

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670120

研究課題名(和文) 動的イメージングによるRanvier絞輪内分子動態の解明

研究課題名(英文) Imaging-based analysis of nodes of Ranvier dynamics

研究代表者

稲生 大輔 (Ino, Daisuke)

国立研究開発法人理化学研究所・生命システム研究センター・特別研究員

研究者番号：40721981

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：感覚や運動の高速な情報伝達の要となるのが有髄神経に存在するRanvier絞輪であり、その機能破綻は様々な病気の原因となりうると想定されている。本研究では、個体内においてRanvier絞輪を標識し、非破壊的に観察する手法を開発することで、Ranvier絞輪が異常時にどのように動的な変化するかを明らかにすることを旨とした。特に、Ranvier絞輪を標識する蛍光プローブを開発し、本プローブをアデノ随伴ウイルスによりマウス脊髄軸索に発現させ、病態時のRanvier絞輪周辺の動的な変化を解析した。

研究成果の概要(英文)：Nodes of Ranvier play a pivotal role in fast transmission of sensory- and motor information in the peripheral nervous system, and disruption of nodes of Ranvier can be a cause of various neurological diseases. To gain the insight into how disruption of nodes of Ranvier occurs during the disease progression, we aimed to develop a method that allows analysis of nodes of Ranvier dynamics in the intact tissue. We developed a fluorescent probe that labels nodes of Ranvier. By expressing this probe in mice spinal cord using AAV vector, we analyzed the morphological changes nodes of Ranvier in diseased nerves.

研究分野：神経科学

キーワード：有髄神経 Ranvier絞輪 イメージング

1. 研究開始当初の背景

有髄神経における高速な情報伝達の要となるのが Ranvier 絞輪であり、その機能破綻は様々な難治性疾患の原因となる。Ranvier 絞輪には活動電位発生に必須な分子アセンブリが形成されており、その動態が軸索の電気活動と密接に関連する可能性が近年明らかになりつつある(図 1)。従って、Ranvier 絞輪の分子アセンブリが”いつ・どこで・どのようにして形成され、破綻するのか?”を解明することは、軸索における情報処理基盤を本質的に理解し、病気の治療ターゲットを探索する上で重要な課題である。そこで申請者は、3次元構造を保った組織内において、非破壊的に Ranvier 絞輪の分子アセンブリ動態を可視化する手法の開拓に挑戦し、Ranvier 絞輪の機能破綻による疾患の発症機構に迫る。

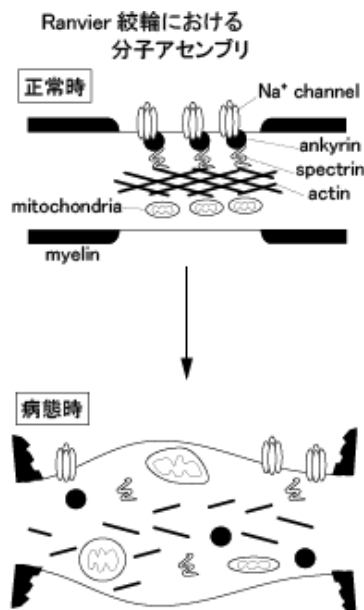


図 1 Ranvier 絞輪における分子アセンブリ

2. 研究の目的

本研究では、病態時の神経において Ranvier 絞輪がどのように変化するかを 1本の軸索の解像度で可視化することを目指した。特に、Ranvier 絞輪を可視化する蛍光プローブを開発し、本プローブをマウス脊髄軸索に導入し、多発性硬化症の実験モデルである Experimental allergic encephalomyelitis (EAE) 誘導時の Ranvier 絞輪の変化を非破壊的な条件下で観察を行なった。

3. 研究の方法

(1) アデノ随伴ウイルスベクター (AAV) による脊髄軸索への遺伝子導入

AAV を新生児マウス (C57BL/6) 腹腔内に投与することで、脊髄軸索への sparse な遺伝子導入を行なった。これにより、ラベルした軸索 1 本の追跡が可能となる(図 2)。

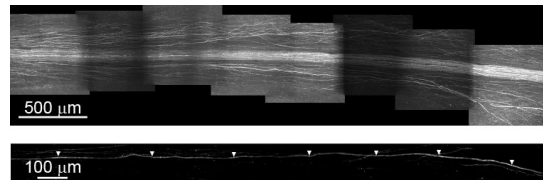


図 2 AAV による軸索のラベル化

上: 透明化脊髄を用いてラベル化された軸索を広範囲に渡って撮影した画像。
下: 1本の軸索をトラックした例。1 mm 以上に渡って追跡できた。矢印は Ranvier 絞輪を示している。

(2) EAE 誘導

ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質 (MOG) の 35-55 番目のアミノ酸残基を C57BL/6 に免疫することで、EAE を誘導した。四肢の麻痺や運動機能の異常など EAE 症状が観察された個体について解析を行なった。

(3) 脊髄軸索のトラッキング

共焦点レーザー顕微鏡、または二光子励起顕微鏡を用いて、透明化処理をした脊髄における蛍光ラベルされた軸索を連続的に撮影した。ステージを手動、または自動で動かすことで XY 方向に広範囲に渡って画像を取得した。画像を再構成し、単一の軸索をトラックした。

(4) 組織の透明化

脊髄を非破壊的に広範囲に渡って観察するために、組織の透明化を行なった。方法としては CUBIC 法を用いた (Susaki et al., Cell, 2014; Tainaka et al., Cell, 2014)。化学固定した脊髄をブロックのまま CUBIC1 液および 2 液に浸潤させることで透明化を達成した。

4. 研究成果

(1) Ranvier 絞輪可視化プローブの開発

Ranvier 絞輪選択的に局在する分子に蛍光蛋白質を付加することで Ranvier 絞輪を蛍光ラベルすることに成功した(図 1)。これにより、免疫染色などの操作を行なうことなく、Ranvier 絞輪を可視化することが可能となった。

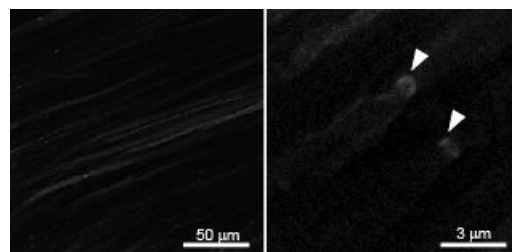


図 3 Ranvier 絞輪可視化プローブ

右は拡大図を示し、矢印は Ranvier 絞輪を示している。

(2) 病態時の Ranvier 絞輪の可視化解析

(1)において開発したプローブを AAV でマウス脊髄に発現させ、EAE を誘導した。EAE 症状が起こったマウス脊髄を化学固定・透明化し、軸索や Ranvier 絞輪の構造について非破壊的に解析を行なった。Ranvier 絞輪周辺において特徴的な形態異常や細胞の集積が観察された。本結果は Ranvier 絞輪が病態時の有髄神経の異常開始部位である可能性を示唆する。

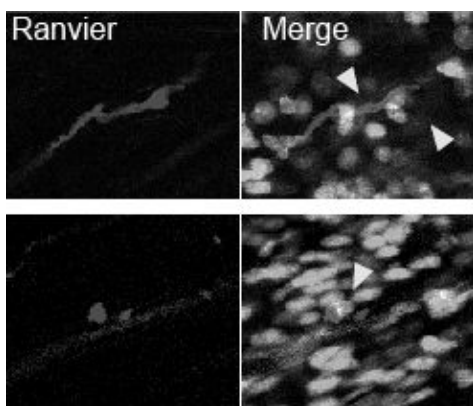


図 4 EAE 誘導時の Ranvier 絞輪の異常
左は Ranvier 絞輪プローブの蛍光、右は細胞の核を重ね合わせた画像を示している。異常部位に変形した細胞核が集結している様子を示している(矢印)。

(3) in vivo imaging の着手

(2)において観察した現象の時空間動態を in vivo で蛍光イメージングにより長期間観察するための系の立ち上げを独自に行なった。マウスの脊椎を加工した金属片により固定し、chronic imaging window の作成を行なった(図 3)。本手法により脊髄軸索の in vivo imaging を達成した。今後、EAE を誘導したマウスに本手法を適用し、解析を進めていく予定である。

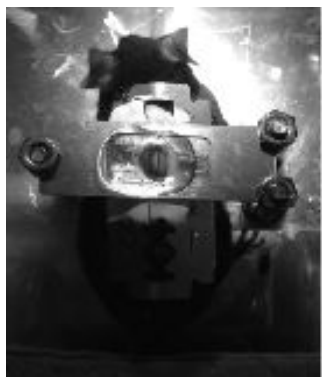


図 5 脊髄 chronic imaging window の作成

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 2 件)

Daisuke Ino and Masamitsu Iino: In vivo gene transfer to rodent sciatic nerve Schwann cells by using electroporation, Journal of Visualized Experiments (2016), in press, 査読有

Daisuke Ino, Hiroshi Sagara, Junji Suzuki, Kazunori Kanemaru, Yohei Okubo, and Masamitsu Iino.: Neuronal Regulation of Schwann Cell Mitochondrial Ca²⁺ Signaling during Myelination, Cell Reports (2015), 12(12):1951-9. 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

稲生 大輔, 相良 洋, 鈴木 純二, 金丸 和典, 大久保 洋平, 飯野 正光: ミエリン鞘形成中のミトコンドリア代謝を制御する末梢神経軸索-シュワン細胞間シグナル, 第121回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2016年3月28日-30日, ビッグパレットふくしま, 郡山

稲生 大輔, 相良 洋, 鈴木 純二, 金丸 和典, 大久保 洋平, 飯野 正光: ミエリン鞘形成中の代謝制御に関わる末梢神経軸索-シュワン細胞間相互作用シグナル, 第133回日本薬理学会関東部会, 2015年10月10日, 柏の葉カンファレンスセンター, 柏

稲生 大輔, 相良 洋, 鈴木 純二, 金丸 和典, 大久保 洋平, 飯野 正光: Neuronal regulation of Schwann cell mitochondrial metabolism controls myelination, 第88回日本薬理学会年会, 2015年3月18日-20日, 名古屋国際会議場, 名古屋

〔その他〕

ホームページ等

東京大学大学院医学系研究科 細胞分子薬理学教室ホームページ

<http://calcium.cmp.m.u-tokyo.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

稲生 大輔 (INO DAISUKE)

国立研究開発法人理化学研究所・生命システム研究センター・特別研究員

研究者番号: 40721981

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし