

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350986

研究課題名(和文)オリゴデンドロサイト - 軸索連関による活動電位の軸索伝導変化の量子的解析

研究課題名(英文)Quantal analysis of changes in axonal conduction along myelinated fibers

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ラット海馬の有髄線維において、量子解析を用いることにより、活動電位の軸索伝導を正確に評価する方法を確立した。そのために、活動電位の潜時差と髄鞘形成突起の長さを計測し、その分布のヒストグラムを作成した。そして、この解析法は、生後の髄鞘形成過程に伴う変化、神経伝達物質受容体刺激によるオリゴデンドロサイト/髄鞘を介した修飾効果の検出に有用であり、オリゴデンドロサイト/髄鞘 - 軸索間の相互作用の検討を可能にすると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We established an experimental method for accurate evaluation of axonal conduction of action potentials along myelinated fibers in rat hippocampus by employing quantal-like analysis. For the methods, we measured the latency differences of action potentials and the length of myelin-forming processes which reflects internodal length, and made the histograms for their distribution. This method was useful for detection of the developmental changes of conduction velocity and the modulatory effects of neurotransmitter receptor activation on axonal conduction. These results suggest that this method can be applied for investigation of the interaction between oligodendrocyte/myelin and axon.

研究分野：神経生理学

キーワード：オリゴデンドロサイト 海馬 活動電位 髄鞘

1. 研究開始当初の背景

これまで、神経情報の伝達に関する研究はシナプス伝達を中心としたものであり、灰白質での研究がほとんどであった。一方、オリゴデンドロサイト (OL) によって髄鞘化された神経軸索を主な構成要素とする白質は、その機能が正確で安定した情報伝達に寄与するのみであると考えられてきた。そのため、白質での研究は、髄鞘化の機序や変性疾患における脱髄機序の解明といったものに限定されており、情報伝達に関する研究はほとんどされていなかった。しかし、近年、白質が学習の成立・認知機能・精神神経疾患の病態に関与しているという報告や、視覚運動課題の修得後に白質の容積が増大しているという報告がなされており、白質が情報伝達において調節機能を有する可能性が示唆されている。細胞レベルにおいては、われわれは OL が脱分極するとそれが髄鞘を形成している軸索の伝導速度が促進することを報告しており、髄鞘形成後もさらに伝導速度を速くする機構の存在を示してきた。OL/髄鞘と軸索間に活発な相互作用があり、それが白質における情報伝達の調節機能に関与していると考えられる。

OL/髄鞘と軸索が相互作用した結果は、活動電位の伝導速度変化あるいは調節という形で表現される。このため、OL/髄鞘 - 軸索間相互作用を検討するためには、脳における正確な伝導速度の測定が必要となる。また、この相互作用の検討には、伝導速度評価に OL/髄鞘の変化を反映するパラメーターを含み、さらに個体間での比較を可能とする評価方法が必要である。

海馬錐体細胞軸索の伝導速度を測定する実験において、電極の位置を変えたり刺激強度を変えたりすると、活動電位が記録部位に到達する時間 (潜時) に差 (潜時差) が生じる。この潜時差の分布を調べると、量子的分布を示すことがわかった。有髄線維では、活動電位は絞輪部で発生するので、この量子的分布の最小単位の値は、活動電位がある絞輪から次の絞輪に達するのに要する時間だと考えられる。また、海馬白板 (錐体細胞の軸索束で構成され、海馬の白質に相当する) に存在する OL をホールセル記録して染色すると、髄鞘形成突起を観察することができ、各突起の長さは 1 つの絞輪間距離に相当すると考えられる。潜時差の量子的分布と絞輪間距離を調べることによって伝導速度を評価することができるが、各突起の長さは染色標本から測定可能なため、OL/髄鞘を反映する

パラメーターを得ることができる。予備実験において、活動電位の潜時差が量子的分布を示すことを見出し、さらに、絞輪間距離が OL/髄鞘の指標として適用できることが可能となったため、本研究の提案に至った。

2. 研究の目的

本研究では、まず、量子的解析法を用いて、脳における活動電位伝導速度の正確な評価方法を確立する。そして、生後の髄鞘形成過程に伴う速度変化、髄鞘形成後での OL を介した修飾効果と可塑的变化、さらに病態モデルとして虚血負荷したときの変化に対してこの解析法を応用し、OL/髄鞘 - 軸索間の新しい相互作用を記述する。具体的には、

- ・海馬錐体細胞の 2 種の軸索における潜時差分布の比較。

- ・生後髄鞘形成期における活動電位潜時差の分布と絞輪間距離の測定。

- ・神経伝達物質投与および条件刺激により伝導速度変化が生じたときの活動電位潜時差の分布変化。

- ・虚血負荷時の活動電位潜時差の分布と絞輪間距離の測定。

以上のことを行い、長い軸索長を得ることが困難な脳組織において、活動電位伝導速度の正確な測定方法を確立し、OL/髄鞘の新しい機能を解明すること、そして、OL/髄鞘 - 軸索間相互作用を検出することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、ラット海馬の薄切片 (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る手法を用いる。

(1) ラットを麻酔下に断頭し、海馬スライス標本 (400 μm 厚) を作成する。近赤外線微分干渉顕微鏡にセットしたチャンバーにスライスを移動し、海馬 CA1 領域の錐体細胞を観察・同定、細胞体よりホールセル記録をする。

(2) 海馬白板を電気刺激し、逆行性に伝導してくる活動電位を記録し、潜時を測定する。この時、海馬采側と海馬台側をそれぞれ刺激し、分岐した軸索をそれぞれ刺激する。刺激強度や位置を変えて潜時差を算出し、ヒストグラムを作成して潜時差分布の量子的解析を行う。

(3) 海馬白板に位置する OL を観察し、ホ

ールセル記録を行う。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 DAB 発色あるいは蛍光染色し、形態を確認する。顕微鏡下にて各髄鞘形成突起の長さを計測し、その分布をヒストグラムで表して、絞輪間距離を推定する。

これらの測定を、次の動物や薬物投与実験・負荷実験に適用する。

・生後各週齢のラット

ラットの有髄線維では生後から髄鞘形成が始まり、生後4週で髄鞘形成のピークに達し、生後8週でほぼ成熟するので、生後2・3・4週および8週齢のラットを用い、潜時差分布と絞輪間距離（髄鞘形成突起の長さ）を測定・算出する。生後週齢によって絞輪間距離と潜時差分布が変化してくると考えられ、両者の関係性の変化を検討する。

・受容体刺激および条件刺激

アデノシン、ニコチン、セロトニンに着目し、薬物投与時に潜時差の量子的分布がどのように変化するか検討する。このとき、特異的阻害薬を用いた薬理学的実験も合わせて行い、伝導速度変化をもたらす受容体のサブタイプを同定する。また、注入したバイオサイチンに対する染色と受容体に対する抗体染色の二重染色を行い、受容体が OL あるいは軸索のどちらに発現しているか確認する。

・頸動脈・椎骨動脈結紮あるいは酸素-グルコース枯渇による脳虚血負荷

病態時における OL/髄鞘 - 軸索間の相互作用の変化やその結果生じる伝導速度変化を検討する。病態モデルとして、脳虚血負荷をした動物を使用する。

4. 研究成果

(1) 生後週齢による潜時差分布と絞輪間距離の分布（海馬採側の軸索）

・生後3週齢：潜時差分布は0.30, 0.63, 0.97ミリ秒に（図1上）、絞輪間距離の分布では41.2, 77.6 μm にピークが認められた。生後3週齢ラットでは、4週齢以降のラットほどの明瞭な量子分布は示さなかった。ピークが明瞭でないのは、この週齢では髄鞘形成が途上であるためと考えられた。

・生後4～5週齢：潜時差分布では0.33, 0.69, 0.95ミリ秒に、絞輪間距離の分布では、36.5, 52.8, 84.1 μm にピークがみられた。

・生後7～8週齢：潜時差分布では0.26, 0.53, 0.79ミリ秒に（図1下）、絞輪間距離の分布では、75.5, 137.8, 180.5 μm にピークがみられた。生後7～8週齢ラットでは、活動電位潜

時差の分布のピークが、量子に相当する値を含めて短縮しており、さらに絞輪間距離も長くなっている可能性が示唆された。これらから、生後7～8週齢ラット活動電位の伝導速度は、生後4～5週齢ラットよりも約1.3倍速くなっていることがわかった。

また、4～5週齢では海馬台側の軸索でも同様の計測を行っており、0.22, 0.45, 0.68ミリ秒に潜時差分布のピークがみられた。海馬台側では軸索の分岐が多いため、軸索分岐点間距離を求めて絞輪間距離を推定したところ、37.5, 86.6, 138.3 μm に分布のピークがみられた。これらのことから、生後発達・髄鞘形成途上における活動電位の伝導速度変化の様相を定量的に記述することができた。

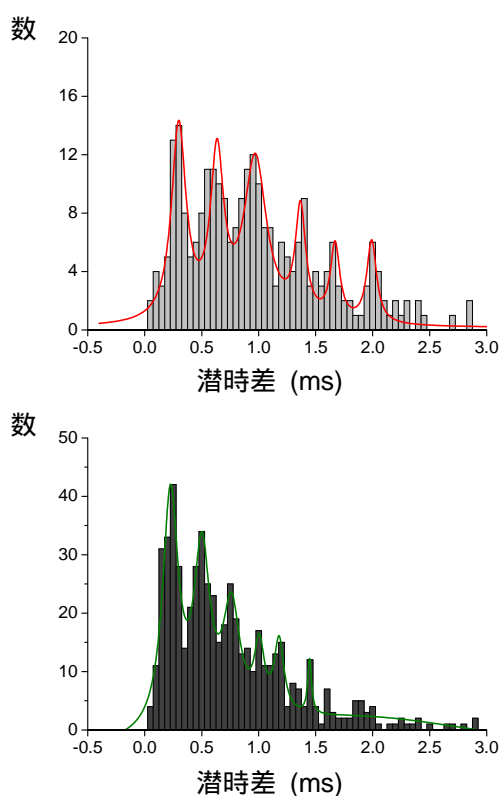


図1 ラット海馬白板における活動電位潜時差の週齢別分布。

(上) 3週齢

(下) 7～8週齢

(2) 神経伝達物質受容体刺激による潜時差分布の変化

この項目での検討では、OL/髄鞘 - 軸索間の相互作用による軸索伝導修飾について調べるために、アデノシン A1 受容体に着目した。この実験では生後6週齢のラットを用いた。薬物非存在下では0.29, 0.65, 0.89ミリ秒にピークを持つ量子分布を示し、アデノシン A1

受容体の刺激薬を灌流投与したところ、明瞭な量子分布は維持されたまま、ピークは0.36, 0.68, 1.02 ミリ秒へと延長していた。すなわち、アデノシン A1 受容体の活性化によって潜時差分布が右方向にシフトしていた。この効果は、アデノシン A1 受容体の阻害薬によって抑制されることを確認した。また、アデノシントランスポーター阻害薬を用いたところ、アデノシン A1 受容体の刺激薬と同様の効果がみられたことから、内因性アデノシンもアデノシン A1 受容体を活性化して軸索伝導を抑制している可能性が考えられた。次に、アデノシン A1 受容体の発現について、OL と軸索のどちらに（あるいは両方に）発現しているか検討した。抗体を用いた検討が以前にもなされているが、統一した結果は得られていなかったため、新規にアデノシン A1 受容体抗体を作成した。しかし、特異性が完全ではないことがわかり、この抗体での検討はできなかった。さらに、入手可能な抗体を用いて、特異性を確認したうえで免疫組織染色を行ったが、いずれの抗体も組織レベルでの染色には不適であることがわかった。しかし、OL からのホールセル記録により、アデノシン A1 受容体アゴニストによる過分極反応が見られたので、OL にはアデノシン A1 受容体が発現しており、その活性化によって伝導速度が遅くなることが強く示唆された。また、複合活動電位の解析とも合わせてアデノシン A1 受容体活性化による軸索伝導抑制効果の機序について調べたところ、cAMP-PKA 系の関与が示唆された。

他に、ニコチン、セロトニンそしてカルバコール（ムスカリン性およびニコチン性アセチルコリン受容体のアゴニスト）を灌流投与し、軸索伝導に与える影響を検討した。これらの薬物の場合では、量子解析ではなく軸索の2か所を電気刺激して得られた活動電位の潜時差を用いた。その結果、ニコチンでは、投与前の $91.3 \pm 3.7\%$ 、セロトニンでは $112.2 \pm 4.6\%$ とそれぞれ変化していた。ニコチンの場合、ホールセル記録によって OL の脱分極を観察しており、ニコチン - OL 脱分極 - 軸索伝導促進という機序が示唆された。セロトニンの場合、5-HT_{1A} 受容体阻害薬存在下でその効果が抑制されたことから、5-HT_{1A} 受容体を介する軸索伝導の修飾効果が考えられた。5-HT_{1A} 受容体が軸索に発現しているのか、OL/髄鞘に発現しているのか、今後検討が必要である。カルバコールでは投与前の $103.5 \pm 6.3\%$ と有意な変化はみられなかった。

以上の結果から、量子的分布を含む潜時差

の検討によって、受容体刺激や薬物投与による活動電位の軸索伝導の変化を検出することが可能であることが確認された。

（3）病態との軸索伝導変化

虚血負荷では CA1 領域の錐体細胞の障害が想定していたよりも強く、前項までの手法を用いた検討は困難であることがわかった。そこで、難治性てんかんに対し大脳冷却が効果的であることなどが報告されていることから、温度変化による軸索伝導変化を検討することにした。実験温度を 30 から 22 まで低下させると、活動電位の潜時が、 $126.0 \pm 2.5\%$ と延長しており、伝導速度が低下していた。また、複合活動電位の幅が、温度低下によって $124.1 \pm 2.1\%$ と大きくなっており、活動電位が非同期化している可能性が示唆された。絞輪部の電位依存性ナトリウムチャネルの活性が低下している可能性が高いが、OL/髄鞘の軸索に対する絶縁効果が弱くなっている可能性もあり、今後の検討が必要な課題である。

（4）今後の展望

今後の脳研究において、神経伝達・情報処理における白質の新しい機能の解明が期待されるが、本研究では、その基礎となる OL/髄鞘 - 軸索間での新しい相互作用を検討した。それに際し、OL/髄鞘側の変化を反映する指標を含み、個体間比較も可能な伝導速度評価法を確立・応用することができた。この方法は、ラット、マウスに共通して用いることができるため、遺伝子操作した疾患モデルマウスや実験的脱髄モデル動物などに適用することができる。このため、病態の理解および病勢や治療法の評価にも応用することができる。また、モデル動物の中には、明らかな脱髄は伴わずに伝導速度が低下しているものもあるので、本研究で得られた結果を適用することにより、白質が関与する複雑な病態生理の理解を前進させることが可能と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計9件)

1. 山崎良彦：オリゴデンドロサイトと神経伝導調節 - 脳白質の機能的可塑性 分子精神医学 16: 25-31, 2016. URL: http://www.sentan.com/cgi-bin/db_n.cgi?mode=view_backno&no=1211. 査読:無.

- 2 . Yamazaki Y, Fujii S, Goto JI, Fujiwara H, Mikoshiba K : Activation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors during preconditioning low-frequency stimulation suppresses subsequent induction of long-term potentiation in hippocampal CA1 neurons. *Neurosci* 311: 195-206, 2015. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2015.10.030. 査読 : 有 .
- 3 . Yamazaki Y, Fujii S : Extracellular ATP modulates synaptic plasticity induced by activation of metabotropic glutamate receptors in the hippocampus. *Biomed Res* 36: 1-9, 2015. DOI: 10.2220/biomedres.36.1. 査読 : 有 .
- 4 . Chida K, Kaneko K, Fujii S, Yamazaki Y : Activity-dependent modulation of the axonal conduction of action potentials along rat hippocampal mossy fibers. *Eur J Neurosci* 41: 45-54, 2015. DOI: 10.1111/ejn.12762. 査読 : 有 .
- 5 . Yamazaki Y : Increased adenosine levels caused by astrocyte dysfunction result in enhanced excitability of the hippocampus. *Ann Rep Jpn Epi Res Found* 25: 1-7, 2014. 査読 : 無 .
- 6 . Fujii S, Tanaka KF, Ikenaka K, Yamazaki Y : Increased adenosine levels in mice expressing mutant glial fibrillary acidic protein in astrocytes result in failure of induction of LTP reversal (depotentiation) in hippocampal CA1 neurons. *Brain Res* 1578: 1-13, 2014. DOI: 10.1016/j.brainres.2014.07.005. 査読 : 有 .
- 7 . Yamazaki Y, Fujiwara H, Kaneko K, Hozumi Y, Xu M, Ikenaka K, Fujii S, Tanaka KF : Short- and long-term functional plasticity of white matter induced by oligodendrocyte depolarization in the hippocampus. *Glia* 62: 1299-1312, 2014. DOI: 10.1002/glia.22681. 査読 : 有 .
- 8 . Ishibashi M*, Yamazaki Y*, Miledi R, Sumikawa K : Nicotinic and muscarinic agonists and acetylcholinesterase inhibitors stimulate a common pathway to enhance GluN2B-NMDAR responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 12538-12543, 2014. DOI: 10.1073/pnas.1408805111. * These authors contributed equally to this work. 査読 : 有 .
- 9 . Li J, Sasaki H, Fujiwara H, Kato H, Kaneko K, Yamazaki Y, Fujii S : Synaptic plasticity in hippocampal CA1 neurons and learning behavior in transient ischemia-loaded gerbils. *Biomed Res* 34: 75-85, 2013. DOI: 10.2220/biomedres.34.75. 査読 : 有 .
- [学会発表](計7件)
- 1 . 山崎良彦 : Involvement of adenosine A1 receptors on oligodendrocytes in regulation of axonal conduction of action potentials. 第20回グリア研究会 . 2015年12月5日 . 名古屋市立大学医学部(愛知県名古屋市).
- 2 . 山崎良彦 : オリゴデンドロサイトによる神経伝導調節と脳白質の機能的可塑性. 第32回山形電気生理研究会 . 2015年11月27日 . 山形大学医学部(山形県山形市).
- 3 . 藤井聡, 金子健也, 藤原浩樹, 後藤純一, 山崎良彦 : 代謝型グルタミン酸受容体活性化で誘導する海馬CA1ニューロンのシナプス可塑性への細胞外ATPの関与 - ATPを介するグリアとニューロン機能のcross talking - . 第47回東北生理談話会 . 2015年10月31日 . 弘前大学医学部コミュニケーションセンター(青森県弘前市).
- 4 . Yamazaki Y : Functional plasticity of white matter in the hippocampus. 第92回生理学会大会 . 2015年3月23日 . 神戸国際会議場・展示場(兵庫県神戸市).
- 5 . 後藤純一, 金子健也, 藤原浩樹, 山崎良彦, 御子柴克彦, 藤井聡 : 海馬CA1領域におけるシナプス脱増強へのIP3受容体及びストア作動性カルシウムチャネルの関与に関する研究 . 第46回東北生理談話会 . 2014年10月25日 . コラッセふくしま(福島県福島市).
- 6 . 山崎良彦, 田中謙二, 金子健也, 藤原浩樹, 後藤純一, 藤井聡 : アストロサイト機能不全マウスにおけるシナプス伝達の変化 . 第45回東北生理談話会 . 2013年10月5日 . 東北大学(宮城県仙台市).
- 7 . Yamazaki Y, Tanaka KF, Fujii S : Plastic changes of axonal conduction induced by oligodendrocytes depolarization in hippocampus. *International Symposium Optogenetics 2013*. 2013年9月27日 . 慶應大学(東京都港区).
- [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

(2)研究協力者

金子 健也 (KANEKO KENYA)
山形大学・医学部・技術専門職員