

機関番号：63905
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21700418
 研究課題名（和文） 視神経をモデルとした神経活動依存的な髄鞘形成と軸索のグループ化
 法則の解明
 研究課題名（英文） Analysis of activity-dependent myelination in optic nerve.

研究代表者

稲村 直子（INAMURA NAKO）
 生理学研究所・分子生理研究系・特別協力研究員
 研究者番号：20397623

研究成果の概要（和文）：

神経系の回路網形成において髄鞘形成は敏速な情報伝達に重要である。髄鞘を形成するオリゴデンドロサイトがある法則原理に基づき、軸索をグループ化していることが予想されるがそのメカニズムについてはまだよくわかっていない。このことを解明するために、視神経をモデルとして研究を行った。これまでに、効果的なオリゴデンドロサイトの標識を確立し、また成熟オリゴデンドロサイトに調節的に遺伝子を発現するマウスを作成した。

研究成果の概要（英文）：

Myelination is important for rapid electric signal transduction in neural circuit formation. To analyze the mechanism of activity-dependent myelination we examined using optic nerve. Effective sparse labeling of oligodendrocyte was observed. Additionally a mouse line enable to manipulate gene expression in mature oligodendrocyte was generated.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,700,000	510,000	2,210,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経化学・神経化学・神経薬理学

キーワード：神経科学，神経化学，神経発生学，ミエリン，グリア

1. 研究開始当初の背景

神経細胞がその神経伝達を敏速にするためには、軸索に髄鞘を巻く必要がある。髄鞘形成は神経活動さらには神経回路網形成の上で非常に重要である（Salzer, 2003）。

研究代表者の所属研究室では、中枢神経系の髄鞘形成細胞であるオリゴデンドロサイトの発生とその異常について長年研究して

いる。例えば髄鞘再生が阻害される変異マウスの研究や(Kagawa et al., 1994)、オリゴデンドロサイトの発生に必須である *Olig2* 欠損マウスの研究である (Takebayashi et al., 2002)。研究代表者も *Olig2* を時期特異的に発現させた細胞の発生中の視床網様核での移動について研究しており (Inamura et al., in press)、最近ではより発達の進んだ段階である髄鞘形成に興味を持っていた。

神経活動依存的な髄鞘形成についてはいくつかの報告がなされている。例えば、培養系では軸索が神経活動依存的に ATP を放出し、それが髄鞘形成の引き金になるという報告がある (Stevens and Fields, 2000; Ishibashi et al., 2006)。また生体内での研究では、マウスの片目を閉じた実験で、目を閉じた側の視神経で髄鞘形成した軸索の数が減少することや、神経活動を抑える薬剤の投与により、髄鞘を形成するオリゴデンドロサイトの数の減少が報告されている (Zalk and Fields, 2000)。

これとは別に、最近の研究により、海馬白板のオリゴデンドロサイトが神経活動によって自身の膜電位が変化すること、さらにこのオリゴデンドロサイトを恣意的に脱分極させると、軸索の伝導速度が増加することが解った (Yamazaki et al., 2008)。

この結果と、一つのオリゴデンドロサイトが複数の軸索に髄鞘を形成することを考え合わせると、オリゴデンドロサイトは、発達過程で性質の似通った軸索をグループ化し髄鞘形成すること、成体期ではグループの複数の軸索を同時に制御していることが示唆されるが、まだ検証されていない。

このことを解明するために、研究代表者は「視神経をモデルとした神経活動依存的な髄鞘形成と軸索のグループ化法則の解明」をテーマとした。

2. 研究の目的

上で述べたように、オリゴデンドロサイトは、発達過程では軸索のグループ化を、成体期ではグループ内の軸索の同時制御に関わっていると考えられるが、本研究では発達過程の軸索のグループ化について明らかにする。

(1) 神経活動依存的な髄鞘形成と軸索のグループ化法則の解明

片側を閉じて神経活動を抑制した生後マウスを用い、視交叉において網膜神経節細胞軸索の髄鞘形成に差があるかどうか、また一つのオリゴデンドロサイトが、目を閉じている方の軸索を排除して複数の軸索と髄鞘を形成するのかを調べ、髄鞘形成と軸索のグループ化法則に与える影響を明らかにする。

(2) 光刺激によるメラノプシン応答を利用した神経束の中の限られた軸索での神経活動依存的な髄鞘形成と軸索のグループ化法則の解明

メラノプシン感受性による神経活動を起

こさせたときに、刺激に応答し活性化した視神経だけが髄鞘形成をしているか、また一つのオリゴデンドロサイトが、活性化した複数の神経細胞の軸索にのみ選択的に髄鞘を形成するのかを調べ、神経束の中の限られた軸索での神経活動が髄鞘形成と軸索のグループ化法則に与える影響を明らかにする。

3. 研究の方法

神経活動依存的なオリゴデンドロサイトによる髄鞘の形成を研究する上で、観察を容易にする最適なオリゴデンドロサイトの可視化と、髄鞘を形成し始めている成熟オリゴデンドロサイトに時期特異的にかつ調節的に標的遺伝子を発現するマウスの作成は必須である。そこでまずこの二つの系を確立することに取り組んだ。

(1) 視神経のオリゴデンドロサイトの可視化

視神経でオリゴデンドロサイトがどのように神経活動依存的に髄鞘を形成するのを観察するには、一つのオリゴデンドロサイトを明確に標識することが必須である。そのためには、次の二つの条件が必要である。①オリゴデンドロサイトの発生過程で、少なくともミエリンを形成し始めた時期から可視化できること。②一つのオリゴデンドロサイトが他のオリゴデンドロサイトと重ならずある程度まばらに可視化できること、この二つを条件としてオリゴデンドロサイトを可視化する方法を検討した。

まず、成熟オリゴデンドロサイトのマーカーとして知られている MBP (Myelin basic protein) や PLP (proteolipid protein) の抗体を用いて、成熟し髄鞘を形成しているオリゴデンドロサイトを観察できる生後5週のマウスの視神経の免疫組織化学染色を行った。また、髄鞘を形成し始めたオリゴデンドロサイトを標識できる O1 抗体を用いて、固定していない視神経に O1 抗体を処理するライブ標識により免疫組織化学染色を行った。その結果、これらの標識ではオリゴデンドロサイトは視神経では非常に密になった状態で観察されるので、一つのオリゴデンドロサイトがミエリンを形成するのを観察するには困難であった。

次により散発的に標識できる手段を検討した。検討の結果、Olig2 の遺伝子座にタモキシフェン依存的に組み換えを起こす Cre リコンビナーゼである CreER をノックインしたマウス Olig2 knock in CreER マウス (Takebayashi et al., 2002) を用いることにした。Olig2 は将来オリゴデンドロサイトに

なる前駆細胞で発現する。この Olig2 knock in CreER (Olig2KICreER) マウスと GFP を発現するレポーター遺伝子を持つマウスを掛け合わせて、タモキシフェン依存的に GFP を時期特異的に発現させ、Olig2 由来細胞を GFP で標識すれば、Olig2 由来細胞であるオリゴデンドロサイトを効率的に可視化できると考えた。そこで、Olig2KICreER マウスとレポーターマウスを掛け合わせ、様々な時期にタモキシフェンを投与し Olig2 由来細胞での GFP 発現を誘導した。個々のオリゴデンドロサイトの判別を容易にするため、レポーターマウスは生後の細胞でも GFP の発現を容易に観察できる Z/EG マウスを用いた。胎生 14 日目から出生後のさまざまな時期にタモキシフェンを投与し、十分に視覚系が発達した生後 5 週目に視神経を採取し、切片を作成して、GFP の発現をそのまま蛍光で観察するもしくは免疫組織化学染色することによりオリゴデンドロサイトの標識可視化を調べた。

(2) 成熟オリゴデンドロサイトに時期特異的にかつ調節的に遺伝子を発現するマウスの作成

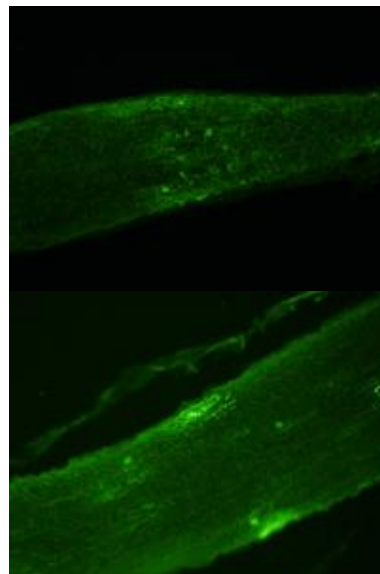
成熟オリゴデンドロサイトに時期特異的にかつ調節的に遺伝子発現できれば、オリゴデンドロサイトの標識に利用でき、また、標的遺伝子の発現に応じて神経活動依存的なオリゴデンドロサイトの髄鞘形成における機能変化を調べることができるのではないかと考え、tTA-tet0 システムを用い成熟オリゴデンドロサイト調節的に遺伝子発現するマウスの作成を検討した。tTA-tet0 システムは Cre-loxP システムと異なり、ドキシサイクリンの有無に従って発現を可逆的に調節できる点で、より調節的である。成熟オリゴデンドロサイトに発現する蛋白 PLP のプロモーターの下流に、従来の tTA よりもトランス転写活性 (transactivation) の効率のよい、改良された tTA である mtTA を発現させ、テトラサイクリン依存的に成熟オリゴデンドロサイトで遺伝子発現を調節できるマウスの作成を試みた。

4. 研究成果

(1) 視神経のオリゴデンドロサイトの標識可視化

視神経でオリゴデンドロサイトを散発的にラベルするため、Olig2KICreER マウスと Z/EG レポーターマウスを掛け合わせ、胎生から生後の様々な時期にタモキシフェンを投与して GFP の発現を調べ、オリゴデンドロサイトの標識を調べた。まずタモキシフェンを胎生 14 日目で投与して GFP 発現を誘導し、生後

5 週で視神経を採取し GFP の発現を調べると、多くのオリゴデンドロサイトがいくつかの集団となって集合的に発現していた。このことは標識された一つの集団のオリゴデンドロサイトが前駆細胞から分裂して出来た、遺伝的に同一な細胞集団であることを示唆している。このように GFP 陽性オリゴデンドロサイトが密接に発現している状態では一つのオリゴデンドロサイトがミエリンを形成する突起を他の細胞と区別することが困難であるため、生後 2 日でタモキシフェンを投与して同様に視神経での GFP の発現を調べたが、胎生投与時と同様に集合して発現しており一つのオリゴデンドロサイトを区別して観察することは困難であった (図 1 上)。



(図 1) 生後 2 日目 (上) 生後 2 週目 (下) でタモキシフェンを投与した生後 5 週の Olig2KICreER/Z/EG マウスの視神経において GFP で標識されたオリゴデンドロサイト (緑色の細胞)。標識されたオリゴデンドロサイトは細胞体から多数のミエリンを形成する突起を伸ばしている。生後 2 日目に投与したマウスでは多くの細胞が密集して発現している。生後 2 週で投与したマウスでは散発的に一つの細胞が標識されているのがみられる。

そこで徐々にタモキシフェン投与時期を遅らせ、最終的に生後 2 週目で発現させた。その結果生後 2 週になってもオリゴデンドロサイトが局所的に集合して発現しているのが見られた。このことはこれらのオリゴデンドロサイトが遺伝的に同一な細胞集団である事を示し、オリゴデンドロサイトの前駆細胞が出生後も分裂していることを示唆している。

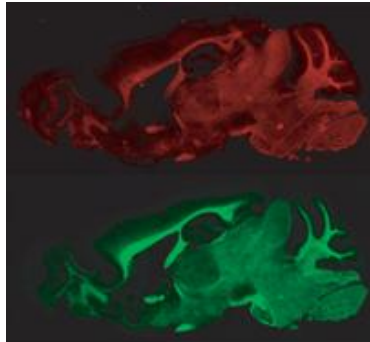
この生後 2 週目でタモキシフェンを投与したマウスでは集合的な GFP の発現オリゴ

ンドロサイトもみられたが、同時に一つのオリゴデンドロサイトが散発的に標識され(図1下)、髄鞘を形成しているのも観察された。この後からネズミが目を開けて視覚刺激が入ることを考えると、これまでのところ生後2週目でタモキシフェンを投与することがオリゴデンドロサイトの標識として最適と考えられる。

さらに以上の結果から生後直後を過ぎてもオリゴデンドロサイトの前駆細胞が分裂していることが示唆された。視神経でオリゴデンドロサイトが胎生後期に過剰に産生され、出生後に細胞死によって数が減少することは知られていたが、出生後もオリゴデンドロサイトの前駆細胞が分列していることは新たな知見である。この成果は今後論文にまとめる予定である。

(2) 成熟オリゴデンドロサイトに調節的に遺伝子を発現するマウスの作成

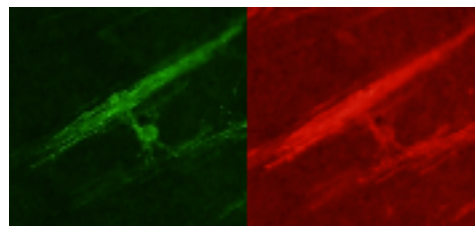
tTA-tet0 システムを用いて成熟オリゴデンドロサイトに調節的に遺伝子を発現するマウス、PLP-mtTA マウスの生後4週齢の脳において、まず PLP と mtTA の mRNA の発現を調べると、成熟オリゴデンドロサイトである PLP mRNA 発現細胞の 97% で mtTA mRNA を発現しており、PLP mRNA と mtTA mRNA の発現はほぼ一致していると考えられる。この発現の一致はオリゴデンドロサイトが観察できるすべての部位、すなわち視神経のみならず小脳や線状体の放線層、脳梁などの他の白質でも見られた。このマウスを tet0-YFP マウスと掛け合わせ、トランス転写活性(transactivation)がおきているかを確認するため、掛け合わせてできたマウスの生後4週齢の脳において PLP 蛋白と YFP の発現を免疫組織化学染色によって調べると、PLP 蛋白の発現は PLP mRNA とほぼ同一の部分、成熟オリゴデンドロサイトが存在する白質の各部分で見られ(図2上)、また YFP の発現は PLP 蛋白の発現と一致していた(図2下)。



(図2) 生後4週齢の PLP-mtTA::tet0-YFP マウスの脳において PLP (上) と YFP (下) の発現を免疫組織化学染色によって調べた。PLP 蛋白の発現部位はオリゴデンドロサイト

の発現部位を示す。この発現は YFP の発現とほぼ一致していた。

次に、より若い時期、オリゴデンドロサイトがミエリンを形成し始めている生後10日目の脳でも YFP の発現が見られるか調べた。その結果、生後10日目でも PLP 陽性オリゴデンドロサイトで PLP 蛋白と YFP との発現が一致してみられ、それはミエリンを形成し始めているオリゴデンドロサイトでも観察された。(図3)。同様の発現の一致は生後4週齢と同様にオリゴデンドロサイトが観察できるすべての部位で見られた。以上の結果は tTA-tet0 システムがこの PLP-mtTA::tet0-YFP マウスでうまく機能していることを示している。



(図3) 生後10日目の PLP-mtTA::tet0-YFP マウスにおける PLP 蛋白(右)と YFP (左) の発現を免疫組織化学染色によって調べた。ミエリンを形成し始めている PLP 蛋白陽性オリゴデンドロサイトが YFP 陽性を示している。

これまでオリゴデンドロサイトに遺伝子を発現するシステムについては Cre-loxP システムで多く作られており、テトラサイクリンで調節できる tTA-tet0 システムについては、Sox10-tTA マウスしかなかった。しかし Sox10 プロモーターは特に胎生のオリゴデンドロサイト前駆細胞で強く活性化する。今回作成した PLP-mtTA マウスは成熟したオリゴデンドロサイトにテトラサイクリン依存的に遺伝子発現を調節できるという点で有用であると考えられる。

この成果については現在論文にまとめ、投稿準備中である。

上で述べたこれらの確立できた二つの系を利用して、今後は神経活動依存的な髄鞘形成と軸索のグループ化法則のメカニズムの解明に向けてさらに詳細な実験を行う予定である。

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)

[その他]

ホームページ等

<http://www.nips.ac.jp/ninfo/research/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲村 直子 (INAMURA NAOKO)

生理学研究所・分子生理研究系・特別協力
研究員

研究者番号：20397623