

平成 22 年 4 月 19 日現在

研究種目： 若手研究 (B)

研究期間： 2007 ~ 2009

課題番号： 19700356

研究課題名 (和文) オリゴデンドロサイトによる活動電位の軸索伝導の修飾

研究課題名 (英文) Modulatory effects of oligodendrocytes on axonal conduction of action potentials

研究代表者

山崎 良彦 (YAMAZAKI YOSHIHIKO)

山形大学・医学部・准教授

研究者番号： 10361247

研究成果の概要 (和文): 海馬白板に位置するオリゴデンドロサイトを同定し, 神経伝達物質であるグルタミン酸や細胞外カリウム濃度の増加に反応して脱分極することを示した。そして, オリゴデンドロサイトを脱分極させると, そのオリゴデンドロサイトの髄鞘で取り囲まれている軸索の活動電位の伝導速度が速くなることを証明した。この効果には, オリゴデンドロサイトの脱分極に伴う髄鞘や軸索の電気的性質の変化が関与していると考えられた。このような修飾効果の存在は, 脳での情報処理に対するオリゴデンドロサイトの新しい役割を示唆するものである。

研究成果の概要 (英文): Oligodendrocytes in the alveus of hippocampus were found to respond to exogenously applied glutamate receptors with depolarization. Electrical stimulation evoked inward currents through various routes involving glutamate receptors and inward rectifier potassium channels. Direct depolarization of oligodendrocytes shortened the latencies of action potentials, indicating that oligodendrocytes increase the conduction velocity of action potentials by another mechanism in addition to saltatory conduction and play active roles in information processing in the brain.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	0	1,300,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	480,000	3,380,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：海馬, 白板, オリゴデンドロサイト, 活動電位, グルタミン酸受容体, 伝導速度, 髄鞘, ラット

1. 研究開始当初の背景

オリゴデンドロサイトは、中枢神経系において、各軸索を絶縁する髄鞘を形成している細胞である。髄鞘があることにより、活動電位は跳躍伝導によって速く確実な伝播をすることが可能である。オリゴデンドロサイトについては、オリゴデンドロサイトの発生・分化、軸索の発達とオリゴデンドロサイト自身の成熟との相互作用、また、神経系における虚血性疾患や変性疾患の病態における役割についてかなり詳細に研究されている。しかしながら、髄鞘形成による絶縁効果以外の正常時の生理的機能については、ほとんど知られていない。グリア細胞が神経活動に対し積極的な関与していることは広く認められてきており、オリゴデンドロサイトも多様な生理的機能を持っている可能性が高いと考えられる。我々は、これまでの研究において用いてきたニューロンとアストロサイトからの同時ホールセル記録法をオリゴデンドロサイトとニューロンの組み合わせに応用することによって、オリゴデンドロサイトの神経活動に対する役割をより広くより詳細に検証することができると考えた。また、活動電位の軸索伝導に関するこれまでの予備的な研究において、セロトニンやアデノシンといった神経修飾物質が、海馬白板における活動電位の軸索伝導に対し抑制的に作用することを観察している。このメカニズムはまだ明らかになっていないが、オリゴデンドロサイトを介した効果である可能性が高い。以上のことから、これまで知られている機能の他に、オリゴデンドロサイトがどのように神経活動に関わっているかを明らかにしたいということが、研究全体の構想であり、本研究では、ニューロンとオリゴデンドロサイトとの細胞レベルでの相互作用を解明する。

2. 研究の目的

研究の具体的な最終目的は、オリゴデンドロサイトによる活動電位の軸索伝導に対する修飾効果のメカニズムを明らかにすることである。そのために、以下のことを行う。

(1) 海馬白板に位置するオリゴデンドロサイトの同定。海馬の個々のオリゴデンドロサイトからホールセル記録した報告は少なく、詳細はわかっていない。このため、オリゴデンドロサイトの細胞膜の電氣的性質（静止膜電位と入力抵抗）と全細胞電流パターンを測定し、さらに形態学的特徴を調べる。

(2) オリゴデンドロサイトに発現している受容体および受容体反応の検討。グルタミン酸を主とした神経伝達物質に対する受容体反応を調べる。

(3) オリゴデンドロサイトと錐体細胞との同時ホールセル記録を行うことによって、ニューロンとオリゴデンドロサイトとの相互作用、特に活動電位の軸索伝導に対するオリゴデンドロサイトの修飾効果を直接的に証明する。具体的には、この修飾効果の性質について、効果が出現するまでの潜時や効果の持続時間を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、ラット海馬のスライス標本を用いた急性実験を行う。ホールセル記録と免疫組織化学染色を組み合わせた手法を用いる。

(1) ラット海馬スライス標本を作成し、近赤外線微分干渉顕微鏡下に海馬白板に存在するオリゴデンドロサイトを観察・同定し、細胞体よりホールセル記録をする。

(2) オリゴデンドロサイトの電気生理学的性質を検討するために、voltage-clamp mode と current-clamp mode の両者を用い、電圧変化、電流注入に対する反応を調べる。

(3) 電極内溶液にバイオサイチンを加え、電気生理学的実験後に染色し、形態を確認する(図1)。



図1 オリゴデンドロサイトのDAB発色像

(4) 注入した バイオサイチン に対する蛍光染色と、オリゴデンドロサイトのマーカータンパクである CNPase に対する抗体を用いた蛍光染色を組み合わせることによって、記録した細胞がオリゴデンドロサイトであることを証明する。

(5) 白板にタングステン製の刺激電極を刺入し、この部位のオリゴデンドロサイトが電気刺激にて反応するかどうか検証する。細胞外カリウム濃度の増加や放出された神経伝達物質による反応の有無について検証する。

(6) 薬物の微量圧投与に対する反応を調べる。薬物としては、主要な神経伝達物質であるグルタミン酸や γ -アミノ酪酸の他に、広範囲調節系における神経伝達物質であるセロトニンやアデノシンを使用する。

(7) オリゴデンドロサイトと錐体細胞を同時ホールセル記録し、逆行性に伝導する活動電位を発生させるために、刺激電極を白板の海馬采側に設置する(図2)。そして、活動電位を発生させる前あるいは同時にオリゴデンドロサイトを刺激した場合に、活動電位の伝導速度がどのように変化するか検証する。

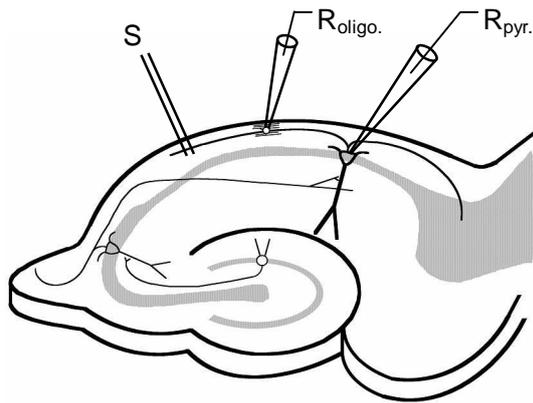


図2 オリゴデンドロサイトとニューロンの相互作用と実験のための電極の設定。オリゴデンドロサイトを刺激することにより、軸索に対し修飾効果を与えるかどうか検証するために、記録用電極をオリゴデンドロサイト (R_{oligo.}) と錐体細胞 (R_{pyr.}) とに、そして電気刺激用の電極 (S) を設置する。

4. 研究成果

(1) 海馬白板に位置するオリゴデンドロサイトの形態学および電気生理学的性質。

1つのオリゴデンドロサイトは、錐体細胞の神経軸索と平行に走る突起を10~30本持っていることがわかった(図3)。また、静止膜電位は平均で約-75 mV、入力抵抗は約115M Ω であり、脳梁や視神経に存在する成熟オリゴデンドロサイトの値とほぼ同じ値であった。

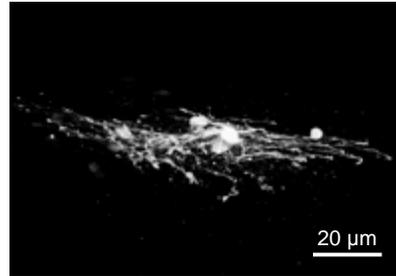


図3 オリゴデンドロサイトの蛍光染色像。

(2) オリゴデンドロサイトの同定。

ホールセル記録したオリゴデンドロサイト(赤)は、オリゴデンドロサイトのマーカータンパクであるCNPase陽性であり(緑)、オリゴデンドロサイトであることが確認された(図4)。

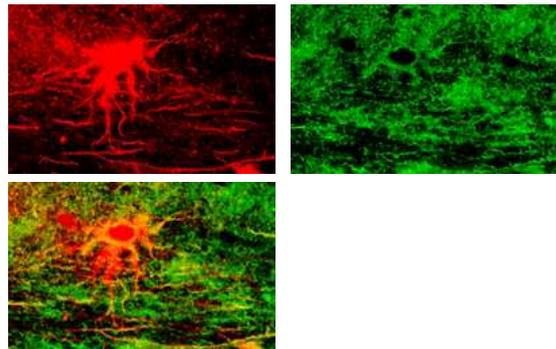


図4 (左上)ホールセル記録で注入したバイオサイチンに対する蛍光染色像。(右上) CNPase の抗体に対する蛍光染色像。(下)重ねた像。

(3) 電気刺激により、オリゴデンドロサイトは脱分極性の反応を示した。反応は時間的にかなり遅い動態を示し、減衰時定数は平均で2.53ミリ秒であった。反応の立ち上がりも著しく遅いことから、通常のシナプス伝達による反応ではなく、拡散してくる神経伝達物

質に反応していると示唆された。これらの電気刺激による反応は、以下の複数の機序で生じていることが分かった。

NMDA型およびnon-NMDA型グルタミン酸受容体を介した反応（上記の通り、拡散による）（図5 A）。

内向き整流性カリウムチャンネルを介した反応（電気刺激によって多数のニューロンが活動電位を発生するため、細胞外カリウムイオン濃度が増加する）（図5 B）。

記録しているオリゴデンドロサイトの髄鞘によって囲まれている軸索を伝導する活動電位由来の反応（図5 C）。

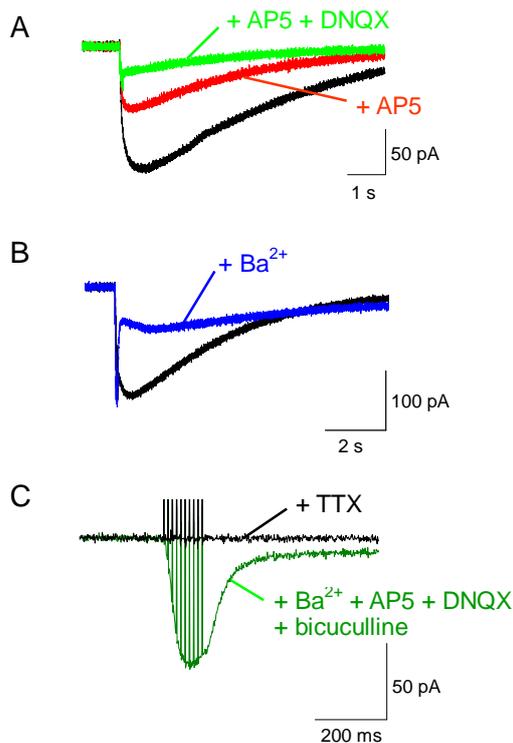


図5 オリゴデンドロサイトで観察される電圧固定下での内向き電流。

(A) グルタミン酸受容体阻害薬 (AP5, DNQX) の効果。

(B) 内向き整流性カリウムチャンネルの阻害薬 (Ba²⁺) の効果。

(C) 電気刺激によって生じる初期に速い成分は、(A), (B) の阻害薬によって影響されなかったが、TTX では完全に抑制された。記録したオリゴデンドロサイトの突起によって覆われている軸索を伝導する活動電位に由来する可能性がある (Ba²⁺ ではブロックされない K⁺ チャンネルなど)。

(4) 薬物微量投与による受容体発現の確認。

グルタミン酸受容体が発現しているかどうかをみるために、TTX と bicuculline 存在下でグルタミン酸を近傍に微量投与した。グルタミン酸投与により、平均で 60 pA ほどの内向き電流が生じた。NMDA 受容体のアンタゴニストでコントロールの 70% 程度まで減少した。これに non-NMDA 受容体のアンタゴニストである DNQX を加えると、コントロールの 15% ぐらいにまで減少した。これらの結果から、オリゴデンドロサイト上にグルタミン酸受容体が発現していることが確認された。

(5) 錐体細胞の軸索とオリゴデンドロサイトとの位置関係を知るために、両者にバイオサイチンを注入して検討した。約 5 分の 1 の確率で軸索とオリゴデンドロサイトの突起領域が重なっている組み合わせを得ることができた (図 6)。

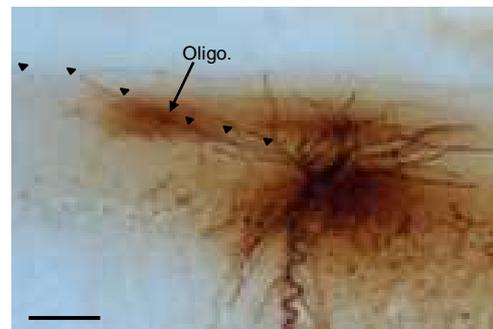


図6 錐体細胞の軸索とオリゴデンドロサイトの位置関係 (DAB 発色)。

(6) オリゴデンドロサイトによる活動電位の軸索伝導に対する修飾効果。オリゴデンドロサイトと錐体細胞から同時にホールセル記録し、軸索を逆行性に伝導してくる活動電位の潜時を測定した。オリゴデンドロサイトを記録電極を通して直接脱分極 (-20 mV, 1 Hz, 30回) すると、10-12秒後に錐体細胞で記録される活動電位の潜時が短くなりはじめ、最大で約10%短くなった。オリゴデンドロサイトの脱分極が終わると、潜時は速やかにコントロールレベルに戻った (図 7)。

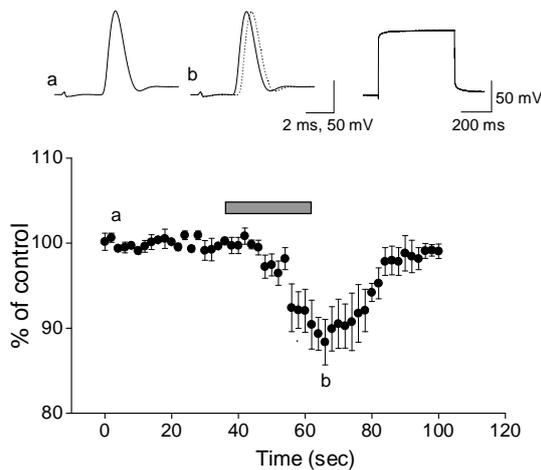


図7 オリゴデンドロサイトの脱分極による、活動電位の伝導速度が促進。

(上左)逆行性に軸索を伝導し、細胞体で記録される活動電位。(上中)オリゴデンドロサイトの脱分極により(上右)、活動電位の潜時が短縮する。

(下)潜時短縮が観察された例の経時的変化。

この変化は27例中4例のみで観察されたが、実験後の染色により、変化がみられなかった例では記録したオリゴデンドロサイトと軸索が離れて位置していたのに対し、変化がみられた4例ではオリゴデンドロサイトの突起の領域を軸索が走行していることを確認した(図8)。

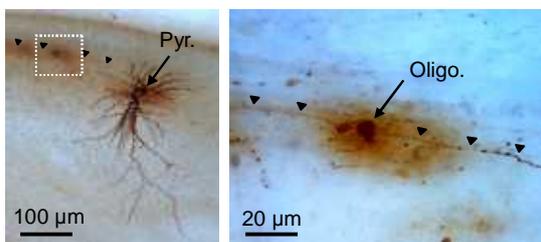


図8 変化が見られた例では、錐体細胞の軸索が、記録したオリゴデンドロサイトの突起領域内を走行しているのが確認された。

以上のことから、オリゴデンドロサイトの脱分極により、活動電位の伝導速度が速くなることがわかった。オリゴデンドロサイトは神経活動によって脱分極するので、オリゴデンドロサイトが活動依存的に軸索の機能を修飾することが示唆された。また、この修飾効果の機序には、髄鞘を形成する突起のダイナ

ミックな形態的变化が含まれ、ランビエの絞輪傍部や絞輪間部における細胞外抵抗の増大・リーク電流の減少などにより活動電位の軸索伝導が促進すると考えられた。

(7) 国内外での評価。

オリゴデンドロサイトの脱分極による海馬錐体細胞の活動電位の軸索伝導速度の促進効果を発見したという内容は、“Boosting Brain Speed” というタイトルで Cambridge University Press よりプレスリリース(2008年4月1日)され、さらに The Neuroscientist 誌(2008年12月号)の表紙でも紹介された。

(8) 今後の展望。

最終年度では、このオリゴデンドロサイトによる修飾効果の作用機序について検討を始めた。髄鞘を形成する突起のダイナミックな形態的变化が含まれる可能性が考えられたため、電極内溶液の浸透圧を増加させ、オリゴデンドロサイトがどのように形態変化するか観察した。その結果、細胞体と近傍の突起における体積変化を観察することができた。髄鞘形成突起における変化については、共焦点顕微鏡下でのリアルタイム観察が必要である。また、アデノシンを代表とする神経修飾物質などの液性因子による伝導速度の修飾の検討も重要な課題であると考えられた。

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5件)

Yamazaki Y, Hozumi Y, Kaneko K, Fujii S, Goto K, Kato H. Oligodendrocytes: Facilitating axonal conduction by more than myelination. published on May 8, 2009, as doi:10.1177/1073858409334425. 査読有。

Jia Y, Yamazaki Y, Nakauchi S, Sumikawa K. $\alpha 2$ nicotine receptors function as a molecular switch to continuously excite a subset of interneurons in rat hippocampal circuits. Eur J Neurosci 29: 1588-1603, 2009. 査読

有.

Yamazaki Y, Hozumi Y, Kaneko K, Sugihara T, Fujii S, Goto K, Kato H. Modulatory effects of oligodendrocytes on the conduction velocity of action potentials along axons in the alveus of the rat hippocampal CA1 region. *Neuron Glia Biology* 3: 325-334, 2008. 査読有.

山崎良彦, 加藤宏司: 介在ニューロン付随性グリア細胞による神経活動の修飾. *Brain and Nerve* 59: 689-695, 2007. 査読無.

Tanaka KF, Takebayashi H, Yamazaki Y, Kato H, Ono K, Iwasato T, Itohara S, Ikenaka K. Murine model of Alexander disease: analysis of GFAP aggregate formation and its pathological significance. *Glia* 55, 617-631, 2007. 査読有.

[学会発表](計8件)

山崎良彦: アストロサイト機能不全マウスにおけるグルタミン酸取り込み機能の変化. 第42回 東北生理談話会. 2009年10月17日, 盛岡.

Yamazaki Y. Modulation of the axonal conduction by oligodendrocytes in the alveus of the rat hippocampus. *Myelin Development, Function and Related Diseases. The 9th Biennial Satellite Meeting of the ISN on Myelin Biology.* 2009年8月21日, Gyeongju, S. Korea.

山崎良彦: 海馬白板のオリゴデンドロサイトの同定および活動電位の軸索伝導に対する修飾効果. 平成21年度 生理学研究 研究所研究会 神経科学の新しい解析法とその応用. 2009年7月18日, 岡崎.

Yamazaki Y. Modulation of neuronal activities by interactions between neurons and glial cells. *The 11th Meeting of the Hirosaki International Forum of Medical Science.* 2009年3月27日, Hirosaki.

山崎良彦: 介在ニューロン付随性オリゴデンドロサイトの形態と機能. 第41回 東北生理談話会. 2008年10月18日, 弘前.

Yamazaki Y. Properties of oligodendrocytes and its modulatory effects on conduction of action potentials in alveus of rat hippocampus. *US-Japan joint meeting for Glial Research,* 2008年3月17-20日. Philadelphia, USA.

Yamazaki Y. Oligodendrocytes modulate conduction of action potentials in alveus of rat hippocampus. *37th Annual meeting of the Society for Neuroscience* 2007年11月4日. San Diego, USA.

山崎良彦: 海馬白板のオリゴデンドロサイトによる活動電位の伝導に対する修飾効果. 第40回 東北生理談話会. 2007年10月20日, 仙台.

[その他]

ホームページ等

<http://www.id.yamagata-u.ac.jp/PhysiologyII/Physiol2-J.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 良彦 (YAMAZAKI YOSHIHIKO)

山形大学・医学部・准教授

研究者番号: 10361247