

氏 名 長内 康幸

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1774 号

学位授与の日付 平成27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 Clarification of the principle governing axon-selective  
myelination by oligodendrocytes and regulation of neuronal  
information processing in the white matter

論文審査委員 主 査 教授 古瀬 幹夫  
教授 池中 一裕  
教授 南部 篤  
教授 吉村 由美子  
教授 小泉 修一 山梨大学大学院

論文内容の要旨  
Summary of thesis contents

Oligodendrocytes myelinate multiple axons in the central nervous system (CNS). Conduction velocity of myelinated axons is at least 50 times faster than that of unmyelinated axons. Myelin is also important for axonal survival because oligodendrocytes metabolically support axons via myelin. In contrast to a Schwann cell that myelinates axon in the peripheral nervous system, one oligodendrocyte myelinates multiple axons in the CNS. A recent report showed depolarization of oligodendrocytes increases conduction velocity of neuronal axons (Yamazaki et al., 2007). This finding suggests that depolarization of one oligodendrocyte simultaneously increases conduction velocity of multiple axons, owing to multiple myelination by one oligodendrocyte. If one oligodendrocyte ensheaths neuronal axons that are involved in an identical neuronal circuit, depolarization of the oligodendrocyte comprehensively increases information processing of the neuronal circuit. An idea that oligodendrocytes selectively myelinate neuronal axons is supported by several oligodendrocyte characters. To examine whether oligodendrocyte select axons to myelinate, it is important to identify the neurons whose axons are ensheathed by each oligodendrocyte, however, high density of oligodendrocytes in the CNS prevents us from detecting precise morphology of each oligodendrocyte.

I found that attenuated rabies virus sparsely labels oligodendrocytes in the white matter and adeno-associated virus type2 (AAV2) efficiently labels neuronal axons in the mouse brain. Interaction between each oligodendrocyte and neuronal axons was successfully detected by dual injection of attenuated rabies virus and AAV2 into the mouse brain. I examined whether oligodendrocytes selectively or randomly myelinate axons by this newly established method.

To visualize processes of each oligodendrocyte and its myelinating axons

(別紙様式 2)  
(Separate Form 2)

derived from different brain areas, AAV2-DsRed2 and AAV2-BFP were injected into motor cortex and sensory cortex, respectively, and attenuated rabies virus harboring the gene encoding GFP was injected to the corpus callosum. About a half (58.4%) of callosal oligodendrocytes ensheathed axons derived from both motor and sensory cortex, whereas the other half ensheathed axons derived from either motor cortex or sensory cortex. Therefore callosal oligodendrocytes were classified into 3 groups: oligodendrocytes myelinating axons derived from 1) motor cortex, 2) sensory cortex, 3) both regions in the mouse brain. This result was different from myelination on axons derived from an identical brain region of each hemisphere: majority of callosal oligodendrocytes evenly myelinated axons derived from each hemisphere. These results suggest that callosal oligodendrocytes distinguish axons derived from different brain regions but not from the same region of the brain even when they are from different hemispheres.

To investigate chiasmal oligodendrocyte myelination on axons derived from each eyeball, AAV2-DsRed2 and AAV2-BFP were injected, respectively. About a half of chiasmal oligodendrocytes dominantly myelinated axons derived from one of eyeballs in contrast with majority of callosal oligodendrocytes that evenly myelinated axons derived from each hemisphere. The result suggests functional difference between chiasmal and callosal oligodendrocytes in the mouse brain.

It is known that oligodendrocytes initiate myelination on axons by sensing their axonal activity. However, it has not been shown whether one oligodendrocyte preferentially myelinates active axons or not after initiation of myelination. To examine whether each oligodendrocyte selectively myelinates highly active axons, I trimmed and sutured eyelids at postnatal day 10 and assessed chiasmal myelination on axons derived from sutured or intact eyes of 8-week-old mice. There were no significant differences between myelination on axons derived from sutured or intact

(別紙様式 2)  
(Separate Form 2)

eyes. This result suggests that chiasmal oligodendrocyte myelination does not distinguish active or inactive axons once myelination program is turned on.

In this study, I developed a novel method to observe interaction between each oligodendrocyte and neuronal axons, and revealed that there were 3 groups of callosal oligodendrocyte. There were significant differences between callosal and chiasmal oligodendrocytes myelination involving myelination on axons derived from bilateral hemispheres or eyeballs. This study reveals that some parts of oligodendrocytes selectively myelinate axons, depending on neuronal subtypes. This study also suggests activity dependent myelination does not occur after initiation of myelination.

Ref. Y. Yamazaki et al., *Neuron Glia Biology* **3**, 325 (2007)

Summary of the results of the doctoral thesis screening

近年、オリゴデンドロサイトが髄鞘形成後の軸索の伝導速度を調節することが報告されている。このことから、オリゴデンドロサイトは活動電位が標的細胞に同調的に到達するための重要な役割を果たしていると考えられる。このような神経情報処理におけるオリゴデンドロサイトの機能を研究するためには、個々のオリゴデンドロサイトが髄鞘形成する神経軸索がどの神経細胞由来かを同定する必要がある。出願者はこの課題に取り組み、オリゴデンドロサイトが特定の神経細胞体由来する軸索と髄鞘形成する様子を直接可視化する新規手法を開発した。さらにこの手法を用いて、オリゴデンドロサイトが軸索を選択して髄鞘形成するか否かについて解析を行った。

まず、出願者は、マウス脳白質に蛍光タンパク質を発現する弱毒化狂犬病ウイルスを注入することにより、オリゴデンドロサイトを80%以上の特異性で標識できることを見出した。さらに、異なる蛍光タンパク質を発現するアデノ随伴ウイルス血清型2を脳の異なる領域に注入することにより、それぞれの領域から投射する神経軸索を高い効率で標識し、識別することに成功した。これらの技術の開発により、従来困難であった、オリゴデンドロサイトが髄鞘形成する神経軸索の由来を明らかにすることが可能となった。

次に、出願者は上記の新技术を用いて、マウスの脳梁と視交叉の個々のオリゴデンドロサイトがどの様な神経軸索に対して髄鞘形成を行うかについて解析した。大脳皮質の運動野、感覚野に由来する神経軸索と脳梁のオリゴデンドロサイトをそれぞれ標識した実験により、オリゴデンドロサイトによる髄鞘形成の様式に多様性の存在することを明らかにした。すなわち、脳梁のオリゴデンドロサイトは、1)運動野由来の軸索に対して優先的に髄鞘形成するもの、2)感覚野由来の軸索に優先的に髄鞘形成するもの、3)両方の領野から投射する軸索に概ね均等に髄鞘形成するものの3つのグループに分けられた。一方、両半球の同一領野に由来する神経軸索と脳梁のオリゴデンドロサイトをそれぞれ標識した実験では、オリゴデンドロサイトは両方の半球から投射する神経軸索に対して区別無く、概ね均等に髄鞘形成を行うことを明らかにした。また、両眼球から投射する神経軸索と視交叉のオリゴデンドロサイトをそれぞれ標識した実験では、左右どちらかの眼球から投射する神経軸索に対して優先的に髄鞘形成するオリゴデンドロサイトが全体の50%程度存在することが分かった。

さらに出願者は、新生児マウスに対して片眼の閉眼遮蔽を行い、視交叉のオリゴデンドロサイトが、閉眼遮蔽された眼球と正常の眼球から投射するそれぞれの神経軸索を区別しうるかについて上記の技術を用いて解析した。その結果オリゴデンドロサイトは、両方の軸索に同程度髄鞘形成することが明らかになった。このことは、一旦髄鞘形成のプログラムが開始されたオリゴデンドロサイトは、軸索の神経活動の高低を区別することなく髄鞘形成することを示唆する。

以上のように、出願者はオリゴデンドロサイト・軸索間相互作用を形態学的に観察する新規の手法を開発した。さらに、この技術を用いて、一部のオリゴデンドロサイトが特定の神経軸索に対して優先的に髄鞘形成することを明らかにした。本研究は、今まで考えら

(別紙様式 3)

(Separate Form 3)

れてきた以上にオリゴデンドロサイトの髄鞘選択性に多様性が存在していることを初めて明らかにしたもので、グリア研究に与えるインパクトは大きく、今後の当該分野の発展に資するものと考えられる。従って、審査委員会は全会一致で本論文が学位論文として相応しいと判断した。