

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612
研究種目：若手研究(A)
研究期間：2011～2014
課題番号：23680042
研究課題名(和文)オリゴデンドロサイトによる神経回路調節機能

研究課題名(英文)Oligodendrocyte-neuron interaction

研究代表者

田中 謙二 (Kenji, Tanaka)

慶應義塾大学・医学部・特任准教授

研究者番号：30329700

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではオリゴデンドロサイトを単に神経伝導を速めるだけの絶縁体とみなすのではなく、神経活動量に応じて伝導速度を調節し神経回路と行動を制御する動的な構成要素であるとの仮説にのっとり、オリゴデンドロサイトは神経活動に伴って脱分極性の応答をすることが知られている。光遺伝学をオリゴデンドロサイトに駆使して神経活動にともなう脱分極性変化を模倣したところ、10分間程度の伝導速度の増加と、その後におこる数時間の軸索の興奮性増加が見られた。オリゴデンドロサイトが軸索機能を短期、長期に制御することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Oligodendrocytes can respond to neuronal activity with prolonged depolarization of membrane potential. To understand the functional significance of oligodendrocytic depolarization, we used transgenic animals in which oligodendrocytes expressed channelrhodopsin-2 and examined the neuronal responses. We demonstrated that illumination-triggered depolarization of oligodendrocytes induced early- and late-onset facilitation of axonal conduction; the former lasted for approximately 10 min, whereas the latter continued for up to 3 h. These results suggested that oligodendrocyte depolarization induces short- and long-term functional plastic changes in the white matter and plays active roles in brain circuit functions.

研究分野：神経化学

キーワード：ニューロングリア相互作用 オリゴデンドロサイト オプトジェネティクス カルシウム 海馬 線条体 神経伝導

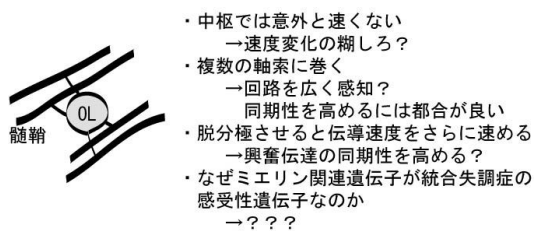
1. 研究開始当初の背景

統合失調症にミエリン関連遺伝子の機能低下があるという最初の報告を皮切りに (Hakak et al., PNAS 2001)、ゲノム関連解析、トランスクリプトーム解析 (Tkachev et al., Lancet 2003) でそれらが追試され、現在ではミエリン関連遺伝子群が統合失調症の感受性遺伝子であることまでは広く受け入れられている。しかしミエリンおよびミエリンを形作るオリゴデンドロサイト (OL) の何が統合失調症の病態にかかわるか全く不明のままである。

研究協力者 山崎良彦博士は OL に微小電極を用いて電流を注入し脱分極させたところ伝導速度がさらに 10% 増加するという現象を世界で初めて報告した (Yamazaki et al., Neuron Glia Biol 2007)。この報告は、OL は髄鞘を形成するだけでなく、髄鞘形成後もなんらかのメカニズムによって高速化した伝導速度をさらに微調整する能力を有することを発見したものである。生理的な条件下の神経興奮によっても同様な OL の脱分極を山崎博士は観察している。

OL が軸索伝導速度を調整することを前提に、伝導速度と髄鞘構造を見直してみると 2 つのことが見えてくる (下図)。1 つは中枢有髄軸索の伝導速度 (0.5-2.0 m/s) は末梢軸索の伝導速度 (数十~百 m/s) と異なりかなり遅いことである。(中枢無髄軸索は 0.3 m/s、イカの giant axon でさえ 25 m/s)。中枢では伝導速度の高速化だけを目的として髄鞘化されているわけではなく、伝導速度の微調整を行うためにそこそこの速度を使っているのではないか。もう一つは、OL は複数の軸索に同時に髄鞘を巻くことである。末梢シュワン細胞が一本の軸索だけに髄鞘を巻くことと決定的に異なる。複数の軸索を通る情報を OL が感知し、統合しうる構造的基盤とみないか。

「OL の機能は伝導速度の高速化だけだろうか」



伝導速度の微妙な変化は神経伝達の統合に影響を及ぼす。2 つの異なるプレシナプス入力のタイミングが近ければポストシナプスの反応を大きくし活動電位を生じやすくさせるが、入力が離れていると活動電位は生じない。Spike-timing dependent plasticity という概念があるが、この可塑性にオリゴデンドロサイトがかかわっている可能性があり、この可塑性の破綻が統合失調症の病態を修飾している可能性がある。

本研究は跳躍伝導を超えた新しい機能、す

なわち山崎博士の先行研究を発展させるものである。

2. 研究の目的

OL は軸索にミエリン鞘を形成する。本研究では OL を単に神経伝導を速めるだけの絶縁体と見るのではなく、神経活動量に応じて伝導速度を調節し神経回路と行動を制御する構成要素であると仮定し、それを検証する実験から神経伝導調節の新たなメカニズムを発見することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 研究リソースの整備

OL だけを操作する、OL だけから活動を抽出するための実験リソースを構築した。OL 選択的に操作・観察機能分子を発現させるために、テトラサイクリン遺伝子発現誘導システム (tTA マウスと tetO マウスの交配によって当該マウスを作出) を採用した。

(2) OL の脱分極が神経伝導速度に及ぼす影響

OL-チャンネルロドプシンマウスから急性海馬スライス調整し、海馬 CA1 軸索の伝導速度を計測する。刺激電極は海馬 CA1 軸索が走る海馬白板におき、記録は海馬 CA1 錐体細胞の細胞体から行う。OL を光照射で脱分極させたときの伝導速度の変化を調べた。

(3) OL の脱分極が神経軸索興奮に及ぼす影響

(2) で用いたスライスから、細胞外記録を行い、集合活動電位を計測する。OL の光刺激後に伴う集合活動電位の変化を調べた。

(4) OL 細胞内の Ca 計測

神経細胞の電気刺激に伴う OL 細胞内の Ca 濃度を計測する。

(5) OL 細胞内の Ca 変動の阻害

小胞体からの Ca 放出を OL だけで阻害したときの神経伝導、伝達に及ぼす影響を調べる。

(6) OL の長期的な脱分極による神経活動変化、脳構造の変化を調べる

OL を 1 週間にわたって脱分極刺激した際に、神経活動がどのように変化し、脳構造がどのように変化するのか小動物 MRI を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) 研究リソースの整備

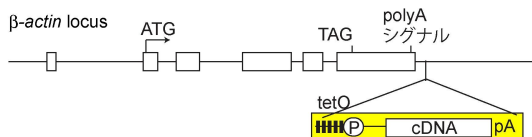
オリゴデンドロサイト特異的プロモーター、PLP プロモーターをコロラド大学 Dr. Wendy Macklin から供与をうけ、tTA (テトラサイク

リントランスアクチベーター) cDNA をつないだコンストラクトを作成し、定法に基づいてトランスジェニックマウスを作成した。tet0-チャネルロドプシン YFP マウス (tet0-ChR2YFP、オプトジェネティクスに使用) tet0-yellow cameleon nano50 マウス (tet0-YC、Ca インジケーター、Ca 観察に使用) tet0-5ppase マウス (IP₃ 分解酵素、Ca 濃度操作に使用) は、β-actin 遺伝子近傍に tet0 カセットをノックインすることによって作成した。

PLP-tTA::tet0-ChR2YFP マウスは、95%以上の OL において ChR2YFP が発現した。前脳では異所性の発現がなかった。PLP-tTA は、OL において特異的に発現が期待できるリソースとして、理研バイオリソースセンターに寄託した (リソース番号: RBRC05446)

β-actin 遺伝子近傍に tet0 カセットをノックインした戦略において、tTA 依存的な発現が劇的に改善した。これまで tTA が発現しているにもかかわらず、誘導を得ることが難しかったケースにおいても、十分な発現を得ることが出来るようになった。House keeping 遺伝子近傍に tet0 カセットをノックインする手法を、Knockin-mediated ENhanced Gene Expression (KENGE)-tet system として確立した。この手法を発明として出願すると共に、tet0-ChR2YFP を tTA 依存的に ChR2 を発現できるリソースとして理研バイオリソースセンターに寄託した (リソース番号: RBRC05454)

tet0-YC マウスも KENGE-tet として作出した。tet0-ChR2YFP のノックイン遺伝子座から



KENGE-tet

β-actin 遺伝子 (□は exon) の polyA シグナル 30 bp 後方に tet0 カセットをノックインすると OL において高い効率で目的遺伝子 (ChR2, 5ppase) を誘導できた。800 bp 後方にノックインすると OL において目的遺伝子を殆ど誘導できなかった (YC)

わずが 800 bp 後ろにずらし、β-actin 遺伝子発現へ与える影響を最小限にすることを目的とした。この結果、ある細胞種においては tTA 依存的な発現が顕著に抑制されてしまった。特に OL においては、その抑制効果が激しく、僅か 1%の OL だけで Ca インジケーターが発現するという残念な結果に終わった。

tet0-5ppase マウスは tet0-ChR2YFP マウスと全く同じ遺伝子座に挿入したため、OL に十分な 5ppase 発現を誘導することが出来た。

KENGE-tet マウスの発現効率を調べる過程で、アストロサイトにおいては、YC も 5ppase も十分に発現していることがわかった。このマウスリソースを用いた副次的な成果として、アストロサイト細胞内 Ca が突起の先端で生じること、Ca 上昇が突起だけに限局する

ケースと、細胞体まで伝播するケースがあること、突起に限局する Ca 信号は細胞内 IP₃ 非依存的であること、突起から細胞体へ伝播する Ca 信号は IP₃ 依存的であることがわかり、「主な雑誌論文」(2)に成果を発表した。

(2) OL の脱分極が神経伝導速度に及ぼす影響

500 ミリ秒の OL の脱分極性光操作によって、OL が 15 mV 程度脱分極し、この効果が約 10 分程度持続することが分かった。この時、海馬 CA1 軸索の伝導速度が速まる現象も 10 分程度観察された。先行研究では軸索に巻く OL のうちの 1 つだけを電極で操作して伝導速度が速まる現象を見いだしていた。本研究ではすべての OL を脱分極操作しているが、伝導速度増加は 1 つの OL 操作と同程度であった。このことから、すべての OL が伝導速度を速める効果を持つのではなく、比較的細胞体に近い軸索を巻く OL にその作用があることが示唆された。

(3) OL の脱分極が神経軸索興奮に及ぼす影響

細胞外記録で集合活動電位を記録したところ、その amplitude の増加が光刺激後、数時間にわたって持続することを発見した。同じ強さの電気刺激によって、興奮する軸索の本数が増えたと解釈された。(2)で記載した変化を短期間の可塑的な変化とすれば、数時間持続する変化は、長期的な可塑性と見なすことが出来る。神経伝達においては、Long term potentiation として分子メカニズム、構造変化までくわしく記載されているが、神経伝達について、このような長期可塑性の報告は無い。

シナプス可塑性と同様に、蛋白質新生が可塑性の誘導に必要などうか調べた。蛋白合成阻害薬アノマイシン存在下で集合活動電位を計測したところ、OL 光刺激後の amplitude の増加は蛋白質新生を阻害しても観察されることがわかった。このことから、蛋白質新生を伴わずに神経伝導長期可塑性が生じることが分かった。

長期可塑性の分子メカニズムとして、GABA、グルタミン酸、ATP、K イオンに注目して、阻害薬を用いた実験を行った。GABA、グルタミン酸、ATP 受容体アンタゴニストは OL 光刺激の神経伝導長期可塑性誘導を阻害しなかったが、K チャネルブロッカーである Ba²⁺が長期可塑性の誘導を阻害した。

(4) OL 細胞内の Ca 計測 および

(5) OL 細胞内の Ca 変動の阻害

神経細胞の興奮に伴う OL の反応の時空間的解析を目的として OL 特異的にカルシウムインジケーターを発現することを目指した。研究成果(1)で述べたように、yellow cameleon の発現誘導が強く抑制され、実験に使うこと

が出来なかった。カルシウムインジケータを OL に発現させることが出来なかったので、小胞体からの Ca 放出阻害の効果判定することが出来なかった。アストロサイトにおける副次的な成果については前述した。

(6) OLの長期的な脱分極による神経活動変化、脳構造の変化を調べる

スライス標本を用いた光遺伝学的実験によって、わずか 500 ミリ秒の OL 光刺激が 2-3 時間にわたって神経伝導の効率を上げることが明らかになった。OL の脱分極が長期間の神経活動変化を起こすのであれば、脳構造の変化を引き起こすはずである。OL 神経相互作用の履歴が脳構造の変化として残るかどうか調べた。

光源と制御装置が一体型になった光照射装置をマウス頭蓋骨表面に固定し、自由行動下で 7 日間刺激した。片側の内包に光ファイバー先端を置き、1 時間に 1 回、500 ミリ秒間光照射した。7 日間の刺激後、マウス脳を取り出し、7T MRI で構造を解析した。内包を通過する線維数が明らかに増加し、刺激側の Fractional anisotropy 値が有意に増加した。この結果から OL 選択的な細胞機能操作が、おそらく OL 神経相互作用の変化を介して、MRI で検出可能な脳構造の変化を引き起こしたと解釈できた。

神経活動に伴って OL が脱分極するが、この OL 脱分極だけをオプトジェネティクスによって再現できる実験系を構築することが出来た。OL 神経相互作用の解析に必須のマウスリソースである。

OL 神経相互作用をリアルタイムに検出するために Ca イメージングに挑戦したが、失敗に終わった。OL の Ca イメージングが可能なマウスリソースを作り直したい。

MRI、特に diffusion tensor imaging (DTI) による軸索の構造評価に OL 光遺伝学が有用であるという予備的データを得たので、OL 神経相互作用を脳構造、軸索構造の変化という視点から取り組んでいきたい。

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 53 件)

- (1) Fujii S, Tanaka KF, Ikenaka K, Yamazaki Y. Increased adenosine levels in mice expressing mutant glial fibrillary acidic protein in astrocytes result in failure of induction of LTP reversal (depotentiation) in hippocampal CA1 neurons. *Brain Res.* (査読有り) 1578:1-13, 2014 doi:
- (2) Kanemaru K, Sekiya H, Xu M, Satoh K, Kitajima N, Yoshida K, Okubo Y, Sasaki T, Moritoh S, Hasuwa H, Mimura M, Horikawa K, Matsui K, Nagai T, Iino M, Tanaka KF. In vivo visualization of subtle, transient, and local activity of astrocytes using an ultrasensitive Ca(2+) indicator. *Cell Rep.* (査読有り) 8(1):311-318, 2014 doi: 10.1016/j.celrep.2014.05.056.
- (3) 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.* (査読有り) 62(8):1299-312, 2014 doi: 10.1002/glia.22681.
- (4) Beppu K, Sasaki T, Tanaka KF, Yamanaka A, Fukazawa Y, Shigemoto R, Matsui K. Optogenetic countering of glial acidosis suppresses glial glutamate release and ischemic brain damage. *Neuron.* (査読有り) 81(2):314-320, 2014 doi: 10.1016/j.neuron.2013.11.011.
- (5) Tsunematsu T, Tabuchi S, Tanaka KF, Boyden ES, Tominaga M, Yamanaka A. Long-lasting silencing of orexin/hypocretin neurons using archaerhodopsin induces slow-wave sleep in mice. *Behav Brain Res.* (査読有り) 255:64-74, 2013 doi: 10.1016/j.bbr.2013.05.021.
- (6) Bepari AK, Sano H, Tamamaki N, Nambu A, Tanaka KF, Takebayashi H. Identification of optogenetically activated striatal medium spiny neurons by Npas4 expression. *PLoS One.* (査読有り) 7(12):e52783, 2012 doi: 10.1371/journal.pone.0052783.
- (7) Shimizu T, Tanaka KF, Takebayashi H, Higashi M, Wisemith W, Ono K, Hitoshi S, Ikenaka K. Olig2-lineage cells preferentially differentiate into oligodendrocytes but their processes degenerate at the chronic demyelinating stage of proteolipid protein-overexpressing mouse. *J Neurosci Res.* (査読有り) 91(2):178-186, 2013 doi: 10.1002/jnr.23153.
- (8) Lee HU, Yamazaki Y, Tanaka KF, Furuya K, Sokabe M, Hida H, Takao K, Miyakawa T, Fujii S, Ikenaka K. Increased astrocytic ATP release results in enhanced excitability of the hippocampus. *Glia.* (査読有り) 61(2):210-224, 2012 doi: 10.1002/glia.22427.

- (9) Sasaki T, Beppu K, Tanaka KF, Fukazawa Y, Shigemoto R, Matsui K. Application of an optogenetic byway for perturbing neuronal activity via glial photostimulation. Proc Natl Acad Sci U S A. (査読有り) 109(50):20720-20725, 2012 doi: 10.1073/pnas.1213458109.
- (10) Tanaka KF, Matsui K, Sasaki T, Sano H, Sugio S, Fan K, Hen R, Nakai J, Yanagawa Y, Hasuwa H, Okabe M, Deisseroth K, Ikenaka K, Yamanaka A. Expanding the repertoire of optogenetically targeted cells with an enhanced gene expression system. Cell Rep. (査読有り) 2(2):397-406, 2012 doi: 10.1016/j.celrep.2012.06.011.
- (11) Inamura N, Sugio S, Macklin WB, Tomita K, Tanaka KF, Ikenaka K. Gene induction in mature oligodendrocytes with a PLP-tTA mouse line. Genesis. (査読有り) 50(5):424-428, 2012 doi: 10.1002/dvg.20808.

〔学会発表〕(計 40 件)

- (1) Tanaka KF. Tetracycline-Controllable Gene Expression and Knockdown. 5th BRI International Symposium: Genome editing technology; its status quo and application to brain research. March 3, 2015. Center for Integrated Human Brain Science, Niigata city, Japan
- (2) 田中謙二 精神医学研究にオプトジェネティクスが期待されること 第 35 回日本レーザー医学会総会 2014 年 11 月 30 日 京王プラザホテル 東京都新宿区
- (3) 田中謙二 オプトジェネティクス 第 110 回日本精神神経学会学術総会 2014 年 6 月 27 日 パシフィコ横浜 神奈川県横浜市
- (4) 田中謙二 グリアが起点となる脳内環境変化 Neuro2013 2013 年 6 月 20 日 京都国際会館 京都府京都市
- (5) 田中謙二 オプトジェネティクスと精神医学 第 109 回日本精神神経学会学術総会 2013 年 5 月 23-25 日 福岡国際会議場 福岡県福岡市
- (6) 田中謙二 オプトジェネティクスと fMRI を融合させたグリアニューロン相互作用の解析 (シンポジウム 20 ニューロン・グリア連環から紐解く神経疾患メカニズム) 第 87 回日本薬理学会年会 2014 年 3 月 20 日 仙台国際センター 宮城県仙台市
- (7) Tanaka KF. Expanding the repertoire of optogenetically targeted cells with an enhanced gene expression system.

OPTOGENETICS-2013 Theme Conference. May 1-2, 2013, Hilton Garden Inn, Waltham, USA

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: テトラサイクリン遺伝子発現誘導システムにおける発現量を増幅させる遺伝子座とノックインによる増幅の効果
 発明者: 田中謙二、山中章弘
 権利者: 田中謙二、山中章弘
 種類: 特許
 番号: 特願 2011-193680
 出願年月日: 平成 23 年 6 月 8 日
 国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 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
http://keioect.web.fc2.com/keioect/Top_Page.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者
 田中 謙二 (TANAKA, Kenji)
 慶應義塾大学・医学部・特任准教授
 研究者番号: 30329700

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