

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：63905

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2013～2017

課題番号：25117005

研究課題名(和文)オリゴデンドロサイトを介した神経軸索間情報伝達機構の解明

研究課題名(英文)Studies on communication between neuroaxons via oligodendrocytes.

研究代表者

池中 一裕(Ikenaka, Kazuhiro)

生理学研究所・分子細胞生理研究領域・教授

研究者番号：00144527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 107,600,000円

研究成果の概要(和文)：オリゴデンドロサイト(以下OL)は、ミエリン形成後もニューロンの活動電位の伝導速度を調節することが明らかになっている。また、一つのOLは複数の軸索に対してミエリンを形成することから、OLがニューロン間の情報伝達を仲介、調節している可能性が考えられているが、未だ不明な点が多い。当該研究課題では、(1)OL-ニューロン間の相互作用を生体マウスの中樞神経系で可視化する技術、(2)OL特異的に光感受性チャネルを発現させたマウス、(3)OL-ニューロン間に形成される paranode が崩壊するノックアウトマウスをそれぞれ確立、解析し、OL-ニューロン相互作用が脳の高次機能に与える影響を研究した。

研究成果の概要(英文)：Oligodendrocytes (OLs) have recently been shown to modulate conduction velocity in an axonal activity-dependent manner even after myelination is completed. The axonal activity also promotes the proliferation and differentiation of OL precursor cells, and these are required for motor skill learning. Taken together, these findings suggest that neuronal activity and subsequent myelin remodeling are required for executing higher brain function. We thus examined whether and/or how OLs play roles in higher brain functions, using following experimental systems. (1) A method for simultaneously labeling both axons from different brain regions and the myelinating OL, (2) Mouse lines with channelrhodopsin-2 expression in OL, (3) NF155 conditional knockout mice, whose paranodes are disrupted after their initial formation.

研究分野：神経生物学

キーワード：グリア 精神疾患 神経興奮制御 活動電位の伝達速度

1. 研究開始当初の背景

(1) 中枢神経系に存在するオリゴデンドロサイト(以下OL)は、ニューロンに髄鞘を形成し、活動電位の伝達速度を飛躍的に上昇させている。従来、OLは神経軸索を取り巻く単なる鞘と認識されていたが、ニューロンと相互作用することにより脳の高次機能を調節する作用が知られてきている。OLには複数の突起があり、それぞれの突起が別々のニューロンに対して髄鞘を形成しており、脳内のOLの突起数は脊髄中のOLの突起数よりも多いことが知られている。申請者はOLが活動性の高い複数の神経軸索を選択的に髄鞘形成することにより情報処理の統合や学習の成立に機能するのではないかと考えた。また、ジャグリングなどの運動学習をおこなうと白質の異方性が増加することが拡散テンソル画像(DTI)解析によって明らかになっている。加えて、OLの分化を抑制したマウスでは運動学習が成立しないことが報告されている。これらの報告からOLは神経活動にตอบสนองして髄鞘の再編成を行い、運動学習の成立に寄与していると考えられる。

(2) OLは、ミエリン形成後もニューロンの活動電位の伝達速度を調節していることが明らかとなり、また一つのOLは複数の軸索に対してミエリンを形成することから、OLがニューロン間の情報伝達を仲介、調節している可能性が考えられている。しかしながら、これらがマウス生体内で果たす役割については不明な点が多い。

(3) OLは髄鞘を形成し神経軸索を絶縁することにより活動電位の跳躍伝導を可能にするが、近年の研究から、ニューロンと相互作用することにより脳の高次機能を調節する作用が知られてきている。髄鞘と軸索が直接接する paranodal 部位では、paranodal junction が形成され軸索と緊密な相互作用を行い、様々な神経機能を調節する。過去の報告から、paranodal junction 形成が軸索上の機能ドメインの集積に寄与することや(Susuki et al., Neuron, 2013)、軸索輸送の恒常性維持に重要であることが明らかになってきた(Ishibashi et al., J Neurosci Res, 2015)。一方で、指定難病である多発性硬化症などの脱髄性疾患において、発症の初期に paranodal junction の破綻が生じることが知られているものの、paranodal junction の破綻が神経細胞にどのような変化を引き起こすのか殆ど理解されていない。

我々は、脳内の特定の領域のみで paranodal junction の崩壊を誘導した場合でも、神経伝達速度の遅延が引き起こされることを明らかにしてきた。従って、paranodal junction 崩壊のような比較的軽微なミエリン異常であっても、ニューロンないしは脳高次機能に影響

を及ぼす可能性が考えられるが、未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

(1) 我々は、単一細胞レベルでOLとニューロンの相互作用を可視化する技術の開発に成功している。この技術を利用して、大脳皮質の異なる領野から投射する特定の神経軸索に対して、OLが選択的に髄鞘形成を行うかどうかを検討する。また、神経活動の低下がOLの分化にどのような影響を及ぼすか？神経活動のない神経軸索と通常の軸索が混在している条件で、通常の軸索が優先的に髄鞘形成されるかを明らかにする。本研究でOLが神経活動に依存して髄鞘形成様式を変化させるかを調べることにより、ニューロン・グリア相互作用を理解し、脳高次機能発現への関与を明らかにすることを目的とする。すなわち、神経活動を低下させるモデルマウスを用いることにより、髄鞘形成に及ぼす影響をより詳細に検討する。OLが神経活動の強弱に応じて髄鞘形成する神経軸索を選択しているとすれば、より使用頻度の高いニューロンの神経伝達速度が上昇し、情報伝達の効率が亢進すると考えられる。

(2) OL特異的に光感受性チャンネルを発現させたマウスを用い、海馬にて複合活動電位を記録し、マウス生体内においてOLの活性を変化させたときの軸索伝導変化を検討する。すなわち、光刺激によってOLを強制的に脱分極させた時、もしくはアーキロドプシンによってOLの活性化を抑制したときの伝達速度変化と同調効果および脳機能に及ぼす影響について検討することを目的とする。

(3) 我々はマイクロアレイ解析を用いて paranodal junction の崩壊に伴い発現変動するニューロン遺伝子を複数個同定した。この結果から、paranodal junction の破綻によって誘導される細胞障害性ストレスにตอบสนองして、ニューロン側の遺伝子が発現変動することを明らかにした。つまり、ストレスにตอบสนองしたニューロン遺伝子発現の変化が、疾病発症に関与している可能性が考えられる。本研究では、これら発現変動したニューロン遺伝子の機能を解明することにより、paranodal junction の破綻がどのような分子機序でニューロンあるいは脳機能障害に影響するか明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) GFP 標識した弱毒化狂犬病ウイルスを脳梁に注入することにより個々のOLの形態を標識することに成功した。この狂犬病ウイルスと、DsRed2 及び BFP 標識したアデノ随伴ウイルス(AAV)を用いた3重標識法によりOL-神経軸索間の相互作用を詳細に解析できる新規

の手法を開発し、大脳皮質の異なる領野から投射する特定の神経軸索に対して、OLが選択的に髄鞘形成を行うかどうかを検討した。また、オリゴデンドロサイトがどのような機構で神経軸索を判別しているのかを明らかにするため、神経活動依存性に着目した。マウスの口髯除去による大脳皮質感覚野の活動低下、および眼瞼縫合による視神経の活動低下を誘起する系を確立し、髄鞘形成が神経活動に依存するかどうかを調べた。

(2) OL 特異的に光感受性チャンネルを発現させたマウスを用い、海馬白板にて複合活動電位を記録し、光刺激によってOLを脱分極させたときの軸索伝導変化を検討した。すなわちOLを強制的に脱分極させた時の伝導速度変化と同調効果および脳機能に及ぼす影響について検討した。また、OL脱分極による軸索伝導変化の生理的意義を検討するために、OL光操作により活動電位が同期したときの出力先(海馬台ニューロン)シナプスにおけるシナプス伝達の変化を詳細に解析した。OL特異的に光感受性チャンネルとCl⁻トランスポーターを発現させたマウスを用い、今年度みられた光刺激による複合活動電位変化がどのように影響されるかを調べることによって、OL脱分極による軸索伝導促進効果に容量調節因子が含まれるかどうかを検討した。また、海馬CA1-海馬台錐体細胞シナプスにおける興奮性シナプス反応が、光照射の前後でどのように変化するかを検討した。さらに、このシナプスにおけるシナプス可塑性について、長期増強を誘導させる条件刺激に先行して、あるいは同時にOLへの光刺激を加えたときに、可塑的变化がどのように影響されるか検討した。最後に、アーキロドプシンをOL特異的に発現させ、OLの活性化を抑制したときの軸索伝導変化、出力先シナプスにおける変化も検討した。

(3) 我々は、髄鞘のパラノードの構成因子の一つであるNF155に対するコンデジショナルKOマウス(NF155 cKOマウス)を用いることにより、マウス生体内のパラノードを破壊する系を確立した。paranodal junctionの崩壊を誘導し、ニューロン側で発現変化する遺伝子をマイクロアレイ法により網羅的に解析した。その結果、発現が増減した遺伝子を複数同定し、それら遺伝子の発現がニューロンマーカーと非常に高い割合で共局在することを確認した。これらの結果を踏まえ、候補遺伝子を組込んだアデノ随伴ウイルス(AAV)をNF155 cKOマウスの大脳皮質ニューロンへ導入し、神経細胞に対する効果を詳細に解析した。

4. 研究成果

(1) 新規に開発したOL-神経軸索間の相互作用解析法を生体マウス脳に適用し、大脳皮質

の異なる領野から投射する神経軸索に対して、OLが選択的に髄鞘形成を行うことを明らかにした。引き続いて、髄鞘形成が神経活動に依存するかどうかに着目した。マウスの口髯除去による大脳皮質感覚野の活動低下、および眼瞼縫合による視神経の活動低下の誘起では、髄鞘形成効率は変化しないものの、活動低下した軸索に対して形成される髄鞘は、インターノードの長さが減少することが明らかになった。

(2) 海馬台ニューロンから興奮性シナプス反応を記録し光刺激後のシナプス反応の変化を調べたところ、海馬台ニューロンの発火パターンによって増大の程度が異なっていた。また、同じ海馬台内でも、近位(CA1に隣接)と遠位(前海馬台~傍海馬台に隣接)とで、光刺激によるシナプス反応の変化が異なっていた。これらの結果から、OL脱分極による出力先シナプスでの変化には場所優位性があり、さらに海馬台ニューロンの発火様式と密接に関連していることがわかった。なお、1.75-2.0ミリ秒の潜時を示す活動電位が発生する部位において伝導促進効果が最も著明であることがわかった。すなわち、海馬出力を場所および細胞特異的に修飾している可能性が示唆された。複合活動電位の振幅は、光刺激によるOLの脱分極の大きさに依存して、光刺激直後の増加とさらなる漸増の両方を示す場合と、漸増のみを示す場合とが観察された。複合活動電位の幅は、前者では、光刺激によって約10分間持続する一過性の減少を示したのに対し、後者では、複合活動電位の幅に変化はみられなかった。また、逆行性に伝導してくる活動電位の潜時を測定したところ、OLが大きく脱分極する場合では、一過性の潜時の減少が観察された。以上の結果は、OLの脱分極によって、軸索伝導に促進性の可塑的变化が生じたことを示唆する。また、低濃度テトロドトキシンによって伝導速度を遅くすると、顕著な変化を示す潜時が延長していた。この結果も、OL脱分極による軸索伝導変化が軸索の部位によって異なることを支持する。さらに、チャンネルロドプシンとともにNKCC1を強制発現させた実験において、より広い範囲で伝導速度が速くなったことから、この促進効果への細胞容量調節の関与がさらに強く示唆された。最後に、軸索伝導に対するOL過分極の効果を検討する必要があるという中間評価でのコメントに従い、アーキロドプシンをOL特異的に発現させたマウスの実験を行ったところ、OLの過分極は軸索伝導には影響を与えていないことがわかった。

(3) パラノードの破綻を誘導したマウスに対してマイクロアレイ解析を行い、発現が変動した遺伝子を複数同定した。その中で、aquaporin3遺伝子はCopy number variantゲ

ノム解析(精神疾患患者サンプルを使用)で重複が認められ、統合失調症の原因遺伝子の候補の一つとして同定された。これらの結果から、パラノードの破綻 aquaporin3 遺伝子の変動 精神疾患の三者間連関が示唆された。初代培養神経細胞と生体マウスを用いて、aquaporin3 遺伝子の機能解析を行った。aquaporin3 を発現するアデノ随伴ウイルスをNF155 に対するコンデジショナルKO マウス脳内に注入した結果、ニューロンの細胞死が増加することが分かった。この結果から、パラノードの異常にตอบสนองした aquaporin3 の発現変化は、脱髄初期のニューロンの生存に作用することが示唆された。また、我々はNF155 に対する siRNA を発現するアデノ随伴ウイルスをマウス脳内の内包に注入し、内包特異的に paranodal junction を破壊し、それに伴ったマウス筋電図の変化を電気生理学的に検出することに成功した。当該 paranodal junction 崩壊マウスの大脳皮質運動野を電気刺激し、前肢から筋電図を解析したところ、皮質脊髄路の活動電位の潜時が変化することを明らかにした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 72 件)

*Shimizu T, Osanai Y, Tanaka KF, Abe M, Natsume R, Sakimura K, Ikenaka K. YAP functions as a mechanotransducer in oligodendrocyte morphogenesis and maturation, GLIA, 査読有, 2017, 65: 917-930, doi: 10.1002/glia.23096.
Osanai Y, *Shimizu T, Mori T, Yoshimura Y, Hatanaka N, Nambu A, Kimori Y, Koyama S, Kobayashi K, Ikenaka K. Rabies virus-mediated oligodendrocyte labeling reveals a single oligodendrocyte myelinates axons from distinct brain regions. GLIA, 査読有, 2017, 65: 93-105, doi: 10.1002/glia.23076.

*Yamazaki Y, Fujiwara H, Kaneko K, Hozumi Y, Xu M, Ikenaka K, Fujii S, Tanaka KF. Short- and long-term functional plasticity of white matter induced by oligodendrocyte depolarization in the hippocampus, GLIA, 査読有, 2014, 62:1299-1312, doi: 10.1002/glia.22681.

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池中 一裕 (IKENAKA Kazuhiro)
生理学研究所・分子細胞生理研究領域・
教授
研究者番号: 00144527

(2) 研究分担者

山崎 良彦 (YAMAZAKI Yoshihiko)
山形大学・医学部・准教授
研究者番号: 10361247

田中 謙二 (TANAKA Kenji)
慶応義塾大学・医学部(信濃町)・准教授
研究者番号: 30329700

清水 健史 (SHIMIZU Takeshi)
名古屋市立大学・医学部・講師
研究者番号: 60398237

小林 憲太 (KOBAYASHI Kenta)
生理学研究所・行動・代謝分子解析センタ
ー・准教授
研究者番号: 70315662

畑中 伸彦 (HATANAKA Nobuhiko)
生理学研究所・システム脳科学研究領域・
助教
研究者番号: 80296053

吉村 武 (YOSHIMURA Takeshi)
生理学研究所・分子細胞生理研究領域・
助教
研究者番号: 60402567
(平成 28 年度 研究分担者)

