

依頼稿 (報告)

平成20年度「独創性のある生命科学研究」プロジェクト課題

1) ミエリンが神経伝導に及ぼす影響と代償機構の解析

研究代表者 板東 良雄

[研究の背景と目的]

多発性硬化症は中枢神経系における炎症及び脱髄を伴う再発・寛解を繰り返す自己免疫疾患であり、オリゴデンドロサイトが形成する髄鞘(ミエリン)が炎症などによって傷害される。その結果、脱髄および軸索傷害が惹起され、麻痺などの様々な神経症状を呈すると考えられている。近年、臨床症状が比較的回復する慢性期において、再ミエリン化に関与すると考えられるオリゴデンドロサイト前駆細胞が病変部位周囲に集積しているものの、オリゴデンドロサイトへの分化がほとんど認められないことが明らかにされた。このことから、ミエリン形成が不完全な状態においても跳躍伝導がある程度維持される可能性も考えられる。しかしながら、現在までにこのような分子機序はほとんど明らかになっていない。

そこで本研究では、マウス脱髄モデルならびにミエリン形成不全 shiverer マウスを用いてミエリンが神経伝導に及ぼす影響と代償機構存在の可能性について検討した。

[研究方法]

1. マウス脱髄モデル

Cuprizone は銅のキレーターとして知られるが、個体に投与すると大脳の脳梁部位に存在するオリゴデンドロサイトを傷害し、脱髄を実験的に誘導出来る。そこで、本学動物実験施設で自己繁殖されている Balb/c マウス(雌、6-8 週齢)に 0.7% cuprizone を含有する特殊飼料を 1 週間与え、大脳の脳梁部位において脱髄を誘導した。また、1 週間後に通常の餌に戻すことにより、再ミエリン化を誘導した (Bando Y. et al., Eur J. Neurosci. 2008; 28, 1731-42)。

2. ミエリン形成不全 shiverer マウス

shiverer マウスはミエリン構成蛋白質の一つである Myelin Basic Protein (MBP) 遺伝子を欠損しているマウスであり、中枢神経系においてミエリンがほとんど形成されていない。

3. 電気生理学的解析

マウス個体における伝導速度を測定するためにマウスを麻酔下にて装置に固定し、左右の大脳皮質に刺激電極および記録電極をそれぞれ挿入し(電極間距離: 約 3 mm)、PowerLab システムを用いて神経活動の記録を行った。

[研究成果および考察]

1. マウス大脳皮質間 (callosal connections) における神経伝導の測定

左右の大脳皮質は脳梁 (corpus callosum) の神経線維を介して互いに連絡しているため、左右の大脳皮質に刺激および記録電極を挿入することによって、左右の脳梁間 (callosal connections) における神経伝導速度を測定することが出来る。そこで、図 1 に示すように in vivo で神経伝導速度を測定する実験系を確立した。その結果、脱髄・再ミエリン化における脱髄の変化が神経伝導速度に及ぼす影響を in vivo で検討することが可能となった。本実験系は多発性硬化症などの脱髄性疾患における分子機序の解析や神経機能評価に有効と考えられた。

2. Cuprizone による脱髄と神経伝導の変化

次に、脱髄および再ミエリン化におけるミエリンが神経伝導に及ぼす影響を検討するために cuprizone による可逆的な脱髄モデルマウスを作成し、callosal connections における神経伝導の変化を測定した。刺激から神経活動が認められるまで時間 (latency) を指標として解析した。また、大脳皮質 II-III 層を中心と

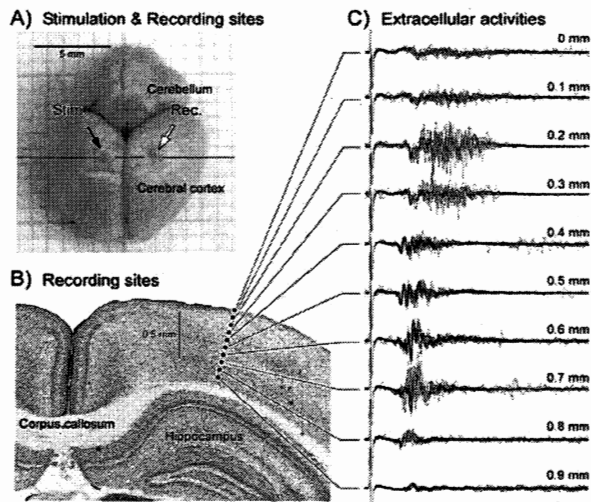


図1 Callosal connections における神経伝導速度測定系の確立 (A) マウス大脳における刺激および記録電極の挿入位置 (BおよびC) 大脳皮質各領域における神経活動の記録

する領域 ($\leq 400 \mu\text{m}$) と V-VI 層を中心とする領域 ($> 400 \mu\text{m}$) に分類し、領域によって伝導速度の変化に差があるか否かについても検討した。その結果、cuprizone が惹起した脱髄によって伝導速度はコントロールに比べ、遅延した (表1)。つまり、脱髄によって伝導速度が遅延することを明らかにした。また興味深いことに、領域間においても伝導速度の変化に差が認められ、領域によって脱髄の程度に差がある可能性が示唆された。

表1 Curprizone による脱髄と神経伝導の変化

Condition	Latency (msec)		p-value
	$\leq 400 \mu\text{m}$	$> 400 \mu\text{m}$	
Control	10.31 \pm 0.47 (n=51)	8.54 \pm 0.38 (n=56)	0.01**
Cuprizone 7 days	11.48 \pm 0.45 (n=56)	13.40 \pm 0.52 (n=46)	0.01**
Cuprizone 4 wks	11.41 \pm 0.36 (n=65)	12.21 \pm 0.45 (n=38)	0.23
Recovery 7 days	11.49 \pm 0.67 (n=52)	9.99 \pm 0.59 (n=54)	0.04*
Recovery 4 wks	10.51 \pm 0.47 (n=49)	10.08 \pm 0.48 (n=58)	0.32

*p=0.04, **p=0.01 significantly different from $> 400 \mu\text{m}$ (Mann Whitney's U test)

表2 shiverer マウスにおける神経伝導の変化

Condition	Latency (ms)		p-value
	$\leq 400 \mu\text{m}$	$> 400 \mu\text{m}$	
wild type (shi+/+)	9.45 \pm 0.25 (n=83)	8.92 \pm 0.43 (n=35)	0.27
shiverer (shi-/-)	10.14 \pm 0.51 (n=32)	9.62 \pm 0.25 (n=71)	0.55

Note: There were no significant differences between latencies recorded at $> 400 \mu\text{m}$ and those at $> 400 \mu\text{m}$ in either group. (Mann Whitney's U test).

一方、再ミエリン化によって伝導速度は若干回復したが、コントロールの神経伝導速度にまでの回復は認められなかった。しかしながら、運動機能に顕著な問題は認められなかった。

3. Shiverer マウスにおける伝導速度の変化

次にミエリン形成不全 shiverer マウス (C3H、雌、6-8 週齢) を用いて、callosal connections における神経伝導速度を上記と同様に測定した。その結果、同腹子の野生型マウスの伝導速度と shiverer マウスの伝導速度に有為な変化は認められなかった (表2)。この結果はミエリン以外にも跳躍伝導を維持する機構 (代償機構) が存在する可能性が示唆される。ランビエ絞輪の部位に認められる Na や K などのイオンチャネルの集積が跳躍伝導に必須であり、ミエリンはイオンチャネルの集積に重要と考えられている。したがって、shiverer マウスではミエリンが形成不全であるにも関わらず、イオンチャネルの集積が維持されている可能性が考えられる。あるいは全く別の機構で維持されている可能性も考えられる。現在、このような点について解析を進めている。

[まとめ]

脱髄および再ミエリン化時における脱髄の変化が神経伝導に及ぼす影響について検討した。Cuprizone による脱髄モデルを用いた本実験系が脱髄疾患の病態解析に有用であることが示された。また、shiverer マウ

スを用いた実験からミエリン以外に跳躍伝導を維持する代償機構が存在する可能性が示された。今後は shiverer マウスで認められる代償機構の解明を行い、マウス多発性硬化症モデルやヒト多発性硬化症患者サンプルを用いて検討することによって、多発性硬化症の治療戦略に役立てたい。

[謝 辞]

平成20年度の“独創性のある生命科学研究”に採択して頂き、このような研究機会を与えて頂きましたこと、この場を借りて心より御礼申し上げます。本研究を遂行するにあたり、本学生理学講座神経機能分野の高草木薫准教授に多大なご指導を頂きましたことを心より感謝申し上げます。