

氏 名 國澤 和生

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1851 号

学位授与の日付 平成28年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻  
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Analysis of neuronal responses against disruption of  
paranodal junction

論文審査委員 主 査 教授 吉村 由美子  
教授 池中 一裕  
教授 南部 篤  
教授 澤本 和延 名古屋市立大学大学院

論文内容の要旨  
Summary of thesis contents

Oligodendrocytes are glial cells that myelinate neuronal axons in the central nervous system (CNS). Myelin insulates axons to increase conduction velocity of neuronal action potentials. Myelinating process induces a dynamic change in axonal membrane protein localization, and segregates the axonal surface into four distinct segments: the node of Ranvier, the paranode, the juxtaparanode, and the internode. The paranodal region is unique in its ultrastructural characteristics and specific axo-glial junction. These junctions are composed of three major paranodal proteins: 155-kD isoform of neurofascin (NF155) on the glial side, and Caspr and a GPI-anchored neural cell adhesion molecule contactin on the axonal side. Although myelin internodes are thought to have crucial roles in cognition and motor functions, the role of paranodal junction in neuronal responses remains unclear.

Previous magnetic resonance imaging (MRI) data showed that local and restricted structural changes within the white matter were observed in schizophrenia patient, suggesting that the focal abnormalities might influence brain function. I hypothesized that the local disruption of paranodal junctions eventually influences electrophysiological properties of entire system, such as motor system. Pyramidal tract, a major motor pathway, has long-range connections through two synapses towards the peripheral nervous system. Therefore, to determine whether site-directed loss of paranodal junctions affect the electrophysiological property of motor system, I injected adeno-associated virus type5 (AAV5) harboring EGFP-2A-Cre into the internal capsule of *NF155<sup>Flox/Flox</sup>* mice, which led to disruption of paranodal junctions in a focal region of pyramidal tract. I observed electromyogram and measured latency in response to electric stimulation of the motor cortex. Electrophysiological analysis showed that the latency was significantly delayed in *NF155<sup>Flox/Flox</sup>* mice injected with AAV5-EGFP-2A-Cre, compared to the control mice. These results demonstrate that the motor system outputs were affected by focal ablation of the paranodal junctions. This motor system contains two synaptic connections and thus my results suggest that site-directed loss of paranodal junctions in other white matter area can affect the electrophysiological properties of other systems as well.

The disruption of oligodendroglial paranodal junctions may also affect neuronal gene expression. To address this issue, I took advantage of conditional ablation of *NF155* in myelinating oligodendrocytes (*Plp-CreERT;NF155<sup>Flox/Flox</sup>* mouse). The mouse displays a gradual loss of paranodal junctions and a concomitant disorganization of axonal domains. To determine whether the expression of neuronal genes is altered in response to the loss of paranodal junctions, I prepared total RNA from *Plp-CreERT;NF155<sup>Flox/Flox</sup>* mice and performed microarray analysis. I found that

(別紙様式 2)  
(Separate Form 2)

expression level of various neuronal genes changed in response to the ablation of paranodal junctions. Among the identified genes, I focused on six genes that could influence neuronal function and survival. *Decorin* and *myosin heavy polypeptide 11* are survival factors for neurons, respectively. *Pituitary tumor-transforming gene 1* and *dopachrome tautomerase* are involved in tumor development, whereas *TELO2 interacting protein 2* is a regulator of DNA damage response, and *aquaporin 3 (Aqp3)* functions to homeostatically maintain water molecule within the cell.

I next examined whether expression levels of the above-mentioned genes were also changed in another mutant mouse line whose paranodes have never been formed. A cerebroside sulfotransferase (CST) enzyme synthesizes sulfatide, a major lipid component of the myelin sheath. *CST* mutant mice do not form paranodal junctions throughout their development. Interestingly, expression of these identified genes were significantly higher than that of control in *Plp-CreERT;NF155<sup>Flox/Flox</sup>* mice, but not in the *CST-KO* mice. These results suggest that some genes are sensitive to the paranodal disruption only after the junction was formed.

Importantly, a previous study reported from our laboratory showed that the disruption of paranodal junctions led to abnormal behavior in the mouse related to schizophrenia. Copy number variant (CNV), a major source of genetic variation in the human genome, contributes to the identification of the susceptibility genes for schizophrenia. To further determine whether the genes identified by microarray analysis were linked to schizophrenia, I examined whether some of the genes identified in this study are present in the list of genes with CNV in the schizophrenic patients. Intriguingly, I found that chromosomal duplications of the *Aqp3* locus were frequently detected in schizophrenia patients. To analyze *Aqp3* expression in the CNS, I examined the mRNA levels in the cerebral cortex. In the *Plp-CreERT;NF155<sup>Flox/Flox</sup>* mice, qRT-PCR analysis showed significantly reduced expression of *Aqp3*. Furthermore, I found that some *Aqp3*<sup>+</sup> cells in the cerebral cortex were also positive for neuron marker NeuN. These data may provide a new insight into the paranodal physiological function as a therapeutic target for psychiatric disorders.

Summary of the results of the doctoral thesis screening

中枢神経系の神経軸索には、オリゴデンドロサイトによりミエリンが形成されている。このミエリン間には活動電位の跳躍伝導を担うランビエ絞輪が存在する。ランビエ絞輪に隣接するミエリン-軸索間にはparanodal junctionが形成されている。paranodal junctionの破綻は脱髄性疾患の最初期にみられる比較的軽微な異常と考えられているが、その機能的役割や病態との関連については不明な点が多い。

國澤和生氏は、paranodal junction形成に必須のタンパク質の一つでありオリゴデンドロサイトに発現するNeurofascin155(NF155)を、領域・時期特異的に欠損させるNF155コンディショナルK0マウスを用いて解析を行い、paranodal junctionの破綻が神経の活動電位伝導や遺伝子発現に及ぼす影響を調べた。まず、随意運動を司る錐体路に着目し、その経路の一部である内包領域に限局してNF155を欠損させることにより、内包のparanodal junctionを破綻させたマウスを作製した。そのマウスを対象に、大脳皮質運動野の電気刺激により誘発される筋活動を測定し、正常なコントロールマウスに比して錐体路の伝導速度が低下することを見出した。この結果は、錐体路のごく一部のparanodal junctionの破綻によって経路の出力が全般的に障害されることを示しており、局所的なparanodal junctionの異常においても機能的に重篤な影響を及ぼす可能性を示唆する。

上記の解析により、オリゴデンドロサイトのNF155の欠損はニューロン側にも影響すると考えられるので、國澤氏は、生後にミエリンが一旦形成された後にparanodal junctionの破綻を誘導できるNF155コンディショナルK0マウスを用い、ニューロンの遺伝子発現変化をマイクロアレイ法により網羅的に解析した。その結果、paranodal junctionの破綻に伴い、ニューロンの生存に重要なdecorinやmyosin heavy polypeptide 11、腫瘍形成に関与するpituitary tumor-transforming gene 1やdopachrome tautomerase、DNA損傷に対する制御機構として働くTEL02 interacting protein 2、細胞内の水の恒常性維持に必要なaquaporin3等、多くの遺伝子の発現が変化することを見出した。さらに、発達過程において元々paranodal junctionが形成されないCST-K0マウスにおいても遺伝子発現を解析し、NF155コンディショナルK0マウスの結果と比較することにより、後者のマウス特異的に発現上昇する遺伝子群を同定した。これらの結果は、脱髄疾患の最初期に生じるparanodal junctionの異常をニューロン側が敏感に感知していることを示す。また、本研究で同定された遺伝子群がparanodal junctionの異常を検出するニューロンマーカーとして応用できる可能性を示した。これまでにparanodal junctionに異常があるマウスが統合失調症様の症状を呈することが報告されているため、さらに國澤氏はparanodal junctionの破綻に伴い発現変動する遺伝子群の中に統合失調症関連遺伝子が存在するか検討した。その結果、同定した遺伝子群の中に統合失調症患者のゲノム解析より得られたゲノムコピー数変異を含む遺伝子が複数存在することを明らかにした。これらの結果は、paranodal junctionの破綻により発現変化した遺伝子群が、精神疾患の発症に関与する可能性を示す重要な知見となるものである。

本研究は、paranodal junctionの破綻が神経機能や遺伝子発現に及ぼす影響を詳細かつ多

(別紙様式 3)

(Separate Form 3)

面的に明らかにした内容で、paranodal junction の機能的役割や脱髄疾患や統合失調症等の精神・神経疾患の病態解明に貢献する成果を得ている。出願者自身により、最先端の分子生物学的手法や電気生理学、組織化学的手法を駆使した多面的な解析が行われており、解析方法も適切である。したがって、本研究が学位論文にふさわしいものであるとして、審査委員全員の意見が一致した。