



## 目次

要 旨	3
序 文	4
方 法	10
結 果	30
考 察	58
謝 辞	65
参考文献	66

## 要旨

早産児の脳室周囲白質軟化症 (PVL) における、後期オリゴデンドロサイト前駆細胞 (premyelinating oligodendrocytes; pre-OLs) の損傷に対する低温の効果を、*in vivo* ラット PVL モデルと *in vitro* pre-OLs / 脊髄後根神経節ニューロン培養系を用いて検討した。低温は pre-OLs のアポトーシスを抑制し、低酸素虚血負荷によるリン酸化 myelin basic protein (MBP)、特に exon2 を含むアイソフォームの減少を抑制した。その作用機序として、低酸素虚血負荷による ERK リン酸化減少の抑制と、Ddx54 を介した MBP mRNA 発現抑制の関与が示唆された。

## 序文

新生児仮死で出生した新生児に発症する低酸素虚血性脳症は、脳性麻痺をはじめとした慢性的な神経障害を引き起こす。正期産児に発症する低酸素虚血性脳症に対しては、脳低温療法が標準的治療となっている。その神経保護効果は、脳代謝を減少させ、細胞死を抑制し、ミクログリアやアストロサイトの炎症反応を減弱させることによると報告されている[1, 2]が、その分子機構に関してはまだ十分に解明されていない。

脳性麻痺の病態は、正期産児と早産児で異なる。脳室周囲白質軟化症（PVL）は早産児が発症する脳性麻痺の主たる病態である。その好発時期は在胎 24 から 32 週であり、出生体重が 1500g 未満の極低出生体重児に多い[3, 4]。新生児医療の進歩により極低出生体重児の生存率は改善しているが、それに伴い、慢性的な神経障害をかかえる早産で出生した児の数は増えている[5]。早産で出生した児のうち 10~15%が、何らかの四肢痙性麻痺を発症すると報告されている。また、学校に入学する時には、25~50%が、認知機能・視覚・社会行動・注意力・学力に障害を来すと報告されている。

PVL の中心的病態は後期オリゴデンドロサイト前駆細胞（premyelinating oligodendrocytes; pre-OLs）の損傷であり、その原因として周産期低酸素虚血と炎症・感染が挙げられる。単独の病因としては子宮内感染と PVL の因果関係は

臨床的にまだ十分証明されていない[6-8]が、炎症・感染は低酸素虚血による pre-OLs への損傷を悪化させることが知られている[8, 9]。オリゴデンドロサイトは、中枢神経においてニューロンの軸索に、跳躍伝導の際に電気絶縁体の役目を果たす髄鞘を形成するグリア細胞の 1 種である。ひとつのオリゴデンドロサイトは同時に最大 30~50 本もの突起を伸ばし、複数のニューロンに巻き付き髄鞘を形成することが知られている。その分化過程は、Olig2 を発現するオリゴデンドロサイト前駆細胞 oligodendrocyte precursor cells (OPCs) を経て、コンドロイチン硫酸の NG2 や O4 を発現する pre-OLs、myelin associated glycoprotein (MAG) や O1 を発現する未成熟オリゴデンドロサイト (immature oligodendrocytes)、そして最終的に myelin basic protein (MBP) を発現し髄鞘形成した成熟オリゴデンドロサイト (mature oligodendrocytes) となる (図 1)。これらのうち、pre-OLs は低酸素虚血負荷や炎症に極めて脆弱である上に、在胎 24 から 32 週に主として局在する脳室周囲白質が、未熟な血管網の分水嶺領域に存在することや、脳血流量が体血圧に応じて変動しやすいことのために、容易に虚血状態に陥り易く[9]、pre-OLs は更に選択的に損傷を受けやすくなる[3, 10-13]。

PVL の急性期には、グルタミン酸による pre-OLs への毒性やミクログリアの活性化を介して、活性酸素及び活性窒素が産生され、pre-OLs が損傷を受ける[9]。

グルタミン酸による毒性は、NMDA や AMPA 受容体を介した経路と、受容体を介さない経路が報告されている。受容体を介さない経路では、グルタチオンが不足することにより、MAP キナーゼや 12-リポキシゲナーゼなどを介して、活性酸素が産生される[5, 14]。一方、慢性期の病巣では、未分化なオリゴデンドロサイト前駆細胞は増殖しているものの、分化障害が起き、髄鞘形成不全に陥ると報告されている[12, 15-17]。さらに、広範な白質障害は、しばしば軸索の損傷を伴っている[12, 18, 19]。軸索損傷は、髄鞘化を開始したオリゴデンドロサイトとの接点で、起こりやすい[20]。軸索変性によるニューロンの障害は、オリゴデンドロサイトの減少や機能障害によっても二次的に引き起こされ得る[21-23]。PVL の予防には、急性期の pre-OLs 細胞死抑制だけではなく、髄鞘形成能を持つ成熟したオリゴデンドロサイトに分化できる能力を維持することが肝要である。

低温のオリゴデンドロサイト分化系列の細胞に対する保護効果が、いくつかの動物モデルで報告されている。例えば、羊の PVL モデルにおいて、未分化なオリゴデンドロサイトとニューロンの細胞死を低温が抑制したと報告されている[24, 25]。また、ラットの低酸素虚血性脳症モデルにおいて、低温は、低酸素虚血負荷後のオリゴデンドロサイトの分化を改善したと報告されている[26]。

このように動物モデルにおいては低温の保護効果は報告され、正期産児に対

する脳低温療法は出生後早期、6時間内以内で有用性が確認され、実施されている[27]ものの、早産児への適応はいまだ結論が出ていない。Late-preterm とされる、在胎 32 から 36 週の早産児へ脳低温療法の適応を拡大については、議論されている[28-30]ものの、極低出生体重児への有用性については、未熟な体温調節機構のために低温療法が低酸素や感染や低血糖による死亡率を上昇させる可能性が示唆されており、適応にはなっていない[31]。そのため、これら極低出生体重児の PVL を減少させるためには、低温の効果を動物モデルや培養系で確認し、その機序を明らかにすることにより低温の代替となり得る新規薬物療法の開発へ繋げる必要がある。また、早産児の PVL は、出生前後の低酸素虚血負荷だけでなく、出生後の循環不全も関与していると言われている[32]。将来的に低温の作用機序を応用した薬物療法の開発へ繋げるためには、低温の効果がより高く想定される低酸素虚血負荷中での検討が望ましいと考えた。そこで *in vivo*、*in vitro* 実験系を用いて、低酸素虚血負荷中に低温にすることによる pre-OLs 保護効果とその機序について検討した。今田らはこれまでに、低温は OPC 増殖効果を有し、30°C から 37°C で培養を行った場合、31.5°C でその増殖効果が最大になることを報告した[33]。そのため、本研究における低温群の条件設定は、*in vitro* 実験では 31.5°C、*in vivo* 実験では直腸温が  $32 \pm 1^\circ\text{C}$  となるように行った。

本研究では、*in vivo* の低酸素虚血負荷によるラット PVL モデルに加えて、pre-OLs 初代培養系に低酸素虚血に相当する、低酸素無糖負荷をかけ、低温による保護効果の分子機構について検討した。急性期の細胞死への効果だけでなく、MBP 発現オリゴデンドロサイトとニューロンの髄鞘形成能についても検討した結果、髄鞘形成に必須である MBP の特に exon2 を含むアイソフォームが低酸素虚血により減少し、低温により保護されることが明らかになった。また、低温下では MBP mRNA の発現が一時的に抑制されており、MBP mRNA 結合蛋白 DEAD-box RNA ヘリカーゼ Ddx54 の低温下での増加が、MBP の転写活性低下に関与している可能性が示唆された。さらに、オリゴデンドロサイトの細胞死抑制とニューロンとの接触能維持には、extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2) のリン酸化が関与していることが明らかになった。



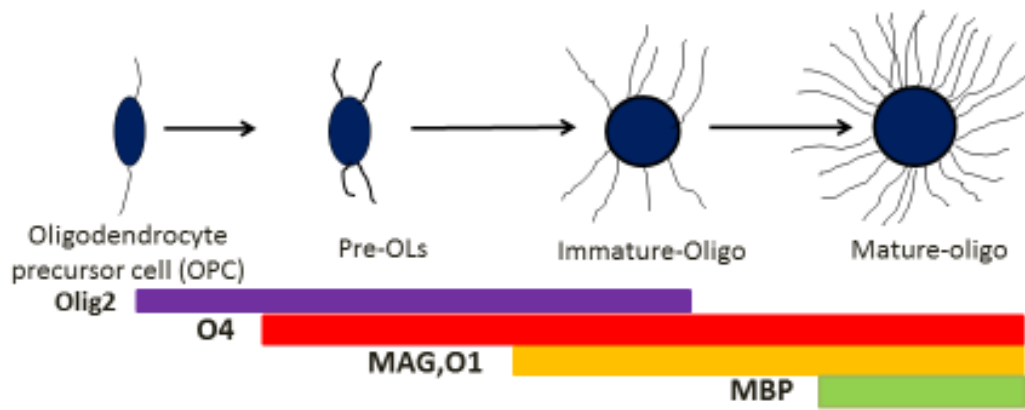


図1 オリゴデンドロサイト分化段階と発現するマーカー蛋白

## 方法

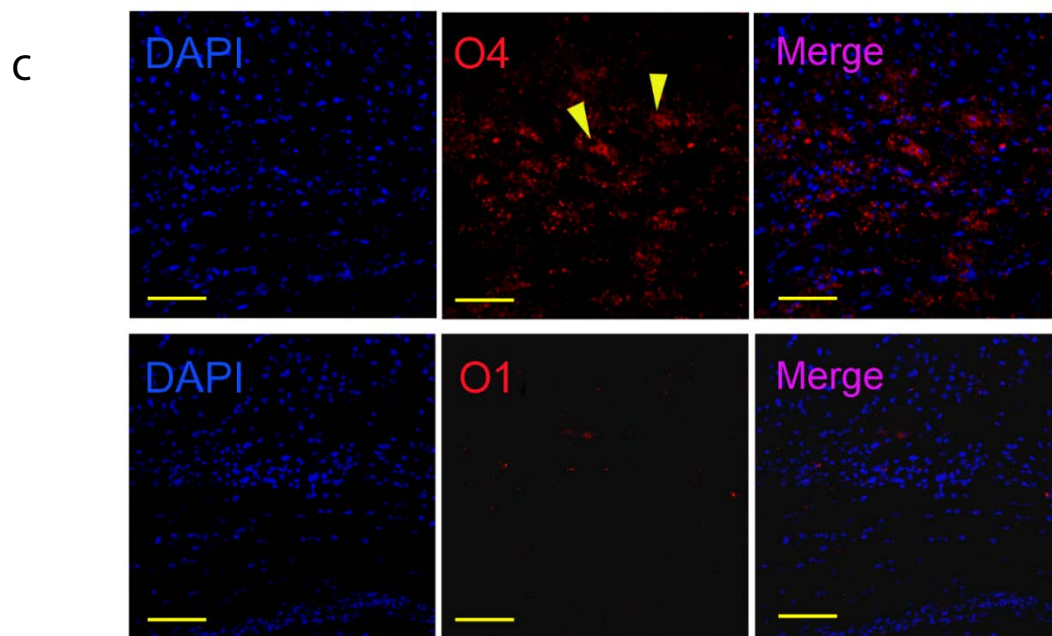
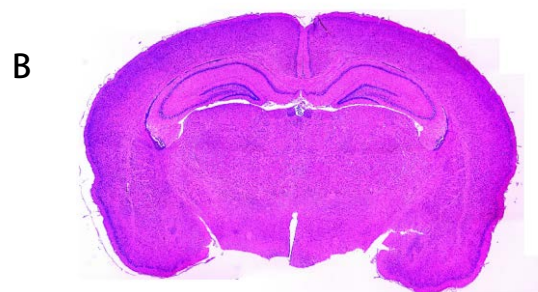
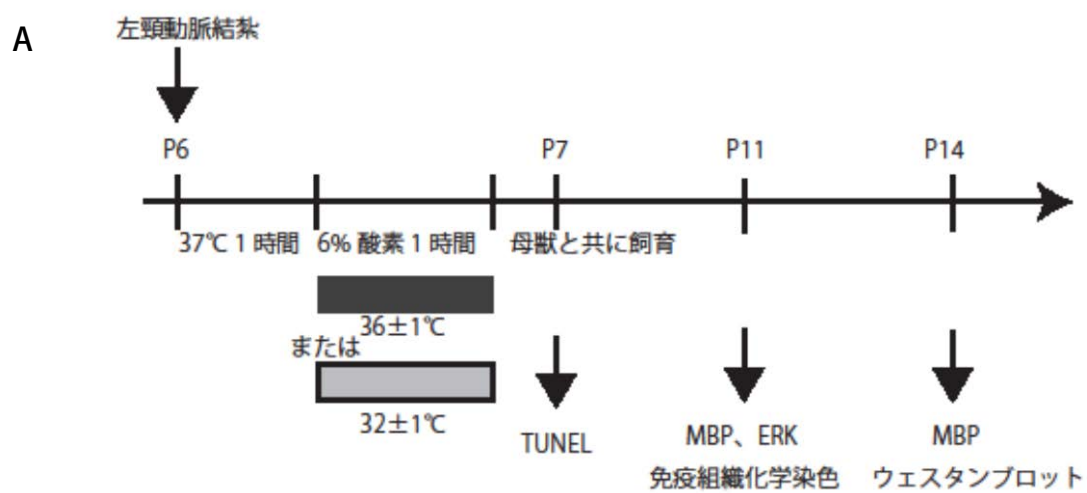
### 動物モデルの作成

動物は、雄の Sprague-Dawley (SD) 新生仔ラット（日本 SLC、静岡）を使用し、12 時間毎の明暗サイクルで温度制御された動物飼育施設で母獣と共に飼育した。仔ラットの出生した日を P0 とカウントした。図 2 に示すようにラット PVL モデルを作成した。具体的には、過去の文献[34, 35]をもとにして、イソフルラン麻酔下で、P6 ラットの左総頸動脈を迷走神経から剥離し、二重結紮・切断し、1 時間休息させた。次に、温度管理された 6%酸素チャンバー内に 1 時間置いた。共に同チャンバー内に置いた P6 ラットには直腸プローベを挿入し、直腸温が常温群では  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、低温群では  $32\pm 1^{\circ}\text{C}$  になるように調整した。低温群のラットは、低酸素チャンバーに置く直前に 70%エタノールを表皮に噴霧し体温を降下させ、その後は温度管理されたチャンバー内で直腸温を目標範囲内に維持した。低酸素負荷後は、30 分間  $37^{\circ}\text{C}$  のチャンバー内で、直腸温が  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$  になるまで休息させ、母獣のもとに戻し、解析に使用するまで飼育した（図 2A）。

過去の文献において、SD ラットを用いた PVL モデルでは、P3[36]から P5[37]、P6[34, 38]が使用されることが多かった。Dean らは、P2 ラットを用いた PVL モデルが人間の PVL に近いと報告している[39]。Pre-OLs は、スルファチドを発現しており O4 抗体によって認識されるが、ガラクトセレブロシドは発現して

おらず O1 抗体には認識されないという特徴を持っている。私は、P6 SD ラットの脳室周囲白質を免疫組織化学染色し、O4 陽性で O1 陰性である pre-OLs が十分に観察されたことから、PVL モデルとして妥当であると判断した (図 2B、C)。P7,11,14 に仔ラットをイソフルランで安楽死させ、大脳を摘出して実験に用いた。

なお、動物実験は、東京大学の動物実験倫理委員会の承認を得て行った (承認番号 : 医-P12-137)。



**図 2** ラット PVL モデル

- (A) 日齢 6 の SD ラットの左総頸動脈を結紮後に、低酸素(6%)負荷を 1 時間かけ、PVL モデルを作成し、P7、11、14 に大脳を摘出した。
- (B) 免疫組織化学染色における標準断面。背側海馬中部を含む断面で切片を作成した。
- (C) 日齢 6 の SD ラットの標準断面における脳室周囲白質を免疫組織学染色したところ、O4 陽性で O1 陰性である pre-OLs が十分に観察された。

## オリゴデンドロサイト初代培養系の作成

図 3 に *in vitro* オリゴデンドロサイト初代培養系を用いた実験のプロトコールを示す。具体的には、妊娠 18 日目の SD ラット（日本 SLC）をイソフルランによる深麻酔で安楽死させた後、腹部を切開して子宮を摘出し、胎児（8~10 匹）を取り出した。次に胎児の頭部を正中切開して大脳半球を摘出し、髄膜を除去した後に 0.3% dispase II と 0.05% DNase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) により酵素分解処理し、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Invitrogen, Gaithersburg, MD) 培養液中でピペッティングにより懸濁した。

分離された細胞を 70 $\mu$ m 孔のフィルター (No.2350; Becton Dickinson, Franklin, NJ) でろ過し、poly-D-lysine (PDL) でコーティングされた直径 10cm のディッシュ (Becton Dickinson) に、濃度  $2.0 \times 10^7$ /dish で均一にまき、10% FBS (fetal bovine serum) を含む DMEM 培養液 (DMEM(+)) を加え、37°C で 5 日間 CO<sub>2</sub> インキュベーター内にて培養した。

5 日間培養後、培養液を吸引し 0.1% トリプシンを加えて接着している細胞をディッシュより剥がし、パストゥールピペットで DMEM(+) の入った 50 ml チューブに移し、10 分間 4°C 1000 rpm で遠心した。この手順によりトリプシン感受性のあるニューロンを取り除いた。沈殿した細胞は、DMEM に glucose (5.6

mg/ml)、kanamycin (60 mg/ml)、insulin (5 µg/ml)、transferrin (0.5 µg/ml)、BSA (100 µg/ml)、progesterone (0.06 ng/ml)、putrescine (16 µg/ml)、sodium selenite (40 ng/ml)、thyroxine (T4) (40 ng/ml)、tri-iodothyronine (T3) (30 ng/ml) (Sigma) を添加した無血清培養液 (BS medium) 中で懸濁して、濃度  $2.5 \times 10^6/\text{ml}$  に調整し、37 度で 2 時間インキュベートした。この操作により、無血清培地では生存できないアストロサイトと、より早く底面に到達するミクログリアを取り除き、OPC を単離した。その後、ピペットで細胞を十分に BS medium で懸濁し、pre-OLs 培養用には 10cm のディッシュ (Becton Dickinson) に  $2.0 \times 10^6$  cells/dish の濃度となるように、pre-OLs と脊髄背側神経束 (Dorsal root ganglia; DRG) ニューロンとの共培養用には 5cm のディッシュ (Sarstedt K.K.、東京) に  $0.9 \times 10^6$  cells/dish の濃度となるように、免疫細胞染色用には PLL コートした 1well のチャンバースライド (IWAKI、東京) に  $0.5 \times 10^6$  cells/dish の濃度となるように、細胞を均一にまいた。

#### **低酸素無糖負荷 (Oxygen Glucose Deprivation : OGD)**

OPC を二日間 37°C インキュベーターで培養し pre-OLs まで分化させ (図 3B)、等張性の低酸素無糖培養液 (OGD solution) に置換した。OGD solution として、21mM の炭酸水素ナトリウム、120mM の塩化ナトリウム、5.36mM の塩化カリウム、0.33mM のリン酸水素ナトリウム、0.44mM のリン酸水素カリウム、

1.27mM の塩化カルシウム、0.81mM の  $\text{MgSO}_4$  を含む無糖液を作成した[40]。OGD solution に置換後、炭酸ガス発生剤（アネロパック kenki 5%、三菱ガスケミカル）を含む湿潤した嫌気培養専用の箱に培養細胞を入れ、インキュベーター内に計 6 時間放置した。アネロパックにより、箱内の酸素濃度が 1 時間以内に 1%未満になっていることを、低酸素指示剤によって確認した。6 時間後に低酸素環境から解放し、D-glucose 濃縮液を最終濃度が 21mM になるように培養液に加え、37°Cあるいは 31.5°Cのインキュベーターで培養した（図 3A）。U0126（Cell signaling、Beverly、MA）を最終濃度が 10 $\mu\text{M}$  になるように[41, 42]、オリゴデンドロサイト培養系に OGD の直前あるいは直後に加え、ERK1/2 リン酸化のアポトーシスと髄鞘形成への関与を検討した。

### 生死細胞判定

OGD による pre-OLs の生存率を、ToxCount (Active Motif、東京) を用いて製造者の推奨する手順で判定した。まず、pre-OLs を 35mm のディッシュ (Becton Dickinson) で培養した。OGD 負荷後に、培養細胞を 0.5mM の calcein AM 中で 37°Cインキュベーターに 30 分間置き、生細胞を蛍光顕微鏡下で観察した。また、アポトーシスについては、TUNEL in situ cell death detection kit (Roche Applied Science、Manheim、Germany) を用いて、製造者の推奨する手順で判定した。さらに、cleaved caspase3 と O4 の二重免疫染色を行い、100

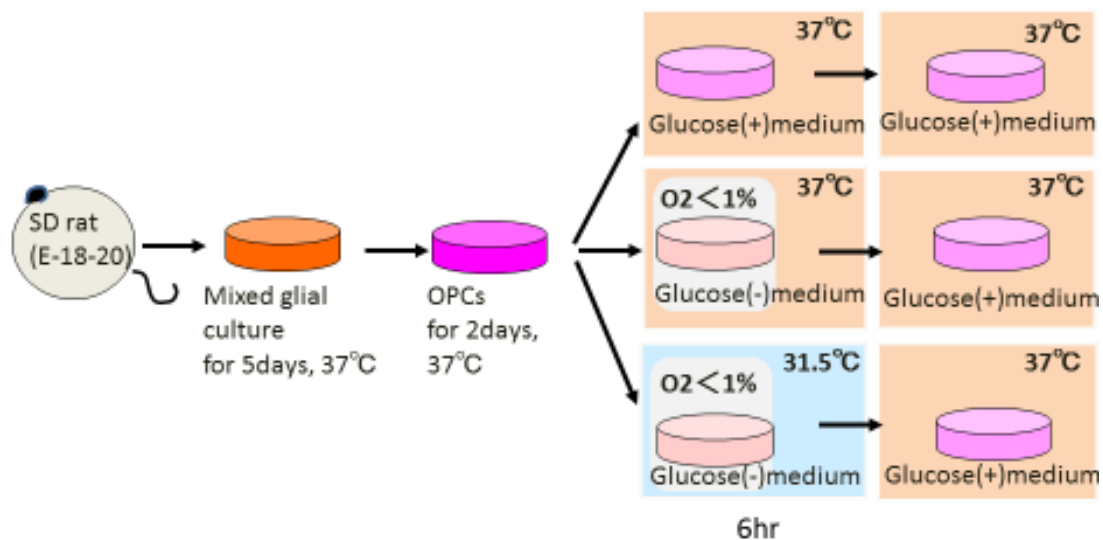


個の O4 陽性細胞中の cleaved caspase3 と二重染色されている細胞の割合を算出した。なお、蛍光画像は、共焦点顕微鏡 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) を用いて撮影した。

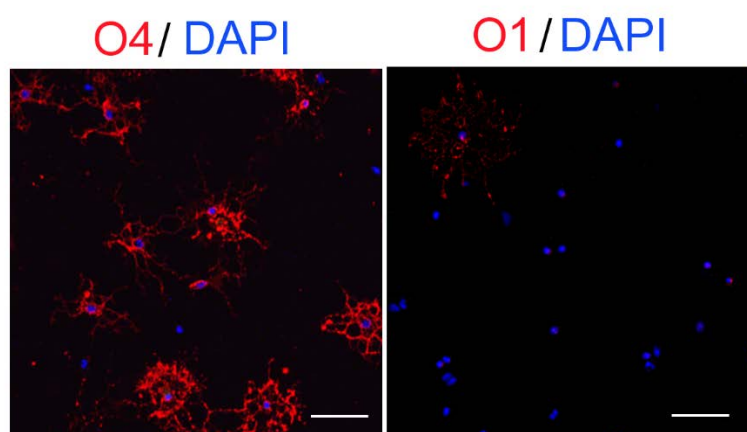
#### 脊髄後根神経節ニューロンとオリゴデンドロサイトの共培養系の作成

脊髄後根神経節 (Dorsal root ganglia; DRG) ニューロンを、P1 から 3 の SD ラットより採取し、collagenase/dispase (Roche Applied Science) と 0.05% DNase (Roche Applied Science) で酵素処理した。分離された細胞を 70 $\mu$ m 孔のフィルター (No.2350; Becton Dickinson) でろ過し、DMEM(+) を加え濃度  $3.2 \times 10^4/\text{ml}$  として懸濁し、6 時間の OGD 負荷をかけた直後の pre-OLs 培養系に加えた (図 3C)。

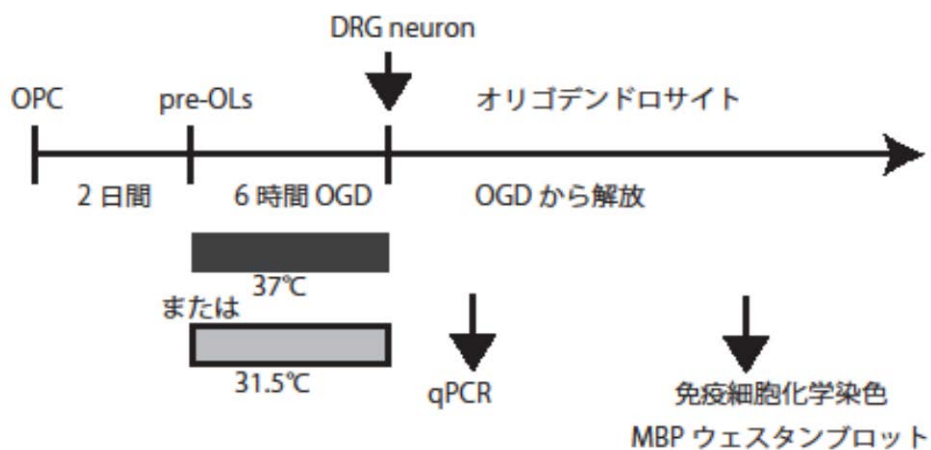
A



B



C



**図 3** in vitro 実験系

- (A) オリゴデンドロサイト前駆細胞を在胎 18 日目の SD ラット大脳半球より単離し、2 日間培養し、pre-OLs となった細胞に、常温あるいは低温下で 6 時間の OGD 負荷をかけた。OGD から解放し常温下で培養し、24 時間後に生死細胞判定とリン酸化 ERK レベルをウェスタンブロットで評価した。
- (B) オリゴデンドロサイト前駆細胞を単離してから 2 日間培養すると、86.7%の細胞が O4 陽性で O1 陰性である pre-OLs となった。Scale bar = 50  $\mu$  m。
- (C) 髄鞘化能を評価する実験では、OGD 負荷から解放した直後に DRG ニューロンを添加した。Pre-OLs は DRG ニューロンと共培養することで成熟したオリゴデンドロサイトへ分化した。

## 免疫組織化学染色

仔ラット (P6,7,11) を、イソフルランの過剰吸入により安楽死させ、まず生理食塩水を左心室から灌流させて血液を洗い流し、次に 4%パラホルムアルデヒドで灌流固定した。大脳を摘出し、4%パラホルムアルデヒドで固定し、30%スクロース液中に沈むまで置いて置換した。Anti-MBP (mouse monoclonal IgG2b, clone SMI-99; Covance, Princeton, NJ)、anti-O4 (mouse monoclonal IgM; R&D Systems, Mineapolis, MN)、anti-O1 (mouse monoclonal IgM; Millipore, Billerica, MA) 抗体での免疫組織化学染色においては、凍結切片を以下の手順で作成した。大脳を OCT compound (Sakura Finetek USA, Torrance, CA) によって保護して-80℃で凍結し、16µm の厚さで薄切した。背側海馬中部を含む大脳の前額断 (図 2B) における切片 を、10%ヤギ血清・1%ウシ血漿アルブミン (BSA) を含んだ PBS に室温で 1 時間浸透させることで、非特異的シグナルのブロッキングを行った。次に切片を Signal Stain antibody diluent (Cell Signaling) で希釈した anti-MBP 抗体 SMI-99 (1:800) に浸し、4℃で一晩かけ 1 次抗体反応を行った。最後に、Alexa Fluor 488 anti-mouse IgG 二次抗体 (1:800、Invitrogen, Carlsbad, CA) と室温で 1 時間反応させ、4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 入り封入剤 (Southern Biotech, Birmingham, AL) を用いて核染色及び封入をし、共焦点顕微鏡を用いて観察

を行った。各サンプルの実験条件を知らない検者が、MBP injury score を決定した。過去の報告[34]で用いられていた 6 段階評価を改変したスケールを用いた。すなわち左右の半球で比較して、対側に比べて頸動脈を結紮した側で、細胞突起も脳梁外包も完全に失われている場合を 5、細胞突起は失われているが外包が菲薄化している場合を 4、細胞突起は失われているが外包が保たれている場合を 3、細胞突起のみが中等度に失われている場合を 2、細胞突起のみが軽度に失われている場合を 1、差がない場合を 0 として判定を行った (図 4)。TUNEL 染色と抗リン酸化 ERK1/2 抗体での免疫組織化学染色には、其々 P7 と P11 のパラフィン切片を用いた。3,3'-Diaminobenzidine (DAB)(Nichirei、東京) によって発色反応を行い、マイヤーのヘマトキシリン溶液を用いて核染色を行った。光学顕微鏡を用いて観察し、400 倍の 5 視野での TUNEL 及びリン酸化 ERK1/2 陽性細胞数の合計を各条件で比較した。

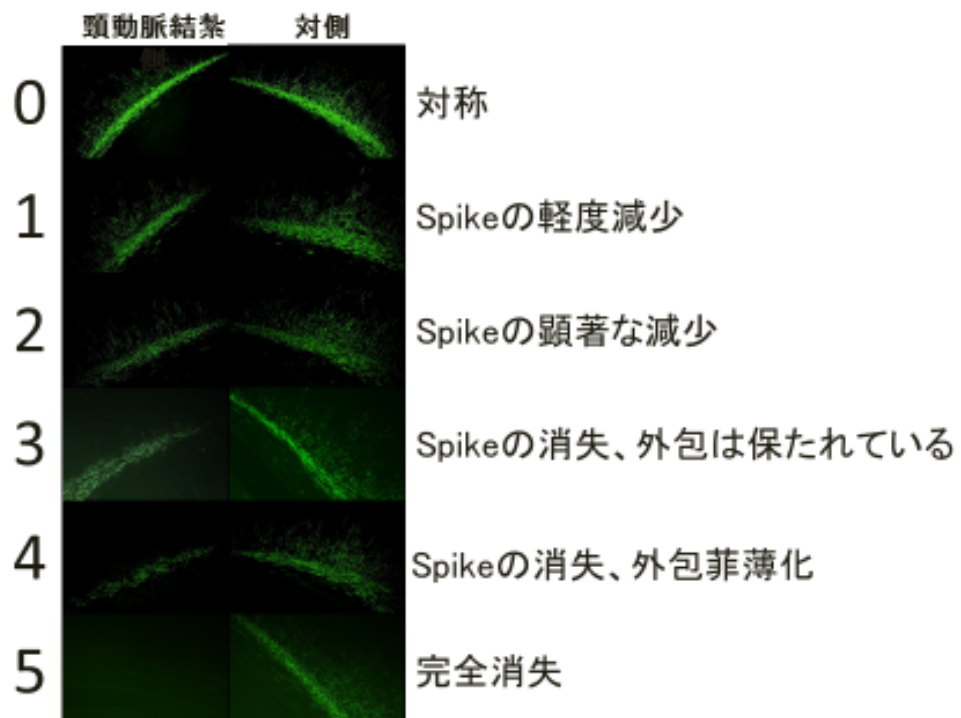


図 4 MBP injury score

## 免疫細胞化学染色

オリゴデンドロサイトと DRG ニューロンの共培養系を、anti-MBP (mouse monoclonal IgG2b, clone SMI-99)、anti-MAG (rabbit polyclonal: gift from Dr. Y. Matsuda, National Center for Neurology and Psychiatry, Tokyo) 抗体で二重染色を行った。培養細胞を 1mM 塩化カルシウム、0.5mM 塩化マグネシウムを加えた PBS で洗浄し、periodite-lysine-paraformaldehyde (PLP) 液で、室温で 15 分間固定した。次に 10%ヤギ血清を含む PBS に室温で 1 時間浸透させることで、非特異的シグナルのブロッキングを行った。そして anti-MBP (1:300)、anti-MAG (1:300) 抗体と室温で 2 時間インキュベートして、一次抗体反応を行った。さらに Alexa Fluor 488 anti-mouse IgG、Alexa Fluor 594 anti-rabbit IgG 二次抗体 (1:800、Invitrogen) と室温で 1 時間反応させた。MBP、MAG と神経線維のマーカーである neurofilament (NF) の三重染色においては、まず細胞を anti-MBP あるいは anti-MBP 21.5、18.5kDa アイソフォーム (mouse monoclonal IgG1; Borhringer Mannheim、Mannheim、Germany) 抗体と anti-MAG 抗体による二重染色を上記のように行い、Alexa Fluor 488 anti-mouse IgG、Alexa Fluor 405 anti-rabbit IgG 二次抗体 (1:800、Invitrogen) と反応させ、4%パラホルムアルデヒドで後固定を行った。Zenon Alexa Fluor 594 mouse IgG1 labeling kit (Molecular Probes、Invitrogen) で

予め二次抗体と結合させた anti-NF 抗体 (mouse monoclonal IgG1、Borhringer Mannheim、1:100) を 0.05% TritonX-100 で希釈して、細胞と反応させた。そして最後に Fluoromount-G (Southern Biotech) で封入し、共焦点顕微鏡で観察した。MBP がオリゴデンドロサイトの細胞内で、突起のどの程度遠位まで発現しているかを検討するために、共焦点顕微鏡を用いて、MBP と MAG の発現範囲の面積を計測し、MAG 発現範囲のうちで MBP が発現している割合を算出した。

#### ウェスタンブロット

In vivo ラット PVL モデルの脳サンプルを用いた解析においては、P14 仔ラットをイソフルラン過剰吸入により安楽死させ、脳を摘出し、背側海馬中部前額断切片を厚さ 3mm で切り出した。頸動脈を結紮した結紮側と対側に分けて、外包の最外側よりも頭側の部分を摘出し、液体窒素で凍結した。次に Tissue Lyser II (Qiagen, Valencia, CA) を用いて、SDS サンプルバッファーで粉砕し均質化した。また、in vitro での検討においては、接着細胞をプロテアーゼ阻害剤と脱リン酸化阻害剤を加えた RIPA バッファーで溶解した。オリゴデンドロサイト単一の培養系では、OGD 負荷後 24 時間で細胞を回収し、ERK1/2 リン酸化レベルを各条件で比較した。オリゴデンドロサイトと DRG ニューロンの共培養系では、OGD の 48 時間後に細胞を回収し、リン酸化 MBP の発現を各



条件で比較した。ウェスタンブロットは以下の手順で行った。サンプルを SDS-PAGE で電気泳動し、PVDF 膜 (Millipore) に転写した。5%スキムミルクを含んだ TBS で、室温で 30 分間ブロッキングし、4°Cで一晩かけて一次抗体反応を行った。ここで使用した一次抗体は、anti-ERK (rabbit polyclonal; Cell Signaling)、anti-phosphorylated ERK (p-ERK; rabbit polyclonal; Cell Signaling)、anti-MBP (rabbit polyclonal, prepared in our laboratory) for total MBP immunoblotting[43]、anti-phosphorylated MBP (p-MBP; mouse monoclonal; Millipore)、anti- $\beta$ -actin (mouse monoclonal; Sigma Aldrich、St.Louis、MO、USA)、anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (rabbit polyclonal; Santa Cruz、CA、USA) である。一次抗体反応後、PVDF 膜を 1%スキムミルク含有 TBS で洗浄し、alkaline phosphatase と結合した二次抗体 (anti-mouse IgG and anti-rabbit IgG) (Sigma Aldrich) と室温で 2 時間反応させた。最後に developing バッファーにより発色し、Chemi Doc XRS+ with Image Lab Software (Bio-Rad Laboratories、Hercules、CA、USA) で撮影し定量化した。

### **Real-Time RT-PCR**

オリゴデンドロサイトと DRG ニューロン共培養系から、OGD 後 18 時間の時点で、RNeasy mini kit (Qiagen) を用いて、RNA を抽出した。RNA を、

ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (Toyobo、東京) を用いて cDNA に逆転写した。Polymerase chain reaction (PCR) は、Thunderbird Syber qPCR mix または Thunderbird Probe qPCR mix を用いて、 TaKaRa Thermal Cycler Dice (TaKaRa、滋賀) により行った。ラット GAPDH 遺伝子をハウスキーピング遺伝子として用いた。用いたプライマーの塩基配列は以下の通りである。rat Olig2 forward、 5\_-TCCTCCAGCACCTCCTCGTC-3\_ and reverse、 5\_-GTGACCCCCGTAATCTCGC-3\_ [44]、 rat GAPDH forward、 5\_- CAACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3\_ and reverse 、 5\_-GGCATGGACTGTGGTCATGA-3\_ [45] 、 rat Sirt2 forward 、 5\_-ATCAGCAAGGCACCACTAGC-3\_ and reverse 、 5\_-GAGTCAAAATCCATGCCGCC -3\_ 、 rat Yy1 forward 、 5\_-GCCCTTTCAGTGCACATTCG -3\_ and reverse 、 5\_-CTCCGGTATGGATTCGCACA-3\_。TaqMa プロローベとプライマーは、以下の通りである。rat MBP exon2-containing splicing variants (Rn01399616\_m1)、 rat MBPexon2-containing splicing variants (Rn 00690341\_m1)、 rat Ddx54 (Rn 01480520\_m1) (Applied Biosystems、 CA)。

#### **DNA マイクロアレイ解析**

E15 マウス胎児より得られた OPC を 31.5°C と 37°C にて 48 時間培養した後、

RNA を抽出した。これを 4 個体で行い、Gene Chip® Mouse Genome 430 2.0 Array (プローブセット数 : 45,101) (Affymetrics, Santa Clara, CA) にて解析を行い、遺伝子発現の変動を調べた。31.5°C群 (E; experiment) と 37°C群 (B; base) 群間で変動のある遺伝子を抽出するため、フィルタリングで得られたプローブセットを用いて、統計検定 SAM (significance analysis of microarray) を行った。paired-t test を改良した対応あるサンプルに適用すべき統計量を使用した。統計検定結果から、多重性を考慮し FDR: False Discovery Rate < 0.05 を満たす有意に変動が認められたプローブセットを抽出した。

#### レポーターアッセイを用いた MBP 転写活性の解析

Ddx54 をコードする cDNA は、RIKEN Fantom Clone (RIKEN Genomic Science Center、横浜) から入手し、pCMV-FLAG (Stratagene、Santa Clara、CA)ベクターにサブクローニングした[46]。レポータープラスミドである pMBP-Luc は、マウス MBP の 5'プロモーター領域の 2027 塩基配列を、pGL4.10-Luc2 ベクター (Promega) の HindIII/HindIIIサイトに挿入して作成した。レポーターアッセイには、以下の 3 種類の細胞を用いた。NIH3T3 細胞は、10%FBS を含む DMEM (low glucose)(Invitrogen) を用いて、培養した。マウス神経芽細胞腫とラット神経膠腫の hybrid である、NG108-15 細胞は、10%FBS を含む DMEM (high glucose)(Invitrogen) に HAT supplement

(Invitrogen) を加えた培養液中で培養した。オリゴデンドロサイト前駆細胞の細胞株として使用されている FBD-102b 細胞[47, 48]は、10%FBS を含む DMEM/F12 (Invitrogen) を用いて、培養した。各細胞を 12well ディッシュ (Greiner Bio-one、Frickenhausen、Germany) に、其々  $7.5 \times 10^4$  cells/dish、 $1.0 \times 10^5$  cells/dish、 $1.3 \times 10^5$  cells/dish の濃度でまいた。なお、FBD-b12 細胞については、予め PLL コートした 12well ディッシュを用いた。12well ディッシュで培養し 24 時間後に 90%コンフルエントとなった細胞に、Lipofectamine2000 (Life technologies、Gaithersburg、MD) を用いて、レポータープラスミド、Ddx54 を含むプラスミドあるいはその空ベクター、トランスフェクション効率を均一化するコントロールとして Renilla luciferase を含むプラスミドをリポフェクション法でトランスフェクションした。NIH-3T3 細胞と NG 細胞についてはトランスフェクション後 24 時間時点で、FBD-b12 細胞についてはトランスフェクション後 60 時間時点で、細胞を passive lysis buffer に溶解し、 $-80^{\circ}\text{C}$  でサンプルを保管した。トランスフェクションした細胞は、Dual-Luciferase Reporter Assay system (Promega、Madison、WI) を用いて、firefly と Renilla luciferase 活性を測定した。

### 統計解析

統計解析は、GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software、San Diego、

CA) を用いて行った。データは平均値±標準誤差で表示した。MBP のウェスタンブロットデータ (図 6) は、Mann-Whitney U test を用いて解析した。他の比較に関しては、one-way ANOVA と Tukey's post-hoc multiple comparison test (図 7、8、9、13、14、15、17) または Dunnet's multiple comparison test (図 6, 16)、student's t-test (図 18) を用いて行った。P<0.05 を有意と見做した。

## 結果

低温は、低酸素虚血負荷による白質障害を軽減した

P6 SD ラットの左頸動脈を結紮し、6%酸素下に1時間置くことにより、P11の時点で肉眼的には左右半球に差のないことを、ヘマトキシリン・エオジン染色で確認した(図 5A 上段)。低酸素虚血負荷後のオリゴデンドロサイトの分化を評価するために、MBP がマーカーとして使用されている[35]。常温で低酸素負荷をかけた群では、頸動脈結紮側で結紮していない側に比べて、有意に MBP の発現が低下していることが、免疫組織学染色により確認された。低酸素中に低温にすることにより、頸動脈結紮側での MBP 低下を有意に抑制することができた ( $P < 0.05$ ; 図 5A、B)。

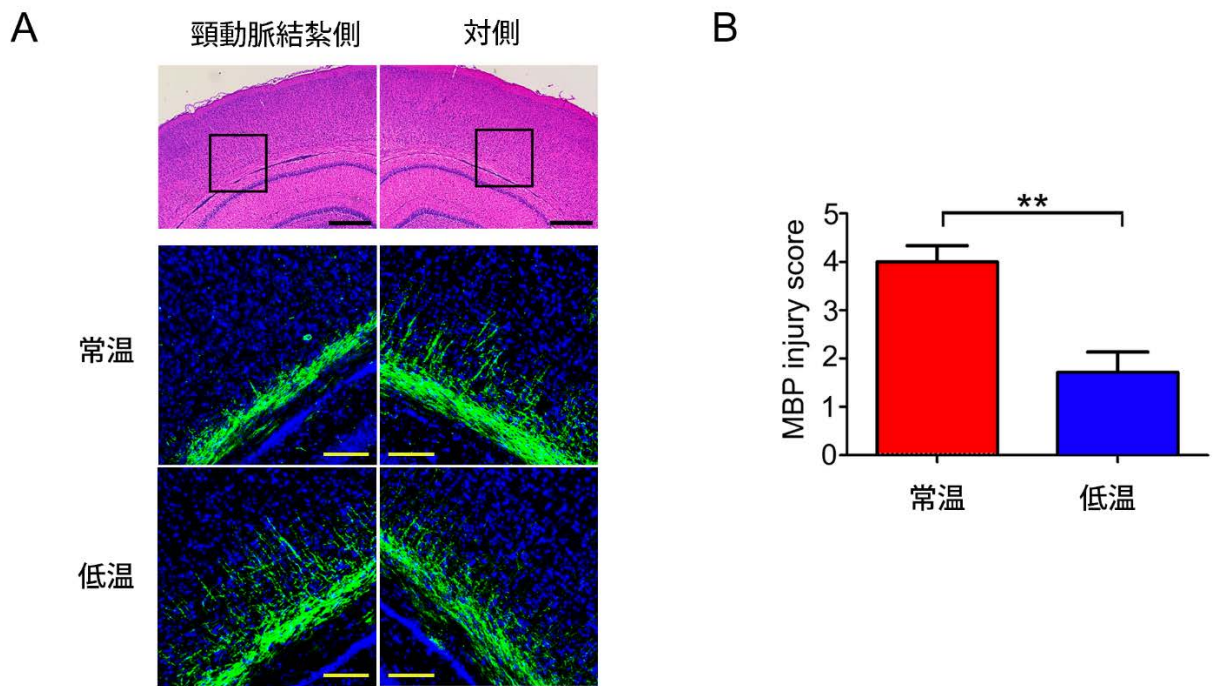


図5 ラット PVL モデルにおける MBP 免疫組織染色

(A)(上段) HE 染色で示すように、頸動脈結紮側でも、大脳半球に肉眼的な損傷は認めなかった。Scale bar = 500  $\mu$  m。

(中、下段) 脳室周囲白質を、anti-MBP 抗体 (緑)、DAPI (青) で染色した。低温は、頸動脈結紮側での MBP 減少を抑制した。Scale bar = 100  $\mu$  m。

(B) MBP injury score は、低温により有意に低下した。常温群 n=10、低温群 n=7。各群の数値は、平均値±標準偏差を表している。\*\*P<0.01。

低温は、*in vivo* PVL モデルにおいて、17 と 21.5kDa リン酸化 MBP を有意に維持した

MBP には、RNA スプライシングの違いにより、14、17、18.5、21.5kDa の主なアイソフォームがある (図 6A) [49]。18.5kDa の MBP は、成熟した髄鞘に豊富に存在し、その構造維持を担っている[50]一方で、17 と 21.5kDa の MBP は、発達段階の脳に多く存在することが報告されている[51]。しかし、17 と 21.5kDa MBP の、周産期脳障害という病的な環境における意味は解明されていない。また、MBP は髄鞘形成の前あるいは最中にリン酸化を受け、全 MBP 蛋白の中のリン酸化レベルは発達と共に変化するとされている[49]。

低酸素虚血負荷によりどのアイソフォームの MBP が障害を受け、低温により救済されるのか検討するために、頸動脈結紮側と結紮していない側の脳を、常温群と低温群でウェスタンブロットにより比較した (図 6 B、C)。なお、げっ歯類の中樞神経において、*exon5* を含まない約 20kDa のアイソフォームが検出されることがあるとされており[52]、本実験のウェスタンブロットでもわずかに検出されたが、変動の有無の解析は positive control (Myelin Basic Protein (Alexis Biochemicals, San Diego, CA)) と一致する主な四つのアイソフォームに関して行った。また、サンプルの抽出部位を均一化するために、方法で記載した脳半球全体を使用した。少なくとも P11 では MBP 発現が脳室周囲白



質に限局されていた (図 5) ことから、P14 でも主に脳室周囲白質での MBP 発現の各群間比較が可能であったと考えられる。

常温群でも低温群でも、全 MBP 蛋白発現量は、頸動脈結紮側で減少を認めなかった。しかし、常温群では、リン酸化 MBP の全てのアイソフォームで、頸動脈結紮側での減少を認めた。低温群では常温群に比べて、14、21.5 と特に 17kDa のリン酸化 MBP が頸動脈結紮側で増加していた。14 と 18.5kDa の全 MBP が、低温の頸動脈結紮側で増加していた。

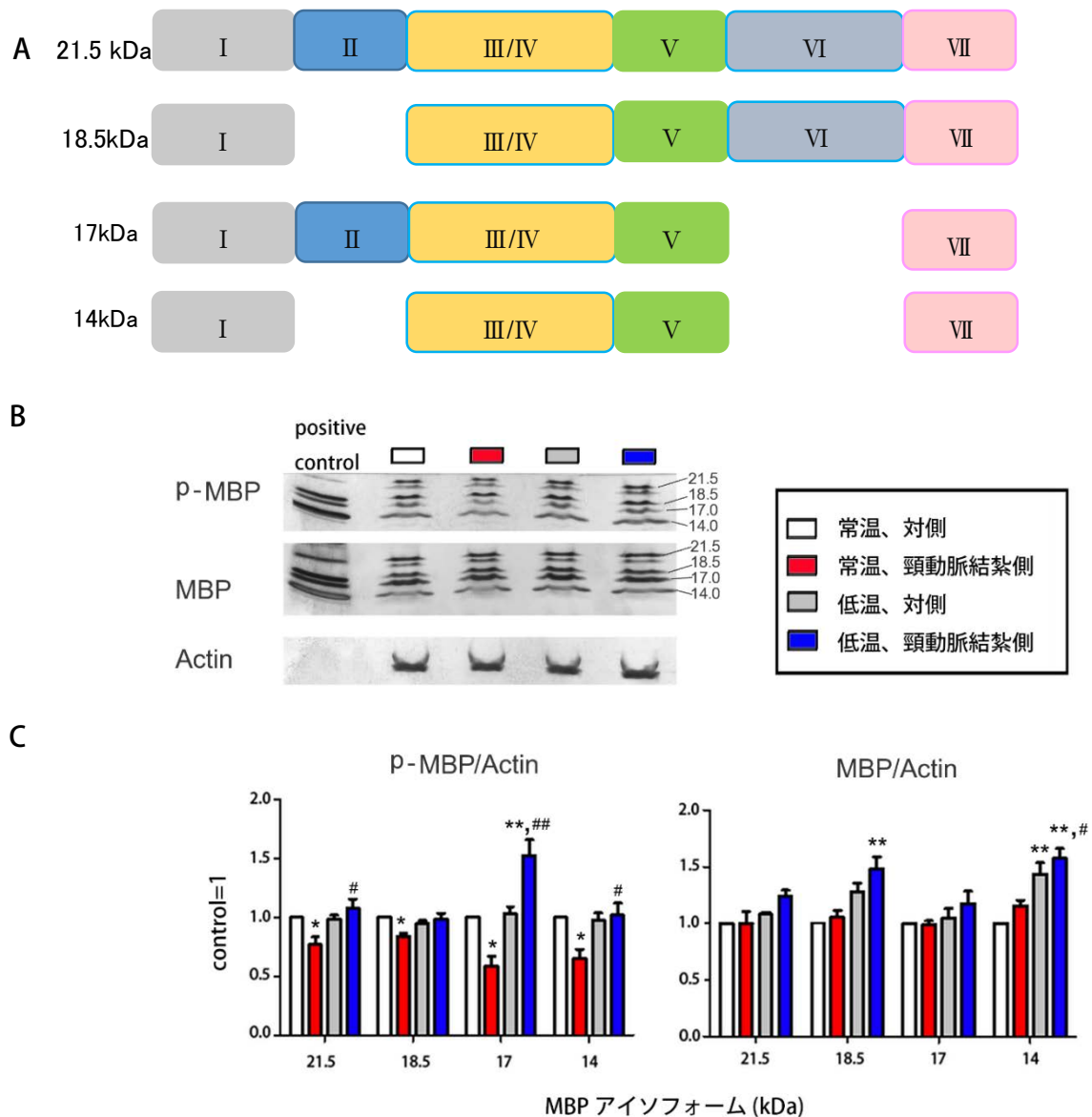


図6 P14ラット大脳半球の、抗MBP、抗リン酸化MBP抗体によるウェスタンブロット

(A) MBP遺伝子は、exon I～VIIを含み、そのスプライシングバリエーションにより、4つのアイソフォームを産生する。17と21.5kDaアイソフォームは、exon IIを含む。

(B) ラットPVLモデルにおけるウェスタンブロット画像。

(C) 各群のバンド濃度を定量化し、常温対側を1として比較したグラフ。

Actinを内部標準として用いた。常温群頸動脈結紮側では、14、21.5、特に17kDaリン酸化MBPが減少したが、低温群では維持されていた。結果は、各群3検体の平均値±標準偏差を表示した。\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$  vs 常温群対側。# $P < 0.05$ 、## $P < 0.01$  vs 常温群頸動脈結紮側。

## 低温は脳室周囲白質においてアポトーシスを抑制した

低温によるアポトーシス抑制効果を明らかにするために、低酸素虚血負荷の24時間後の、TUNEL陽性細胞数について検討を行った。頸動脈結紮側では、常温群で優位にTUNEL陽性細胞の増加を認め、低温群ではその増加が抑制されていた(図7)。

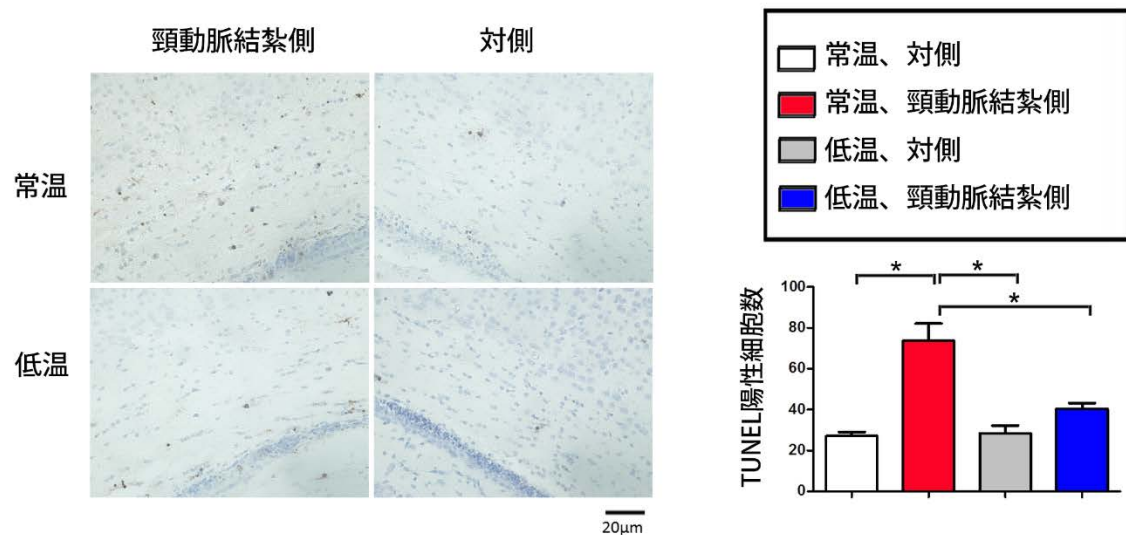
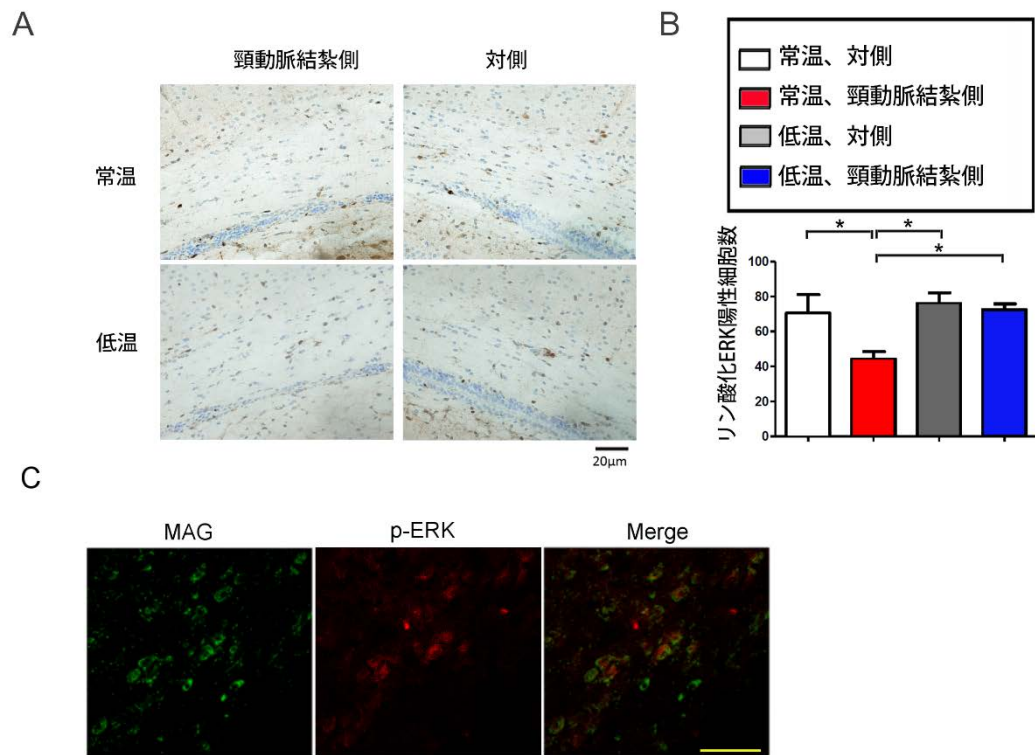


図7 PVLモデルでのTUNEL染色

低酸素虚血負荷後24時間の時点で、脳室周囲白質にTUNEL染色を行った。各条件400倍視野で、5視野のTUNEL陽性細胞数の合計を比較した。常温群、低温群ともn=4。\*P<0.05。Scale bar = 20 μm。

### 低温はオリゴデンドロサイトの ERK1/2 リン酸化レベルを維持した

MBP のリン酸化は、幾つかの蛋白リン酸化酵素による影響を受けるが、その中でも ERK は、オリゴデンドロサイトの増殖、生存、分化において、特に重要である[49]。低酸素虚血負荷の 5 日後に、脳室周囲白質における ERK リン酸化レベルを検討した。常温群では、頸動脈結紮側で、有意にリン酸化 ERK 陽性細胞の減少を認めたが、低温群ではその減少が抑制されていた (図 8A、B)。なお、ほとんどのリン酸化 ERK 陽性細胞は、オリゴデンドロサイトのマーカーである MAG と二重染色されたことから、オリゴデンドロサイトであると確認した (図 8C)。



**図 8** PVL モデルでのリン酸化 ERK 染色

- (A) 低酸素虚血負荷 5 日後の、脳室周囲白質の抗リン酸化 ERK 抗体による免疫組織染色。Scale bar = 20  $\mu$  m。
- (B) 各条件 400 倍視野で、5 視野のリン酸化 ERK 陽性細胞数の合計を比較した。常温群、低温群とも n=4。\*P<0.05。リン酸化 ERK 陽性細胞は、常温群頸動脈結紮側で有意に減少し、低温群では維持されていた。
- (C) リン酸化 ERK 陽性細胞は、オリゴデンドロサイトのマーカーである MAG でも染色された。Scale bar = 50  $\mu$  m。

**低温は、in vitro で pre-OLs のアポトーシスを抑制した**

低温によるオリゴデンドロサイトの保護効果について、さらにその機序について検討を進めるために、pre-OLs 初代培養系に常温あるいは低温下で OGD 負荷をかけた。細胞は O4 陽性、O1 陰性の pre-OLs で主に構成されるようになるまで、BS メディウム中で 2 日間培養した (図 3)。常温下で OGD をかけると、TUNEL 陽性細胞数は有意に増加し、低温下であると常温に比して TUNEL 陽性細胞が減少した (図 9A)。Cleaved caspase3 陽性細胞数も、常温下の OGD により有意に増加し、低温下ではその増加が抑制された (図 9B)。生存細胞数は、常温下の OGD により有意に減少し、低温によりその減少が抑制された (図 9C)。これらの結果から、低温は pre-OLs に対して、直接、アポトーシス抑制効果を持つことが示唆された。

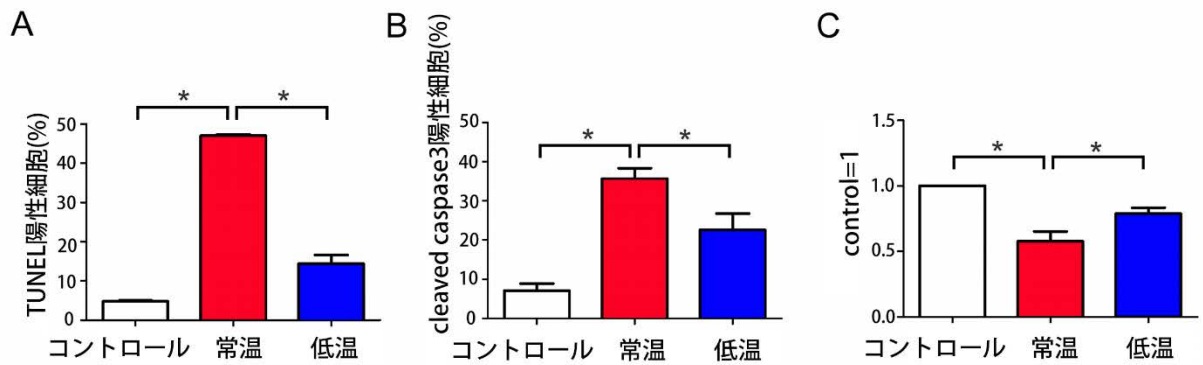


図9 オリゴデンドロサイト初代培養系での、常温あるいは低温下における OGD 負荷による生死細胞の比較

低温により、OGD 負荷によるアポトーシスが抑制された。

(A) 100 個の DAPI 陽性細胞数あたりの、TUNEL 陽性細胞数を比較した。n=3。

(B) 100 個の O4 陽性細胞数あたりの、cleaved caspase3 陽性細胞数を比較した。  
n=4。

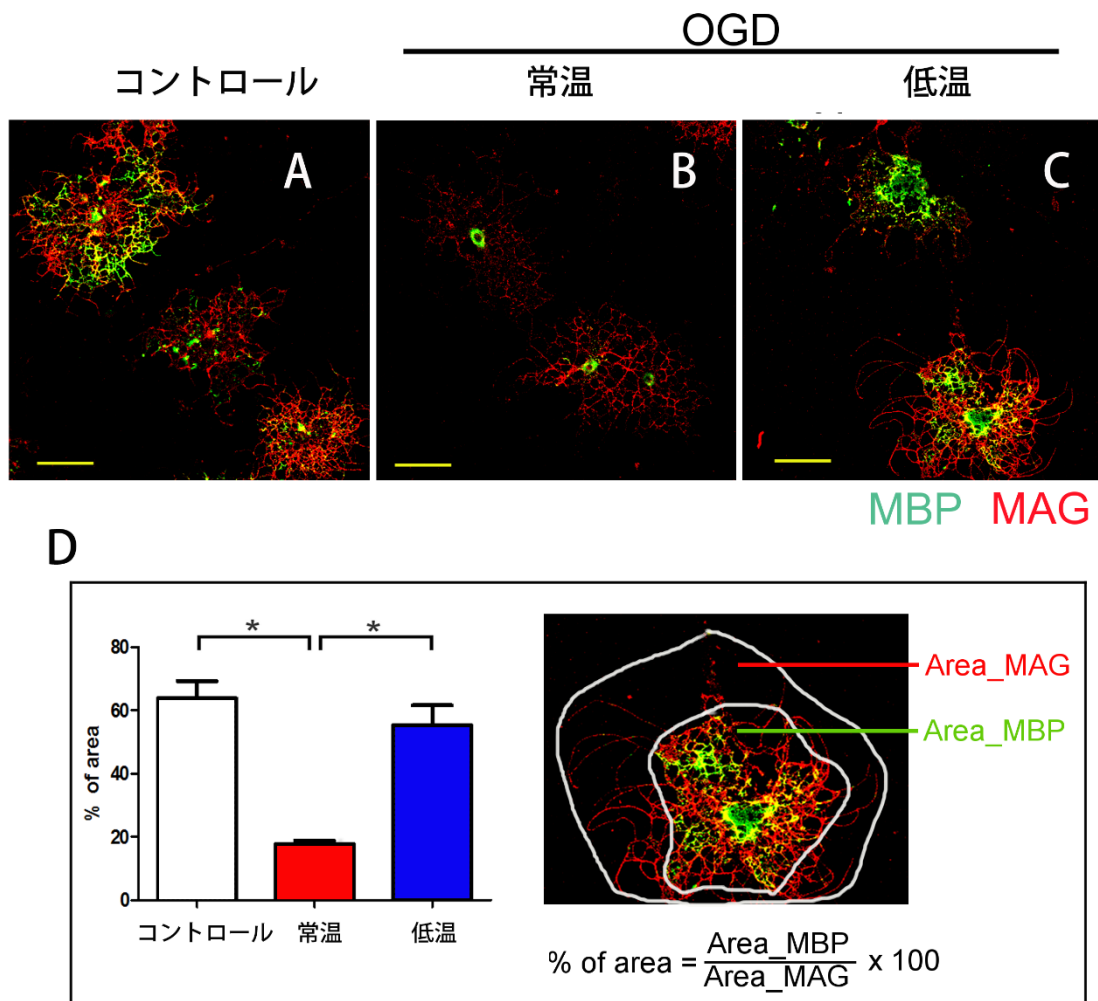
(C) 無作為に選択した 5 視野での、calcein AM で染色された生細胞数を比較した。  
n=4。

いずれも、OGD 負荷をかけずに常温で培養したコントロールと比較し、各群の平均値±標準偏差を表示した。\*P<0.05。

低温は、MBP の細胞内分布を細胞突起まで維持した

MBP の mRNA は、Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) などにより、オリゴデンドロサイトの細胞突起まで運搬されてから、翻訳を受ける[53, 54]。そこで、オリゴデンドロサイト内での MBP の分布を検討するために、オリゴデンドロサイトと DRG ニューロン共培養系において、MBP と MAG の二重染色を行った (図 10)。オリゴデンドロサイトと DRG ニューロンの共培養系は、髄鞘形成のモデルとして用いられている[55-57]。オリゴデンドロサイトは DRG ニューロンと共培養することにより、未分化なオリゴデンドロサイトから、分化した髄鞘を形成するオリゴデンドロサイトへと速やかへ分化する。OGD 負荷を受けていない細胞では、MBP は細胞突起の末端まで発現を認めた (図 10A)。常温下で OGD 負荷を受けた細胞では、MBP は細胞体の周辺に発現が局限していた (図 10B)。しかし、低温下で OGD 負荷を受けた場合は、MBP の分布が OGD 負荷を受けない場合と同程度まで維持されていた (図 10C)。MAG が分布する面積中の、MBP が分布する面積の割合を定量化すると、有意差を認めた (図 10D)。これらの結果により、OGD によって MBP の運搬に障害が生じ、それは低温により改善されることが示された。





**図 10** オリゴデンドロサイト・DRG ニューロン共培養系での、MBP のオリゴデンドロサイト細胞内分布  
 抗 MAG(赤)、抗 MBP(緑)抗体での二重染色。(A) OGD 負荷を受けていないコントロールでは、MBP は細胞突起の先端まで分布していた。(B) 常温下で OGD 負荷を受けた細胞は、MBP は細胞体の周囲に留まっていた。(C) 低温下で OGD を受け、常温に戻した細胞は、(B) と比して細胞突起近くまで MBP が分布していた。(D) 各条件 3 検体で、MAG で染色される範囲のうち、MBP でも染色される範囲の割合を比較した。\*P<0.05。Scale bar = 50 μ m。

**21.5kDa MBP** は、オリゴデンドロサイトと **DRG** ニューロン共培養系において、**髄鞘形成の初期段階でリン酸化を受けた**

オリゴデンドロサイトは分化・成熟して髄鞘を構成する種々の蛋白を発現することは知られているが、髄鞘形成開始のきっかけとなる現象は解明されていない。ウェスタンブロットの結果、共培養を開始し 2-4 日目では、リン酸化 MBP のうち、**21.5kDa** リン酸化 MBP が主体であり (図 11A)、3-4 日目には全 MBP のうち **14** と **18.5kDa** MBP が多い (図 11B) ことがわかった。特に、髄鞘形成の初期段階と考えられる 2 日目には、リン酸化 MBP のうち **21.5kDa** のみが検出可能であった。これらの結果から、**21.5kDa** MBP は髄鞘形成の開始段階において重要な役割を持っている可能性が示唆された。リン酸化 MBP 抗体は免疫細胞染色に適さなかったため、**MBP 21.5** と **18.5kDa** アイソフォームのみを識別する抗体 (mouse monoclonal IgG1; Borhringer Mannheim)[43]を使用して、**21.5kDa** MBP の分布について検討を行った。すべてのアイソフォームに対する抗体と、**18.5kDa** と **21.5kDa** のアイソフォームのみを識別する抗体では、同じ染色パターンを示したため (図 11C)、**21.5kDa** MBP は、細胞体だけでなく、軸索との接点となる細胞突起の先端にも発現していることが示唆された。

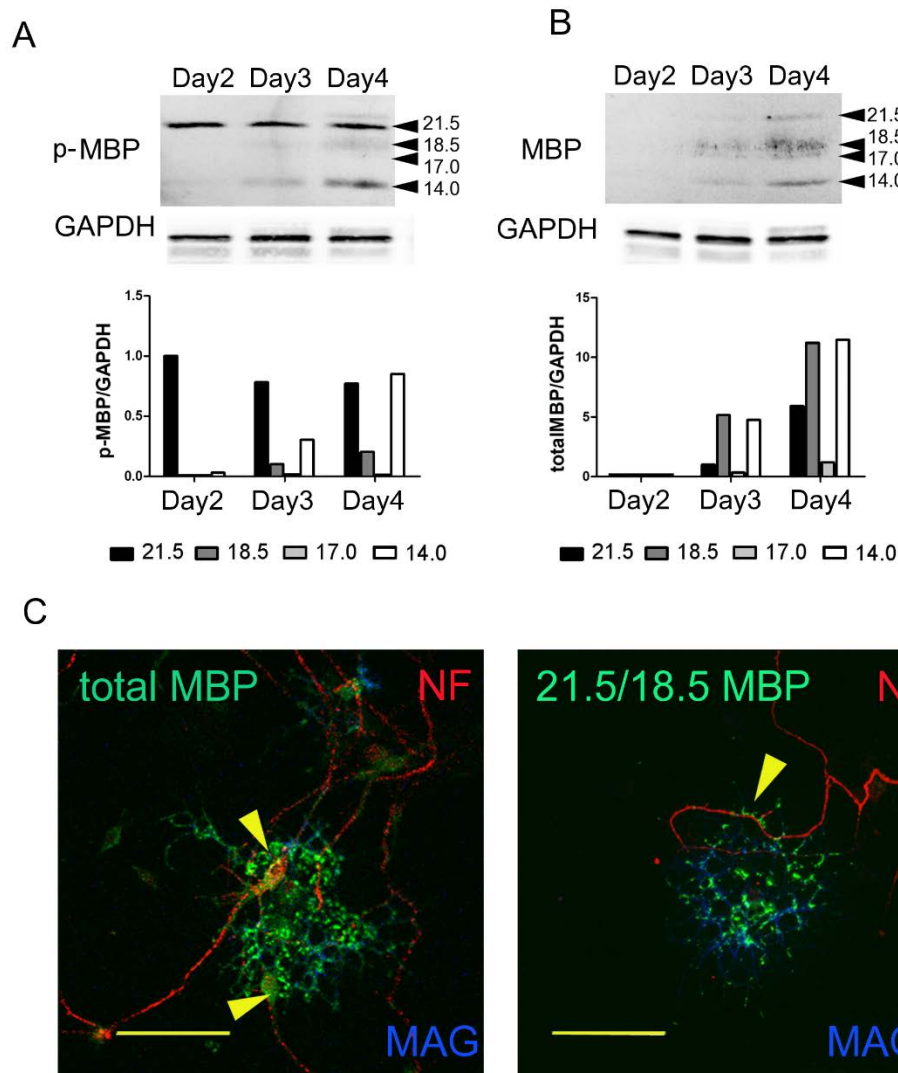


図 11 オリゴデンドロサイト・DRG ニューロン共培養系での、抗リン酸化 MBP 及び抗 MBP 抗体による、ウェスタンブロットと免疫細胞染色

(A) 共培養を開始して、2-4 日目の間、21.5kDa リン酸化 MBP は最初に検出され、4 日目までリン酸化 MBP の中で最も強く検出された。

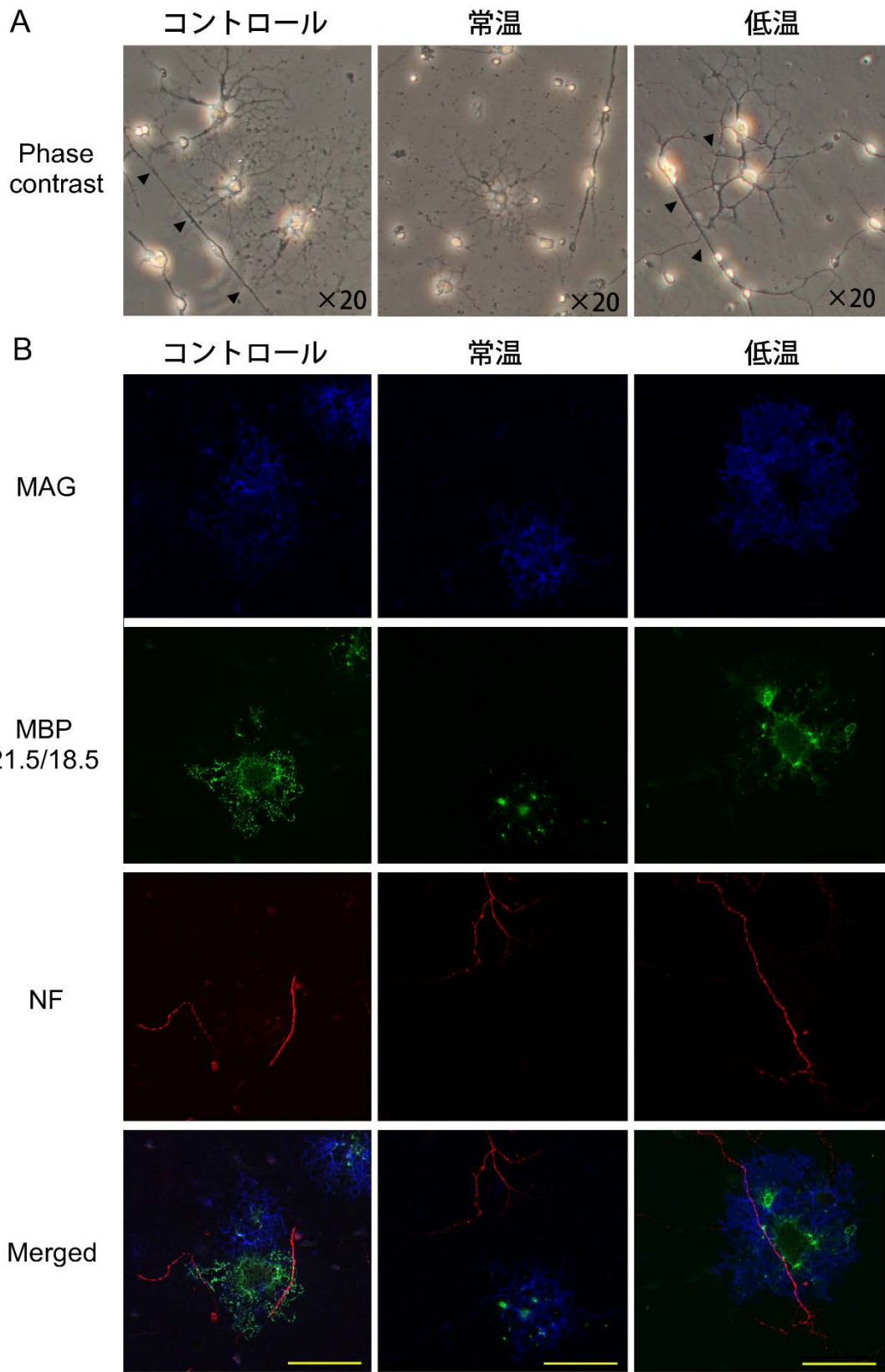
(B) 全 MBP については、18.5 と 14kDa MBP の方が多く検出された。

(A)、(B)において、GAPDH を内部標準として使用した。

(C) 抗 MAG(青)、抗 MBP(緑)、抗 NF(赤)抗体による三重染色。全 MBP 及び 21.5 と 18.5kDa MBP に対する抗体で検出される MBP は、オリゴデンドロサイトの細胞突起末端まで分布し、矢印で示す部分で、ニューロンと接触していた。Scale bar = 50  $\mu$  m。

低温は、オリゴデンドロサイトの、ニューロンとの接触能を OGD 負荷から保護した

軸索周囲に髄鞘を形成する能力（髄鞘形成能：ミエリン化）について、OGD 負荷と低温による影響を調べるために、オリゴデンドロサイトと DRG ニューロン共培養系において、オリゴデンドロサイトと DRG ニューロンを同時に、免疫細胞染色を行った。なお、DRG ニューロンは同じ培養で単離した細胞を、各条件のオリゴデンドロサイトに添加したため、各条件の結果の相違は、オリゴデンドロサイトの性質の違いに起因すると考えることができる。OGD 負荷をかけない場合、オリゴデンドロサイトは DRG ニューロンと接触した（図 12 左）。常温で OGD 負荷をかけた場合、オリゴデンドロサイトは MBP を発現したものの、DRG ニューロンとの接触をほとんど認めなかった（図 12 中）。オリゴデンドロサイトが低温下で OGD 負荷を受け、常温に戻された場合、DRG ニューロンとの接触は OGD 負荷を受けなかった場合とほぼ同程度に維持されていた（図 12 右）。この結果から、低温は *in vitro* において、オリゴデンドロサイトの髄鞘形成能を維持し、ニューロンとオリゴデンドロサイトの細胞間コミュニケーションを確立させていることが示された。



**図 12** 常温あるいは低温で OGD 負荷をかけたオリゴデンドロサイトと、DRG ニューロンの共培養における、抗 MBP 21.5・18.5kDa、MAG、NF 抗体による三重染色

(A) 明視野での観察で、OGD を受けていないコントロールと、低温下で OGD を受けたオリゴデンドロサイトは、ニューロンと接触している(矢印)が、常温下で OGD を受けた細胞はニューロンと接触していなかった。

(B) 抗 MBP 21.5・18.5kDa(緑)、MAG(青)、NF(赤)抗体での三重染色では、OGD を受けていないコントロールと、低温下で OGD を受けたオリゴデンドロサイトに発現する MBP は NF と接しているが、常温下で OGD を受けた細胞では MBP と NF の接触は認められなかった。

3 回の培養系で同じ傾向を確認した。画像が 200 倍視野で取得した。定量結果は、図 15 に記載した。Scale bar = 50  $\mu$  m。

## 低温は ERK リン酸化レベルを維持した

Pre-OLs 培養系において、OGD と低温が ERK リン酸化レベルに与える影響を検討するために、total ERK1/2 と ERK1/2 リン酸化抗体を用いて、ウェスタンブロットを行った。常温下で OGD 負荷をかけると、ERK1/2 リン酸化レベルは有意に減少し、低温下で OGD 負荷をかけると ERK1/2 リン酸化レベルは、OGD 負荷をかけていないコントロールと同程度に維持されていた (図 13)。この結果から、低温によるオリゴデンドロサイトの保護効果に ERK1/2 リン酸化が関与している可能性が示唆された。

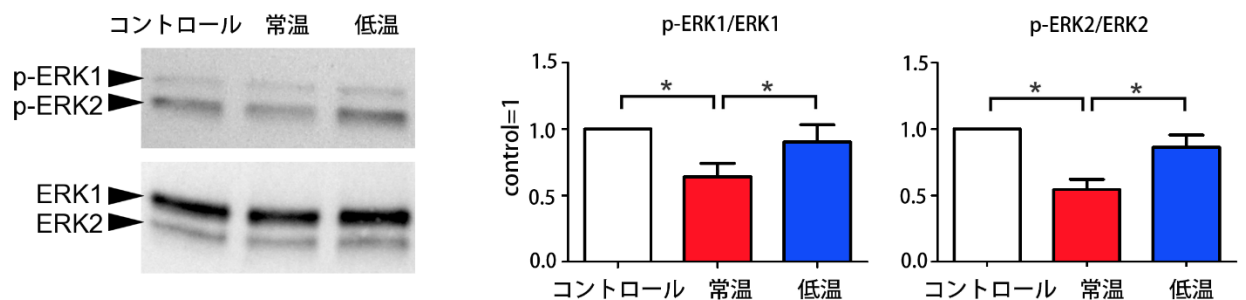


図 13 オリゴデンドロサイト培養系での抗 ERK1/2、抗リン酸化 ERK1/2 抗体によるウェスタンブロット

常温下で OGD を受けたオリゴデンドロサイトは、ERK1/2 リン酸化レベルが低下し、低温下で OGD を受けた細胞では維持されていた。OGD を受けていない細胞をコントロールとして、定量化したバンドの濃度を比較した。n=6。データは、平均値±標準偏差を表示した。\*P<0.05。

低温によりアポトーシス抑制効果には、**ERK1/2** リン酸化が関与していた

Pre-OLs のアポトーシスにおける **ERK1/2** リン酸化の関与を調べた。MEK 阻害剤の U0126 を、pre-OLs に、OGD 負荷の前あるいは後に添加した。U0126 によって **ERK1/2** リン酸化が抑制されていることをウェスタンブロットで確認した (図 14A)。OGD 負荷前に U0126 を添加すると、低温下で OGD をかけた場合に、TUNEL 陽性細胞の割合が有意に増加した (図 14B)。一方で、OGD 負荷後に U0126 を添加しても、低温下で OGD をかけた場合の TUNEL 陽性細胞の割合に変化は認められなかった。これらの結果から、**ERK1/2** リン酸化は、OGD 負荷中の低温によるアポトーシス抑制効果に関与していることが示唆された。



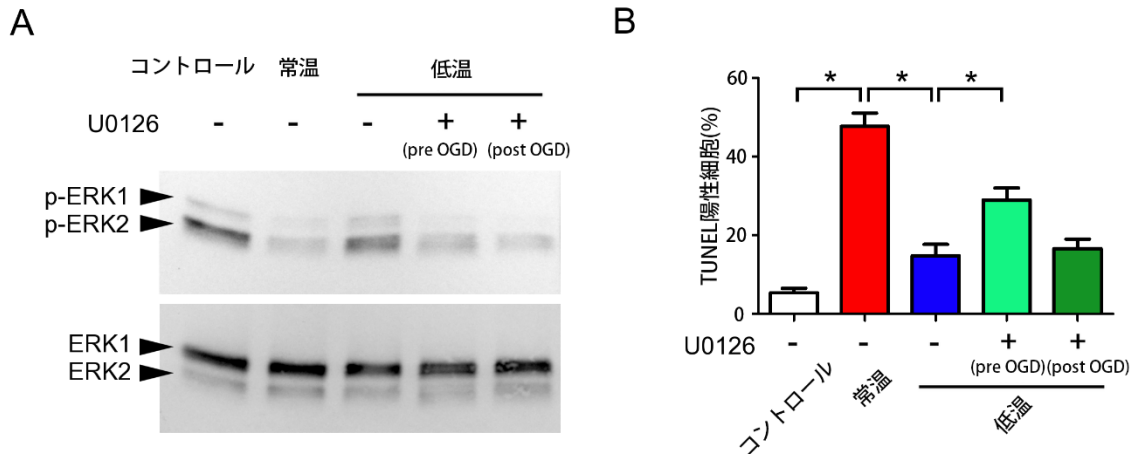


図 14 ERK1/2 リン酸化のアポトーシスへの影響

- (A) OGD 負荷の前後に MEK 阻害剤の U0126 を  $10\mu\text{M}$  添加すると、いずれでも、ERK1/2 リン酸化レベルが抑制されることを確認した。
- (B) 各条件 100 個の DAPI 陽性細胞のうちの、TUNEL 陽性細胞の割合を算出した。OGD 前に U0126 を加えると、低温のアポトーシス抑制効果は有意に減少した。n=5。データは平均値±標準偏差を表示した。\*P<0.05。

低温の、オリゴデンドロサイトのニューロンとの接触能維持効果には、

### **ERK1/2 リン酸化が関与していた**

OGD 負荷後の髄鞘形成における、ERK1/2 リン酸化の関与を検討するために、OGD 負荷後に U0126 を加えた pre-OLs 培養系に、DRG ニューロンを添加して検討を行った。低温下で OGD 負荷をかけたオリゴデンドロサイトは、U0126 添加によって、DRG ニューロンとの接触が阻害された (図 12 右、図 15A)。ウェスタンブロットでは、常温下で OGD 負荷をかけると、21.5kDa リン酸化 MBP が有意に減少することが示された (図 15B)。低温下で OGD 負荷をかけると、21.5kDa リン酸化 MBP は、OGD 負荷をかけない場合と同程度に維持された。しかし、低温下で OGD 負荷をかけた後に U0126 を添加すると、21.5kDa リン酸化 MBP は有意に減少した。このことから、OGD 負荷から解放した後の時期においては、ERK1/2 リン酸化は髄鞘形成能に関与していることが示された。

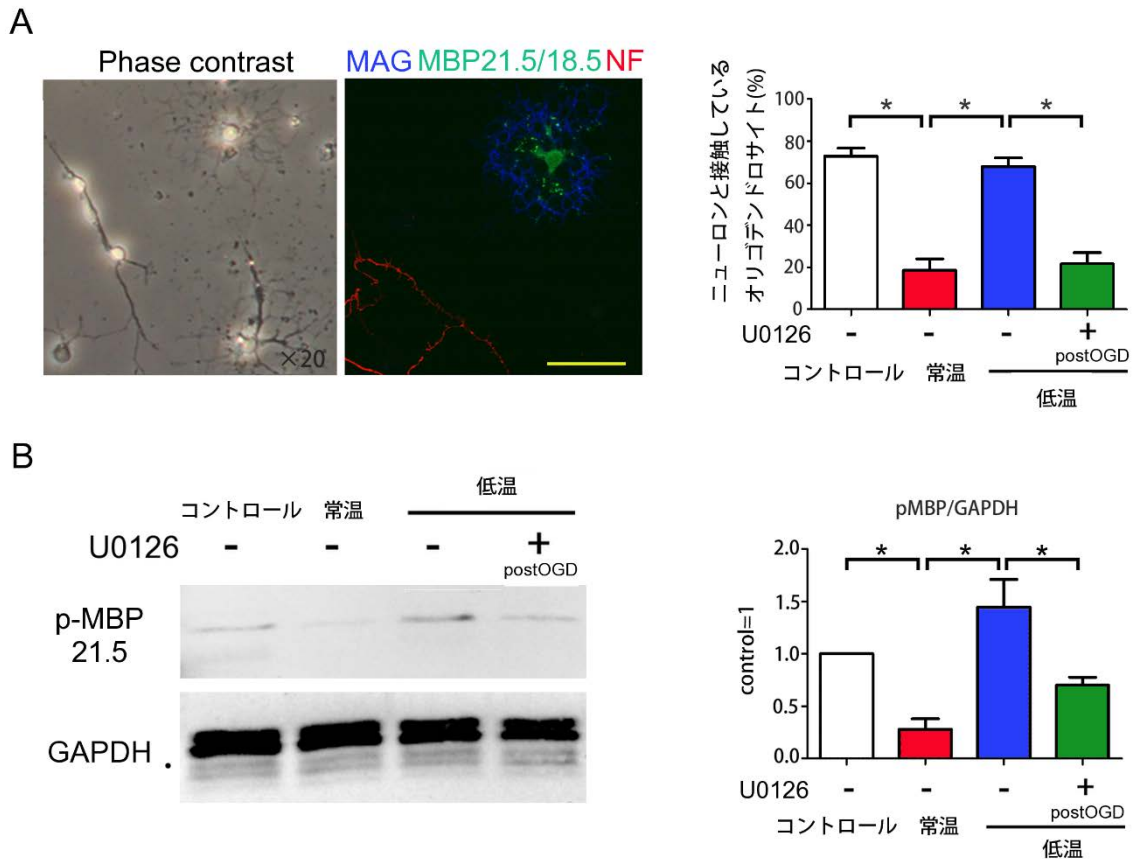


図 15 ERK1/2 リン酸化によるニューロン・オリゴデンドロサイトの接触能への影響

(A) 低温下で OGD 後に U0126(10  $\mu$  M)を添加した場合の、明視野及び、抗 MBP 21.5・18.5kDa、MAG、NF 抗体による三重染色。低温下で OGD 負荷を受け、U0126 は添加されなかった場合(図 10 右列)と比して、ニューロンとの接触が認められなかった。図 12 の 3 条件とあわせて、50 個のオリゴデンドロサイトのうちニューロンと接触している細胞の割合を、定量化し、比較した。n=3。\*P<0.05。Scale bar = 50  $\mu$  m。

(B) 抗リン酸化 MBP 抗体によるウェスタンブロットでは、低温下で OGD 後に U0126 を添加することで、リン酸化 MBP21.5kDa の発現が減少していた。n=4。\*P<0.05。

MBP exon2 を含む mRNA は低温により発現が抑制され、OGD 負荷の後に常温に戻すことで回復した

In vivo で低温による保護効果が認められた、17 と 21.5kDa の MBP は、MBP exon2 を含む mRNA から翻訳される。また、in vitro のこれまでの実験から、髄鞘形成初期段階における 21.5kDa MBP の重要性が示唆され、低温により OGD 負荷から保護されることが明らかとなった。そこで、MBP の遺伝子発現への低温の影響をさらに検討するために、OGD 負荷の直後に DRG ニューロンを添加して、18 時間後に、MBP の exon2 を含む(+)、あるいは含まない(-)、mRNA をリアルタイム PCR により定量した (図 16)。常温下で OGD 負荷をかけ、解放した後も常温に置いた細胞では、MBP exon2(+), (-) mRNA は有意に減少した (図 16 赤)。低温は OGD 負荷の有無にかかわらず MBP mRNA を抑制し、低温下での OGD 負荷は MBP mRNA 発現に有意な変化を及ぼさなかった (図 16 薄紫、紫)。MBP exon2(+) mRNA は、exon2(-) mRNA に比べて、より顕著に低温により発現が抑制された。低温下に 6 時間置いた細胞も常温に戻すことで、OGD をかけずに常温に置いたコントロールと同じレベルまで MBP mRNA は回復した (図 16 灰色)。低温下で OGD をかけ、その後常温に戻した細胞では、常温下で OGD をかけ、そのまま常温においた細胞に比べて、MBP exon2 mRNA の発現が有意に維持されていた (図 16 青)。一方、Olig2 mRNA の発現は各群

で差を認めなかった。これらの結果より、MBP の特に exon2 を含む mRNA は、低温下でその発現が抑制され、常温に戻すことにより速やかに回復することが示された。

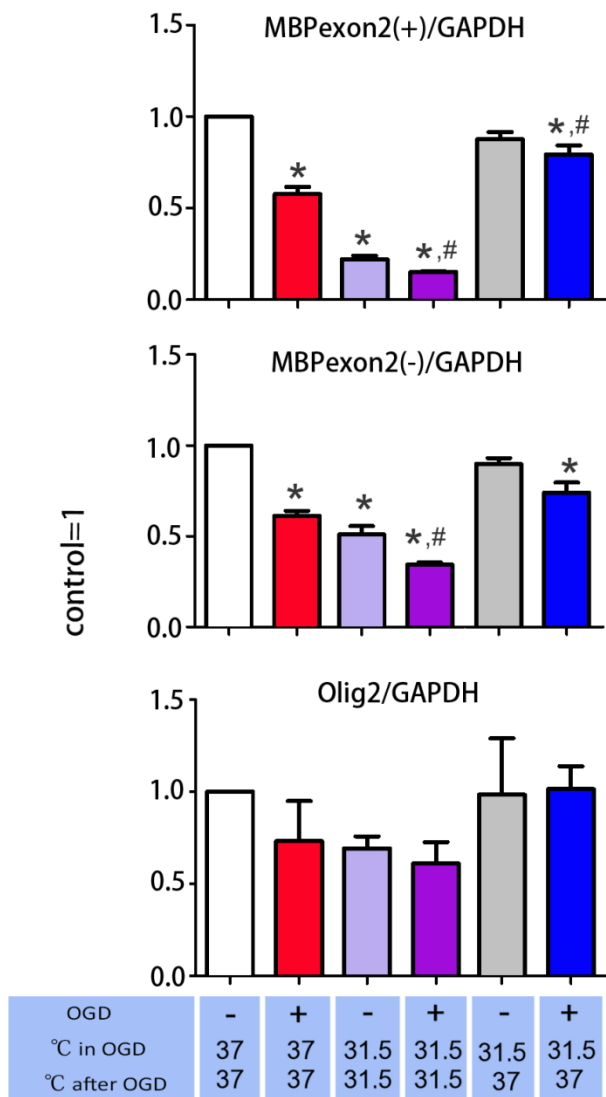


図 16 OGD 後 DRG ニューロンを添加して 18 時間後の、共培養系における、MBP exon2(+), exon2(-)、Olig2 mRNA 定量  
 低温下では特に MBP exon2(+) mRNA が抑制された。低温下で OGD をかけ、常温に戻すことで、MBP mRNA は回復した。GAPDH を内部標準遺伝子として用いた。OGD を受けていないコントロールを 1 として、各条件を比較した。3 回のサンプルの平均値±標準偏差を表示した。\*P<0.05 vs. コントロール。#P<0.05 vs. 37°C OGD。

**MBP mRNA の発現調節に関与する候補遺伝子のうち、Ddx54 は低温下で発現が増加していた**

低温により MBP mRNA が抑制される機序を明らかにするために、MBP の発現調節に関与する候補遺伝子について検討を行った。具体的には、オリゴデンドロサイト前駆細胞初代培養系において、常温下と低温下での遺伝子発現についてマイクロアレイ解析を行い、有意差を認めた遺伝子群[33]から、オリゴデンドロサイト分化に関与する遺伝子を二つ抽出した。転写因子 Yin Yang1 (Yy1) は、MBP の転写抑制因子 Tcf4 などの発現を抑制し、ミエリン関連遺伝子の発現に必要とされている[58]。また、Sirt2 は、MBP の発現を誘導し、オリゴデンドロサイトの分化を促すと報告されている[59]。また、DEAD-box 蛋白ファミリーは、RNA ヘリカーゼとして RNA 高次構造の変化に関与するが、その一部は転写調節にも関与すると報告されている[60]。HEK293 細胞を用いた Ribonucleoprotein Immunoprecipitation Assay において、MBP の特に exon2 を含む mRNA と、Ddx54 が結合するという報告[61]から、本研究では、Yy1、Sirt2、Ddx54 について、それぞれの mRNA レベルでの発現が低温下で変動しているか、図 16 と同じ条件で採取したサンプルを用いて、real-time RT-PCR を行った。その結果、前二者は低温下で発現に有意差を認めず、Ddx54 mRNA は低温下で有意に増加していた (図 17)。

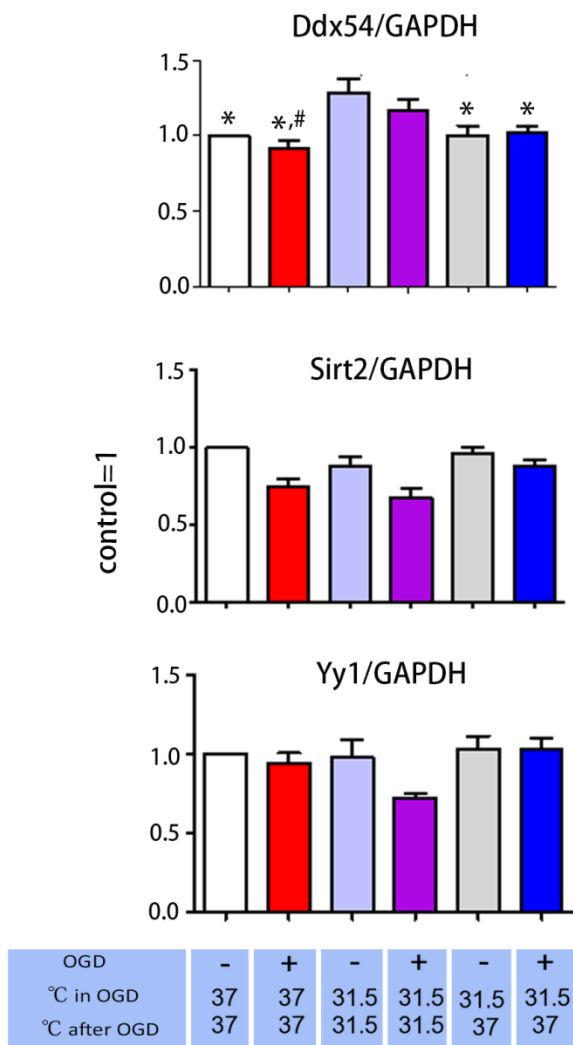


図 17 OGD 負荷後 DRG ニューロンを添加して 18 時間後の、共培養系における、Ddx54、Sirt2、Yy1 mRNA 定量  
 低温下で、Ddx54 mRNA は増加していた。OGD 負荷のないコントロールを 1 として、各条件を比較した。7 回のサンプルの平均値±標準偏差を表示した。\*P<0.05 vs. 31.5°C で OGD はせず、そのまま 31.5°C で培養した条件。#P<0.05 vs. 31.5°C で OGD を受け、その後 31.5°C で培養した条件。



Ddx54 は、NIH3T3、NG108-15、FBD-102b 細胞株において、MBP の転写活性を抑制した

Ddx54 の MBP 転写活性に与える影響を検討するために、オリゴデンドロサイト初代培養系を用いたが、トランスフェクション試薬による毒性に耐えられなかったため、NIH3T3、NG108-15、FBD-102b の三種類の細胞株を用いて、レポーターアッセイを行った。いずれの細胞株においても、Ddx54 をトランスフェクションした場合、MBP 転写活性が有意に低下した (図 18)。なお、Ddx54 を含むプラスミドを半量トランスフェクションした場合、量依存的に MBP 転写活性が抑制された。

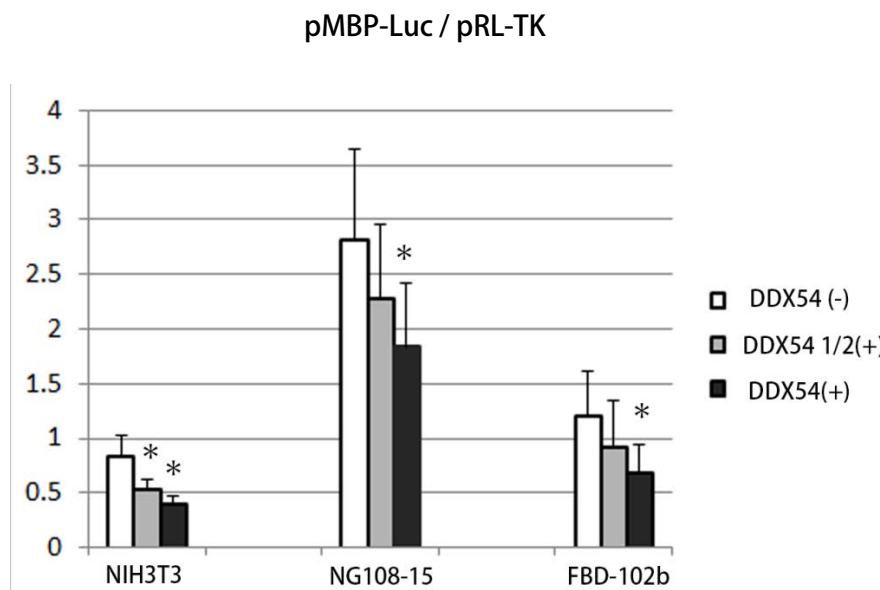


図 18 NIH3T3、NG108-15、FBD-102b 細胞株における、Ddx54 が MBP の転写活性に与える影響

いずれの細胞株においても、Ddx54 を含むプラスミドをトランスフェクションした方が、MBP のプロモーター活性が有意に低下した。n=6。\*P<0.05 vs. Ddx54(-)。

## 考察

本研究では、低酸素虚血負荷からの pre-OLs に対する低温の保護効果が確認された。PVL は、早産児の脳障害の重要な原因であり [17]、未熟な大脳白質における pre-OLs の損傷により髄鞘形成において必須の蛋白質である MBP の発現が低下し、髄鞘形成不全に陥ると考えられている。本研究では、MBP の exon2 を含むスプライシングバリエントである、21.5kDa と 17kDa のリン酸化 MBP レベルが、ラット PVL モデルにおいて低温により維持されることが明らかとなった (図 5)。また、*in vitro* でも、21.5kDa リン酸化 MBP が低温により OGD 負荷から保護されることが示された (図 15)。図 11 に示すように、21.5kDa リン酸化 MBP は髄鞘形成の初期段階で発現し、軸索との接点に存在している可能性が示唆された。その生理学的意義についてはより詳細な検討を必要とするが、21.5kDaMBP は、軸索に接触するオリゴデンドロサイトの突起に細胞体から運搬され、他のアイソフォームが何層にも折り重なった髄鞘を形成する際に誘導役として機能している可能性があり、MBP exon2 を含むアイソフォームは、低温による髄鞘保護において重要な役割を担っていることが示唆された。

MBP exon2 を含むアイソフォームは、核へ能動的に取り込まれ、オリゴデンドロサイトが分化するにつれて、MBP exon2 を含まないアイソフォームと同様に細胞質や細胞膜へ再分配されることが報告されている [49]。本研究では、OGD

負荷により MBP の発現がオリゴデンドロサイトの細胞体周辺に留まっていたが、低温により突起へと分布が維持されることが明らかとなった (図 9)。これにより、低温は MBP の発現量だけではなく、おそらくは MBP の運搬機構を維持することにより、髄鞘形成における MBP の多様な機能を調節していると考えられた。

MBP のリン酸化は、髄鞘構造の安定化、タンパク融解からの保護、ニューロンとの共培養においてリン脂質二重層との接触に、重要であることが報告されている[49]。多発性硬化症においてはリン酸化 MBP が減少しており[62]、特に 21.5kDa のリン酸化 MBP がカプリゾンを用いた脱髄モデルマウスで減少していることが報告されている[63]。MBP exon2 を含むアイソフォームは核内へ移行する際に、リン酸化を受ける必要があることが報告されている[64]。N19-OLG 細胞に 21.5kDa MBP を強制発現させると、核内でリン酸化 ERK1/2 レベルが上昇したという報告がある[65]。以上の 2 つの報告から、MBP exon2 を含むアイソフォームとリン酸化 ERK1/2 は相互に影響している可能性が考えられる。

今田らは、オリゴデンドロサイト前駆細胞は、低温下で ERK1/2 のリン酸化が亢進し、増殖することを報告した[33]。本研究では、低温の pre-OLs に対する OGD 負荷からの保護効果に MEK-ERK 経路が関与することが確認された (図 14)。低温は、海馬のニューロンや大脳血管内皮細胞においても、ERK1/2

リン酸化を亢進すると報告されている[66, 67]。Pre-OLs 培養系で、アストロサイトの培養液による OGD からのアポトーシス抑制作用にも ERK1/2 リン酸化が関与していると報告されている[41]。ERK1/2 は、繊維芽細胞や上皮細胞において、bcl-2 などの生存シグナルに関与する蛋白から Bim を解離させることによって、細胞を生存へ導く機能を持つと報告されている[68]が、同様の機序が pre-OLs においても働いているかは不明である。また、今回の *in vivo* 実験においては、頸動脈を結紮した側で、対側に比して、低酸素虚血負荷の急性期である 24 時間後では、ERK1/2 リン酸化減少は認められなかった。この *in vitro* 実験結果との乖離は、アポトーシスのシグナルは急速な変化として生じるために、適切なタイミングで捉えていなかった可能性が考えられる。しかし、低酸素虚血負荷の虚血再灌流障害において、ERK1/2 リン酸化が保護的に働くのか、有害に働くのかは結論が出ていない[69]。今回の *in vitro* 実験で得られた、ERK1/2 リン酸化が低温によるアポトーシス抑制効果に関与するという結果についてはさらなる確認が必要であると考えられる。

ERK1/2 は、オリゴデンドロサイトの分化や髄鞘形成においても重要な役割を担っていることが報告されている[70]。本研究では、pre-OLs に、常温あるいは低温下で OGD 負荷をかけ、その直後に DRG ニューロンを添加して常温で共培養を行ったため、今回のモデルでは、低温によるオリゴデンドロサイトに対す

る保護効果が髄鞘形成に関与すると言える。OGD 後に U0126 を添加することで ERK リン酸化を阻害しても、低温によるアポトーシス抑制作用には影響を与えなかった (図 14) ことから、低温下で OGD をかけた pre-OLs が DRG ニューロンとの接触能を維持した結果は、低温によるアポトーシス抑制の副次的効果ではないと考えられる。さらに、U0126 を OGD 負荷の後に添加すると、21.5kDa リン酸化 MBP の発現が減少することが確認された (図 15)。これらの結果は、MBP を発現するオリゴデンドロサイトへの分化維持とニューロンとの接触能保護に、MEK-ERK 経路が関与していることを示唆する。この関与については in vivo 実験でも一致する結果が得られ、低酸素虚血負荷から 5 日後、急激に髄鞘形成が進むとされる P11 の時期において、頸動脈結紮側では ERK1/2 リン酸化が減少し、低温はその減少を抑制した (図 8)。このことから、PVL モデルにおいて、MEK-ERK 経路は、オリゴデンドロサイトの分化と髄鞘形成維持に関与していると考えられた。

近年、オリゴデンドロサイト初代培養系において、OGD 負荷後に 2 時間低温にすることによって、8 及び 12 日後に MBP の蛋白発現が増加し、P7 ラットに低酸素虚血負荷 (頸動脈結紮・8%酸素負荷 2 時間) をかけた後 2 時間低温にすることにより、42 日後にロータロッド試験での成績改善を認めたと報告されている [26]。この文献での検討は、過去の文献でラット正期産児低酸素虚血性脳症

モデルとして用いられてきたモデルを用いて評価を行っているため、本研究のラット PVL モデルとは異なり、また MBP をアイソフォーム毎に比較を行っていない。ただし、私の研究において *in vivo* で、低酸素虚血負荷後に常温に戻すと、低温群では 18.5 と 14kDa total MBP が増加していることに一致する結果である。さらに、私の研究では、リン酸化 MBP について検討し、*in vivo* では特に MBP exon2 を含む 21.5 と 17kDa のリン酸化 MBP レベルが、*in vitro* では 21.5kDa リン酸化 MBP レベルが、低温により維持されることが明らかとなった。そこで、オリゴデンドロサイトと DRG ニューロン共培養系において、低温が mRNA レベルに与える影響について検討を行った。図 16 に示すように、低温では MBP の特に exon2 を含む mRNA の発現を劇的に減少させた。この影響は可逆的であり、低温下で OGD 負荷を受けた細胞を、常温に戻すことによって、OGD 負荷を受けない常温のコントロール群と同じレベルまで MBP mRNA の発現が回復した。なお、この変化は Olig2 では認められず、MBP mRNA に特徴的な変化であった。本研究による新しい知見は、低温は MBP 発現を増加させるのではなく、むしろ一時的に、特に exon2 を含む MBP mRNA 発現を抑制していることを示唆している。

MBP mRNA の生成には多くのエネルギーを要し、糖は解糖系によって産生されるエネルギーの主たる供給源となる [71, 72]。また、髄鞘において、酸素消

費と ATP 産生がなされていると報告されている[73]。これらは、一度 MBP が産生されると、髄鞘形成まで様々な局面において、大量のエネルギーが必要となることを示唆している。本研究から、MBP exon2 を含むアイソフォームは、髄鞘形成の開始において重要な役割を担うと考えられる。低温中に MBP mRNA の産生が抑制されている現象は MBP 蛋白発現の減少を意味し、髄鞘形成を抑制することに繋がると考えられる。これは、OGD 環境下では、髄鞘形成のための十分なエネルギーが供給されないため、有利に働いていると推測される。常温下では、MBP exon2 を含むアイソフォームが産生され、髄鞘形成を開始しようとするが、OGD 環境下では酸素と ATP の供給が不十分であるために、オリゴデンドロサイトの分化が阻害され、ニューロンとのコミュニケーション障害を引き起こしている可能性がある。

低温が MBP mRNA 産生を抑制する機序を明らかにするために、MBP の発現調節因子について検討した。オリゴデンドロサイト初代培養系において、低温下で Ddx54 mRNA レベルが上昇しているという結果が得られた (図 17)。さらに、NIH3T3、NG108-15、FBD-102b 細胞において、Ddx54 をトランスフェクションすると、MBP 転写活性は低下した (図 18)。このことから、低温下で増加した Ddx54 によって、MBP の転写活性が低下し、MBP mRNA 発現が抑制される可能性が示唆された。Ddx54 が MBP 遺伝子の発現を調節する詳細な機

序については今後の検討課題である。Ddx54 はエストロゲンレセプターやアンドロゲンレセプターに結合し、下流の遺伝子調節に関与しているという報告もある[74, 75]。オリゴデンドロサイトにも、エストロゲン及びアンドロゲンレセプターは存在する[76, 77]ことから、Ddx54 は直接的に MBP のプロモーター領域に作用する可能性以外に、これらを介した MBP の間接的な発現調節に関与している可能性も考えられる。また、DEAD-box RNA ヘリカーゼファミリーの RCF1 は、シロイロナズナを用いた研究で、pre-mRNA スプライシングによって低温感受性遺伝子の調節に関与しているという報告もあり[78]、オリゴデンドロサイトにおいて *in vivo* での状態も含めて MBP 発現に Ddx54 が与える影響について、今後検討する予定である。

結論としては、低温は ERK1/2 リン酸化を介して、オリゴデンドロサイトのアポトーシスを抑制し、髄鞘形成能を維持していた。さらに、*in vivo*、*in vitro* の実験において、低温は、MBP の特に exon2 を含むアイソフォームの発現を維持していたことから、MBP exon2 と ERK1/2 リン酸化とが密接に関連し、初期段階の髄鞘形成保護効果に貢献している可能性が示唆された。Ddx54 は低温下での MBP 発現調節に関与している可能性があり、低温の作用機序の解明を分子基盤とした新規分子標的療法の候補として今後期待される。



## 謝辞

本研究を遂行するにあたって、終始御指導・御鞭撻を頂きました、東京大学医学部産婦人科藤井知行教授、埼玉医科大学産婦人科亀井良政教授（元東京大学医学部産婦人科講師）、慶應義塾大学漢方医学センター阿相皓晃教授に、心より深謝致します。

1. Xiong, M., et al., *Post-ischemic hypothermia for 24h in P7 rats rescues hippocampal neuron: association with decreased astrocyte activation and inflammatory cytokine expression*. Brain research bulletin, 2009. **79**(6): p. 351-357.
2. Paul, P.D., B. Laura, and J.G. Alistair, *Mechanisms of hypothermic neuroprotection*. Seminars in Fetal and Neonatal Medicine, 2010. **15**(5): p. 287-92.
3. Back, S., et al., *Late oligodendrocyte progenitors coincide with the developmental window of vulnerability for human perinatal white matter injury*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 2001. **21**(4): p. 1302-1312.
4. Volpe, J., *Cerebral white matter injury of the premature infant-more common than you think*. Pediatrics, 2003. **112**(1 Pt 1): p. 176-180.
5. Back, S. and P. Rosenberg, *Pathophysiology of glia in perinatal white matter injury*. Glia, 2014. **62**(11): p. 1790-1815.
6. Chau, V., et al., *Chorioamnionitis in the pathogenesis of brain injury in preterm infants*. Clinics in Perinatology, 2014. **41**(1): p. 83-103.
7. Chau, V., et al., *Effect of chorioamnionitis on brain development and*

- injury in premature newborns*. Annals of Neurology, 2009. **66**(2): p. 155-164.
8. Kaukola, T., et al., *Population cohort associating chorioamnionitis, cord inflammatory cytokines and neurologic outcome in very preterm, extremely low birth weight infants*. Pediatric Research, 2006. **59**(3): p. 478-483.
  9. Volpe, J., et al., *The developing oligodendrocyte: key cellular target in brain injury in the premature infant*. International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience, 2011. **29**(4): p. 423-440.
  10. Back, S., et al., *Selective vulnerability of late oligodendrocyte progenitors to hypoxia-ischemia*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 2002. **22**(2): p. 455-463.
  11. McQuillen, P. and D. Ferriero, *Selective vulnerability in the developing central nervous system*. Pediatric neurology, 2004. **30**(4): p. 227-235.
  12. Billiards, S., et al., *Myelin abnormalities without oligodendrocyte loss in periventricular leukomalacia*. Brain pathology 2008. **18**(2): p.

- 153-163.
13. Butts, B., C. Houde, and H. Mehmet, *Maturation-dependent sensitivity of oligodendrocyte lineage cells to apoptosis: implications for normal development and disease*. Cell death and differentiation, 2008. **15**(7): p. 1178-1186.
  14. Oka, A., et al., *Vulnerability of oligodendroglia to glutamate: pharmacology, mechanisms, and prevention*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 1993. **13**(4): p. 1441-1453.
  15. Kuhlmann, T., et al., *Differentiation block of oligodendroglial progenitor cells as a cause for remyelination failure in chronic multiple sclerosis*. Brain, 2008. **131**(Pt 7): p. 1749-1758.
  16. Segovia, K., et al., *Arrested oligodendrocyte lineage maturation in chronic perinatal white matter injury*. Annals of neurology, 2008. **63**(4): p. 520-530.
  17. Buser, J., et al., *Arrested preoligodendrocyte maturation contributes to myelination failure in premature infants*. Annals of neurology, 2012. **71**(1): p. 93-109.

18. Haynes, R., et al., *Diffuse axonal injury in periventricular leukomalacia as determined by apoptotic marker fractin*. Pediatric research, 2008. **63**(6): p. 656-661.
19. Shen, Y., et al., *Axon-glia synapses are highly vulnerable to white matter injury in the developing brain*. Journal of Neuroscience Research, 2012. **90**(1): p. 105-121.
20. Alix, J.J. and R. Fern, *Glutamate receptor-mediated ischemic injury of premyelinated central axons*. Ann Neurol, 2009. **66**(5): p. 682-93.
21. Lappe-Siefke, C., et al., *Disruption of Cnp1 uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination*. Nature genetics, 2003. **33**(3): p. 366-374.
22. Ghosh, A., et al., *Targeted ablation of oligodendrocytes triggers axonal damage*. PloS one, 2011. **6**(7).
23. Lee, Y., et al., *Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration*. Nature, 2012. **487**(7408): p. 443-448.
24. Bennet, L., et al., *The effect of cerebral hypothermia on white and grey matter injury induced by severe hypoxia in preterm fetal sheep*. The Journal of physiology, 2007. **578**(Pt 2): p. 491-506.

25. Barrett, R., et al., *Destruction and reconstruction: hypoxia and the developing brain*. Birth Defects Res C Embryo Today 2007. **81**(3): p. 163-176.
26. Xiong, M., et al., *Effects of hypothermia on oligodendrocyte precursor cell proliferation, differentiation and maturation following hypoxia ischemia in vivo and in vitro*. Experimental neurology, 2013.
27. Shankaran, S., et al., *Whole-body hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy*. The New England journal of medicine, 2005. **353**(15): p. 1574-1584.
28. Gancia, P. and G. Pomero, *Brain cooling and eligible newborns: should we extend the indications?* J Matern Fetal Neonatal Med, 2011. **24 Suppl 1**: p. 53-55.
29. Gancia, P. and G. Pomero, *Therapeutic hypothermia in the prevention of hypoxic-ischaemic encephalopathy: new categories to be enrolled*. J Matern Fetal Neonatal Med, 2012. **25 Suppl 4**: p. 94-96.
30. Laura, F., et al., *Therapeutic hypothermia in a late preterm infant*. J Matern Fetal Neonatal Med, 2012. **25 Suppl 1**: p. 125-127.
31. Lunze, K., et al., *The global burden of neonatal hypothermia:*

- systematic review of a major challenge for newborn survival. BMC Med*, 2013. **11**: p. 24.
32. Al Tawil, K., et al., *Risk factors for isolated periventricular leukomalacia*. *Pediatric neurology*, 2012. **46**(3): p. 149-153.
33. Imada, S., et al., *Hypothermia-induced increase of oligodendrocyte precursor cells: Possible involvement of plasmalemmal voltage-dependent anion channel 1*. *Journal of Neuroscience Research*, 2010. **88**(16): p. 3457-3466.
34. Manning, S., et al., *NMDA receptor blockade with memantine attenuates white matter injury in a rat model of periventricular leukomalacia*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 2008. **28**(26): p. 6670-6678.
35. Gerstner, B., et al., *17beta-estradiol protects against hypoxic/ischemic white matter damage in the neonatal rat brain*. *Journal of Neuroscience Research*, 2009. **87**(9): p. 2078-2086.
36. Sato, Y., et al., *Hypoxia-ischemia induces hypo-phosphorylation of collapsin response mediator protein 2 in a neonatal rat model of periventricular leukomalacia*. *Brain Research*, 2011. **1386**: p. 165-174.

37. Falahati, S., et al., *Ischemia-Induced Neuroinflammation Is Associated with Disrupted Development of Oligodendrocyte Progenitors in a Model of Periventricular Leukomalacia*. *Developmental neuroscience*, 2013.
38. Lechpammer, M., et al., *Minocycline treatment following hypoxic/ischaemic injury attenuates white matter injury in a rodent model of periventricular leucomalacia*. *Neuropathology and applied neurobiology*, 2008. **34**(4): p. 379-393.
39. Dean, J., et al., *Strain-specific differences in perinatal rodent oligodendrocyte lineage progression and its correlation with human*. *Developmental Neuroscience*, 2011. **33**(3-4): p. 251-260.
40. Liu, Y., et al., *Activation of Microglia Depends on Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchange-Mediated H<sup>+</sup> Homeostasis*. *Journal of Neuroscience*, 2010. **30**(45): p. 15210-15220.
41. Arai, K. and E. Lo, *Astrocytes protect oligodendrocyte precursor cells via MEK/ERK and PI3K/Akt signaling*. *Journal of Neuroscience Research*, 2010. **88**(4): p. 758-763.
42. Guardiola-Diaz, H., A. Ishii, and R. Bansal, *Erk1/2 MAPK and mTOR*



- signaling sequentially regulates progression through distinct stages of oligodendrocyte differentiation. Glia, 2012. 60(3): p. 476-486.*
43. Akiyama, K., et al., *Study of expression of myelin basic proteins (MBPs) in developing rat brain using a novel antibody reacting with four major isoforms of MBP. Journal of Neuroscience Research, 2002. 68(1): p. 19-28.*
44. Fumagalli, M., et al., *Phenotypic changes, signaling pathway, and functional correlates of GPR17-expressing neural precursor cells during oligodendrocyte differentiation. The Journal of biological chemistry, 2011. 286(12): p. 10593-10604.*
45. Hyun Jung, J., et al., *Increased expression of three-repeat isoforms of tau contributes to tau pathology in a rat model of chronic type 2 diabetes. Experimental neurology, 2011. 228.*
46. Ueki, T., et al., *A new monoclonal antibody, 4F2, specific for the oligodendroglial cell lineage, recognizes ATP-dependent RNA helicase Ddx54: possible association with myelin basic protein. Journal of Neuroscience Research, 2012. 90(1): p. 48-59.*
47. Horiuchi, M. and Y. Tomooka, *An oligodendroglial progenitor cell line*

- FBD-102b possibly secretes a radial glia-inducing factor.* Neuroscience Research, 2006. **56**(2): p. 213-219.
48. Miyamoto, Y., et al., *Cdk5 regulates differentiation of oligodendrocyte precursor cells through the direct phosphorylation of paxillin.* Journal of Cell Science, 2007. **120**(Pt 24): p. 4355-4366.
49. Harauz, G. and J. Boggs, *Myelin management by the 18.5-kDa and 21.5-kDa classic myelin basic protein isoforms.* Journal of neurochemistry, 2013. **125**(3): p. 334-361.
50. Harauz, G., V. Ladizhansky, and J. Boggs, *Structural polymorphism and multifunctionality of myelin basic protein.* Biochemistry, 2009. **48**(34): p. 8094-8104.
51. Jordan, C., V. Friedrich, and M. Dubois-Dalcq, *In situ hybridization analysis of myelin gene transcripts in developing mouse spinal cord.* The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 1989. **9**(1): p. 248-257.
52. Campagnoni, A. and W. Macklin, *Cellular and molecular aspects of myelin protein gene expression.* Molecular Neurobiology, 1988. **2**(1): p. 41-89.

53. White, R., et al., *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) F is a novel component of oligodendroglial RNA transport granules contributing to regulation of myelin basic protein (MBP) synthesis.* The Journal of biological chemistry, 2012. **287**(3): p. 1742-1754.
54. Maggipinto, M., et al., *Increased expression of the MBP mRNA binding protein HnRNP A2 during oligodendrocyte differentiation.* Journal of Neuroscience Research, 2004. **75**(5): p. 614-623.
55. Seiwa, C., et al., *CNS myelinogenesis in vitro: myelin basic protein deficient shiverer oligodendrocytes.* Journal of Neuroscience Research, 2002. **69**(3): p. 305-317.
56. Bernard, F., et al., *Role of transmembrane semaphorin Sema6A in oligodendrocyte differentiation and myelination.* Glia, 2012. **60**(10): p. 1590-1604.
57. Xiao, J., et al., *Extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling promotes oligodendrocyte myelination in vitro.* Journal of neurochemistry, 2012. **122**(6): p. 1167-1180.
58. Ye, H., et al., *The Transcription Factor Yin Yang 1 Is Essential for Oligodendrocyte Progenitor Differentiation.* Neuron, 2007. **55**.

59. Ji, S., J. Doucette, and A. Nazarali, *Sirt2 is a novel in vivo downstream target of Nkx2.2 and enhances oligodendroglial cell differentiation*. Journal of molecular cell biology, 2011. **3**(6): p. 351-359.
60. Fuller-Pace, F., *DExD/H box RNA helicases: multifunctional proteins with important roles in transcriptional regulation*. Nucleic Acids Research, 2006. **34**(15): p. 4206-4215.
61. Zhan, R., et al., *A DEAD-box RNA helicase Ddx54 protein in oligodendrocytes is indispensable for myelination in the central nervous system*. Journal of Neuroscience Research, 2013. **91**(3): p. 335-348.
62. Kim, J., et al., *Multiple sclerosis: an important role for post-translational modifications of myelin basic protein in pathogenesis*. Molecular & cellular proteomics : MCP, 2003. **2**(7): p. 453-462.
63. Seiwa, C., et al., *Restoration of FcRgamma/Fyn signaling repairs central nervous system demyelination*. Journal of Neuroscience Research, 2007. **85**(5): p. 954-966.

64. Pedraza, L., et al., *The active transport of myelin basic protein into the nucleus suggests a regulatory role in myelination*. Neuron, 1997. **18**(4): p. 579-589.
65. Smith, G., et al., *Nucleus-localized 21.5-kDa myelin basic protein promotes oligodendrocyte proliferation and enhances neurite outgrowth in coculture, unlike the plasma membrane-associated 18.5-kDa isoform*. Journal of Neuroscience Research, 2013. **91**(3): p. 349-362.
66. Atkins, C., et al., *Hypothermia treatment potentiates ERK1/2 activation after traumatic brain injury*. The European journal of neuroscience, 2007. **26**(4): p. 810-819.
67. Choi, E.-K., et al., *Animal models of periventricular leukomalacia*. Laboratory animal research, 2011. **27**(2): p. 77-84.
68. Ewings, K., C. Wiggins, and S. Cook, *Bim and the pro-survival Bcl-2 proteins: opposites attract, ERK repels*. Cell cycle, 2007. **6**(18): p. 2236-2240.
69. Sawe, N., G. Steinberg, and H. Zhao, *Dual roles of the MAPK/ERK1/2 cell signaling pathway after stroke*. J Neurosci Res, 2008. **86**(8): p.

- 1659-69.
70. Ishii, A., et al., *ERK1/ERK2 MAPK signaling is required to increase myelin thickness independent of oligodendrocyte differentiation and initiation of myelination*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 2012. **32**(26): p. 8855-8864.
  71. Royland, J., et al., *Down regulation of myelin-specific mRNAs in the mechanism of hypomyelination in the undernourished developing brain*. Brain research. Developmental brain research, 1992. **65**(2): p. 223-226.
  72. Royland, J., G. Konat, and R. Wiggins, *Myelin gene activation: a glucose sensitive critical period in development*. Journal of Neuroscience Research, 1993. **36**(4): p. 399-404.
  73. Ravera, S., et al., *Evidence for aerobic ATP synthesis in isolated myelin vesicles*. The international journal of biochemistry & cell biology, 2009. **41**(7): p. 1581-1591.
  74. Kanno, Y., et al., *DP97, a DEAD box DNA/RNA helicase, is a target gene-selective co-regulator of the constitutive androstane receptor*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2012. **426**(1):

p. 38-42.

75. Rajendran, R., et al., *Regulation of nuclear receptor transcriptional activity by a novel DEAD box RNA helicase (DP97)*. The journal of biological chemistry, 2003. **278**(7): p. 4628-4638.
76. Xiao, L., et al., *Diosgenin promotes oligodendrocyte progenitor cell differentiation through estrogen receptor-mediated ERK1/2 activation to accelerate remyelination*. Glia, 2012. **60**(7): p. 1037-1052.
77. Hussain, R., et al., *The neural androgen receptor: a therapeutic target for myelin repair in chronic demyelination*. Brain : a journal of neurology, 2013. **136**(Pt 1): p. 132-146.
78. Guan, Q., et al., *A DEAD box RNA helicase is critical for pre-mRNA splicing, cold-responsive gene regulation, and cold tolerance in Arabidopsis*. The Plant cell, 2013. **25**(1): p. 342-356.