

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：63905

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890291

研究課題名(和文)オリゴデンドロサイトによるニューロン軸索選定機構の解析

研究課題名(英文)Molecular mechanisms that function in oligodendrocyte myelination

研究代表者

清水 健史 (SHIMIZU, Takeshi)

生理学研究所・分子生理研究系・助教

研究者番号：60398237

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：近年、オリゴデンドロサイトが形成するミエリンによって神経情報伝達が調節されることが示唆されており、適切な本数、肥厚度のミエリンを形成する分子機構を理解することは、脳の高次機能を理解する上で重要であると考えられる。また多発性硬化症などの脱髄性疾患が発症すると重篤な症状が引き起こされるため更なる病態の理解も望まれていることから、本研究ではミエリン形成を制御するファクターを新規に発見し、オリゴデンドロサイトの脳機能発現と脱髄性疾患の研究を行った。

研究成果の概要(英文)：Oligodendrocytes are glial cells that myelinate neuronal axons in the central nervous system. Myelin insulates axons to increase conduction velocity of neuronal action potentials. Recent studies have shown that mechanical factors influence various cell properties. Mechanical stimulation can be transduced to intracellular biochemical signals through conformational changes in focal adhesion-related mechanosensors. We analyzed oligodendrocyte morphology and myelination in relation with the mechanosensors. In addition, we found that non-canonical Wnt signaling was up-regulated in a demyelinating mouse model. We examined whether non-canonical Wnt signaling pathway had a role in the Experimental Autoimmune Encephalomyelitis-induced neural pathology.

研究分野：神経化学・神経薬理学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：オリゴデンドロサイト ミエリン グリア細胞

1. 研究開始当初の背景

ニューロンは活動電位を跳躍伝導で伝えることにより、迅速に神経回路間の情報交換を行うことができる。そのため、多発性硬化症などの脱髄性疾患が発症すると神経情報伝達が滞り、重篤な症状が引き起こされる。近年、髄鞘形成後も髄鞘は伝導速度を調節していることが明らかとなり、脳機能発現に従来考えられなかった様式で関与していることが示唆された (Yamazaki Y et al., *Neuroscientist.*, 2010)。中枢神経系では一つのオリゴデンドロサイト細胞が、複数の軸索に対して髄鞘を形成することが知られているため、複数の軸索が同調して伝導速度調節を受けている可能性がある。しかし、一つのオリゴデンドロサイトが形成する髄鞘の数は一定ではなく、太い軸索に髄鞘を形成するオリゴデンドロサイトはミエリンの本数が少なく、細い軸索に髄鞘を形成するオリゴデンドロサイトは本数が多いことが知られている。では、オリゴデンドロサイトはどのようにして最終的に形成すべきミエリンの本数を決定するのだろうか？近年、ニューロン側のみならず、ミエリン側の軽度な変化が、正常な神経情報伝達に関与することが知られてきており (Tanaka H et al., *J. Neurosci.*, 2009)、適切な肥厚度および数のミエリンを形成する機構を理解することは、脳の高次機能を理解する上で極めて重要であると考えられた。

2. 研究の目的

近年、オリゴデンドロサイトが形成するミエリンによって神経情報伝達が調節されることが示唆されており、適切な本数、肥厚度のミエリンを形成する分子機構を理解することは、脳の高次機能を理解する上で重要であると考えられる。また多発性硬化症などの脱髄性疾患が発症すると重篤な症状が引き起

こされることから更なる病態の理解が望まれている。本研究では、

- (1) ミエリン構成因子の産生量
- (2) オリゴデンドロサイトのメカノトランスダクション
- (3) Wnt シグナル

に着目し、ミエリン形成の分子機構を理解し、オリゴデンドロサイトの脳機能発現調節の新たな概念を創出することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ドイツのマックスプランク研究所との共同研究により、オリゴデンドロサイト特異的なコレステロール合成酵素欠損マウスの固定脳を入手した。ピプラトーム切片を作成後、Floating Immunohistochemistry 法によりオリゴデンドロサイトマーカーである Myelin Basic Protein (MBP) 抗体の組織染色を行った。その後、個々のオリゴデンドロサイトの形態と、突起の本数を解析した。現在、オリゴデンドロサイト特異的 Myelin Basic Protein (MBP) 遺伝子のエンハンサーを用い、少数のオリゴデンドロサイトのみを標識できる GFP トランスジェニックマウスと、前述したコレステロール合成経路に関わる酵素 Fdft1 のコンディショナル KO マウス (Fdft1^{flox/flox}; PLP/CreER^T マウス) を交配させている。今後、個々のオリゴデンドロサイトを GFP で標識して詳細に形態を解析する。その後、Fdft1 欠損マウスとコントロールマウスの成体脳の間で、一つのオリゴデンドロサイトが形成する髄鞘の数を蛍光顕微鏡下で比較する。

- (2) 機械的刺激を感受し細胞内の化学シグ

ナルへ変換するメカノセンサーが、ミエリン形成期のオリゴデンドロサイトに発現しているかどうかを in situ hybridization 法で解析した。

メカノセンサーをロックダウンすることによって培養オリゴデンドロサイトの形態、およびオリゴデンドロサイト-ニューロン共培養時のミエリン形成効率が変化するかどうかを調べた。

オリゴデンドロサイトに機械刺激を加えることによりメカノセンサーに関連した様々な変化が認められるかどうかを調べた。

Shear stress(ずり応力)をかける実験を行った。Shear stress をかけるとオリゴデンドロサイトの形態が変化するかどうか、またドミナントネガティブ体の導入により、それらの効果がキャンセルされるかどうかを調べた。

(3)マウス生後の正常ミエリン形成期と、脱髄誘導後の再ミエリン形成部位における Wnt リガンドおよび Wnt シグナル下流因子の発現を in situ hybridization 法で解析した。マウス生体内のそれらの時期、部位で発現が確認された因子に関して、培養細胞を用いて、それら因子の強制発現、siRNA を用いたロックダウン、阻害剤の添加を行ってシグナル経路を検討した。Wnt シグナル関連因子が担う役割を in vivo で解析するために、それらの因子に対するトランスジェニックマウスを入手した。トランスジェニックマウスは、Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)によって脱髄を誘導し、その後ドキシサイクリンを投与することにより、それら遺伝子の発現を誘導して脱

髄性疾患への影響を検討する。

4. 研究成果

(1)コレステロール合成酵素欠損マウスの固定脳をドイツのマックスプランク研究所から受け取り、オリゴデンドロサイト-細胞あたりの突起の数を測定したところ突起の減少が認められたため、より詳細な解析を行うために当該コレステロール合成酵素欠損マウスを岡崎動物実験センターに輸送、導入した。

(2)機械的刺激を感受し細胞内の化学シグナルへ変換するメカノセンサーに注目し、凍結切片 in situ hybridization 法により複数個のメカノセンサーの発現をミエリン形成期のオリゴデンドロサイトで検出した。メカノセンサーとして機能する因子を培養オリゴデンドロサイト前駆細胞において特異的に阻害した結果、オリゴデンドロサイト細胞の形態変化と、オリゴデンドロサイト-ニューロン共培養におけるミエリン形成効率に変化が見られた。実際にオリゴデンドロサイトに機械刺激を加えたところ、それらメカノセンサーの活性化が認められた。

(3)脱髄がおこったマウス脊髄のニューロンにおいて、non canonical Wnt シグナルが活性化されることを見出した。この脱髄マウス脊髄における Wnt シグナルの活性化は、ミクログリア細胞に隣接して特異的に認められた。この結果から、脱髄の進行に伴う免疫作用を受けたミクログリアが脊髄ニューロンに作用するメカニズムを想定し、その活性

化される細胞内シグナル経路を解析した。

5．主な発表論文等

特になし

6．研究組織

(1)研究代表者

清水 健史 (SHIMIZU, Takeshi)

生理学研究所・分子生理研究系・助教

研究者番号:60398237