

審査の結果の要旨

氏名 土肥 透

本研究は脊髄損傷後のオリゴデンドロサイト前駆細胞 (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 Chd7 に着目し、その役割について解析したものであり、下記の結果を得ている。

1. マウス正常脊髄における Chd7 の発現解析では、マウス発生期脊髄の Olig2<sup>+</sup>、Sox10<sup>+</sup>オリゴデンドロサイト (OL)系譜細胞で Chd7 が発現しており、成体正常脊髄でも OL系譜細胞や成熟 OL 及び、PDGFR $\alpha$ -GFP<sup>+</sup>OPC の多くで Chd7 が発現していた。また培養 OPC においても OPC の多くで Chd7 が発現していた。以上から Chd7 は OPC や成熟 OL を含む OL 系譜細胞に発現していることがわかった。
2. 次に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。OPC 特異的レポーターマウス (*PDGFR $\alpha$ -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 日で評価したところ、損傷後に増殖する PDGFR $\alpha$ -GFP<sup>+</sup>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。以上より脊髄損傷後の OPC 活性化に Chd7 が関与している可能性が考えられた。
3. OPC 特異的 Chd7 ノックアウトマウス (*PDGFR $\alpha$ -CreER; Chd7<sup>flx/flx</sup>;CAG-CAT-EGFP*マウス、*Chd7cKO* マウス)を用いて、同様に損傷後 3 日で評価したところ、*Chd7cKO* マウスでは OPC 増殖が抑制され、OL 系譜の維持が損なわれていることがわかった。また損傷後 42 日における検討では、*Chd7cKO* マウスで成熟 OL への分化が抑制され、再髄鞘化の抑制及び後肢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 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。
4. *Chd7<sup>flx/flx</sup>*マウス由来培養 OPC で Chd7 をノックアウトしたところ、*in vivo*と同様に OPC の増殖が抑制され、OL 系譜の維持が損なわれており、成熟 OL への分化も抑制されていた。以上から *in vitro*においても Chd7 は OPC 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。
5. 次に Chd7 が標的遺伝子の発現制御領域にリクルートされるためにパートナーとなる転写因子として、OPC 活性化に重要な転写因子である Sox2 に注目した。*in vitro*での検討で、培養 OPC での Sox2 ノックダウンにより OPC 増殖が抑制され、OL 系譜維持が損なわれていた。培養 OPC で Chd7 ノックダウンと Sox2 ノックダウンを同時に行ったところ、OPC の増殖抑制に明らかな相乗効果は認められなかった。培養 OPC で

の共免疫沈降や Proximity Ligation Assay (PLA)解析から、Chd7 と Sox2 が複合体を形成していることがわかった。以上から、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。

6. 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 ノックダウンにより OL 関連遺伝子群の発現が減少していることがわかった。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 分化関連遺伝子群が含まれていた。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わかった。
7. 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 標的分子候補として Rgcc と PKCθ に着目した。培養 OPC での Chd7、Sox2 ノックダウンにより、Rgcc、PKCθ の発現が減少した。また ChIP 解析により Chd7 と Sox2 が Rgcc、PKCθ 遺伝子のエンハンサーやプロモーター領域に enrich しており、遺伝子発現を直接制御していることが示された。
8. 培養 OPC での Rgcc、PKCθ ノックダウンにより OPC 増殖が抑制され、OL 系譜の維持が損なわれた。また培養 OPC での Rgcc や PKCθ の過剰発現では OPC 増殖が促進した。さらに Chd7 ノックアウトによる OPC 増殖抑制などの表現型を Rgcc、PKCθ のダブルの過剰発現ではほぼ完全にレスキューできることが確認された。以上の結果から Rgcc、PKCθ は Chd7 の標的分子として、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、本論文は、脊髄損傷後に内在性の OPC で Chd7 と Sox2 が複合体を形成し、Rgcc や PKCθ などの標的遺伝子の発現を誘導することで、OPC 活性化を制御していることを明らかにした。本研究の知見から、Chd7、Rgcc、PKCθ が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。本研究結果は将来的な再髄鞘化促進による新たな脊髄損傷治療につながる点で重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。