bars; 弱拡大像: 100 μm、強拡大像: 25 μm (A)、25 μm (C, E)。(B, D, F) 平均値 ± 標準偏差 (s.d.) で示す (n = 3 / group)。* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$ 。NS: non-significant。

5-5. *in vitro* で Chd7 と Sox2 は OPC 増殖と系譜維持を制御する

次に *in vitro* においても Chd7 が同様に OPC 増殖や系譜維持を制御しているかについて検討した。Chd7^{flx/flx} マウス由来の培養 OPC に、GFP のみ (Control) もしくは GFP と Cre を発現するレトロウイルスを感染させ、増殖条件及び分化条件で培養を行った。Chd7 のノックアウトは免疫細胞化学染色及び定量 RT-PCR にて確認した (図 24A, B)。Chd7 ノックアウトでは Control と比べ、cleaved caspase 3⁺ 細胞の割合に差はなく、生存に影響はなかった (図 24C, D)が、EdU⁺ 細胞や Ki67⁺ 細胞の割合が有意に減少しており、OPC 増殖が抑制されていた (図 24E, F)。さらに増殖条件において Chd7 ノックアウトにより PDGFR α ⁺ OPC や Sox10⁺ OL 系譜細胞が減少していた (図 24G, H)。以上の結果から *in vitro* においても Chd7 は OPC 増殖や系譜維持に必要であることが示された。また分化条件において、Chd7 ノックアウトにより Sox10⁺ OL 系譜細胞及び MBP⁺ 成熟 OL が減少しており、反対に GFAP⁺ アストロサイトは顕著に増加していた (図 25A, B)。これらの結果より *in vitro* においても Chd7 は OPC から成熟 OL への分化を制御していることが判明した。Chd7 ノックアウトにより OPC 増殖が抑制されることで、二次的に成熟 OL への分化が抑制されている可能性を考慮し、分化段階の過程における OL 系譜細胞で Chd7 をノックアウトする実験を行い、OL 分化への影響につ

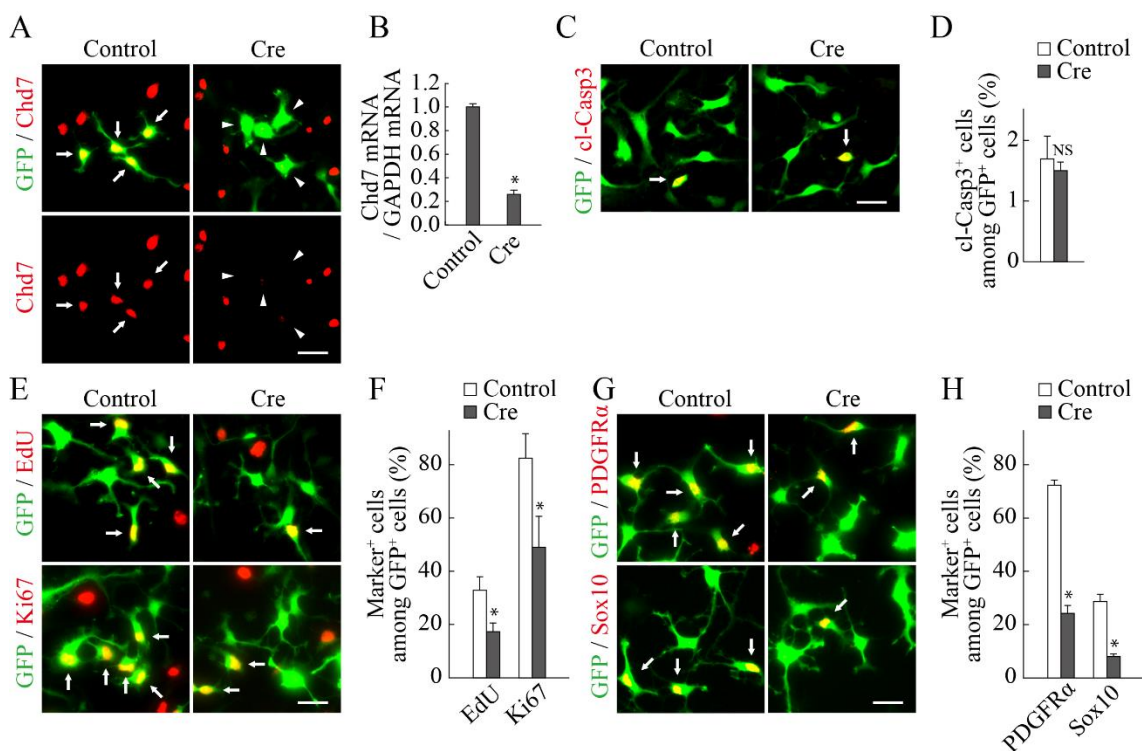


図 24 *in vitro* において Chd7 は OPC 増殖、系譜維持に必要である

A : *Chd7^{lox/lox}* マウス由来培養 OPC に GFP のみ (control) または GFP と Cre を発現したレトロウイルスを感染、増殖条件で培養、感染 3 日後に GFP と Chd7 の免疫細胞化学 2 重染色を行った。矢印は Chd7⁺ GFP⁺ 細胞、矢頭は Chd7⁻ GFP⁺ 細胞を示す。

B : 感染 3 日後の培養細胞を回収し、定量 RT-PCR で Chd7 mRNA 発現量を解析。Control 値で補正した値を示す。

C-H : *Chd7^{lox/lox}* マウス由来培養 OPC に control または Cre 発現レトロウイルスを感染、増殖条件で培養。感染 3 日後に 2 時間 EdU で標識し、GFP と cleaved caspase 3 (cl-Casp3) (C)、EdU 及び Ki67 (E)、PDGFR α 及び Sox10 (G) をそれぞれ免疫細胞化学 2 重染色した。GFP⁺ 細胞におけるそれぞれのマーカー陽性細胞の割合を定量 (D, F, H)。矢印は 2 重陽性細胞を示す (C, E, G)。Scale bars; 25 μ m (A, C, E, G)。

(B, D, F, H) 平均値 \pm 標準偏差 (s.d.) で示す (n = 3 / group)。* $p < 0.01$ 。NS: non-significant。

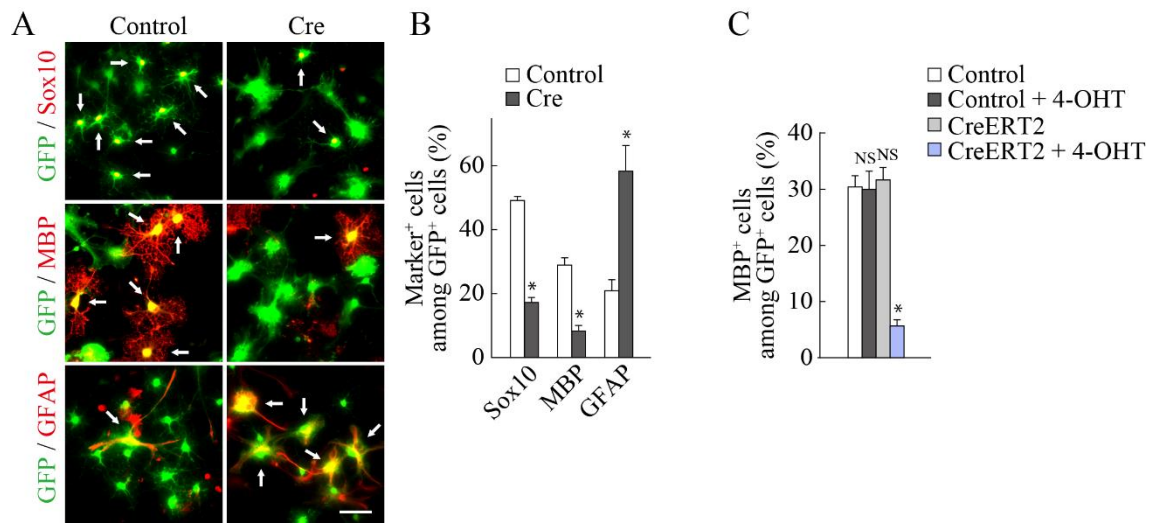


図 25 *in vitro* において Chd7 は成熟 OL への分化に必要なである

A: *Chd7^{lox/lox}* マウス由来培養 OPC に control または Cre 発現レトロウイルスを感染させ、増殖条件で培養。感染 2 日後に 5 日間分化条件で培養し、GFP と Sox10、MBP、GFAP とで免疫細胞化学 2 重染色した。矢印は 2 重陽性細胞を示す。Scale bar; 50 μ m。

B: GFP⁺ 細胞におけるそれぞれのマーカー陽性細胞の割合を定量。

C: *Chd7^{lox/lox}* マウス由来培養 OPC に control または CreERT2 発現レトロウイルスを感染させ、増殖条件で培養。感染 2 日後から分化誘導を行った 8 時間後に 4-OHT 処理した。5 日後に GFP と MBP の免疫細胞化学 2 重染色を行った。GFP⁺ 細胞における MBP⁺ 細胞の割合を定量。

(B, C) 平均値 \pm 標準偏差 (s.d.) で示す (n = 3 / group)。* $p < 0.01$ 。NS: non-significant。

いて解析した。*Chd7^{flx/flx}* マウス由来培養 OPC に CreERT2 発現レトロウイルスを感染させ、分化誘導を行った 8 時間後に 4-OHT 処理した。分化段階の OL で *Chd7* をノックアウトすると、MBP⁺ 成熟 OL が減少していた (図 25C) ことから、*Chd7* は OPC 増殖や系譜維持の制御と独立して、OL 分化を制御していることが示された。

次に *Chd7* が活性化 OPC において *Sox2* と共発現していたことから、*Sox2* も同様に OPC 増殖や系譜維持を制御しているかについて *in vitro* で検討した。培養 OPC での *Sox2* ノックダウンは 2 種類の shRNA (sh-*Sox2* #1 及び #2) を用いて行った。免疫細胞化学染色及び定量 RT-PCR で *Sox2* ノックダウンを確認した (図 26A, B)。*Chd7* ノックアウトと同様に、*Sox2* ノックダウンにより細胞死には影響がなかった (図 26C, D) が、EdU⁺、Ki67⁺ 増殖細胞が減少し (図 26E, F)、PDGFR α ⁺ OPC や Sox10⁺ OL 系譜細胞も減少していた (図 26G, H)。以上の結果から *Sox2* も OPC 増殖や系譜維持に必要であることがわかった。さらに培養 OPC で *Chd7* ノックアウトと *Sox2* ノックダウンを同時に行ったところ、*Chd7* ノックアウト単独や *Sox2* ノックダウン単独と比べて、OPC 増殖や OPC 及び OL 系譜細胞の減少に明らかな相乗効果は見られなかった (図 27A - C)。このことから *Chd7* と *Sox2* は同じシグナル経路で OPC 増殖や系譜維持を制御していることが考えら

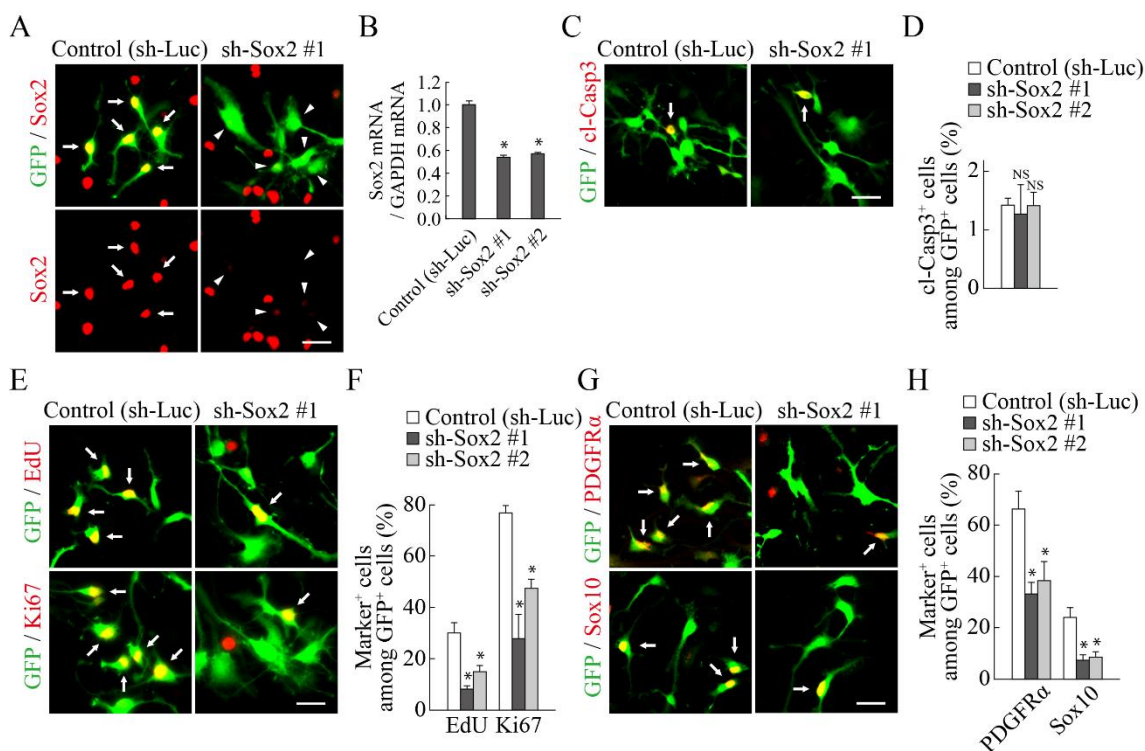


図 26 *in vitro* において Sox2 は OPC 増殖、系譜維持に必要である

A: 培養 OPC に GFP と control shRNA (sh-Luc) または Sox2 shRNA (sh-Sox2 #1) を発現したレトロウイルスを感染させ、増殖条件で培養。感染 3 日後に GFP と Sox2 を免疫細胞化学 2 重染色した。矢印は Sox2^{high} GFP⁺ 細胞、矢頭は Sox2^{low} GFP⁺ 細胞を示す。

B: 培養 OPC に control、sh-Sox2 #1 または sh-Sox2 #2 発現レトロウイルスを感染、感染 3 日後に回収し、定量 RT-PCR で shRNA のノックダウン効率を解析。Control 値で補正した値を示す。

C-H: 培養 OPC に control、sh-Sox2 #1 または sh-Sox2 #2 発現レトロウイルスを感染、増殖条件で培養。感染 3 日後に 2 時間 EdU で標識し、GFP と cleaved caspase 3 (cl-Casp3) (C)、EdU 及び Ki67 (E)、PDGFR α 及び Sox10 (G) をそれぞれ免疫細胞化学 2 重染色した。GFP⁺ 細胞におけるそれぞれのマーカー陽性細胞の割合を定量 (D, F, H)。

(C, E, G) 矢印は 2 重陽性細胞を示す。Scale bars; 25 μ m (A, C, E, G)。

(B, D, F, H) 平均値 \pm 標準偏差 (s.d.) で示す (n = 3 / group)。* $p < 0.01$ 。NS: non-significant。

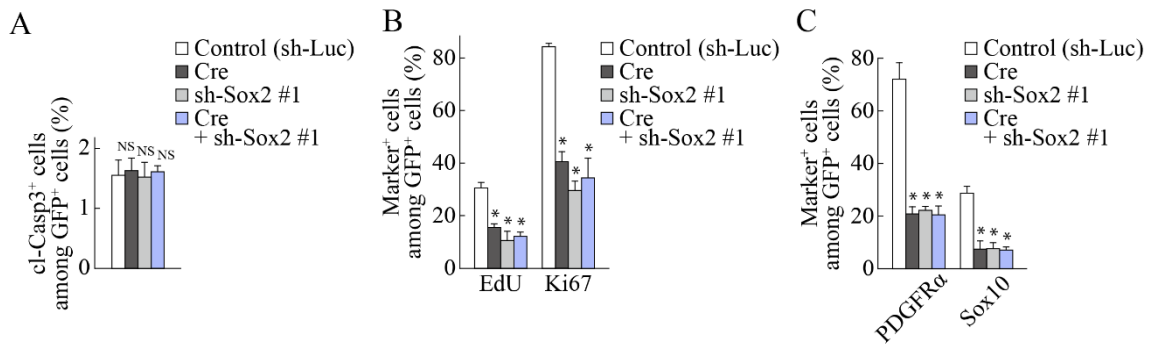


図 27 培養 OPC での *Chd7* ノックアウトと *Sox2* ノックダウンにより OPC 増殖の抑制や OPC 及び OL 系譜細胞の減少に相乗効果は認められない

A-C : *Chd7^{fllox/fllox}* マウス由来培養 OPC に control、Cre、sh-Sox2 #1 または Cre + sh-Sox2 #1 発現レトロウイルスを感染、増殖条件で培養。感染 3 日後に 2 時間 EdU で標識し、GFP と cl-Casp3 (A)、EdU 及び Ki67 (B)、PDGFRα 及び Sox10 (C) をそれぞれ免疫細胞化学 2 重染色し、GFP⁺ 細胞におけるそれぞれのマーカー陽性細胞の割合を定量。平均値 ± 標準偏差 (s.d.) で示す (n = 3 / group)。* $p < 0.01$ 。NS: non-significant。

れた。そこで Chd7 と Sox2 の相互作用を調べるため、共免疫沈降による解析を行ったところ、Chd7 及び Sox2 をトランスフェクションした 293T 細胞で Chd7 と Sox2 が結合し (図 28A)、培養 OPC でも内在性の Chd7 と Sox2 が結合し、複合体を形成していることがわかった (図 28B)。さらに分子同士の近接性をみる PLA 解析でも、培養 OPC で内在性の Chd7 と Sox2 の結合が確認された (図 28C)。

以上の結果から、Chd7 と Sox2 は複合体を形成し、協調して OPC 増殖や系譜維持を制御していることが示された。

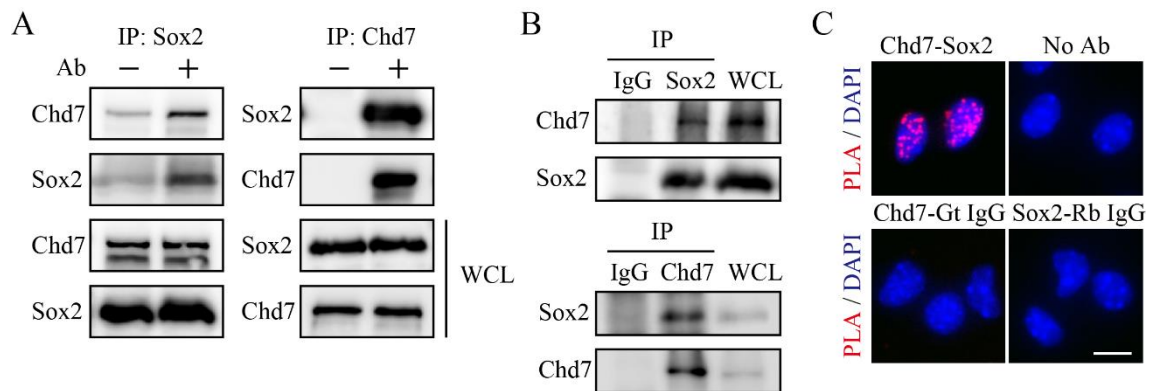


図 28 OPC において Chd7 と Sox2 は結合し複合体を形成する

A : 293T 細胞に Chd7 と Sox2 発現プラスミドをトランスフェクションし、その細胞溶解液を共免疫沈降及びウエスタンブロッティングで解析した。

B : 増殖条件の培養 OPC の溶解液を共免疫沈降及びウエスタンブロッティングで解析した。

C : 増殖条件の培養 OPC で抗 Chd7 抗体、抗 Sox2 抗体、正常 rabbit IgG、正常 goat IgG による proximity ligation assay (PLA)を行った。PLA シグナル (赤色蛍光) は Chd7 と Sox2 が近接していることを示す。Scale bar; 10 μ m。

Ab: antibody、IP: immunoprecipitation、WCL: whole cell lysate、IgG: immunoglobulin G、Gt: goat、Rb: rabbit。

5-6. Chd7 と Sox2 は OL 関連遺伝子群の発現を制御する

次に Chd7 による OPC 活性化のメカニズムを明らかにするため、Chd7 の標的遺伝子に関する網羅的な遺伝子発現解析を行った。Control 及び Chd7 をノックダウン (sh-Chd7 #1 のノックダウン効率は 65%) した培養 OPC を用いたマイクロアレイ解析から、Chd7 ノックダウンにより発現が減少する遺伝子が 616 遺伝子、発現が増加する遺伝子が 556 遺伝子あることがわかった (図 29A)。Chd7 ノックダウンにより発現が減少する遺伝子群には、*PDGFRa*、*Sox10*、*NG2 (CSPG4)*、*Olig2*、*Myt1*、*Hes5* などの多くの OL 関連遺伝子が含まれていた (図 29A, B-a)。反対に Chd7 ノックダウンにより発現が増加する遺伝子群には、*Gfap*、*Acsbg1*、*Gjb6 (Connexin 30)*、*Gjal1 (Connexin 43)*、*Slc6a9 (Glyt1)*、*Btbd17*、*Megf10*、*Sparcl1 (Hevin)* などのアストロサイト関連遺伝子が含まれていた (図 29B-b)。培養 OPC での Chd7 及び Sox2 ノックダウンにより上記の OL 関連遺伝子の発現が減少することを定量 RT-PCR で確認した (図 30A)。GO 解析では Chd7 ノックダウンにより発現が減少する遺伝子群に細胞増殖制御やオリゴデンドロサイト分化、グリア細胞発生関連遺伝子群が含まれていることがわかった (図 30B)。以上の結果から Chd7 は OL 関連遺伝子群の発現を制御していることが示された。

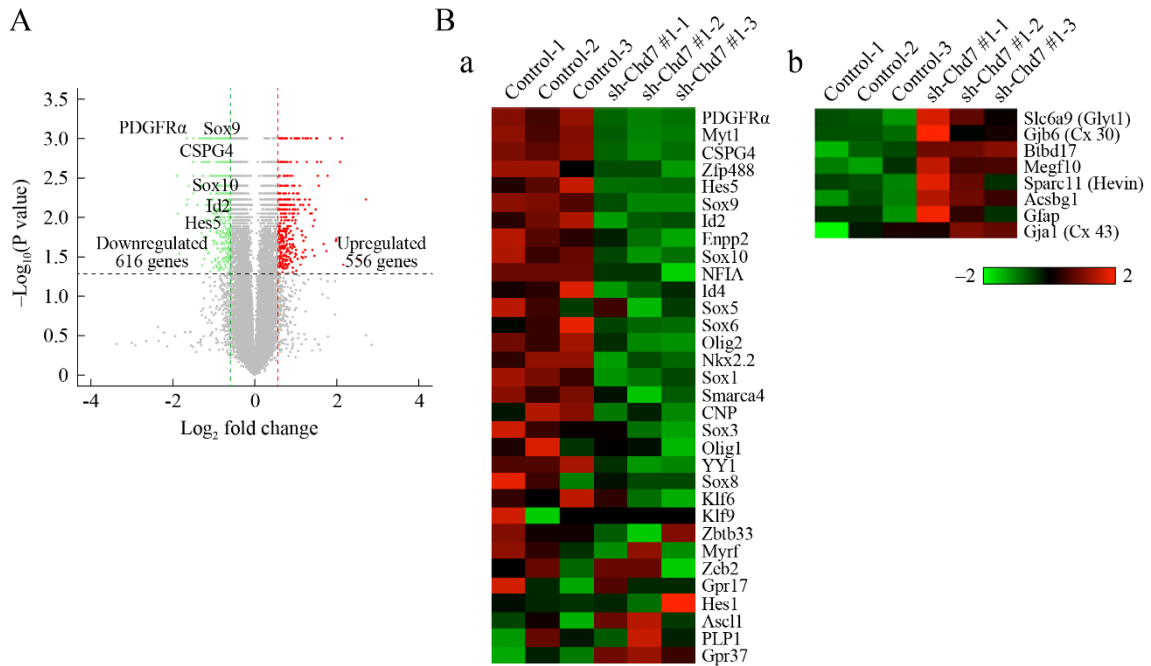


図 29 Chd7 は OL 関連遺伝子群の発現を制御する

A: control 及び Chd7 ノックダウン培養 OPC 間における遺伝子発現変化を volcano plot で示す。Chd7 ノックダウンにより発現が有意に増加した遺伝子 (fold change > 1.5、 $p < 0.05$) を赤色ドット、有意に減少した遺伝子 (fold change < 0.66、 $p < 0.05$) を緑色ドットで示す。

B: control 及び Chd7 ノックダウン培養 OPC (それぞれ独立 3 サンプル) における (a) OL 関連遺伝子及び、(b) アストロサイト関連遺伝子発現をヒートマップで示す。カラースケールは補正した遺伝子発現レベルを示す (赤は発現増加、緑は発現減少)。

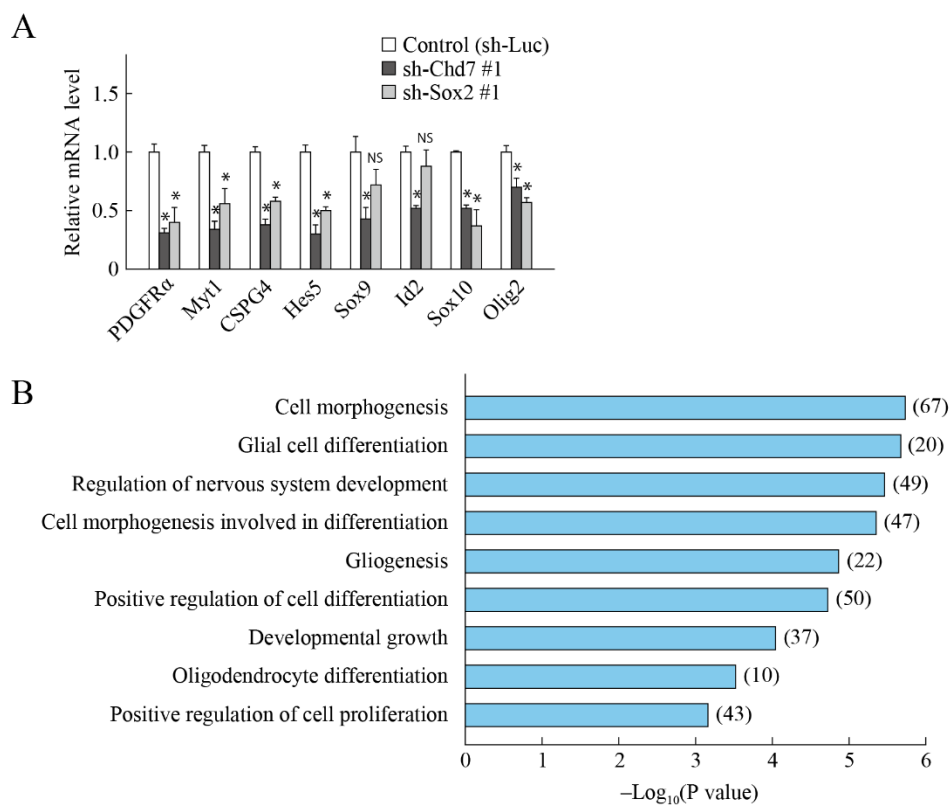


図 30 Chd7 及び Sox2 は OL 関連遺伝子群の発現を制御する

A : 培養 OPC に control、sh-Chd7 #1 または sh-Sox2 #1 発現レトロウイルスを感染し、増殖条件で培養。感染 3 日後に回収し、それぞれの mRNA 発現量を定量 RT-PCR で解析。平均値 ± 標準偏差 (s.d.) で示す (n = 3 実験)。* $p < 0.01$ 。NS: non-significant。

B : Chd7 ノックダウン培養 OPC で発現が減少した遺伝子群の gene ontology (GO) 解析。カッコ内の数字はそれぞれのカテゴリーに属する遺伝子数を示す。

5-7. Rgcc 及び PKC θ は Chd7 - Sox2 複合体の直接の標的分子である

マイクロアレイ解析結果より、Chd7 ノックダウンにより発現が減少する遺伝子群の中から、細胞増殖に関連する新規分子の候補を探索したところ、Rgcc 及び PKC θ の発現が顕著に減少していることがわかった (図 31A)。Rgcc (別名 RGC32)はもともとラット初代培養オリゴデンドロサイトで補体活性化により発現が誘導される遺伝子として同定された [121]。OL と C6 グリオーマ株化細胞を融合したハイブリッド細胞において、Rgcc 過剰発現により DNA 合成が亢進するという報告 [121]があるが、OL 系譜細胞におけるその役割はほとんどわかっていない。PKC θ (別名 Prkcq)は、活性化に Ca²⁺ を必要としない novel PKC ファミリー (δ , ϵ , η , θ)のうちの一つで、T 細胞や消化管間質腫瘍 (gastrointestinal stromal tumor, GIST) 細胞などの細胞種において細胞増殖促進に働くことが知られている [122]。また *in vitro* の培養ラット成熟 OL において、PKC θ 発現を認めるといふ報告がある [123]が、OL 系譜における PKC θ の役割はほとんど明らかにされていない。そこで OPC 増殖の新たな制御因子の候補として、Rgcc と PKC θ に着目して解析することとした。定量 RT-PCR 解析により、培養 OPC での Chd7 ノックダウンで、Rgcc と PKC θ 発現が著明に減少しており、Sox2 ノックダウンでも同様に Rgcc、PKC θ 発現が減少していた (図 31B)。Chd7 と Sox2 が Rgcc、

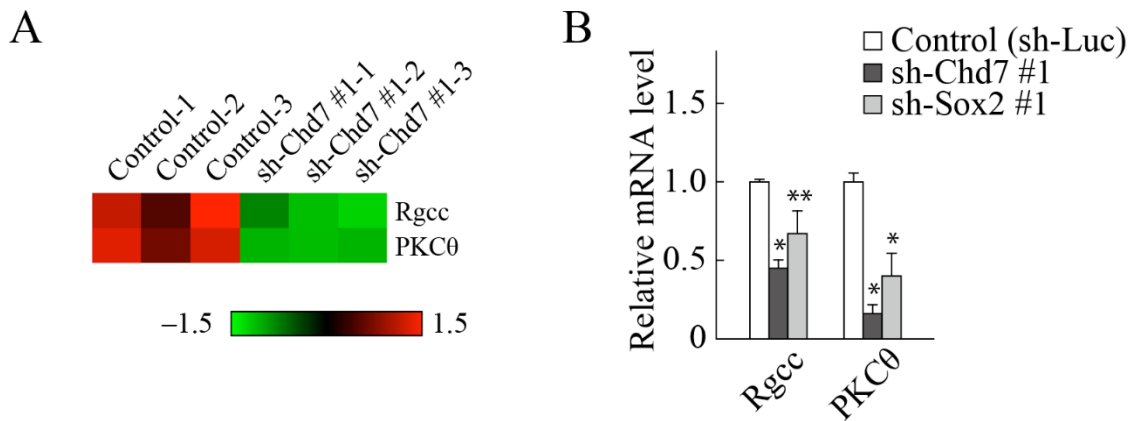


図 31 Rgcc 及び PKCθ は Chd7 の新たな標的分子である

A : control 及び Chd7 ノックダウン培養 OPC (それぞれ独立 3 サンプル)における Rgcc 及び PKCθ 遺伝子発現をヒートマップで示す。カラースケールは補正した遺伝子発現レベルを示す (赤は発現増加、緑は発現減少)。

B : 培養 OPC に control、sh-Chd7 #1 または sh-Sox2 #1 発現レトロウイルスを感染し、増殖条件で培養。感染 3 日後に回収し、Rgcc 及び PKCθ の mRNA 発現量を定量 RT-PCR で解析。平均値 ± 標準偏差(s.d.) で示す (n = 3 / group)。* $p < 0.01$ 、** $p < 0.05$ 。

PKC θ 発現を直接制御しているかについて調べるため、ChIP 解析を行った。培養 OPC における ChIP 解析により、*Rgcc* 遺伝子では R1、R2、R3 領域、*PKC θ* 遺伝子では R3 領域周辺で Chd7 と Sox2 が enrich していた (図 32A, B, D, E)。さらに Chd7 と Sox2 が enrich した *Rgcc* 及び *PKC θ* 遺伝子領域は、H3K27 がアセチル化 (H3K27ac)された active な状態のプロモーターやエンハンサー領域と一致することがわかった (図 32C, F)。以上の結果より Chd7 - Sox2 複合体は *Rgcc* 及び *PKC θ* 遺伝子の active なプロモーターやエンハンサー領域に結合し、遺伝子発現を直接制御していることが示された。

次に *in vivo* の成体正常脊髄における *Rgcc* 及び PKC θ の発現パターンを解析した。*Rgcc* と PKC θ が Chd7 と Sox2 の直接のターゲット分子であることを反映して、*Rgcc*⁺ 細胞と PKC θ ⁺ 細胞の多くが Chd7 を発現しており、さらに一部の *Rgcc*⁺ 細胞と PKC θ ⁺ 細胞は Sox2 を発現していた (図 33A, B)。さらに Olig2⁺、Sox10⁺ OL 系譜細胞や PDGFR α -GFP⁺ OPC において *Rgcc* と PKC θ が発現していた (図 33C, D)。一方でアストロサイトに関しては、多くの GFAP⁺ アストロサイトで *Rgcc* が発現していたが、PKC θ は発現していなかった (図 33C, D)。過去の神経系細胞の網羅的遺伝子発現解析 [124]のデータベースから、*Rgcc* は OPC 及びアストロサイトに強く発現し、PKC θ は OPC と新生 OL で強く発現しており (図 34A, B)、

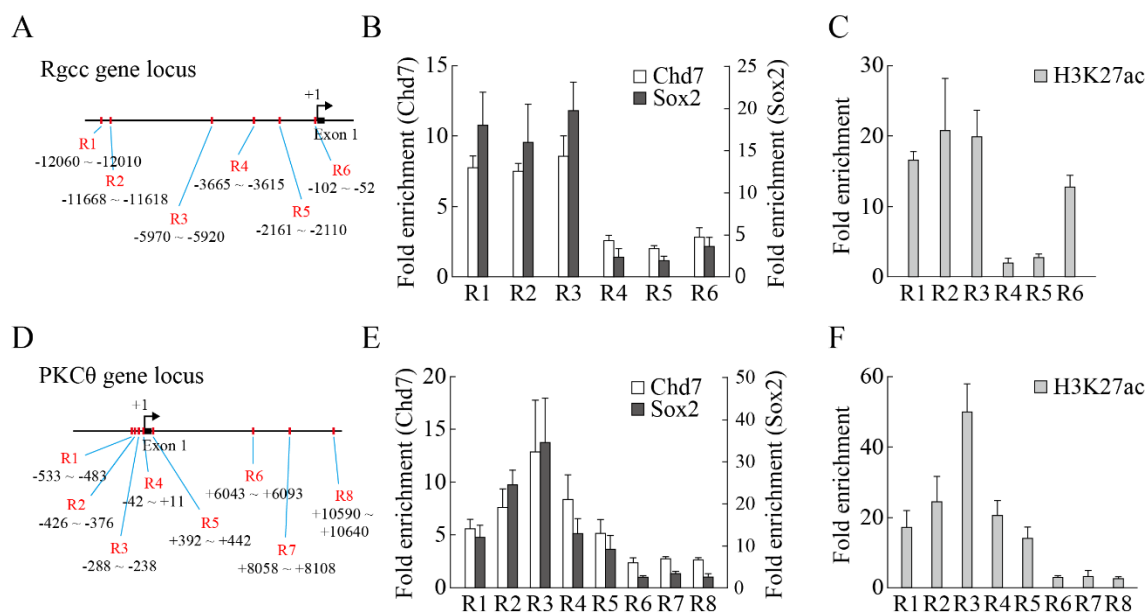


図 32 Rgcc 及び PKCθ は Chd7 - Sox2 複合体の直接の標的分子である

A-F: 増殖条件の培養 OPC で抗 Chd7 抗体及び抗 Sox2 抗体 (B, E)、抗 H3K27ac 抗体 (C, F)を用いたクロマチン免疫沈降 (ChIP)解析を行った。Rgcc gene locus の 6 領域 (R1-R6) (A)及び PKCθ gene locus の 8 領域 (R1-R8) (D)で検討した。データ値は control の Immunoglobulin G (IgG)で補正した fold enrichment で表した。平均値 ± 標準偏差 (s.d.) で示す (n = 3-6)。

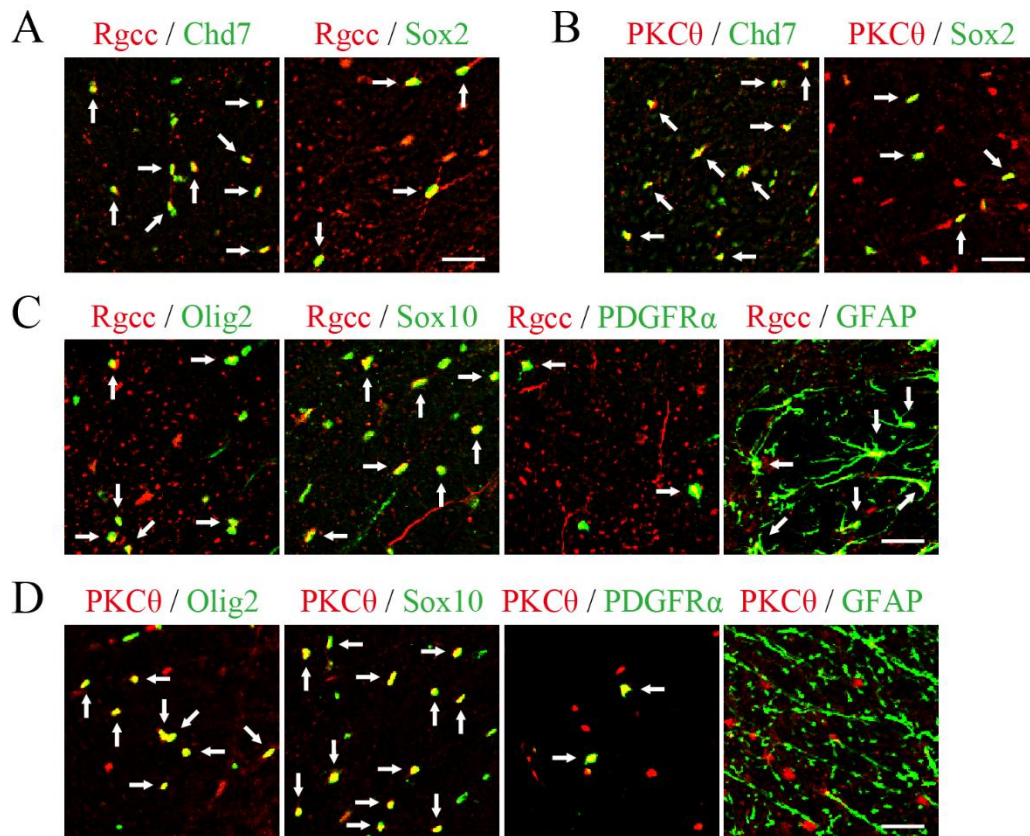


図 33 マウス成体正常脊髄で Rgcc 及び PKCθ は Chd7、Sox2 と共発現し、OPC 及び OL 系譜細胞に発現する

A: 成体正常脊髄での Rgcc と Chd7 または Sox2 との免疫組織化学 2 重染色像。

B: 成体正常脊髄での PKCθ と Chd7 または Sox2 との免疫組織化学 2 重染色像。

C: 成体正常脊髄での Rgcc と Olig2、Sox10、PDGFRα-GFP、GFAP との免疫組織化学 2 重染色像。

D: 成体正常脊髄での PKCθ と Olig2、Sox10、PDGFRα-GFP、GFAP との免疫組織化学 2 重染色像。

矢印は 2 重陽性細胞を示す。Scale bars; 50 μm (A-D)。

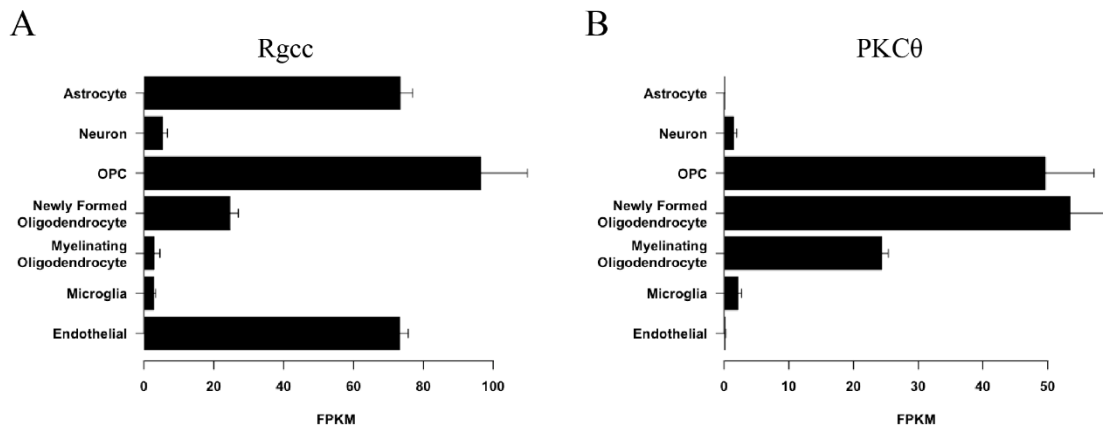


図 34 Rgcc 及び PKCθ は OL 系譜細胞に発現する

中枢神経系組織に見られる各細胞種 (アストロサイト [astrocyte]、ニューロン [neuron]、OPC、新生 OL [newly formed oligodendrocyte]、髄鞘形成 OL [myelinating oligodendrocyte]、ミクログリア [microglia]、血管内皮細胞 [endothelial])における Rgcc (A)及び PKCθ (B)遺伝子発現量 (fragments per kilobase of exon per million reads mapped、FPKM)を示す (文献番号 [124] Zhang *et al.*, 2014 公開データベース [https://web.stanford.edu/group/barres_lab/brain_maseq.html]より検索し、抜粋)。

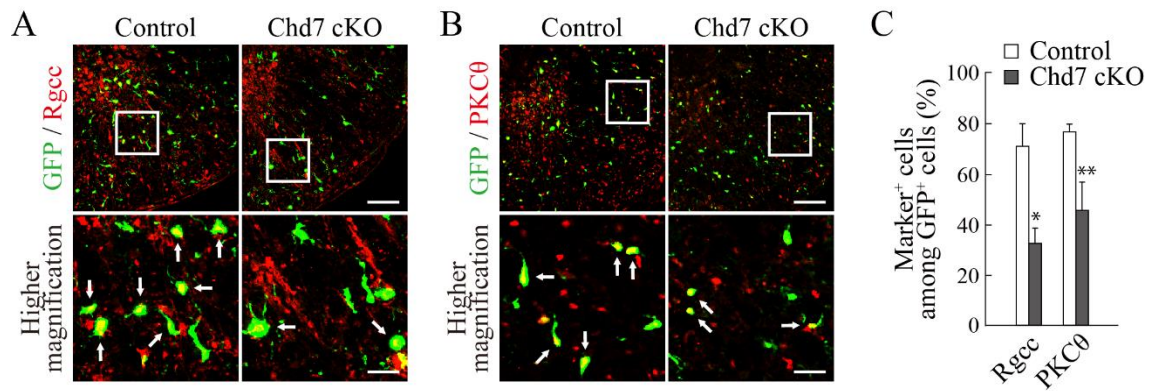


図 35 Chd7 は脊髄損傷後の Rgcc 及び PKCθ の発現誘導に必要である

A, B : Control マウス及び *Chd7* cKO マウスの 3 dpi 損傷脊髄での Rgcc (A)、PKCθ (B) と GFP との免疫組織化学 2 重染色像。写真上の弱拡大像のボックス範囲を下の強拡大像に示す。矢印は 2 重陽性細胞を示す。Scale bars; 弱拡大像: 100 μm、強拡大像: 25 μm。

C : 写真 A, B の GFP⁺ 細胞における各マーカー陽性細胞の割合を定量。平均値 ± 標準偏差 (s.d.) で示す (n = 3 / group)。* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$ 。

本研究結果の発現パターンと一致していた。さらに 3 dpi 損傷脊髄の GFP⁺ 細胞における Rgcc⁺ 細胞と PKC θ ⁺ 細胞の割合が *Chd7* cKO マウスでは Control よりも減少していた (図 35A - C)。以上から *in vivo* において *Chd7* は Rgcc や PKC θ の発現誘導に必要であることが示された。

5-8. Rgcc 及び PKC θ は OPC 増殖と系譜維持を制御する

次に *Chd7* や *Sox2* と同様に Rgcc や PKC θ が OPC 増殖や系譜維持を制御しているかについて調べるため、培養 OPC でそれぞれの shRNA によるノックダウン実験を行った。定量 RT-PCR により Rgcc、PKC θ のノックダウンが確認できた (図 36A)。培養 OPC で Rgcc、PKC θ ノックダウンにより、EdU⁺ または Ki67⁺ 増殖細胞が減少し (図 36B, C)、また PDGFR α ⁺ OPC や Sox10⁺ OL 系譜細胞も減少していた (図 37A, B) が、一方で OPC 生存には影響がなかった (図 37C, D)。以上から Rgcc と PKC θ は OPC 増殖や系譜維持に必要であることがわかった。

次に培養 OPC で Rgcc 及び PKC θ の過剰発現実験を行った。定量 RT-PCR により Rgcc、PKC θ の過剰発現が確認できた (図 38A, B)。培養 OPC で Rgcc 及び PKC θ の過剰発現により EdU⁺ または Ki67⁺ 増殖細胞が増加し (図 38C)、Rgcc 及び

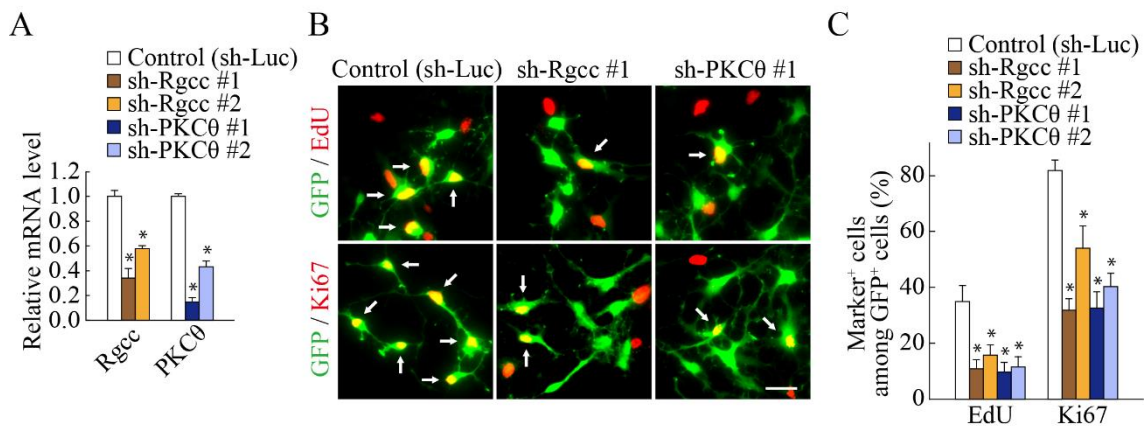


図 36 Rgcc 及び PKCθ は OPC 増殖に必要である

A: 培養 OPC に control shRNA (sh-Luc)、Rgcc shRNA (sh-Rgcc #1、2) または PKCθ shRNA (sh-PKCθ #1、2) 発現レトロウイルスを感染し、増殖条件で培養。感染 3 日後に回収し、定量 RT-PCR でそれぞれの shRNA のノックダウン効率を解析。Control 値で補正した値を示す。

B: 培養 OPC に control、sh-Rgcc #1、2 または sh-PKCθ #1、2 発現レトロウイルスを感染、増殖条件で培養。感染 3 日後に 2 時間 EdU で標識し、GFP と EdU 及び Ki67 を免疫細胞化学 2 重染色した。矢印は 2 重陽性細胞を示す。Scale bar; 25 μm。

C: 写真 B の GFP⁺ 細胞におけるそれぞれのマーカー陽性細胞の割合を定量。平均値 ± 標準偏差 (s.d.) で示す (n = 3 / group)。* $p < 0.01$ 。

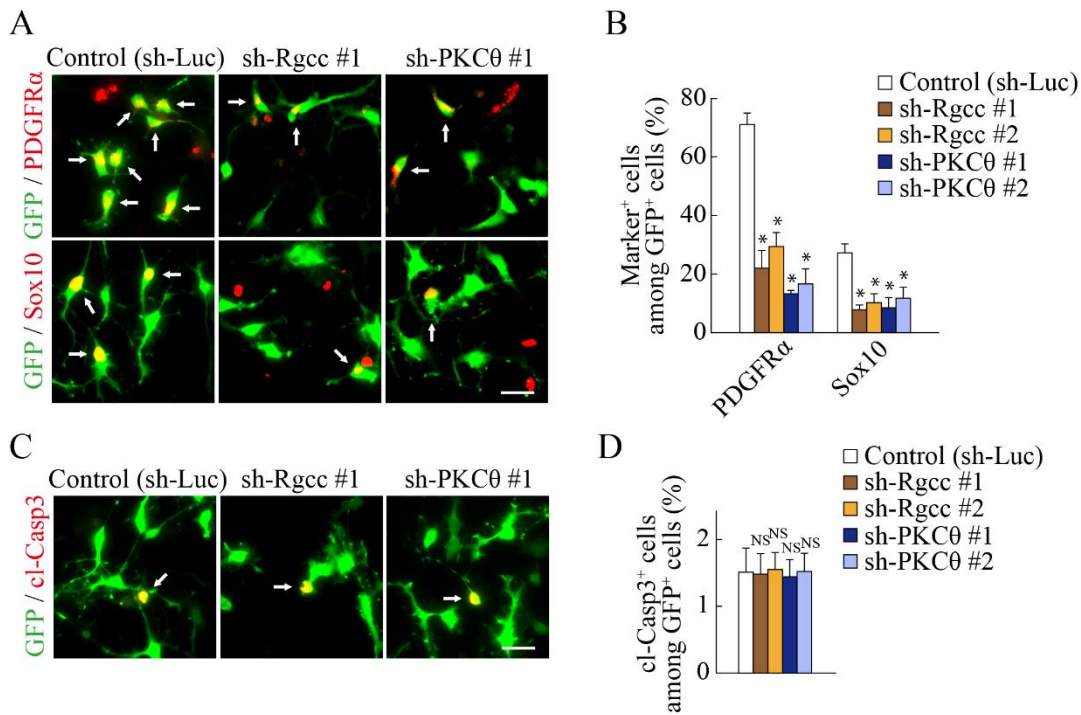


図 37 Rgcc 及び PKCθ は OPC 系譜維持に必要である

A, C: 培養 OPC に control、sh-Rgcc #1、2 または sh-PKCθ #1、2 発現レトロウイルスを感染、増殖条件で培養。感染 3 日後に PDGFRα 及び Sox10 (A)、cleaved caspase 3 (cl-Casp3) (C)をそれぞれ免疫細胞化学 2 重染色した。矢印は 2 重陽性細胞を示す。Scale bars; 25 μm。

B, D: 写真 A, C の GFP⁺ 細胞におけるそれぞれのマーカー陽性細胞の割合を定量。平均値 ± 標準偏差 (s.d.) で示す (n = 3 / group)。* $p < 0.01$ 。NS: non-significant。

PKC θ はOPC増殖を促進することがわかった。またPKC θ 過剰発現ではPDGFR α ⁺ OPCやSox10⁺OL系譜細胞が有意に増加し、Rgcc過剰発現では有意な変化は認められなかった(図38D)。さらにChd7ノックアウトによるOPC増殖抑制やOPC、OL系譜細胞の減少効果を、RgccやPKC θ 単独の過剰発現で部分的にレスキューし、さらにRgcc、PKC θ 双方の過剰発現により完全にレスキューされた(図38C, D)。以上より、Rgcc、PKC θ はChd7 - Sox2複合体の下流分子として働き、OPC増殖や系譜維持に中心的な役割を果たしていることが示された。

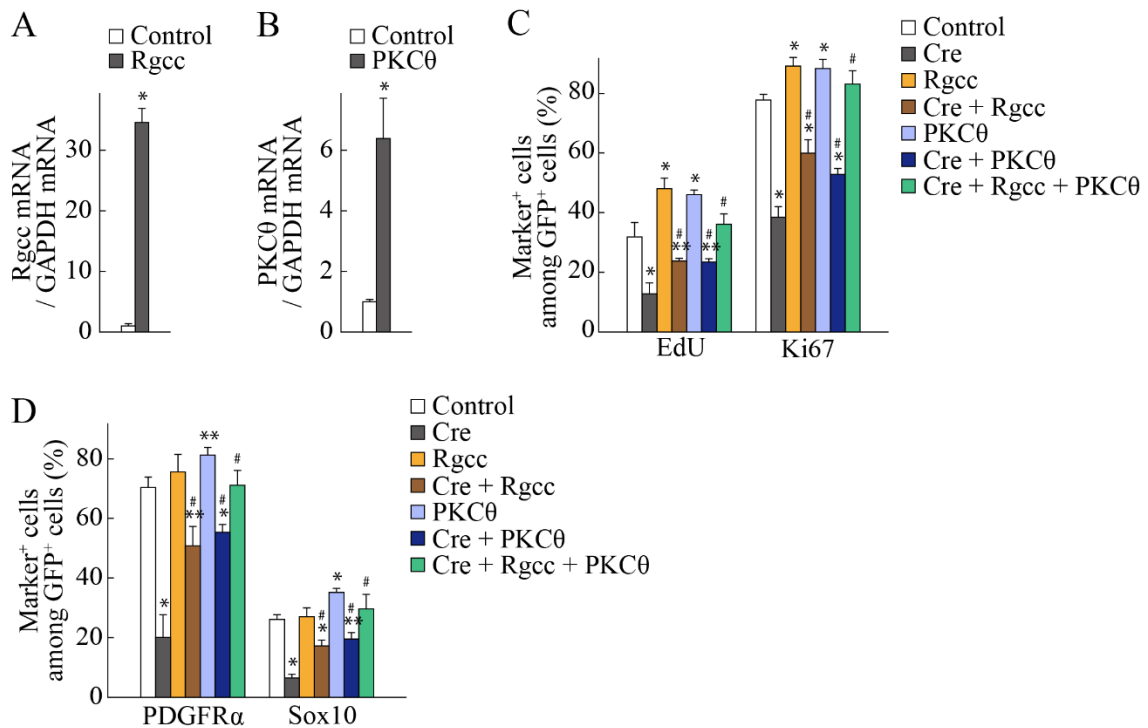


図 38 Rgcc、PKCθ の過剰発現は Chd7 ノックアウトによる OPC 増殖抑制や OPC、OL 系譜細胞の減少効果をレスキューする

A, B : 培養 OPC に GFP のみ (control)、GFP + Rgcc、GFP + PKCθ 発現レトロウイルスを感染し、増殖条件で培養。感染 3 時間後に回収、定量 RT-PCR で Rgcc (A)、PKCθ (B) mRNA 発現を解析。Control 値で補正した値を示す。平均値 ± 標準偏差 (s.d.) で示す (n = 3 / group)。* $p < 0.01$ 。

C, D : 培養 OPC に control、Cre、Rgcc、Cre + Rgcc、PKCθ、Cre + PKCθ、Cre + Rgcc + PKCθ 発現レトロウイルスを感染し、増殖条件で培養。感染 3 日後に 2 時間 EdU で標識し、GFP と EdU 及び Ki67 (C)、PDGFRα 及び Sox10 (D)をそれぞれ免疫細胞化学 2 重染色した。GFP⁺ 細胞におけるそれぞれのマーカー陽性細胞の割合を定量 (C, D)。平均値 ± 標準偏差 (s.d.) で示す (n = 3 / group)。* $p < 0.01$ 、** $p < 0.05$ (control に対する Student's *t* 検定)。[#] $p < 0.01$ (Cre に対する Student's *t* 検定)。

6. 考察

脊髄損傷後に内在性の OPC が活性化、増殖し、成熟 OL への分化を経て、脱髄した神経軸索を再髄鞘化することで、損傷後神経機能が回復する。この再髄鞘化の過程において、OPC 活性化の制御メカニズム、特にエピジェネティックな制御に関しては、十分に明らかにされていなかった。本研究結果から、クロマチンリモデリング因子 Chd7 が脊髄損傷後の OPC 増殖や系譜維持を制御していることが示された。さらに Chd7 は OPC 活性化に重要な転写因子である Sox2 と複合体を形成し、*Rgcc* や *PKCθ* 遺伝子のエンハンサーやプロモーター領域などの発現制御領域に直接結合することでその発現を誘導し、OPC 活性化に働いていることが示された (図 39)。

本研究実施中の 2016 年に、OL 系譜細胞における Chd7 の役割に関する先行研究として、Chd7 が OL 分化や髄鞘化、損傷後の再髄鞘化を制御することが報告された [101]。本研究においても *in vivo* (図 18A–C、図 19A, B)、*in vitro* (図 25A–C)の双方の検討で、OPC 特異的な Chd7 ノックアウトにより、OL 分化が減少することを確認している。一方で本研究結果と異なり、先行研究では OPC 特異的 Chd7 ノックアウトマウス (*Olig1-Cre;Chd7^{flx/flx}* マウス)による生後初期の脳梁での検討で、OPC 発生や増殖への影響が見られず、リゾレシチン誘導脱髄モデ

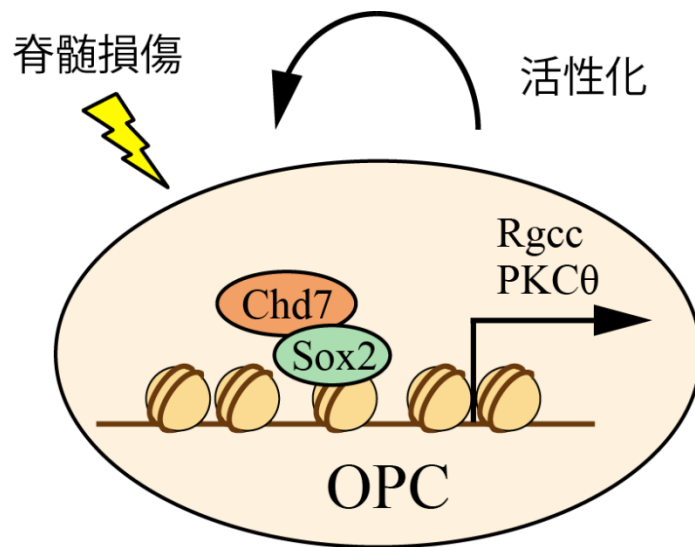


図 39 Chd7 による OPC 活性化メカニズムの模式図

脊髄損傷に反応して活性化 OPC での Chd7 及び Sox2 の発現が上昇、複合体を形成し、Rgcc 及び PKCθ 発現を誘導することで OPC 増殖、系譜維持を制御する。

ルによる解析でも、損傷部での OPC 数に変化が見られなかったと報告している [101]。先行研究と本研究が異なる結果となった理由として以下の可能性が考慮された。まずひとつの可能性として、異なる Cre line マウスの使用 (本研究では *PDGFRa-CreER* マウスを使用 (図 8)し、先行研究では *Olig1-Cre* マウスを使用していた)による結果の相違が考えられる。本研究で用いた *PDGFRa-CreER* マウスでは、タモキシフェン投与により時期特異的に速やかな *Chd7* ノックアウトが可能であるが、*Olig1-Cre* マウスでは OPC 発生初期 (E12.5)から Cre 酵素による組み換えを認める [125]ため、発生期から長期にわたる *Chd7* ノックアウトにより、別の分子 (例えば同じ CHD ファミリー分子の *Chd8* など)による代償作用がかかり、結果として OPC 増殖が抑制される表現型が見られなかった可能性が推測される。また別の理由の可能性として、異なる損傷モデルの使用 (本研究では圧挫脊髄損傷モデル、先行研究ではリゾレシチンによる局所脱髄モデル)による結果の相違が考慮される。OPC とは異なるが、脊髄中心管周囲に存在し、多分化能を有する上皮細胞は、圧挫脊髄損傷モデルでは反応性に増殖するが、リゾレシチン誘導脱髄モデルや実験的脳脊髄炎モデルなどでは増殖しないという報告 [126]があり、損傷モデルの違いで内在性の幹細胞や前駆細胞の増殖が異なる挙動を示す可能性が示唆されている。本研究と先行研究との OPC 増殖における解

析結果の相違も、用いた損傷モデルの違いから導かれた可能性も推察される。

別のクロマチンリモデリング因子である **Brg1** は、様々な OL 系譜の **Cre line** マウスを用いて機能解析がなされており、OL 発生の様々な段階に関与していることが報告されている [95-97]。先行研究と本研究結果から、**Chd7** が OL 分化のみならず OPC 増殖や系譜維持にも関与することから、**Brg1** と同じように **Chd7** が OL 系譜の様々な段階で異なる機能を果たしていることが示唆された。

Chd7 はパイオニア転写因子 (凝集したクロマチンに結合し、弛緩させ他の転写因子やエピジェネティック因子をリクルートする転写因子)と複合体を形成し、標的遺伝子の発現制御領域にリクルートされることが知られている [99]。他のクロマチンリモデリング因子では **Brg1** が **Olig2** と結合し、標的遺伝子のエンハンサー領域にリクルートされ、OL 分化を制御することが報告されている [97]。また OL 分化での **Chd7** の役割に関する先行研究 [101]においても **Olig2** が **Chd7** を標的遺伝子の発現制御領域にリクルートするパイオニア転写因子として働くと考えられており、引き続いて転写因子の **Sox10** がリクルートされることで **Chd7** と **Sox10** が協調して OL 分化や髄鞘化を制御していると報告している。本研究結果から、活性化 OPC において **Chd7** と **Sox2** が複合体を形成し、標的遺伝子である *Rgcc* や *PKCθ* などの発現制御領域に結合することが示され (図 32)、

Olig2 のように Sox2 も Chd7 を標的遺伝子の発現制御領域にリクルートするパイオニア転写因子として働く可能性が考えられた。Sox2 は ES 細胞のニューロン分化関連遺伝子のエンハンサー領域にあらかじめ結合しており、ニューロン発生のパイオニア転写因子として働くことが知られている [127, 128]。また序論に述べたように、NPC において Chd7 と Sox2 は複合体を形成して、標的遺伝子発現を制御することが報告されている [114]。OPC における Sox2 のパイオニア転写因子としての働きに関しては今後さらなる検討を要するが、少なくとも過去の研究 [71, 111-114] 及び本研究結果から、Chd7 - Sox2 複合体は NPC 及び OPC 増殖制御に重要な役割を果たしていることが考えられる。

本研究結果から、OPC では Sox10 と Sox2 は Chd7 と共発現していた (図 7A, B, 図 10A, D, 図 11A, 図 12A, C)。このことから OPC では、Chd7 - Sox2 複合体による OPC 増殖が主に働き、一方で Chd7 - Sox10 複合体による OL 分化は抑制されている可能性が考えられた。OPC で Sox10 が発現しているにも関わらず、Chd7 と複合体を形成しない理由として以下のことが考慮された。グリア細胞発生制御を担う転写因子である NF1A は、OPC で発現し、Sox10 と直接結合することで、Sox10 による髄鞘形成関連遺伝子発現を抑制することが知られている [129]。実際に成体正常脊髄において PDGFR α ⁺ OPC で NF1A と Sox10 が共発現している

ことを確認した (図 11C)。また他の転写因子 Hes5、Sox5、Sox6 が OPC で発現しており、Sox10 による OL 分化関連遺伝子発現を抑制することが言われている [130, 131]。以上から、OPC ではこれら転写因子による Sox10 抑制により、Chd7 - Sox10 複合体による OL 分化が抑制され、Chd7 - Sox2 複合体による OPC 増殖が働く可能性が考えられた。

本研究の知見から、Rgcc 及び PKC θ が OPC 活性化における Chd7 の直接の標的分子として新たに同定された (図 32)。Rgcc は平滑筋細胞で Cdk1 活性化を介して、細胞周期進行を促進することが報告されている [132]。さらに Rgcc は様々な腫瘍細胞で発現が高く [132]、腫瘍細胞の増殖促進に働くことが示唆されている。PKC θ は T 細胞でサイクリン D3 の活性化や p27^{Kip1} 抑制に働き、T 細胞の活性化や増殖を促進することが報告されている [117]。また PKC θ は GIST 細胞や乳癌細胞においても p21^{Cip1} や p27^{Kip1} を抑制することで細胞増殖を促進することが知られている [122]。このように Rgcc や PKC θ は神経系細胞以外の様々な細胞種で細胞増殖促進に働いており、さらに Cdk2 や p27^{Kip1} は OPC 増殖に関与する細胞周期関連分子である [45, 52, 60] ことから、Rgcc や PKC θ がこれら細胞周期関連分子を介して OPC 増殖に働く可能性が考えられた。今後 Rgcc や PKC θ の下流分子のさらなる解析により、OPC 増殖制御メカニズムの理解がより深ま

るものと考えられる。

本研究における Chd7 による OPC 活性化メカニズムの解明は、脊髄損傷や、多発性硬化症などの脱髄性疾患以外に中枢神経系の腫瘍性疾患の病態への関与も考慮される。OL を含むグリア細胞から発生する脳腫瘍は神経膠腫 (glioma) と呼ばれ、その中で最も悪性度が高い腫瘍 (WHO grade IV) が、神経膠芽腫 (glioblastoma multiforme, GBM) である。GBM の発生率は欧米において 10 万人当たり 3 人と稀であるが、全神経膠腫の中では最も多く、その 50% 以上を占めている [133]。前述のように、最も悪性度が高く、1 年生存率は 17 ~ 30%、2 年生存率はわずかに 3 ~ 5% 程度と言われている [133]。近年 GBM の遺伝子変異発現解析から、ヒト GBM は proneural type、neural type、classical type、mesenchymal type の 4 つの異なるサブタイプに分類されている [134]。その中の proneural type では OPC と類似した遺伝子発現パターンを示すことが報告され、またマウスグリオーマ細胞の起源は OPC と考えられている [134-136] ことから、OPC 増殖メカニズムと GBM 形成メカニズムが類似する可能性が考えられた。実際に、proneural type に特徴的な変異遺伝子のひとつに Sox2 があり、GBM でその発現が亢進し、グリオーマ幹細胞の増殖や維持、腫瘍形成に関与することが知られている [137]。また proneural type に特徴的な変異遺伝子の中に、Sox2 と同様に Chd7 が含まれ

ており [134]、マウスグリオーマ細胞では Sox2、Chd7、Rgcc、PKCθ の発現が亢進していることが報告されている [135, 138]。さらに GBM 細胞における Sox2 ノックダウンにより、Rgcc や PKCθ の発現が減少するという報告 [139] もあり、これら過去の報告から Chd7、Rgcc、PKCθ は脊髄損傷のみならず GBM に対する新たな治療標的分子となる可能性も考えられた。

前述の通り、CHARGE 症候群は Chd7 のヘテロ接合体変異が原因で発症する先天性奇形症候群である [99, 100]。先行研究において、Chd7 が OL 分化や髄鞘化に関与することが見出され、それが CHARGE 症候群患者で見られる白質形成異常 (図 4B) の分子メカニズム解明の一助となったことが報告されている [101]。本研究結果はこの先行研究の成果をさらに支持するものであると考えられる。

さらに CHARGE 症候群患者では前述の 5 徴候や脳神経系の異常だけでなく、T 細胞の減少及び機能異常により、免疫不全を認めることがあり、易感染性から死亡に至る症例も報告されている [140]。しかしながら、Chd7 変異と T 細胞減少、機能異常とを関連付ける分子メカニズムは明らかにされていない。本研究で Chd7 の下流分子として新たに同定された PKCθ は、もともと T 細胞の増殖や活性化に関与することが知られており [122]、このことから Chd7 欠損による PKCθ 不活化が CHARGE 症候群患者での免疫不全に関与している可能性が考え

られた。今後 CHARGE 症候群患者で見られる T 細胞減少、機能異常における PKC θ の関与をさらに解析することで、免疫不全による易感染性を予防する新たな治療につながる可能性があると考えられる。

脊髄損傷治療において OPC をターゲットとしたものでは、細胞移植での利用が過去に報告されており、ラット脊髄損傷モデルでのヒト ES 細胞由来 OPC 移植により再髄鞘化促進による運動機能回復を示したことが報告されている [141]。さらに米国の Geron 社によるヒト ES 細胞由来 OPC である GRNOPC1 細胞を用いた亜急性脊髄損傷患者を対象とした世界初の臨床治験が 2010 年に承認され、同年スタートしたが、その後経営上の問題から 2011 年に中止されている [142]。また再髄鞘化促進の創薬研究においては、多発性硬化症などの脱髄性疾患治療目的に、既存の承認薬剤の利用 (drug repositioning) のためのスクリーニング研究などが行われている [143]。本研究による知見から、OPC 活性化を制御する新規分子として同定された Chd7、Rgcc、PKC θ は、脊髄損傷後の再髄鞘化を促進する新たな創薬標的分子となる可能性が考えられた。また脊髄損傷後に OPC は再髄鞘化をもたらす新生オリゴデンドロサイトの供給源として神経機能回復に寄与する反面、反応性アストロサイト同様にグリア瘢痕形成を担い、さらに損傷後の二次炎症にも関与するなど機能回復にとって有害な側面も併せ持

つことが知られている [54-56]。以上のことから、脊髄損傷後に適切なタイミングで OPC 活性化を制御することで、より効果的な神経機能回復につながる可能性があると考えられる。具体的な治療戦略としては、脊髄損傷後の炎症による二次損傷が落ち着いた亜急性期のタイミングで上記の候補分子促進剤による OPC 活性化、成熟 OL への分化及び再髄鞘化促進により神経機能回復を効率よく高める方法などが考慮される。今後 Chd7、Rgcc 及び PKCθ の脊髄損傷治療での臨床応用に向けた創薬研究をさらに推し進め、脊髄損傷患者にとって有効な脊髄再生治療につなげていくことが重要である。

7. 結語

本研究により、クロマチンリモデリング因子 Chd7 は Sox2 と協調して、Rgcc 及び PKCθ 遺伝子発現を誘導し、脊髄損傷後の OPC 活性化を制御することがわかった。Chd7、Rgcc 及び PKCθ は OPC 活性化制御による脊髄損傷後機能回復をもたらす新規治療標的分子となる可能性がある。

8. 謝辞

本論文の作成に当たり、次の先生方に感謝いたします。基礎研究を始める機会を与えてくださった東京大学整形外科学教室 田中栄教授に深く感謝いたします。本研究の立案及び遂行にあたり、多くのご助言とご指導を賜りました国立障害者リハビリテーションセンター障害者健康増進・運動医科学支援センター 緒方徹センター長に厚く感謝いたします。さらに実験遂行の詳細なご指導から、論文作成に当たり、多大なご指導とご高閲を賜りました国立障害者リハビリテーションセンター運動機能障害部分子病態研究室 長尾元史室長に深く感謝いたします。また本研究遂行にあたり、ご助言を賜りました東京薬科大学生命科学部分子神経科学教室 山内淳司教授に厚く感謝いたします。また研究に関する数多くの有難いお言葉を賜りました国立障害者リハビリテーションセンター運動機能障害部 澤田泰宏部長に謹んで感謝いたします。

本研究の実験をサポート頂きました市原克則先生、柳泳在先生、村瀬修平先生、前川貴郊先生を含め、研究室の同僚の先生方に感謝いたします。実験や動物メンテナンスをサポートして頂いた久米尚子さんに感謝いたします。

最後に、家事に育児に仕事に頑張りながら、いつも笑顔で支えてくれた妻 凌に感謝いたします。

9. 引用文献

1. Shingu H, Ohama M, Ikata T, Katoh S, Akatsu T: A nationwide epidemiological survey of spinal cord injuries in Japan from January 1990 to December 1992. *Paraplegia* 1995, 33(4):183-188.
2. Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF, Holford TR, Young W, Baskin DS, Eisenberg HM, Flamm E, Leo-Summers L, Maroon J, Marshall LF, Perot PL, Piepmeier J, Sonntag VKH, Wagner FC, Wilberger JE, Richardson H: A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury. Results of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study. *N Engl J Med* 1990, 322(20):1405-1411.
3. Ito Y, Sugimoto Y, Tomioka M, Kai N, Tanaka M: Does high dose methylprednisolone sodium succinate really improve neurological status in patient with acute cervical cord injury?: a prospective study about neurological recovery and early complications. *Spine (Phila Pa 1976)* 2009, 34(20):2121-2124.
4. Matsumoto T, Tamaki T, Kawakami M, Yoshida M, Ando M, Yamada H: Early complications of high-dose methylprednisolone sodium succinate treatment in

- the follow-up of acute cervical spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976)* 2001, 26(4):426-430.
5. Pointillart V, Petitjean ME, Wiart L, Vital JM, Lassie P, Thicoipe M, Dabadie P: Pharmacological therapy of spinal cord injury during the acute phase. *Spinal Cord* 2000, 38(2):71-76.
 6. Hurlbert RJ, Hadley MN, Walters BC, Aarabi B, Dhall SS, Gelb DE, Rozzelle CJ, Ryken TC, Theodore N: Pharmacological therapy for acute spinal cord injury. *Neurosurgery* 2013, 72 Suppl 2:93-105.
 7. Beattie MS, Farooqui AA, Bresnahan JC: Review of current evidence for apoptosis after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 2000, 17(10):915-925.
 8. Sekhon LH, Fehlings MG: Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976)* 2001, 26(24 Suppl):S2-12.
 9. Geisler FH, Coleman WP, Grieco G, Poonian D, Sygen Study G: The Sygen multicenter acute spinal cord injury study. *Spine (Phila Pa 1976)* 2001, 26(24 Suppl):S87-98.
 10. Hashimoto T, Fukuda N: Effect of thyrotropin-releasing hormone on the neurologic impairment in rats with spinal cord injury: treatment starting 24 h

and 7 days after injury. *Eur J Pharmacol* 1991, 203(1):25-32.

11. Pitts LH, Ross A, Chase GA, Faden AI: Treatment with thyrotropin-releasing hormone (TRH) in patients with traumatic spinal cord injuries. *J Neurotrauma* 1995, 12(3):235-243.
12. Casha S, Zygun D, McGowan MD, Bains I, Yong VW, Hurlbert RJ: Results of a phase II placebo-controlled randomized trial of minocycline in acute spinal cord injury. *Brain* 2012, 135(Pt 4):1224-1236.
13. Wells JE, Hurlbert RJ, Fehlings MG, Yong VW: Neuroprotection by minocycline facilitates significant recovery from spinal cord injury in mice. *Brain* 2003, 126(Pt 7):1628-1637.
14. Nagoshi N, Nakashima H, Fehlings MG: Riluzole as a neuroprotective drug for spinal cord injury: from bench to bedside. *Molecules* 2015, 20(5):7775-7789.
15. Huang H, Fan S, Ji X, Zhang Y, Bao F, Zhang G: Recombinant human erythropoietin protects against experimental spinal cord trauma injury by regulating expression of the proteins MKP-1 and p-ERK. *J Int Med Res* 2009, 37(2):511-519.
16. Inada T, Takahashi H, Yamazaki M, Okawa A, Sakuma T, Kato K, Hashimoto M,

- Hayashi K, Furuya T, Fujiyoshi T, Kawabe J, Mannoji C, Miyashita T, Kadota R, Someya Y, Ikeda O, Hashimoto M, Suda K, Kajino T, Ueda H, Ito Y, Ueta T, Hanaoka H, Takahashi K, Koda M: Multicenter prospective nonrandomized controlled clinical trial to prove neurotherapeutic effects of granulocyte colony-stimulating factor for acute spinal cord injury: analyses of follow-up cases after at least 1 year. *Spine (Phila Pa 1976)* 2014, 39(3):213-219.
17. Kitamura K, Fujiyoshi K, Yamane J, Toyota F, Hikishima K, Nomura T, Funakoshi H, Nakamura T, Aoki M, Toyama Y, Okano H, Nakamura M: Human hepatocyte growth factor promotes functional recovery in primates after spinal cord injury. *PLoS One* 2011, 6(11):e27706.
18. Rabchevsky AG, Fugaccia I, Turner AF, Blades DA, Mattson MP, Scheff SW: Basic fibroblast growth factor (bFGF) enhances functional recovery following severe spinal cord injury to the rat. *Exp Neurol* 2000, 164(2):280-291.
19. Tetzlaff W, Okon EB, Karimi-Abdolrezaee S, Hill CE, Sparling JS, Plemel JR, Plunet WT, Tsai EC, Baptiste D, Smithson LJ, Kawaja MD, Fehlings MG, Kwon BK: A systematic review of cellular transplantation therapies for spinal cord injury. *J Neurotrauma* 2011, 28(8):1611-1682.

20. Thuret S, Moon LD, Gage FH: Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci* 2006, 7(8):628-643.
21. Takahashi K, Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006, 126(4):663-676.
22. McDonald JW, Liu XZ, Qu Y, Liu S, Mickey SK, Turetsky D, Gottlieb DI, Choi DW: Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat Med* 1999, 5(12):1410-1412.
23. Ogawa Y, Sawamoto K, Miyata T, Miyao S, Watanabe M, Nakamura M, Bregman BS, Koike M, Uchiyama Y, Toyama Y, Okano H: Transplantation of in vitro-expanded fetal neural progenitor cells results in neurogenesis and functional recovery after spinal cord contusion injury in adult rats. *J Neurosci Res* 2002, 69(6):925-933.
24. Tsuji O, Miura K, Okada Y, Fujiyoshi K, Mukaino M, Nagoshi N, Kitamura K, Kumagai G, Nishino M, Tomisato S, Higashi H, Nagai T, Katoh H, Kohda K, Matsuzaki Y, Yuzaki M, Ikeda E, Toyama Y, Nakamura M, Yamanaka S, Okano H: Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent

- stem cells for spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, 107(28):12704-12709.
25. Lima C, Pratas-Vital J, Escada P, Hasse-Ferreira A, Capucho C, Peduzzi JD: Olfactory mucosa autografts in human spinal cord injury: a pilot clinical study. *J Spinal Cord Med* 2006, 29(3):191-203; discussion 204-196.
26. Ramon-Cueto A, Cordero MI, Santos-Benito FF, Avila J: Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia. *Neuron* 2000, 25(2):425-435.
27. Ohta M, Suzuki Y, Noda T, Ejiri Y, Dezawa M, Kataoka K, Chou H, Ishikawa N, Matsumoto N, Iwashita Y, Mizuta E, Kuno S, Ide C: Bone marrow stromal cells infused into the cerebrospinal fluid promote functional recovery of the injured rat spinal cord with reduced cavity formation. *Exp Neurol* 2004, 187(2):266-278.
28. Urdzikova L, Jendelova P, Glogarova K, Burian M, Hajek M, Sykova E: Transplantation of bone marrow stem cells as well as mobilization by granulocyte-colony stimulating factor promotes recovery after spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma* 2006, 23(9):1379-1391.

29. Takami T, Oudega M, Bates ML, Wood PM, Kleitman N, Bunge MB: Schwann cell but not olfactory ensheathing glia transplants improve hindlimb locomotor performance in the moderately contused adult rat thoracic spinal cord. *J Neurosci* 2002, 22(15):6670-6681.
30. Rapalino O, Lazarov-Spiegler O, Agranov E, Velan GJ, Yoles E, Fraidakis M, Solomon A, Gepstein R, Katz A, Belkin M, Hadani M, Schwartz M: Implantation of stimulated homologous macrophages results in partial recovery of paraplegic rats. *Nat Med* 1998, 4(7):814-821.
31. Ben-David U, Benvenisty N: The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nat Rev Cancer* 2011, 11(4):268-277.
32. Miura K, Okada Y, Aoi T, Okada A, Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Ohnuki M, Ogawa D, Ikeda E, Okano H, Yamanaka S: Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat Biotechnol* 2009, 27(8):743-745.
33. Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A: Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 1999, 97(6):703-716.

34. Gage FH: Mammalian neural stem cells. *Science* 2000, 287(5457):1433-1438.
35. Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J: Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 1999, 96(1):25-34.
36. Lindvall O, Kokaia Z, Martinez-Serrano A: Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders-how to make it work. *Nat Med* 2004, 10 Suppl:S42-50.
37. Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto S, Hatano O, Kawahara N, Tamura A, Kirino T, Nakafuku M: Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* 2002, 110(4):429-441.
38. Okano H: Neural stem cells and strategies for the regeneration of the central nervous system. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2010, 86(4):438-450.
39. Simons M, Nave KA: Oligodendrocytes: Myelination and Axonal Support. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015, 8(1):a020479.
40. Hart IK, Richardson WD, Heldin CH, Westermarck B, Raff MC: PDGF receptors on cells of the oligodendrocyte-type-2 astrocyte (O-2A) cell lineage.

- Development 1989, 105(3):595-603.
41. Nishiyama A, Lin XH, Giese N, Heldin CH, Stallcup WB: Co-localization of NG2 proteoglycan and PDGF alpha-receptor on O2A progenitor cells in the developing rat brain. *J Neurosci Res* 1996, 43(3):299-314.
 42. Stallcup WB, Beasley L: Bipotential glial precursor cells of the optic nerve express the NG2 proteoglycan. *J Neurosci* 1987, 7(9):2737-2744.
 43. Bergles DE, Richardson WD: Oligodendrocyte Development and Plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015, 8(2):a020453.
 44. Fancy SP, Chan JR, Baranzini SE, Franklin RJ, Rowitch DH: Myelin regeneration: a recapitulation of development? *Annu Rev Neurosci* 2011, 34:21-43.
 45. Gallo V, Deneen B: Glial development: the crossroads of regeneration and repair in the CNS. *Neuron* 2014, 83(2):283-308.
 46. Dawson MR, Polito A, Levine JM, Reynolds R: NG2-expressing glial progenitor cells: an abundant and widespread population of cycling cells in the adult rat CNS. *Mol Cell Neurosci* 2003, 24(2):476-488.
 47. Kang SH, Fukaya M, Yang JK, Rothstein JD, Bergles DE: NG2+ CNS glial

- progenitors remain committed to the oligodendrocyte lineage in postnatal life and following neurodegeneration. *Neuron* 2010, 68(4):668-681.
48. Rivers LE, Young KM, Rizzi M, Jamen F, Psachoulia K, Wade A, Kessaris N, Richardson WD: PDGFRA/NG2 glia generate myelinating oligodendrocytes and piriform projection neurons in adult mice. *Nat Neurosci* 2008, 11(12):1392-1401.
 49. Young KM, Psachoulia K, Tripathi RB, Dunn SJ, Cossell L, Attwell D, Tohyama K, Richardson WD: Oligodendrocyte dynamics in the healthy adult CNS: evidence for myelin remodeling. *Neuron* 2013, 77(5):873-885.
 50. Zawadzka M, Rivers LE, Fancy SP, Zhao C, Tripathi R, Jamen F, Young K, Goncharevich A, Pohl H, Rizzi M, Rowitch DH, Kessaris N, Suter U, Richardson WD, Franklin RJ: CNS-resident glial progenitor/stem cells produce Schwann cells as well as oligodendrocytes during repair of CNS demyelination. *Cell Stem Cell* 2010, 6(6):578-590.
 51. Dimou L, Gallo V: NG2-glia and their functions in the central nervous system. *Glia* 2015, 63(8):1429-1451.
 52. Franklin RJ, Goldman SA: *Glia Disease and Repair-Remyelination*. Cold Spring

- Harb Perspect Biol 2015, 7(7):a020594.
53. McTigue DM, Wei P, Stokes BT: Proliferation of NG2-positive cells and altered oligodendrocyte numbers in the contused rat spinal cord. *J Neurosci* 2001, 21(10):3392-3400.
 54. Fernandez-Castaneda A, Gaultier A: Adult oligodendrocyte progenitor cells - Multifaceted regulators of the CNS in health and disease. *Brain Behav Immun* 2016, 57:1-7.
 55. Levine J: The reactions and role of NG2 glia in spinal cord injury. *Brain Res* 2016, 1638(Pt B):199-208.
 56. Li N, Leung GK: Oligodendrocyte Precursor Cells in Spinal Cord Injury: A Review and Update. *Biomed Res Int* 2015, 2015:235195.
 57. Zuchero JB, Barres BA: Intrinsic and extrinsic control of oligodendrocyte development. *Curr Opin Neurobiol* 2013, 23(6):914-920.
 58. Emery B, Lu QR: Transcriptional and Epigenetic Regulation of Oligodendrocyte Development and Myelination in the Central Nervous System. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015, 7(9):a020461.
 59. Liu J, Moyon S, Hernandez M, Casaccia P: Epigenetic control of

- oligodendrocyte development: adding new players to old keepers. *Curr Opin Neurobiol* 2016, 39:133-138.
60. Moyon S, Liang J, Casaccia P: Epigenetics in NG2 glia cells. *Brain Res* 2016, 1638(Pt B):183-198.
61. Stolt CC, Lommes P, Sock E, Chaboissier MC, Schedl A, Wegner M: The Sox9 transcription factor determines glial fate choice in the developing spinal cord. *Genes Dev* 2003, 17(13):1677-1689.
62. Parras CM, Hunt C, Sugimori M, Nakafuku M, Rowitch D, Guillemot F: The proneural gene Mash1 specifies an early population of telencephalic oligodendrocytes. *J Neurosci* 2007, 27(16):4233-4242.
63. Sugimori M, Nagao M, Parras CM, Nakatani H, Lebel M, Guillemot F, Nakafuku M: Ascl1 is required for oligodendrocyte development in the spinal cord. *Development* 2008, 135(7):1271-1281.
64. Lu QR, Sun T, Zhu Z, Ma N, Garcia M, Stiles CD, Rowitch DH: Common developmental requirement for Olig function indicates a motor neuron/oligodendrocyte connection. *Cell* 2002, 109(1):75-86.
65. Zhou Q, Anderson DJ: The bHLH transcription factors OLIG2 and OLIG1

- couple neuronal and glial subtype specification. *Cell* 2002, 109(1):61-73.
66. Liu Z, Hu X, Cai J, Liu B, Peng X, Wegner M, Qiu M: Induction of oligodendrocyte differentiation by Olig2 and Sox10: evidence for reciprocal interactions and dosage-dependent mechanisms. *Dev Biol* 2007, 302(2):683-693.
67. Stolt CC, Rehberg S, Ader M, Lommes P, Riethmacher D, Schachner M, Bartsch U, Wegner M: Terminal differentiation of myelin-forming oligodendrocytes depends on the transcription factor Sox10. *Genes Dev* 2002, 16(2):165-170.
68. Li H, Lu Y, Smith HK, Richardson WD: Olig1 and Sox10 interact synergistically to drive myelin basic protein transcription in oligodendrocytes. *J Neurosci* 2007, 27(52):14375-14382.
69. Shen S, Sandoval J, Swiss VA, Li J, Dupree J, Franklin RJ, Casaccia-Bonnett P: Age-dependent epigenetic control of differentiation inhibitors is critical for remyelination efficiency. *Nat Neurosci* 2008, 11(9):1024-1034.
70. Zhao C, Ma D, Zawadzka M, Fancy SP, Elis-Williams L, Bouvier G, Stockley JH, de Castro GM, Wang B, Jacobs S, Casaccia P, Franklin RJ: Sox2 Sustains Recruitment of Oligodendrocyte Progenitor Cells following CNS Demyelination

- and Primes Them for Differentiation during Remyelination. *J Neurosci* 2015, 35(33):11482-11499.
71. Reiprich S, Wegner M: From CNS stem cells to neurons and glia: Sox for everyone. *Cell Tissue Res* 2015, 359(1):111-124.
72. Hoffmann SA, Hos D, Kuspert M, Lang RA, Lovell-Badge R, Wegner M, Reiprich S: Stem cell factor Sox2 and its close relative Sox3 have differentiation functions in oligodendrocytes. *Development* 2014, 141(1):39-50.
73. Lee HJ, Wu J, Chung J, Wrathall JR: SOX2 expression is upregulated in adult spinal cord after contusion injury in both oligodendrocyte lineage and ependymal cells. *J Neurosci Res* 2013, 91(2):196-210.
74. Probst AV, Dunleavy E, Almouzni G: Epigenetic inheritance during the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009, 10(3):192-206.
75. Esteller M: Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 2008, 358(11):1148-1159.
76. Martin C, Zhang Y: The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005, 6(11):838-849.
77. Ganesan A: Multitarget Drugs: an Epigenetic Epiphany. *ChemMedChem* 2016, 11(12):1227-1241.

78. Abematsu M, Tsujimura K, Yamano M, Saito M, Kohno K, Kohyama J, Namihira M, Komiya S, Nakashima K: Neurons derived from transplanted neural stem cells restore disrupted neuronal circuitry in a mouse model of spinal cord injury. *J Clin Invest* 2010, 120(9):3255-3266.
79. Lv L, Sun Y, Han X, Xu CC, Tang YP, Dong Q: Valproic acid improves outcome after rodent spinal cord injury: potential roles of histone deacetylase inhibition. *Brain Res* 2011, 1396:60-68.
80. Penas C, Verdu E, Asensio-Pinilla E, Guzman-Lenis MS, Herrando-Grabulosa M, Navarro X, Casas C: Valproate reduces CHOP levels and preserves oligodendrocytes and axons after spinal cord injury. *Neuroscience* 2011, 178:33-44.
81. Marin-Husstege M, Muggironi M, Liu A, Casaccia-Bonnet P: Histone deacetylase activity is necessary for oligodendrocyte lineage progression. *J Neurosci* 2002, 22(23):10333-10345.
82. Ye F, Chen Y, Hoang T, Montgomery RL, Zhao XH, Bu H, Hu T, Taketo MM, van Es JH, Clevers H, Hsieh J, Bassel-Duby R, Olson EN, Lu QR: HDAC1 and HDAC2 regulate oligodendrocyte differentiation by disrupting the

- beta-catenin-TCF interaction. *Nat Neurosci* 2009, 12(7):829-838.
83. Zhang L, He X, Liu L, Jiang M, Zhao C, Wang H, He D, Zheng T, Zhou X, Hassan A, Ma Z, Xin M, Sun Z, Lazar MA, Goldman SA, Olson EN, Lu QR: Hdac3 Interaction with p300 Histone Acetyltransferase Regulates the Oligodendrocyte and Astrocyte Lineage Fate Switch. *Dev Cell* 2016, 36(3):316-330.
84. Jablonska B, Gierdalski M, Chew LJ, Hawley T, Catron M, Lichauco A, Cabrera-Luque J, Yuen T, Rowitch D, Gallo V: Sirt1 regulates glial progenitor proliferation and regeneration in white matter after neonatal brain injury. *Nat Commun* 2016, 7:13866.
85. Rafalski VA, Ho PP, Brett JO, Ucar D, Dugas JC, Pollina EA, Chow LM, Ibrahim A, Baker SJ, Barres BA, Steinman L, Brunet A: Expansion of oligodendrocyte progenitor cells following SIRT1 inactivation in the adult brain. *Nat Cell Biol* 2013, 15(6):614-624.
86. Liu J, Magri L, Zhang F, Marsh NO, Albrecht S, Huynh JL, Kaur J, Kuhlmann T, Zhang W, Slesinger PA, Casaccia P: Chromatin landscape defined by repressive histone methylation during oligodendrocyte differentiation. *J Neurosci* 2015,

35(1):352-365.

87. Sher F, Boddeke E, Olah M, Copray S: Dynamic changes in Ezh2 gene occupancy underlie its involvement in neural stem cell self-renewal and differentiation towards oligodendrocytes. *PLoS One* 2012, 7(7):e40399.
88. Sher F, Rossler R, Brouwer N, Balasubramaniyan V, Boddeke E, Copray S: Differentiation of neural stem cells into oligodendrocytes: involvement of the polycomb group protein Ezh2. *Stem Cells* 2008, 26(11):2875-2883.
89. Moyon S, Huynh JL, Dutta D, Zhang F, Ma D, Yoo S, Lawrence R, Wegner M, John GR, Emery B, Lubetzki C, Franklin RJ, Fan G, Zhu J, Dupree JL, Casaccia P: Functional Characterization of DNA Methylation in the Oligodendrocyte Lineage. *Cell Rep* 2016, 15(4):748-760.
90. Zhao X, Dai J, Ma Y, Mi Y, Cui D, Ju G, Macklin WB, Jin W: Dynamics of ten-eleven translocation hydroxylase family proteins and 5-hydroxymethylcytosine in oligodendrocyte differentiation. *Glia* 2014, 62(6):914-926.
91. Xu YZ, Kanagaratham C, Radzioch D: Chromatin Remodelling During Host-Bacterial Pathogen Interaction. *Chromatin Remodel* 2013:173-198.

92. Hargreaves DC, Crabtree GR: ATP-dependent chromatin remodeling: genetics, genomics and mechanisms. *Cell Res* 2011, 21(3):396-420.
93. Ho L, Crabtree GR: Chromatin remodelling during development. *Nature* 2010, 463(7280):474-484.
94. Ronan JL, Wu W, Crabtree GR: From neural development to cognition: unexpected roles for chromatin. *Nat Rev Genet* 2013, 14(5):347-359.
95. Bischof M, Weider M, Kuspert M, Nave KA, Wegner M: Brg1-dependent chromatin remodelling is not essentially required during oligodendroglial differentiation. *J Neurosci* 2015, 35(1):21-35.
96. Matsumoto S, Banine F, Feistel K, Foster S, Xing R, Struve J, Sherman LS: Brg1 directly regulates Olig2 transcription and is required for oligodendrocyte progenitor cell specification. *Dev Biol* 2016, 413(2):173-187.
97. Yu Y, Chen Y, Kim B, Wang H, Zhao C, He X, Liu L, Liu W, Wu LM, Mao M, Chan JR, Wu J, Lu QR: Olig2 targets chromatin remodelers to enhancers to initiate oligodendrocyte differentiation. *Cell* 2013, 152(1-2):248-261.
98. Hall JA, Georgel PT: CHD proteins: a diverse family with strong ties. *Biochem Cell Biol* 2007, 85(4):463-476.

99. Basson MA, van Ravenswaaij-Arts C: Functional Insights into Chromatin Remodelling from Studies on CHARGE Syndrome. *Trends Genet* 2015, 31(10):600-611.
100. Bergman JE, Janssen N, Hoefsloot LH, Jongmans MC, Hofstra RM, van Ravenswaaij-Arts CM: CHD7 mutations and CHARGE syndrome: the clinical implications of an expanding phenotype. *J Med Genet* 2011, 48(5):334-342.
101. He D, Marie C, Zhao C, Kim B, Wang J, Deng Y, Clavairoly A, Frah M, Wang H, He X, Hmidan H, Jones BV, Witte D, Zalc B, Zhou X, Choo DI, Martin DM, Parras C, Lu QR: Chd7 cooperates with Sox10 and regulates the onset of CNS myelination and remyelination. *Nat Neurosci* 2016, 19(5):678-689.
102. Schnetz MP, Bartels CF, Shastri K, Balasubramanian D, Zentner GE, Balaji R, Zhang X, Song L, Wang Z, Laframboise T, Crawford GE, Scacheri PC: Genomic distribution of CHD7 on chromatin tracks H3K4 methylation patterns. *Genome Res* 2009, 19(4):590-601.
103. Schnetz MP, Handoko L, Akhtar-Zaidi B, Bartels CF, Pereira CF, Fisher AG, Adams DJ, Flicek P, Crawford GE, Laframboise T, Tesar P, Wei CL, Scacheri PC: CHD7 targets active gene enhancer elements to modulate ES cell-specific

- gene expression. *PLoS Genet* 2010, 6(7):e1001023.
104. Bosman EA, Penn AC, Ambrose JC, Kettleborough R, Stemple DL, Steel KP:
Multiple mutations in mouse *Chd7* provide models for CHARGE syndrome.
Hum Mol Genet 2005, 14(22):3463-3476.
 105. Hurd EA, Capers PL, Blauwkamp MN, Adams ME, Raphael Y, Poucher HK,
Martin DM: Loss of *Chd7* function in gene-trapped reporter mice is embryonic
lethal and associated with severe defects in multiple developing tissues. *Mamm
Genome* 2007, 18(2):94-104.
 106. Danielian PS, Muccino D, Rowitch DH, Michael SK, McMahon AP:
Modification of gene activity in mouse embryos in utero by a
tamoxifen-inducible form of Cre recombinase. *Curr Biol* 1998,
8(24):1323-1326.
 107. Hebert JM, McConnell SK: Targeting of cre to the *Foxg1* (BF-1) locus mediates
loxP recombination in the telencephalon and other developing head structures.
Dev Biol 2000, 222(2):296-306.
 108. Feng W, Khan MA, Bellvis P, Zhu Z, Bernhardt O, Herold-Mende C, Liu HK:
The chromatin remodeler CHD7 regulates adult neurogenesis via activation of

- SoxC transcription factors. *Cell Stem Cell* 2013, 13(1):62-72.
109. Hurd EA, Poucher HK, Cheng K, Raphael Y, Martin DM: The ATP-dependent chromatin remodeling enzyme CHD7 regulates pro-neural gene expression and neurogenesis in the inner ear. *Development* 2010, 137(18):3139-3150.
 110. Jones KM, Saric N, Russell JP, Andoniadou CL, Scambler PJ, Basson MA: CHD7 maintains neural stem cell quiescence and prevents premature stem cell depletion in the adult hippocampus. *Stem Cells* 2015, 33(1):196-210.
 111. Layman WS, McEwen DP, Beyer LA, Lalani SR, Fernbach SD, Oh E, Swaroop A, Hegg CC, Raphael Y, Martens JR, Martin DM: Defects in neural stem cell proliferation and olfaction in Chd7 deficient mice indicate a mechanism for hyposmia in human CHARGE syndrome. *Hum Mol Genet* 2009, 18(11):1909-1923.
 112. Micucci JA, Layman WS, Hurd EA, Sperry ED, Frank SF, Durham MA, Swiderski DL, Skidmore JM, Scacheri PC, Raphael Y, Martin DM: CHD7 and retinoic acid signaling cooperate to regulate neural stem cell and inner ear development in mouse models of CHARGE syndrome. *Hum Mol Genet* 2014, 23(2):434-448.

113. Ohta S, Yaguchi T, Okuno H, Chneiweiss H, Kawakami Y, Okano H: CHD7 promotes proliferation of neural stem cells mediated by MIF. *Mol Brain* 2016, 9(1):96.
114. Engelen E, Akinci U, Bryne JC, Hou J, Gontan C, Moen M, Szumska D, Kockx C, van Ijcken W, Dekkers DH, Demmers J, Rijkers EJ, Bhattacharya S, Philipsen S, Pevny LH, Grosveld FG, Rottier RJ, Lenhard B, Poot RA: Sox2 cooperates with Chd7 to regulate genes that are mutated in human syndromes. *Nat Genet* 2011, 43(6):607-611.
115. Kawamoto S, Niwa H, Tashiro F, Sano S, Kondoh G, Takeda J, Tabayashi K, Miyazaki J: A novel reporter mouse strain that expresses enhanced green fluorescent protein upon Cre-mediated recombination. *FEBS Lett* 2000, 470(3):263-268.
116. Basso DM, Fisher LC, Anderson AJ, Jakeman LB, McTigue DM, Popovich PG: Basso Mouse Scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains. *J Neurotrauma* 2006, 23(5):635-659.
117. Morita S, Kojima T, Kitamura T: Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther* 2000, 7(12):1063-1066.

118. Chen Y, Balasubramaniyan V, Peng J, Hurlock EC, Tallquist M, Li J, Lu QR: Isolation and culture of rat and mouse oligodendrocyte precursor cells. *Nat Protoc* 2007, 2(5):1044-1051.
119. Pedraza CE, Monk R, Lei J, Hao Q, Macklin WB: Production, characterization, and efficient transfection of highly pure oligodendrocyte precursor cultures from mouse embryonic neural progenitors. *Glia* 2008, 56(12):1339-1352.
120. Raff MC, Miller RH, Noble M: Glial cell lineages in the rat optic nerve. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1983, 48 Pt 2:569-572.
121. Badea TC, Niculescu FI, Soane L, Shin ML, Rus H: Molecular cloning and characterization of RGC-32, a novel gene induced by complement activation in oligodendrocytes. *J Biol Chem* 1998, 273(41):26977-26981.
122. Black AR, Black JD: Protein kinase C signaling and cell cycle regulation. *Front Immunol* 2012, 3:423.
123. Li S, Lin W, Tchanchou F, Lai R, Wen J, Zhang Y: Protein kinase C mediates peroxynitrite toxicity to oligodendrocytes. *Mol Cell Neurosci* 2011, 48(1):62-71.
124. Zhang Y, Chen K, Sloan SA, Bennett ML, Scholze AR, O'Keefe S, Phatnani HP, Guarnieri P, Caneda C, Ruderisch N, Deng S, Liddelow SA, Zhang C, Daneman

- R, Maniatis T, Barres BA, Wu JQ: An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J Neurosci* 2014, 34(36):11929-11947.
125. Xin M, Yue T, Ma Z, Wu FF, Gow A, Lu QR: Myelinogenesis and axonal recognition by oligodendrocytes in brain are uncoupled in *Olig1*-null mice. *J Neurosci* 2005, 25(6):1354-1365.
126. Lacroix S, Hamilton LK, Vaugeois A, Beaudoin S, Breault-Dugas C, Pineau I, Levesque SA, Gregoire CA, Fernandes KJ: Central canal ependymal cells proliferate extensively in response to traumatic spinal cord injury but not demyelinating lesions. *PLoS One* 2014, 9(1):e85916.
127. Bergsland M, Ramskold D, Zaouter C, Klum S, Sandberg R, Muhr J: Sequentially acting Sox transcription factors in neural lineage development. *Genes Dev* 2011, 25(23):2453-2464.
128. Wegner M: SOX after SOX: SOXession regulates neurogenesis. *Genes Dev* 2011, 25(23):2423-2428.
129. Glasgow SM, Zhu W, Stolt CC, Huang TW, Chen F, LoTurco JJ, Neul JL, Wegner M, Mohila C, Deneen B: Mutual antagonism between Sox10 and NFIA

- regulates diversification of glial lineages and glioma subtypes. *Nat Neurosci* 2014, 17(10):1322-1329.
130. Liu A, Li J, Marin-Husstege M, Kageyama R, Fan Y, Gelinas C, Casaccia-Bonnel P: A molecular insight of Hes5-dependent inhibition of myelin gene expression: old partners and new players. *EMBO J* 2006, 25(20):4833-4842.
131. Stolt CC, Schlierf A, Lommes P, Hillgartner S, Werner T, Kosian T, Sock E, Kessaris N, Richardson WD, Lefebvre V, Wegner M: SoxD proteins influence multiple stages of oligodendrocyte development and modulate SoxE protein function. *Dev Cell* 2006, 11(5):697-709.
132. Vlaicu SI, Cudrici C, Ito T, Fosbrink M, Tegla CA, Rus V, Mircea PA, Rus H: Role of response gene to complement 32 in diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2008, 56(2):115-122.
133. Adamson C, Kanu OO, Mehta AI, Di C, Lin N, Mattox AK, Bigner DD: Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. *Expert Opin Investig Drugs* 2009, 18(8):1061-1083.
134. Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR,

- Ding L, Golub T, Mesirov JP, Alexe G, Lawrence M, O'Kelly M, Tamayo P, Weir BA, Gabriel S, Winckler W, Gupta S, Jakkula L, Feiler HS, Hodgson JG, James CD, Sarkaria JN, Brennan C, Kahn A, Spellman PT, Wilson RK, Speed TP, Gray JW, Meyerson M, Getz G, Perou CM, Hayes DN, Cancer Genome Atlas Research N: Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 2010, 17(1):98-110.
135. Lei L, Sonabend AM, Guarnieri P, Soderquist C, Ludwig T, Rosenfeld S, Bruce JN, Canoll P: Glioblastoma models reveal the connection between adult glial progenitors and the proneural phenotype. *PLoS One* 2011, 6(5):e20041.
136. Liu C, Sage JC, Miller MR, Verhaak RG, Hippenmeyer S, Vogel H, Foreman O, Bronson RT, Nishiyama A, Luo L, Zong H: Mosaic analysis with double markers reveals tumor cell of origin in glioma. *Cell* 2011, 146(2):209-221.
137. Garros-Regulez L, Garcia I, Carrasco-Garcia E, Lantero A, Aldaz P, Moreno-Cugnon L, Arrizabalaga O, Undabeitia J, Torres-Bayona S, Villanua J, Ruiz I, Egana L, Sampron N, Matheu A: Targeting SOX2 as a Therapeutic Strategy in Glioblastoma. *Front Oncol* 2016, 6:222.

138. Alcantara Llaguno SR, Wang Z, Sun D, Chen J, Xu J, Kim E, Hatanpaa KJ, Raisanen JM, Burns DK, Johnson JE, Parada LF: Adult Lineage-Restricted CNS Progenitors Specify Distinct Glioblastoma Subtypes. *Cancer Cell* 2015, 28(4):429-440.
139. Berezovsky AD, Poisson LM, Cherba D, Webb CP, Transou AD, Lemke NW, Hong X, Hasselbach LA, Irtenkauf SM, Mikkelsen T, deCarvalho AC: Sox2 promotes malignancy in glioblastoma by regulating plasticity and astrocytic differentiation. *Neoplasia* 2014, 16(3):193-206, 206 e119-125.
140. Wong MT, Scholvinck EH, Lambeck AJ, van Ravenswaaij-Arts CM: CHARGE syndrome: a review of the immunological aspects. *Eur J Hum Genet* 2015, 23(11):1451-1459.
141. Keirstead HS, Nistor G, Bernal G, Totoiu M, Cloutier F, Sharp K, Steward O: Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *J Neurosci* 2005, 25(19):4694-4705.
142. Lukovic D, Stojkovic M, Moreno-Manzano V, Bhattacharya SS, Erceg S: Perspectives and future directions of human pluripotent stem cell-based

therapies: lessons from Geron's clinical trial for spinal cord injury. *Stem Cells Dev* 2014, 23(1):1-4.

143. Najm FJ, Madhavan M, Zaremba A, Shick E, Karl RT, Factor DC, Miller TE, Nevin ZS, Kantor C, Sargent A, Quick KL, Schlatzer DM, Tang H, Papoian R, Brimacombe KR, Shen M, Boxer MB, Jadhav A, Robinson AP, Podojil JR, Miller SD, Miller RH, Tesar PJ: Drug-based modulation of endogenous stem cells promotes functional remyelination in vivo. *Nature* 2015, 522(7555):216-220.