

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 土肥 透

【要旨】

脊髄損傷は直達外力による1次損傷と炎症による2次損傷によってニューロン細胞死や軸索損傷、脱髄などが起こり、恒久的な神経機能障害を呈する難治性の中枢神経系外傷のひとつである。細胞移植を含め、治療に関する多くの研究が行われているが、残存する神経機能障害に対する有効な治療法は未だ確立されていない。一方で生体に備わる自然修復機構として、脊髄損傷後に脊髄内在性のオリゴデンドロサイト前駆細胞 (oligodendrocyte precursor cells, OPC) が活性化、増殖し、髄鞘形成細胞である成熟オリゴデンドロサイト (oligodendrocytes, OL) に分化することで再髄鞘化が誘導され、部分的な神経機能回復がもたらされる。この再髄鞘化の促進は脊髄損傷治療の重要な治療戦略のひとつであり、OL 発生や再生の制御メカニズムの分子レベルの解明は新たな脊髄再生治療につながる可能性がある。OL 発生の細胞内因性制御として、転写因子による制御の他に、エピジェネティック因子による制御が知られているが、脊髄損傷後の OPC 活性化を制御する新規エピジェネティック因子としては未だ不明な点が多い。本研究では脊髄損傷後の OPC 活性化を制御する新規エピジェネティック因子としてクロマチンリモデリング因子 Chromodomain helicase DNA-binding protein 7 (Chd7) に着目し、その役割について解析した。

まず、マウス正常脊髄における Chd7 の発現パターンについて解析した。マウス発生期脊髄では、Olig2⁺、Sox10⁺ OL 系譜細胞で Chd7 が発現しており、成体正常脊髄でも Olig2⁺、Sox10⁺ OL 系譜細胞や GSTπ⁺ 成熟 OL で Chd7 が発現していた。OPC 特異的に GFP を発現するレポーターマウス (PDGFRα-CreER; CAG-CAT-EGFP マウス) を用いた解析で、PDGFRα-GFP⁺ OPC の多くで Chd7 が発現することが確認された。また培養 OPC においても OL 系譜細胞や成熟 OL と同様に OPC の多くで Chd7 が発現していた。以上から *in vivo*, *in vitro* 双方で、OPC を含む OL 系譜細胞に Chd7 が発現していることがわかった。

一方、脊髄損傷後の OPC 活性化に重要な転写因子である Sox2 に関して、成体正常脊髄及び培養 OPC でその発現パターンを解析した結果、Sox2 は OPC 及びアストロサイトで発現していたが、成熟 OL では発現していないことがわかった。

OPC で Chd7 が発現していたことから、脊髄損傷後に増殖する活性化 OPC での Chd7 発現について解析した。PDGFRα-CreER; CAG-CAT-EGFP マウスを用いて圧挫脊髄損傷モデルを作成し、損傷後3日 (3 days post injury, 3 dpi) で評価したところ、損傷後に増殖する PDGFRα-GFP⁺ OPC で Sox2 の発現増加に伴い、Chd7 の発現が顕著に増加していた。このことから脊髄損傷後の OPC 活性化に Chd7 が関与している可能性が考えられた。

そこで OPC 特異的 Chd7 ノックアウトマウス (PDGFRα-CreER; Chd7^{lox/lox}; CAG-CAT-EGFP マウス、Chd7 cKO マウス) を用いて、同様に 3 dpi で評価したところ、Chd7 cKO マウスではコントロールマウス (PDGFRα-CreER; Chd7^{+/+}; CAG-CAT-EGFP マウス) と比べて、GFP⁺ 細胞における BrdU の取り込みや Ki67⁺ 細胞

の割合が減少していることから、OPC の増殖が抑制されていることがわかった。一方で OPC 生存には変化がなかった。また *Chd7* cKO マウスでは、GFP⁺ 細胞における OPC マーカーの NG2 の発現や OL 系譜細胞マーカーの Sox10 の発現の割合が有意に減少していたことから、OL 系譜の維持も損なわれていることがわかった。また損傷後 42 日 (42 dpi)における検討では、*Chd7* cKO マウスで GST π ⁺ 成熟 OL への分化が減少し、それを反映して再髄鞘化も抑制されていた。BMS スコアによるマウスの後肢運動機能評価では、*Chd7* cKO マウスでは 28、35、42 dpi で有意に 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。以上の結果から、*Chd7* は脊髄損傷後の OPC の増殖や系譜維持、成熟 OL への分化に必須であり、再髄鞘化による運動機能回復に寄与することが示された。

続いて *Chd7*^{fllox/fllox} マウス由来培養 OPC で *Chd7* をノックアウトし、*in vitro* での解析を行った。*in vivo* と同様に増殖条件の培養 OPC で *Chd7* ノックアウトにより、OPC の増殖が抑制され、OPC や OL 系譜細胞が減少した。また分化条件の培養 OPC では *Chd7* ノックアウトにより成熟 OL への分化が抑制され、一方で GFAP⁺ アストロサイトが増加した。以上の結果から *in vitro* においても *Chd7* は OPC の増殖や系譜維持、成熟 OL への分化に必要であることが示された。

次に *Chd7* による OPC 活性化のメカニズムに関して解析を行った。*Chd7* は転写因子と複合体を形成して標的遺伝子の発現制御領域にリクルートされ、クロマチン構造のリモデリングを行うことで遺伝子発現を調節することが知られている。そこで活性化 OPC で *Chd7* と複合体を形成する転写因子の候補として、Sox2 に着目した。*in vitro* での検討で、培養 OPC での Sox2 ノックダウンにより、OPC の増殖が抑制され、OPC、OL 系譜細胞が減少した。また培養 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、OPC の増殖抑制や OPC、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。このことから *Chd7* と Sox2 が同じシグナル経路で OPC 活性化に働いている可能性が考慮された。実際に培養 OPC での共免疫沈降や Proximity Ligation Assay (PLA)による解析から、*Chd7* と Sox2 が結合して複合体を形成していることがわかった。以上の結果より、OPC で *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。

続いて *Chd7* をノックダウンした培養 OPC を用いたマイクロアレイ解析から *Chd7* の標的遺伝子に関する検討を行った。その結果 *Chd7* ノックダウンにより OL 関連遺伝子群の発現が減少し、一方でアストロサイト関連遺伝子群の発現は増加していた。また定量 RT-PCR により *Chd7*、Sox2 ノックダウンにより OL 関連遺伝子群の発現が減少することが確認された。Gene ontology (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関連や OL 分化関連遺伝子が含まれていることがわかった。以上から *Chd7* - Sox2 複合体は OL 関連遺伝子群の発現を制御していることがわかった。

Chd7 ノックダウンにより発現が減少する遺伝子群の中で、新たな *Chd7* 標的遺伝子の候補として細胞周期関連遺伝子の regulator of cell cycle (*Rgcc*)及び novel protein kinase C (PKC) family のひとつ、PKC θ に着目した。培養 OPC での *Chd7* 及び Sox2 ノックダウンにより *Rgcc* および PKC θ の発現が減少することを確認した。また ChIP 解析により、*Chd7* と Sox2 が *Rgcc* 及び PKC θ 遺伝子のエンハンサーもしくはプロモーター領域に結合し、遺伝子発現を直接制御していることがわかった。*in vivo* での検討では、成体正常脊髄において *Rgcc*、PKC θ は共に *Chd7* や Sox2 と共発現し、OPC を含む OL 系譜細胞で発現していることがわかった。また *Chd7* cKO マウスでは 3 dpi 損傷脊髄での *Rgcc*、PKC θ 発現が減少しており、このことから *Chd7* は脊髄損傷後の *Rgcc*、PKC θ の発現誘導に必要であることがわかった。

in vitro での検討では、培養 OPC での *Rgcc*、PKC θ ノックダウンにより OPC の増殖が抑制され、OPC、OL

系譜細胞が減少した。また培養 OPC での Rgcc、PKCθ の過剰発現では OPC の増殖が促進し、Chd7 ノックアウトによる OPC の増殖抑制や OPC、OL 系譜細胞の減少効果をレスキューすることが確認された。以上の結果から Rgcc、PKCθ は Chd7 - Sox2 複合体の標的遺伝子として、OPC 活性化に中心的な役割を果たしていることが示された。

以上の結果をまとめると、脊髄損傷後に脊髄内在性の OPC で Chd7 と Sox2 の発現が上昇し、複合体を形成することで、Rgcc、PKCθ などの標的遺伝子の発現を誘導し、OPC 活性化 (増殖と系譜の維持) を制御していることがわかった。本研究の知見から、Chd7、Rgcc、PKCθ は脊髄損傷治療の新たな創薬標的分子となる可能性が見出された。今後これら候補分子の創薬応用への研究を進めることで、脊髄損傷後の OPC 活性化をタイミングよく制御し、再髄鞘化促進による有効な脊髄再生治療につながることを期待される。