

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15197

研究課題名（和文）新規オリゴデンドロサイト-神経軸索同時標識法の開発と応用

研究課題名（英文）Analyzing oligodendrocyte-neuron interaction using a rabies virus vector and AAV vectors

研究代表者

長内 康幸（Osanai, Yasuyuki）

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：90758004

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：我々は弱毒化狂犬病ウイルスと組織透明化手法を組み合わせることで、マウス小脳のオリゴデンドロサイトとそれが髄鞘形成している軸索の種類を決定した。この手法により、成獣期のオリゴデンドロサイトの約半数はプルキンエ細胞の軸索に髄鞘形成すること、発生の初期では9割以上の細胞がプルキンエ細胞を選択的に髄鞘形成することを明らかにした(Battulga et al., BioRxiv, 2023)。またCre依存性発現ベクターを用いる際に問題となる遺伝子リークが起こるメカニズムを明らかにした(Osanai et al., Mol Ther Methods Clin Dev, in press, 2024)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小脳は運動機能や認知機能に重要な役割を持つ。プルキンエ細胞は小脳皮質における唯一の出力細胞であり、今回我々はこの細胞が発生の初期に選択的に髄鞘形成されていることを突き止めた(Battulga et al., BioRxiv, 2023)。

遺伝子治療では標的細胞のみに遺伝子を発現させるのが理想だが、実際にはリークと呼ばれる標的外での遺伝子発現がみられる(Osanai et al., Mol Ther Methods Clin Dev, in press, 2024)。我々はこのメカニズムの一端を解明した。本研究により、近い将来標的細胞のみを破壊するような遺伝子治療が開発できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We have combined attenuated rabies virus and tissue clearing techniques to determine the type of axons that are myelinated by single cerebellar oligodendrocytes. This approach revealed that approximately half of adult oligodendrocytes myelinate on Purkinje cell axons and that more than 90% of cells selectively myelinate axons of Purkinje cells during mouse early development(Battulga et al., BioRxiv, 2023). We also clarified the mechanism of gene leakage, which is a major problem for using Cre-dependent expression vectors (Osanai et al., Mol Ther Methods Clin Dev, in press, 2024).

研究分野：神経科学

キーワード：オリゴデンドロサイト 髄鞘 小脳 プルキンエ細胞 ウイルスベクター

1. 研究開始当初の背景

脳内では感覚情報や記憶など様々な情報を運ぶ神経軸索が走行している。オリゴデンドロサイトは複数の神経軸索に対して髄鞘を形成するが、特定の情報を持つ神経軸索に髄鞘形成しているのかは不明である。オリゴデンドロサイトによる髄鞘形成は長期記憶の成立や運動学習に不可欠であるため、特定の記憶や行動に関連する神経軸索に対して選択的に髄鞘を形成するオリゴデンドロサイトが存在する可能性がある。そこで本研究では小脳のオリゴデンドロサイトに注目して、オリゴデンドロサイトが小脳皮質の唯一の出力細胞であるプルキンエ細胞に優先的に髄鞘形成するかを調べた。また、細胞種特異的に遺伝子を発現するベクターが標的外の細胞で遺伝子発現「リーク」する原因が分かっていたため、リークのマカニズムの解明を試みた。

2. 研究の目的

オリゴデンドロサイトは 10-50 本の神経軸索に対して髄鞘を形成し、神経伝導速度はオリゴデンドロサイトに髄鞘形成されることで 20-100 倍高速になる(Nave & Werner, 2014)。オリゴデンドロサイトの分化を止めると運動学習や長期記憶が出来なくなることが知られている(McKenzie et al., 2014) (Pan et al., 2020)。近年の研究で OL は複数のニューロンの出力を同期させることで記憶・学習を成立させる可能性が示された(Yamazaki et al., 2019) (Kato et al., 2020)。しかしオリゴデンドロサイトがどのように神経活動を同期させるのか不明であり、記憶の成立・保持のプロセスにおけるオリゴデンドロサイトの動態が分かっていない。仮説として、一部のオリゴデンドロサイトは特定の行動や記憶に関連する複数の神経軸索を選択的に髄鞘形成しそれらの神経活動を同期させることで記憶を定着・保持すると考えられる。そこで本研究では狂犬病ウイルスを用いたオリゴデンドロサイト-神経軸索同時標識法を開発し、オリゴデンドロサイトが特定種類の軸索に対し優先的に髄鞘形成するのかを解明する。また遺伝子発現ベクターを用いた基礎研究や遺伝子治療において標的細胞にのみ目的遺伝子を発現させることが重要であるが、標的外の細胞にも遺伝子が発現するリークが頻りに観察される(Lavin et al., 2020)。本研究ではこのリークのマカニズムを遺伝子導入された細胞を可視化し、リークの発現を定量できるベクターを用いて解析した。

3. 研究の方法

(1)オリゴデンドロサイト-神経相互作用の可視化

8 週齢及び生後 8 日齢の C57BL/6 マウスの小脳に対して GFP 発現弱毒化狂犬病ウイルス(Osanai et al., 2017)をインジェクションし、プルキンエ細胞の軸索を抗 Calbindin 抗体(1/500, MSFR100390)で可視化した。全軸索を標識する抗ニューロフィラメント抗体(1/500, NB300-217)と 3 重標識することでオリゴデンドロサイト・プルキンエ細胞の軸索(Calbindin 陽性・ニューロフィラメント陽性)・プルキンエ細胞以外の軸索(Calbindin 陰性・ニューロフィラメント陽性)を可視化し、単一のオリゴデンドロサイトがどのような軸索に対して髄鞘形成しているかを測定した。抗体染色には組織透明化用の高浸透の免疫染色法を用いた(Rapi Clear)。

(2)遺伝子リークメカニズムの解明

遺伝子が導入された細胞が GFP で可視化され、TetON 調節遺伝子(rtTA)と mCherry が Cre 存在下で発現するリーク測定用プラスミドベクター(pCAG-loxp-GFP-STOP-loxp-rtTA-mCherry)を構築した。このベクターが Cre 非存在下で、どの程度 rtTA と mCherry を発現するかルシフェラーゼ測定法と蛍光観察法、フローサイトメトリーを用いて調べた。

4. 研究成果

(1) 発生初期のオリゴデンドロサイトはプルキンエ細胞に選択的に髄鞘形成する。

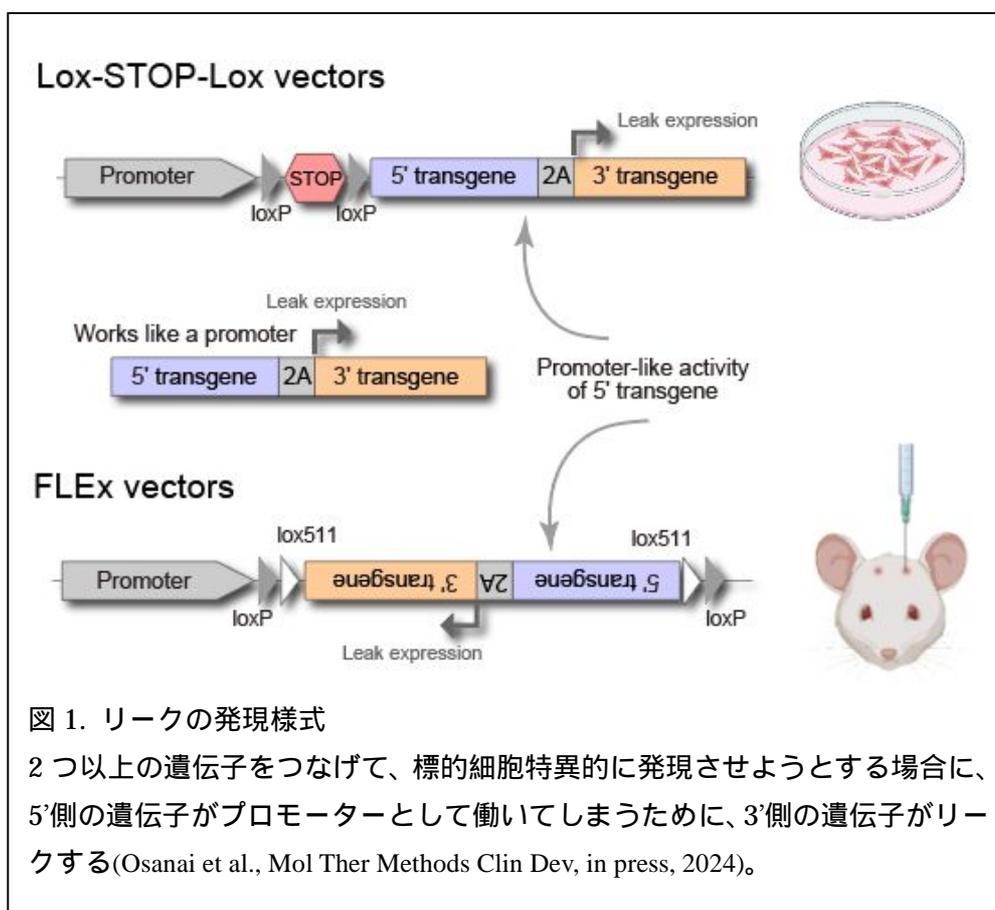
8 週齢のオリゴデンドロサイトの 17 個がどの種類の軸索に対して優先的に髄鞘形成するか調べたところ約半数(8/17)のオリゴデンドロサイトがプルキンエ細胞由来の軸索に対して優先的に髄鞘形成することが分かった。興味深いことに小脳発生の初期(生後 8 日齢)では 9 割以上のオリゴデンドロサイトがプルキンエ細胞由来の軸索に対して優先的に髄鞘形成することが分かった。

(Battulga et al., 2023)。

小脳発生の初期は特に低酸素に弱く、小脳白質がダメージを受けると認知障害や運動障害が障害にわたり続くことがある(Lee & Glass, 2021)。本研究の結果は幼少期の低酸素が特にプルキンエ細胞軸索への髄鞘形成に影響を与える可能性を示している。今後プルキンエ細胞選択的な髄鞘形成のメカニズムと機能的な意義について研究を進めていく予定である。

(2) リーク発現メカニズムの解明

リーク測定用プラスミドベクターを培養細胞に遺伝子導入した所、5'側にある rtTA のリークは少なく、3'側にある mCherry が通常発現量の 5-8% 程度リークすることが分かった。このリークは mCherry 以外の遺伝子にも共通して起こり、2 つ以上の遺伝子をつなげることでリークが起こることが明らかになった。また一般的に使われている AAV-FLEX ベクターにおいても 2 遺伝子が繋がっているベクターの場合(例えば AAV-FLEX-DTR-GFP)、3'側の遺伝子がリークすることが分かった(図 1)。本研究により得られて知見を応用することで基礎研究や遺伝子治療の分野において標的細胞にのみ遺伝子を発現させることのできるベクターが構築できるようになると考えられる(Osanai et al., 2022) (Osanai et al., Mol Ther Methods Clin Dev, in press, 2024)。



引用文献

Battulga, B., Osanai, Y., Yamazaki, R., Shinohara, Y., & Ohno, N. (2023). Axonal selectivity of myelination by single oligodendrocytes established during development in mouse cerebellar white matter. *bioRxiv*, 2023.2010.2003.560586. <https://doi.org/10.1101/2023.10.03.560586>

Kato, D., Wake, H., Lee, P. R., Tachibana, Y., Ono, R., Sugio, S., Tsuji, Y., Tanaka, Y. H.,

- Tanaka, Y. R., Masamizu, Y., Hira, R., Moorhouse, A. J., Tamamaki, N., Ikenaka, K., Matsukawa, N., Fields, R. D., Nabekura, J., & Matsuzaki, M. (2020). Motor learning requires myelination to reduce asynchrony and spontaneity in neural activity. *Glia*, *68*(1), 193-210. <https://doi.org/10.1002/glia.23713>
- Lavin, T. K., Jin, L., Lea, N. E., & Wickersham, I. R. (2020). Monosynaptic Tracing Success Depends Critically on Helper Virus Concentrations. *Front Synaptic Neurosci*, *12*, 6. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2020.00006>
- Lee, B. L., & Glass, H. C. (2021). Cognitive outcomes in late childhood and adolescence of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Clin Exp Pediatr*, *64*(12), 608-618. <https://doi.org/10.3345/cep.2021.00164>
- McKenzie, I. A., Ohayon, D., Li, H., de Faria, J. P., Emery, B., Tohyama, K., & Richardson, W. D. (2014). Motor skill learning requires active central myelination. *Science*, *346*(6207), 318-322. <https://doi.org/10.1126/science.1254960>
- Nave, K. A., & Werner, H. B. (2014). Myelination of the nervous system: mechanisms and functions. *Annu Rev Cell Dev Biol*, *30*, 503-533. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013101>
- Osanai, Y., Shimizu, T., Mori, T., Yoshimura, Y., Hatanaka, N., Nambu, A., Kimori, Y., Koyama, S., Kobayashi, K., & Ikenaka, K. (2017). Rabies virus-mediated oligodendrocyte labeling reveals a single oligodendrocyte myelinates axons from distinct brain regions. *Glia*, *65*(1), 93-105. <https://doi.org/10.1002/glia.23076>
- Osanai, Y., Xing, Y. L., Kobayashi, K., Homman-Ludiye, J., Cooray, A., Poh, J., Ohno, N., & Merson, T. D. (2022). 5' transgenes drive leaky expression of 3' transgenes in inducible bicistronic vectors. *bioRxiv*, 2022.2004.2023.489261. <https://doi.org/10.1101/2022.04.23.489261>
- Pan, S., Mayoral, S. R., Choi, H. S., Chan, J. R., & Kheirbek, M. A. (2020). Preservation of a remote fear memory requires new myelin formation. *Nat Neurosci*, *23*(4), 487-499. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0582-1>
- Yamazaki, Y., Abe, Y., Shibata, S., Shindo, T., Fujii, S., Ikenaka, K., & Tanaka, K. F. (2019). Region- and Cell Type-Specific Facilitation of Synaptic Function at Destination Synapses Induced by Oligodendrocyte Depolarization. *J Neurosci*, *39*(21), 4036-4050. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1619-18.2019>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Osanai Yasuyuki, Battulga Batpurev, Yamazaki Reiji, Kouki Tom, Yatabe Megumi, Mizukami Hiroaki, Kobayashi Kenta, Shinohara Yoshiaki, Yoshimura Yumiko, Ohno Nobuhiko	4. 巻 47
2. 論文標題 Dark Rearing in the Visual Critical Period Causes Structural Changes in Myelinated Axons in the Adult Mouse Visual Pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurochemical Research	6. 最初と最後の頁 2815 ~ 2825
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11064-022-03689-8	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Osanai Yasuyuki, Yamazaki Reiji, Shinohara Yoshiaki, Ohno Nobuhiko	4. 巻 10
2. 論文標題 Heterogeneity and regulation of oligodendrocyte morphology	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 eCollection
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2022.1030486	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yasuyuki Osanai, Yao Lulu Xing, Kenta Kobayashi, Jihane Homman-Ludiye, Amali Cooray, Jasmine Poh, Nobuhiko Ohno, Tobias D. Merson	4. 巻 in press
2. 論文標題 5 transgenes drive leaky expression of 3 transgenes in inducible bicistronic vectors	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Molecular Therapy Methods and Clinical Development	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2022.04.23.489261	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Battulga Batpurev, Osanai Yasuyuki, Yamazaki Reiji, Shinohara Yoshiaki, Ohno Nobuhiko	4. 巻 -
2. 論文標題 Axonal selectivity of myelination by single oligodendrocytes established during development in mouse cerebellar white matter	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2023.10.03.560586	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 長内 康幸、Yao Lulu Xing、小林 憲太、Jihane Homman-Ludiye、Amali Cooray、Jasmine Poh、大野 伸彦、Tobias D Merson
2. 発表標題 Cre依存性ベクターがリークするメカニズムの解明: Bicistronic発現ベクターはリークする
3. 学会等名 Neuro2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長内康幸
2. 発表標題 視覚遮断マウスにおける髄鞘形態の解析
3. 学会等名 第6回ミエリン研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長内康幸
2. 発表標題 感覚代償における髄鞘形成の役割の解析
3. 学会等名 第7回ミエリン研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 長内康幸、山崎礼二、幸喜富、矢田部恵、山本真理子、吉村由美子、篠原良章、大野伸彦
2. 発表標題 視覚遮断に応じたオリゴデンドロサイト形態変化の解析
3. 学会等名 日本解剖学会第110回関東支部学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yasuyuki Osanai, Batpurev Battulga, Reiji Yamazaki, Tom Kouki, Megumi Yatabe, Yoshiaki Shinohara, Nobuhiko Ohno
2. 発表標題 Identification of neuronal subtypes that are myelinated by a single oligodendrocyte
3. 学会等名 第63回日本組織細胞化学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長内康幸、Battulga Batpurev、高瀬堅吉、山崎礼二、幸喜富、矢田部恵、菊地元史、水上浩明、小林憲太、清水健史、池中一裕、吉村由美子、大野伸彦
2. 発表標題 視覚遮断による髄鞘構造の変化と行動異常の解析
3. 学会等名 第128回日本神経解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yasuyuki Osanai, Batpurev Battulga, Reiji Yamazaki, Mariko Yamamoto, Tom Kouki, Megumi Yatabe, Hiroaki Mizukami, Masaki Ueno, Kenta Kobayashi, Yumiko Yoshimura, Yoshiaki Shinohara, Nobuhiko Ohno.
2. 発表標題 Oligodendrocytes form normal myelin in the visual pathway when all axons are derived from deprived eyes
3. 学会等名 神経化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長内 康幸, バツツルガ バツブレブ, 山崎 礼二, 山本 真理子, 幸喜 富, 矢田部 恵, 水上 浩明, 上野 将紀, 小林 憲太, 吉村 由美子, 篠原 良章, 大野 伸彦
2. 発表標題 視覚伝導路における神経活動に依存した髄鞘形成機構の解明
3. 学会等名 日本組織細胞化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長内康幸、パツツルガ パトプレブ、山崎礼二、山本真理子、幸喜富、矢田部恵、小林憲太、上野将紀、水上 浩明、篠原良章、吉村由美子、大野伸彦
2. 発表標題 視覚遮断マウスにおける髄鞘形態の解析
3. 学会等名 日本ミエリン研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長内 康幸、パツツルガ パトプレブ、山崎 礼二、山本 真理子、幸喜 富、矢田部 恵、小林 憲太、中村 由香、上野 将紀、水上 浩明、篠原 良章、吉村 由美子、大野 伸彦
2. 発表標題 Myelination in visual pathway is modulated by relative neuronal activity between eyes
3. 学会等名 日本解剖学会全国学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

自治医科大学医学部解剖学講座組織学部門ホームページ https://www.jichi.ac.jp/histology/ 自治医科大学組織学部門ホームページ https://www.jichi.ac.jp/histology/
--

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------