

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07005

研究課題名(和文) 中枢無髄神経の機能解析に関する研究基盤の確立

研究課題名(英文) Distribution and characteristic of unmyelinated fibers in the central nervous system

研究代表者

宮崎 晴子 (Haruko, Miyazaki)

同志社大学・研究開発推進機構・助教

研究者番号：80525890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経系には意外にも多くの無髄神経が存在するが、その分布や機能はほとんどわかっていない。本研究では、先行研究で我々が発見した無髄神経線維マーカーの抗Nav1.2抗体を用いて免疫組織染色を行い、脳梁の一部と分界条の神経線維が無髄であることを明らかにした。また、無髄神経のひとつである線条体投射神経のトランスクリプトーム解析を行い、遺伝子プロファイルを作成した。線条体投射神経線維のプロテオーム解析の結果から、無髄神経軸索がグリア系細胞と相互作用を形成している可能性を示した。実際、アストロサイトの突起が無髄神経線維を覆うように存在することを免疫組織化学的に明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、今まで知られていなかった中枢神経系の無髄領域を明らかにした。また、無髄神経線維はアストロサイトの突起で覆われていることを明らかにした。有髄神経は情報伝達スピードの速さという点では優れているが、微妙な調節や修正は無髄神経が担っている可能性がある。本研究を進めることにより、これまで分かっていなかった無髄神経の機能を解明できる可能性がある。またNav1.2の遺伝子であるSCN2Aはてんかんと自閉症スペクトラム症の原因遺伝子であることから、本研究を進めることによりこれらの疾患の病態への理解が深まり、治療法開発へ繋がる知見が得られると期待される。

研究成果の概要(英文)：In the central nerve system, not all axons are myelinated. A large proportion of axons are unmyelinated but their distribution and function still unclear. Here, we identified parts of fibers in the corpus callosum and stria terminalis as novel unmyelinated fibers by immunostaining using anti-Nav1.2, which is a marker of unmyelinated fibers. To obtain the information relating to unmyelinated neurons/fibers, we generated gene expression profile of striatal medium spiny neurons, which are unmyelinated neurons. Next, we performed proteome analysis using MBP (+) and MBP (-) membrane fraction of striatal projection fibers and compared enriched proteins in each fraction. Gene ontology analysis of these data suggested that unmyelinated fibers may interact with glial cells on the surface of fibers and form synapses with other projection fibers. Indeed, we found the striatonigral fibers were surrounded by astrocyte processes by immunostaining using astrocyte markers.

研究分野：神経解剖学

キーワード：無髄神経 髄鞘 ミエリン アストロサイト Nav1.2 MBP 電位依存性ナトリウムチャネル

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

髄鞘は神経軸索を覆う絶縁性のカバーであり、脊椎動物はその進化において髄鞘を獲得することで神経伝達速度を飛躍的に上げた。一方で中枢神経系には海馬顆粒細胞、小脳顆粒細胞などの無髄神経が保存されており、有髄神経の代表格である大脳錐体細胞でも部分的に無髄領域が存在することが最近明らかとなった (Tomassy GS et al, Science, 2014)。このように無髄神経線維は中枢の多くに存在しているが、その役割についてはほとんど明らかにされていない。

電位依存性ナトリウムチャンネル (Nav チャンネル) は有髄神経では主にランビエ絞輪に存在し、活動電位の発生を担っている。そのサブユニットのひとつである sodium channel beta4 subunit (Navbeta4) は、小脳や脊髄ではランビエ絞輪や軸索起始部に限局して存在するが、線条体投射神経では神経軸索に diffuse に分布し、他の系とは異なる発現パターンを示す。研究代表者らはその Navbeta4 のユニークな分布に注目し、免疫組織化学的によりランビエ絞輪や髄鞘の構成因子が線条体投射神経軸索には存在しないことを確かめ、最終的に免疫電顕像によつての Navbeta4 陽性の軸索が無髄線維であることを明らかにした (Miyazaki H et al, Nat Commun, 2014)。またこのことから、Nav チャンネルのサブユニットの diffuse な分布は無髄神経軸索のマーカーとなり得ることがわかった。

### 2. 研究の目的

本研究では中枢神経系における新規の無髄神経を同定し、その投射経路を明らかにすることを目的とする。また無髄神経の特性を明らかにするため、トランスクリプトーム解析を行い、無髄神経細胞で発現する遺伝子を網羅的に解析する。さらにはプロテオーム解析を行い、無髄神経軸索に存在する蛋白質を網羅的に解析する。

### 3. 研究の方法

(1) Nav1.2 は sodium channel alpha subunit のひとつであり、Navbeta4 よりも広く中枢に、diffuse に分布する。抗 Nav1.2 抗体を用いてマウス脳切片の免疫組織染色を行い、中枢神経系における新規の無髄神経とその投射経路を調べた。

(2) 先行研究で研究代表者らが作製した線条体投射神経細胞 (medium spiny neuron: MSN) で Venus を発現するトランスジェニックマウス (*Scn4b-Venus*) から FACS を用いて MSN を分離し、遺伝子発現解析を行い MSN で発現している遺伝子のリストを作成した。この遺伝子リストは無髄神経で発現している遺伝子を含んでいる可能性が高い。

(3) 無髄神経軸索の蛋白質を調べるため、マウス脳の線条体投射神経線維 (無髄線維) を多く含む領域を採取し、ライセートを作製した。超遠心によって得られた膜画分は、スクロース密度勾配遠心を行い、髄鞘を含む画分 (MBP (+) 膜画分) と髄鞘を除いた画分 (MBP (-) 膜画分) に分離した (MBP: myelin basic protein, 髄鞘の主要な蛋白質の1つ)。得られた画分は質量分析を行い、各画分に含まれている蛋白質の同定を行った。続いて、MBP (-) 膜画分に特異的な蛋白質、および双方の Mascot Score の ratio から MBP (-) 膜画分で score が高い蛋白質 (ratio > 1.5) を抽出した。このような蛋白質は無髄神経軸索に特有の蛋白質を含んでいる可能性がある。

### 4. 研究成果

(1) マウス脳における Nav1.2 の分布を免疫組織化学的に調べると、海馬顆粒細胞や小脳顆粒細胞といった、一般的によく知られた無髄神経の軸索と線条体投射神経軸索で diffuse な染色が見られたほか、脳梁の一部と分界条の神経線維でも同様に diffuse な染色が認められた (図 1)。これらの軸索は抗 MBP 抗体の免疫染色像とほとんど共局在しないことから、無髄神経である可能性が高い (図 1)。今後は、抗 Nav1.2 抗体を用いて免疫電顕を行い、これらの神経軸索が無髄であることを確認する。また、ウイルストレーサーを用いてオリジンの細胞と投射先を同定する予定である。

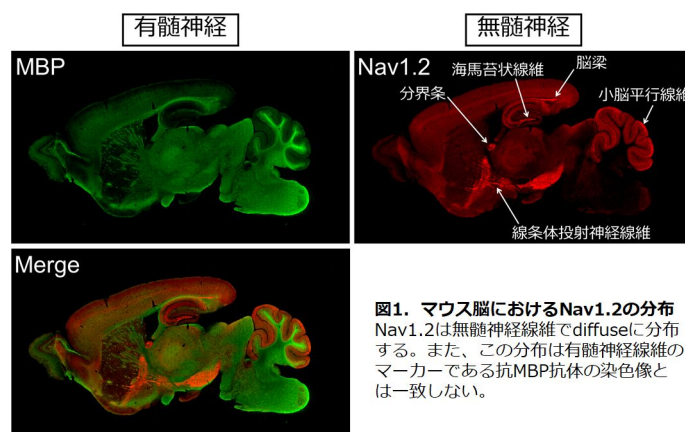


図1. マウス脳におけるNav1.2の分布  
Nav1.2は無髄神経線維でdiffuseに分布する。また、この分布は有髄神経線維のマーカーである抗MBP抗体の染色像とは一致しない。

(2) *Scn4b-Venus* マウスの線条体から FACS を用いて MSN を分離し、マイクロアレイを用いて遺伝子発現解析を行い、MSN の遺伝子プロファイルを作成した (~3,000 遺伝子)。面白いことに、この MSN 遺伝子群の中には Golli-MBP という MBP のスプライスバリエントが含まれていた。In situ Hybridization の結果から、Golli-MBP はオリゴデンドロサイトだけでなく神経細胞でも発現していることがわかった (図 2, A, B) Golli-MBP は髄鞘を持たないヤツメウナギの脳でも

発現していることから (Smith JJ et al, Nat Genet, 2013)、脊椎動物の進化の過程において髄鞘獲得に与与する可能性が考えられた。

(3) スクロー密度勾配遠心によって得られた各画分を抗 MBP 抗体で Western blot を行い、バンドの有無によって MBP (+) 膜画分と MBP (-) 膜画分に分けた (図 3, A)。LC-MS/MS 解析の結果では、髄鞘構成蛋白質の Mascot Score は MBP (+) 膜画分で高く、MBP (-) 膜画分で低い値を示した (図 3, B)。また LC-MS/MS 解析の結果から、MBP (+) 膜画分では 1,846 個、MBP (-) 膜画分では 2,269 個 (Mascot Score > 0) の蛋白質のリストが得られた (図 3, C)。本手法を用いると、ミトコンドリア蛋白質が MBP (-) 膜画分に濃縮するため、無髄神経軸索に濃縮して存在する蛋白質との区別が難しくなる。そこで、ミトコンドリア蛋白質の遺伝子リスト (GO\_0005739) を用いて、ミトコンドリア蛋白質をリストから除いた (図 3, C)。続いて、無髄神経軸索で濃縮して存在する蛋白質を抽出するため、MBP (-) 膜画分と MBP (+) 膜画分との Mascot Score の ratio が 1.5 倍以上となる蛋白質をリストから抽出した (図 3, C)。最終的に、これらの MBP (-) 膜画分に濃縮して存在する蛋白質と、MBP (-) 膜画分に特異的に存在する蛋白質とを合わせて 333 個の蛋白質のリストを作成した (図 3, C)。Gene ontology 解析で cellular component について調べると、これらの蛋白質には、cell junction、synapse、axon に関係する蛋白質が多く含まれていることがわかった。このことから、無髄神経の軸索は髄鞘で覆われていないため、周囲のグリア系細胞と相互作用を形成している可能性が考えられた。また無髄神経では、その軸索上に他の軸索終末とシナプスを形成している可能性が考えられた。さらにこの蛋白質のリストを Astrocyte-enriched gene (Cahoy JD et al, J Neurosci, 2008) と比較すると、アストロサイトに濃縮して存在する遺伝子を数多く含んでいることがわかった。実際、アストロサイトのマーカーで免疫染色を行ったところ、アストロサイトの突起が無髄神経軸索を覆うように存在していた (図 4)。

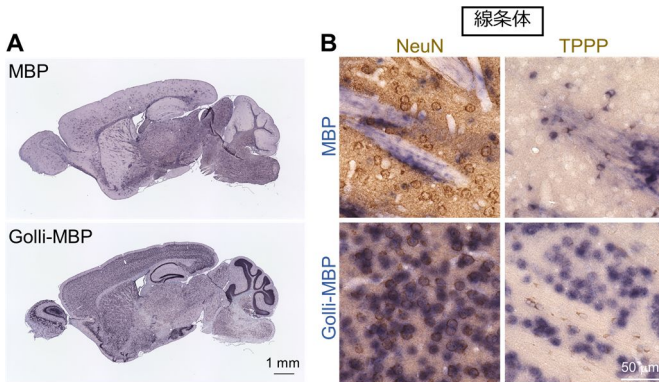


図2. マウス脳におけるMBPとGolli-MBPの分布  
A, MBPとGolli-MBPのmRNAの分布をin situ Hybridization (ISH) で比較した。B, マウス脳の線条体のsagittal断面。MBP、Golli-MBP (ISH, 青) と神経細胞マーカー (NeuN)、オリゴデンドロサイトマーカー (TPPP) (免疫染色、茶) の2重染色。MBPはオリゴデンドロサイトに発現しているが、Golli-MBPは神経細胞とオリゴデンドロサイトの両方で発現している。

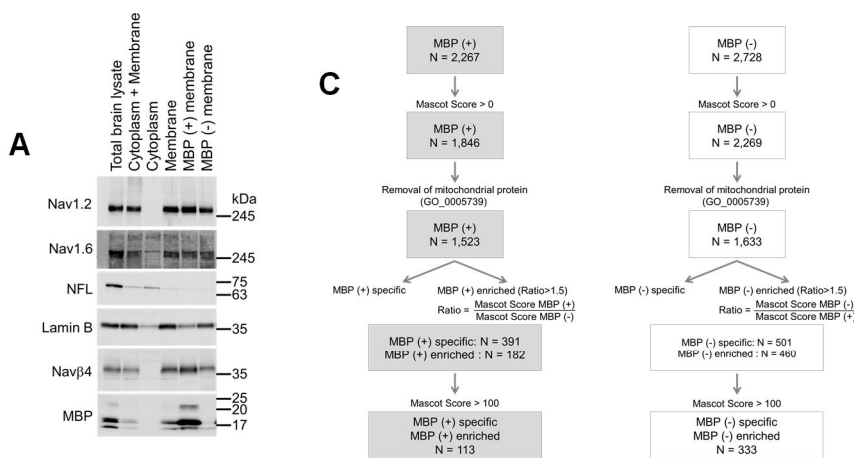


図3. マウス線条体投射神経線維のLC-MS/MS解析

A, マウス脳の線条体投射神経線維を多く含む領域から MBP (+) 膜画分と MBP (-) 膜画分を分離し、得られた画分を各種抗体を用いて WB を行った。B, 髄鞘構成蛋白質の Mascot Score を MBP (+) 膜画分と MBP (-) 膜画分とで比較した。C, データプロセッシングのフローチャート。それぞれの画分に特異的、もしくはエンリッチしている蛋白質を抽出した。

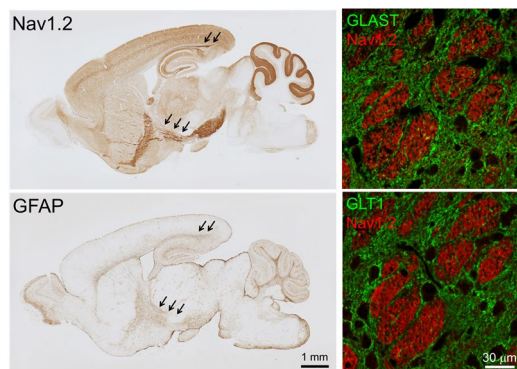


図4. アストロサイトは無髄神経軸索を覆うように分布している  
(左) マウス脳の近接切片を Nav1.2 と GFAP の抗体で免疫染色を行った。GFAP 陽性のアストロサイトは Nav1.2 陽性の無髄線維の周囲に多く存在する。矢印は脳梁と線条体投射神経線維を示している。(右) マウス脳の線条体投射神経軸索束の coronal 断面。アストロサイト特異的なグルタミン酸トランスポーター (GLAST, GLT1) は Nav1.2 陽性の無髄線維束の表面を覆うように存在する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Park Hongsun, Miyazaki Haruko, Yamanaka Tomoyuki, Nukina Nobuyuki	4. 巻 147
2. 論文標題 Non-coding RNA Neat1 and Abhd11os expressions are dysregulated in medium spiny neurons of Huntington disease model mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 58 ~ 63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.neures.2018.10.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimizu H, Tosaki A, Ohsawa N, Ishizuka-Katsura Y, Shoji S, Miyazaki H, Oyama F, Terada T, Shirouzu M, Sekine SI, Nukina N, Yokoyama S.	4. 巻 292
2. 論文標題 Parallel homodimer structures of the extracellular domains of the voltage-gated sodium channel 4 subunit explain its role in cell-cell adhesion.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 13428-13440
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1074/jbc.M117.786509.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 宮崎晴子、貫名信行
2. 発表標題 質量分析による線条体投射神経領域のMBP (+)、MBP (-)膜画分の解析
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮崎晴子、山野里紗、西岡佐紀、伊川正人
2. 発表標題 中枢無髄神経特異的分子の探索
3. 学会等名 第41会 日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山野里紗、宮崎晴子、貫名信行
2. 発表標題 中枢神経系における無髄線維の分布
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 朴洪宣、宮崎晴子、貫名信行
2. 発表標題 ハンチントン病モデルマウスにおけるノンコーディングRNAの発現変化
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Haruko Miyazaki, Fumitaka Oyama, Yoshihiro Kino, Masaru Kurosawa, Mizuki Kurosawa, Tomoyuki Yamanaka, Nobutaka Hattori, Tomomi Shimogori, Nobuyuki Nukina
2. 発表標題 Gene expression profiling of medium spiny neurons in Huntington's disease model mouse
3. 学会等名 XXIII World Congress of Neurology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮崎晴子、小山文隆、紀嘉浩、黒澤大、黒澤みず樹、太田和健之、服部信孝、下郡智美、貫名信行
2. 発表標題 ハンチントン病モデルマウスの線条体投射ニューロンにおける遺伝子発現解析
3. 学会等名 第39回日本神経科学大会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	下郡 智美  (Shimogori Tomomi)  (30391981)	国立研究開発法人理化学研究所・脳発達分子メカニズム研究 チーム・チームリーダー    (82401)	