

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：14501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06089・19K21211

研究課題名(和文) 神経活動依存的髄鞘形成の分子基盤の解明：脳白質は可塑的であるか？

研究課題名(英文) Analysis of molecular and cellular basis of activity-dependent myelination

研究代表者

杉尾 翔太 (SUGIO, SHOUTA)

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：30825344

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々の脳は神経細胞とグリア細胞から構成されている。グリア細胞の一種であるオリゴデンドロサイト(OC)は主に脳の白質に分布し、無数の突起を神経細胞の軸索(神経情報の伝導部位)に巻きつけ、神経情報の伝導速度を制御することで神経情報の伝導を最適化することが、明らかになってきている。本研究では、in vivoイメージング法を用いて、神経細胞の活動を増強・抑制した際のOCカルシウム活動の変化を記録し、OCの活動が神経細胞の活動変化と相関することを明らかにした。また、OC-神経細胞間の活動連関を仲介する神経由来因子の一端を突き止めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでのグリア細胞に関する研究は、神経細胞・グリア細胞間の情報交換や栄養交換といった主に「灰白質や脳血管周囲」での神経細胞・グリア細胞クロストークに焦点が当てられてきた。近年、統合失調症などの高次脳機能を獲得した人に固有の疾患である精神疾患において、白質における髄鞘密度(情報伝導速度)の低下とその発症との関連性が示され、高次脳機能障害における白質の重要性が認識されるようになってきている。本研究によって得られた知見はこれら高次脳機能を理解するための共通基盤となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Our brain is composed from neurons and glial cells. Recent studies have unveiled that oligodendrocytes (OCs), a type of glial cells, extend numerous processes to neuronal axons and communicate together to regulate neuronal conduction velocity, which likely mediated by processes of OCs. Here, we performed two-photon microscopy in vivo and patch clamp recording in acute brain slice using a transgenic mouse that expressed a fluorescent calcium indicator (GCaMP6) in OCs. Two-photon imaging revealed that an oligodendrocyte has various spatiotemporal pattern of calcium activity at each processes within a cells, and we demonstrated that changes in neuronal activity are affected to the calcium responses of oligodendrocytes. Notably, the frequency and active spots are increased with neuronal activation and decreased with neuronal suppression. Moreover, patchclamp analysis indicated that the calcium transient in oligodendrocyte is mediated by neurotransmitters.

研究分野：神経科学

キーワード：神経活動依存性髄鞘形成

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳白質の神経軸索は髄鞘と呼ばれる脂質に富んだ電気絶縁体によって被覆されており、髄鞘が形成されることによって神経軸索を伝わる活動電位の伝導速度が飛躍的に上昇する。脳全体に占める白質の割合は高等動物になるに従い増大することから、我々が高次脳機能を獲得した背景には、灰白質の進化的発達のみならず白質による神経情報伝達の高速化が重要であったと考えられる。

髄鞘はグリア細胞の一種であるオリゴデンドロサイト(OC)の細胞突起が特殊化したものである。髄鞘の形成やターンオーバーには神経細胞・OC・OPC 間の Ca^{2+} を介したクロストークが重要であると考えられており、生後発達期の環境や経験は神経情報伝達の高速化を促す要因となる。実際に、特殊な訓練を幼少期から受けている人(ジャグラー、ピアニストなど)では白質の肥厚が認められる(Scholz et al., 2009)。また、成体マウスを用いた研究から、成熟期における新規髄鞘形成を阻害することによって新規運動学習の習得が損なわれることが明らかになっている(McKenzie et al., 2014)。これは学習の習得には白質の可塑的変化が必要で、クロストークを介した白質(OC)の可塑的とも言うべき変化が重要であること示している。

このように、脳白質は、「単なる電線」から神経細胞の活動に呼応してその伝導速度を変化させる「可塑的な電線」へ、と概念の転換期にあると言える。しかしながら、どのような神経細胞-OC・OPC 間の Ca^{2+} クロストークが髄鞘形成を制御するのか？ クロストークによって白質にもたらされる変化の実態は何なのか？ 神経細胞や OC の活動を時空間的に制御することで白質伝導速度を人為的に操作し、高次脳機能を操作することが可能なのか？ これらは「白質は可塑的であるか？」という問いに答える上で重要な課題であると考えられる。

2. 研究の目的

これまでのグリア細胞に関する研究は、神経細胞・グリア細胞間の情報交換や栄養交換といった主に「灰白質や脳血管周囲」での神経細胞・グリア細胞クロストークに焦点が当てられてきた。近年、統合失調症などの高次脳機能を獲得した人に固有の疾患である精神疾患において、白質における髄鞘密度(情報伝導速度)の低下とその発症との関連性が示され、高次脳機能障害における白質の重要性が認識されるようになってきている。このような背景を踏まえ、本申請では、OC・OPC の Ca^{2+} 活動に着目し、「情報伝導速度の可塑的変化の細胞応答基盤」を明らかにする点で独自性が高く、高次脳機能障害の分子基盤を解明する点においても重要な知見をもたらすと考えられる。さらに本研究によって明らかにされる知見はこれら高次脳機能を理解するための共通基盤となることが期待される。

これらの点を踏まえて、本研究では、2光子顕微鏡を用いて神経活動が増強あるいは低下時、および運動学習課題中の OC・OPC のカルシウム活動を記録し、神経活動依存的髄鞘形成を制御する Ca^{2+} 活動様式を明らかにし、その細胞応答基盤の解明を目的とした。

3. 研究の方法

蛍光カルシウムインディケーター(GCaMP6)をオリゴデンドロサイト及びその前駆細胞に発現する遺伝子改変マウスを用いて、in vivo 2光子顕微鏡観察を行った。当マウスの神経細胞活動を人工的に増強あるいは低下させた際のオリゴデンドロサイトカルシウム活動を記録し、その活動頻度や1細胞における活動領域を算出した。神経細胞の活動増強には、clozapine n-oxide(CNO)投与によって活動増強を誘導する化学遺伝学手法ならびに自発的運動学習を、活動抑制にはイソフルランの全身投与ならびにテトロドトキシン(TTX)局所投与を行った。神経細胞の活動操作の前後で、同一のオリゴデンドロサイトのカルシウム活動を記録し、比較した。さらに、オリゴデンドロサイト Ca^{2+} 活動の駆動機構を明らかにする為に急性脳スライス標本を作成し、オリゴデンドロサイトから電気記録を取得し、カルシウム活動変化をもたらす因子群の同定を試みた。

4. 研究成果

1) 神経細胞活動-オリゴデンドロサイト活動相関。

オリゴデンドロサイト及びその前駆細胞に蛍光カルシウムインディケーターを発現する遺伝子改変マウスを用いて、神経活動を操作した際のオリゴデンドロサイトおよびその前駆細胞のカルシウム活動を記録した。生体を用いた in vivo イメージングの為に、保定用の金属プレートをマウス頭蓋骨に設置し、頭蓋骨を円形(直径 2 mm)に削り出しカバーガラスに置換することで、観察窓を作成した(観察部位は一次運動野、2/3 層とした)。麻酔下、テトロドトキシン(TTX)投与、運動学習課題前後および化学遺伝学的操作の過程で、神経細胞活動が抑制・増強されることを確認した後に、オリゴデンドロサイトの in vivo Ca^{2+} イメージングを行った。取得したイメージング画像は、蛍光輝度が低く、細胞全体のカルシウム活動を評価することが難しかったため、1細胞から取得したタイムラプス画像(総数 1000 イメージ)の蛍光輝度値をその標準偏差値で重ね合わせ、赤色の疑似カラーで表示することで細胞の全体像を描出し、その上に、時間軸に沿って個々のイメージ画像をプロットした(図1)。この画像編集法により、オリゴデンドロサイトの細胞体および細胞突起のカルシウム活動を評価することが可能となった。オリゴデンドロサイトおよび、その前駆細胞は複数の突起を有しており、その一部が軸索と接触し髄鞘を形成してい

る。今回の解析から、オリゴデンドロサイトのカルシウム活動、特に突起のカルシウム活動は同一細胞の突起であってもそれぞれ独立した固有の時定数・活動領域を有する(突起中の特定のコンパートメントの活動が高い;活動スポット)ことが明らかとなった。イソフルラン麻酔下ならびに TTX 投与下では突起全体のカルシウム活動が優位に低下し、活動領域も縮小した(図 2、図 3)。一方、化学遺伝学手法を用いて神経細胞を増強する為に、DREADD システムを用いた。DREADD は、遺伝学的に改変されたムスカリン受容体(G タンパク質共役型受容体)である。本受容体は合成リガンドであるクロザピン-N-オキシド(CNO)を投与した場合にのみ活性化され、神経細胞の活動増強を誘導する(内因性リガンドでは活性化しない)。アデノ随伴ウイルスを用いて、この受容体を視床運動核へと発現させ運動野上の軸索の活動を増強させた際のオリゴデンドロサイトの活動を解析した。神経軸索の活動を増強させた場合、オリゴデンドロサイトのカルシウム活動頻度は優位に増加し、また活動領域の拡大が観察された(図 4)。コントロール実験として、CNO の代わりに生理食塩水を投与した群及び DREADD を発現しないマウスに CNO を投与した群を設定したが、いずれの群においても、オリゴデンドロサイトのカルシウム活動に変化は認められなかった。また、マウスの運動学習課題を遂行させた前後のオリゴデンドロサイトのカルシウム活動増加も観察された。これらの結果から、*in vivo* におけるオリゴデンドロサイトのカルシウム活動は神経細胞の活動に強く相関し神経細胞由来シグナル因子がオリゴデンドロサイトのカルシウム活動に関与することが明らかになった。これまでの先行研究から、オリゴデンドロサイト及びその前駆細胞は多様な神経伝達物質受容体を発現し、その発現プロファイルは細胞分化に伴ってダイナミックに変化することが知られている。そこで、オリゴデンドロサイトの神経活動依存性カルシウム活動に寄与する神経伝達物質を特定することを試みた。

2) 神経細胞活動-オリゴデンドロサイト活動相関を仲介する伝達物質の解析。

神経細胞活動-オリゴデンドロサイト活動相関を仲介する伝達物質を同定する為に、緑色蛍光カルシウムインディケーター(GCaMP6)をオリゴデンドロサイトに発現するマウスから急性脳スライス標本を作成し、GCaMP6(緑色蛍光タンパク質)の発現を指標にホールセルパッチクランプ法を施し、オリゴデンドロサイトの電気活動を記録した。電気記録を取得する間に各種神経伝達物質受容体の阻害剤を投与し、その電気活動変化を解析した。結果、オリゴデンドロサイトは定常時において興奮性のポテンシャル電位が記録され、これら電気入力、グルタミン酸やATP受容体のブロッカーによって優位に抑制された(図5)。この結果から、オリゴデンドロサイトが神経活動を受容する機構の一端が明らかになった。

3) アデノ随伴ウイルスを用いた、オリゴデンドロサイトへの効率的な遺伝子導入法の確立。

当初の研究計画では、アデノ随伴ウイルスベクター(AAVベクター)を用いて、オリゴデンドロサイトに光遺伝学ツール(チャンネルロドプシン、アーキロドプシン)を導入し、光を用いて白質の伝導速度を人工的に制御し、マウス個体における高次脳機能を制御することを計画していた。しかしながら、既報でオリゴデンドロサイトへ感染指向性が高いとされている血清型ベクターを用いてもオリゴデンドロサイトへ十分な遺伝子導入を達成することが困難であった。そこで、AAVベクターをパッケージングする実験系を立ち上げ、近年、新たに報告されたオリゴデンドロサイトに対して高い感染指向性を示す特殊な血清型の AAV ベクターの作成を進めた。

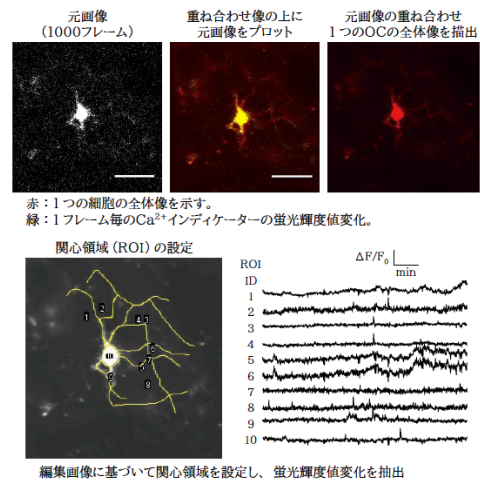


図 1) 関心領域抽出のための画像編集法

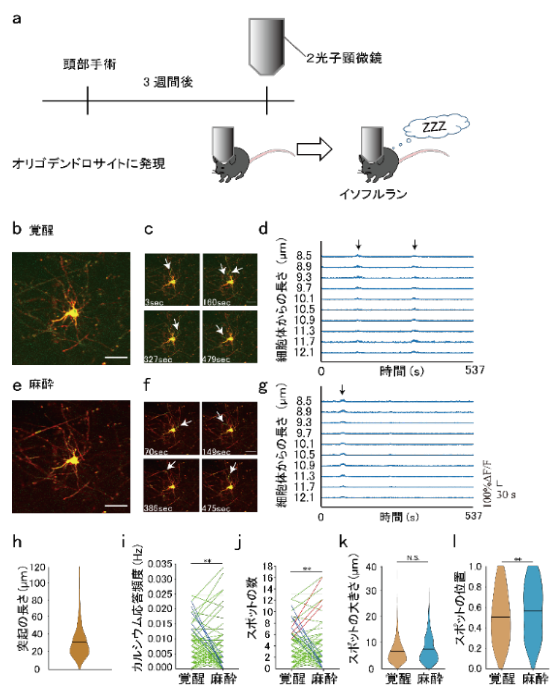


図 2) 麻酔時のオリゴデンドロサイトの活動変化

- a) 実験概略。
b, c, d) 覚醒時の画像および関心領域のカルシウム波形。
e, f, g) 麻酔時の画像および関心領域のカルシウム波形 (bと同一細胞を記録)。スケールバー: 30 μm。
h) オリゴデンドロサイトの突起長。
i) カルシウム活動頻度の変化。
j, k, l) カルシウム活動スポット域の変化。
t-Test (N=7. **p<0.0010)。

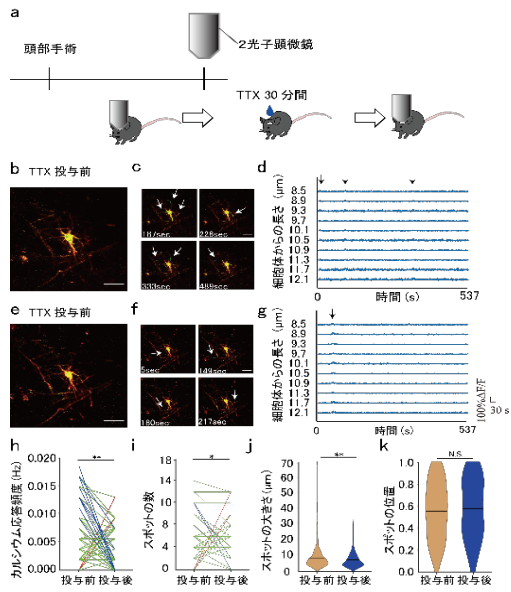


図3) TTX 投与時のオリゴデンドロサイトの活動変化

a) 実験概略。
 b, c, d) TTX 投与前の画像および関心領域のカルシウム波形。
 e, f, g) TTX 投与後の画像および関心領域のカルシウム波形 (b と同一細胞を記録)。スケールバー: $30\ \mu\text{m}$ 。
 h) カルシウム活動頻度の変化。
 i, j, k) カルシウム活動スポット域の変化。
 t-Test (N=4, **p<0.0010)。

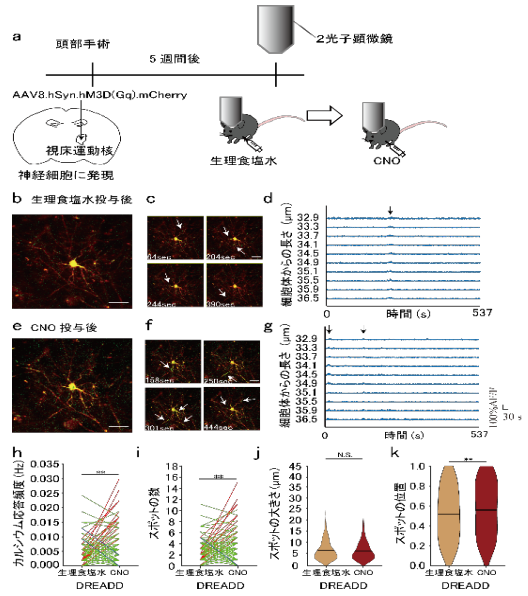


図4) 神経活動増強時のオリゴデンドロサイトの活動変化

a) 実験概略 (DREADD 投与)。
 b, c, d) TTX 投与前の画像および関心領域のカルシウム波形。
 e, f, g) TTX 投与後の画像および関心領域のカルシウム波形 (b と同一細胞を記録)。スケールバー: $30\ \mu\text{m}$ 。
 h) カルシウム活動頻度の変化。
 i, j, k) カルシウム活動スポット域の変化。
 t-Test (N=7, **p<0.0010)。

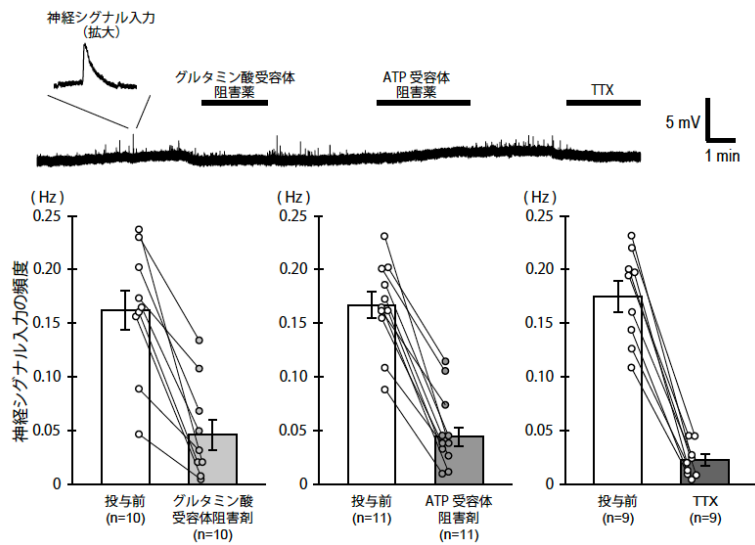


図5)オリゴデンドロサイトの電気活動の変化

上図) オリゴデンドロサイトの電気活動トレース。急性脳スライス標本を作成し電気記録を取得。トレース上のスパイク上のシグナルは微弱な興奮電位を示している。記録中に神経伝達物質受容体の阻害剤(グルタミン酸受容体阻害剤、ATP 受容体阻害剤)及びテロドトキシン(TTX)を投与することで、興奮電位の低下が認められる

下グラフ) 各種薬剤投与前後での、興奮電位の頻度を定量。グルタミン酸受容体阻害剤、ATP 受容体阻害剤、TTX の投与によって、興奮電位の優位な低下が認められる。t-Test (いずれも p<0.0010)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shouta Sugio, Riho Ono, Hiroaki Wake
2. 発表標題 Two-photon in vivo Ca2+ imaging in oligodendrocytes and oligodendrocyte precursor cells
3. 学会等名 Neuro 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shouta Sugio, Riho Ono, Hiroaki Wake
2. 発表標題 Two-photon in vivo Ca2+ imaging in oligodendrocytes and oligodendrocyte precursor cells
3. 学会等名 2019 ISN-ASN Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shouta Sugio, Daisuke Kato, Riho Ono, Kenji Yoshida, Hiroaki Wake
2. 発表標題 Cellular and Molecular basis regulation activity-dependent myelination
3. 学会等名 第43回 日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----