

博士学位論文審査要旨

2022年1月28日

論文題目： Study on unmyelinated fibers in the corpus callosum and stria terminalis.

(脳梁および分界条における無髄線維に関する研究)

学位申請者： 山野 里紗

審査委員：

主査： 脳科学研究科 教授 高森 茂雄

副査： 脳科学研究科 教授 元山 純

副査： 脳科学研究科 教授 正水 芳人

要 旨：

哺乳類中枢神経系の軸索は、オリゴデンドロサイトによって形成されるミエリン鞘の有無によって有髄線維と無髄線維に大別される。有髄線維では、ミエリン鞘が絶縁体として働き、各々のミエリン鞘の間にあるランビエ絞輪にNa⁺チャンネルが蓄積している。これらにより、活動電位の電動速度は飛躍的に速くなることが知られており、跳躍伝導と呼ばれている。神経線維が有髄化しているか否かは、電子顕微鏡による観察で同定できるが、脳の広範囲にわたる解析には限界がある。したがって、無髄線維の脳内分布を簡便に同定する方法を確立するためには、無髄線維に特異的に存在するマーカー分子を同定することが有用であると考えられる。

本学位論文において、山野氏は免疫組織学的手法と免疫電子顕微鏡法を組み合わせ、無髄線維を特異的に染めることができる特異抗体を探索し、その有用性を検証した。これまでの所属研究室における先行研究では、Naチャンネルのβ4サブユニットとαサブユニットの一つであるNav1.2が線条体投射線維においてびまん性に存在すること、β4サブユニットが線条体に投射する無髄線維に特異的に存在することが明らかになっていた。しかしながら、βサブユニットは線条体を含めた脳の限局した部位にしか発現が認められないことから、Nav1.2の方が無髄線維の分子マーカーとしてより適している可能性を考えた。

第一章では、8週齢マウスの脳切片を用いて、第一に抗Nav1.2抗体による免疫染色を行った。本抗体では脳梁(Corpus callosum: CC)と分界条(Stria terminalis: ST)において、強い染色が認められた。そこで、それらの部位を含む矢状断切片と冠状断切片を作成し、有髄線維マーカーであるNeurofilament H(NFH)、ランビエ絞輪周囲のパラノードに集積するCasprタンパク質、ランビエ絞輪に局在するNav1.6に対する抗体を用いて、Nav1.2との共局在を免疫組織化学法によって検証した。興味深いことに、Nav1.2は両部位においてびまん性に存在し、有髄線維の分子マーカーとは異なる線維に発現していることが明らかとなった。これらの抗Nav1.2抗体陽性部位が無髄線維であることを検証するために、CC、STを含む矢状断切片を作成し、免疫電子顕微鏡法により、Nav1.2陽性部位の詳細な形態を観察した。その結果、抗Nav1.2抗体は両部位のミエリン鞘で覆われていない線維内に陽性反応を示した。一方、両部位における抗NFH抗体による染色を行ったところ、ミエリン鞘で覆われた有髄線維内に選択的に標識が認められた。これらの結果から、少なくともCC及びSTにおいては、抗Nav1.2抗体によるびまん性の標識が無髄線維の有効な分子マーカーとなり得ることが明らかになった。

第二章では、CC及びSTで認められた無髄線維の起始細胞の同定を試みた。起始細胞を同定

するための手法として、(1) 連続切片を観察して、Nav1.2 陽性線維の追跡、(2) 起始細胞が存在すると思われる脳部位への蛍光順行性トレーサー注入を組み合わせた Nav1.2 陽性線維との局在比較、(3) CC における無髄線維の起始細胞が存在する可能性がある大脳皮質 4 層の細胞が選択的に蛍光標識された *Scnn1a*^{Cre}-tdTomato トランスジェニックマウスを利用した検証、の 3 つを遂行した。その結果、CC に存在する無髄線維の一部は V1 領域に起始細胞が存在すること、ST に存在する無髄線維の一部は扁桃体中心核に起始細胞が存在することが示唆された。

本学位研究は、従来光学顕微鏡を用いた同定が困難であった無髄線維に対する新たな分子マーカー候補を提供したものである。今後、脳内の他の部位における Nav1.2 の発現を詳細に解析することで、その汎用性が明らかになるであろう。また、Nav1.2 をコードする *SCN2A* 遺伝子の変異は、てんかん、自閉症スペクトラム障害、知的障害、統合失調症などの神経疾患と関連していることがわかっている。これらの神経疾患の発症メカニズムと無髄線維の機能破綻の関連を明らかにできれば、無髄神経の生理学的重要性の解明にもつながるものと思われる。

以上のように、本論文は、博士(理学)(同志社大学)の学位論文として十分な価値を有するものと認められる。

総合試験結果の要旨

2022年1月28日

論文題目： Study on unmyelinated fibers in the corpus callosum and stria terminalis.

(脳梁および分界条における無髄線維に関する研究)

学位申請者： 山野 里紗

審査委員：

主査： 脳科学研究科 教授 高森 茂雄

副査： 脳科学研究科 教授 元山 純

副査： 脳科学研究科 教授 正水 芳人

要 旨：

博士論文提出者は、2017年4月に本学大学院脳科学研究科発達加齢脳専攻一貫制博士課程に入学し、現在、在籍中である。病態脳科学分野・認知記憶加齢部門に属し、齧歯類脳内において無髄線維を同定するための分子マーカーの探索研究を行った。本研究を通じ脳梁および分界条における無髄線維に選択的に存在するタンパク質として Nav1.2 を新たに同定することに成功した。また、齧歯類脳内の解剖学的構造、免疫蛍光組織学的手法、免疫電子顕微鏡など、病態脳科学分野の研究に必要な知識、研究手法とその原理を習得した。本博士論文の骨子となる研究内容は、2021年11月に日本神経科学学会誌 Neuroscience Research 誌に筆頭著者として刊行された。

2022年1月26日午後2時10分より約1時間30分、提出論文に関する公聴会を Zoom にて行い、提出者による英語でのプレゼンテーションと質疑応答を行った。プレゼンテーションでは、研究の背景、目的、方法、結果、結論、考察が過不足なく適切に説明され、国際的に活躍するための語学力（英語）を有していることが認められた。プレゼンテーション後の質疑応答においても的確に回答がなされたと評価できる。

更に、2022年1月27日午後3時から約1時間、主査1名副査2名により論文内容並びに関連する脳科学分野の諸問題について非公開の口頭試問を実施した結果、本論文提出者は当該分野の研究者として十分な知識と、ディベート能力を有していることが認められた。

よって、総合試験の結果は合格であると認める。

博士学位論文要旨

論文題目：Study on unmyelinated fibers in the corpus callosum and striatum terminalis. (脳梁および分界条における無髄線維に関する研究)

氏名： 山野 里紗

要旨：

中枢神経系における無髄線維の分布と役割については、驚くほど未解明である。中枢神経系の軸索は、ミエリン鞘の有無によって有髄線維と無髄線維に大別される。軸索起始部から終末側枝の間には mid-axon と呼ばれる領域があり、有髄線維では複数のミエリン鞘が存在する。ミエリン鞘の間にあるランビエ絞輪には、Na⁺チャネルが集積し、活動電位を発生させ、軸索に沿って跳躍伝導が行われる。有髄線維では同じ直径の無髄線維と比較して、神経伝導は 20~100 倍速い (Castelfranco and Hartline, 2016)。このように、脊椎動物では、神経は伝導速度を上げる手段として軸索を髄鞘化し、進化してきたと考えられる。しかし、私たちの脳には、進化の過程で獲得した有髄線維とともに無髄線維が残っている。この理由を探るために無髄線維と有髄線維の脳内分布を比較して特性の違いを調べる必要がある。

中枢神経系における無髄線維は、海馬の苔状線維や小脳の平行線維、線条体投射線維に存在することが知られている (Westenbroek et al., 1989)。所属研究室では線条体投射線維においてナトリウムチャネルβ4サブユニットの発現がハンチントン病のトランスジェニックマウスにおいて、発症初期に低下する報告 (Oyama et al., 2006) から、ナトリウムチャネルβ4サブユニットの脳内での局在を探索したところ、線条体投射線維においてナトリウムチャネルβ4サブユニットが軸索にびまん性に存在した。免疫組織化学染色や免疫電子顕微鏡解析によりβ4サブユニットがびまん性に存在する線条体投射線維は無髄線維であることがわかった。その上、ナトリウムチャネルαサブユニットの一つである Nav1.2 もβ4サブユニットと同様に線条体投射線維にびまん性に存在することから、Nav1.2 が無髄線維のマーカーになることが示唆された (Miyazaki et al., 2014)。

本研究では、まず、無髄線維の軸索には Nav1.2 がびまん性に存在すると仮説を立てて、8 週齢のマウスの脳において無髄線維の脳内での分布の検討を行った。β4サブユニットは、びまん性に存在する軸索が線条体投射線維に限定されていたため、より広範囲の軸索においてびまん性に存在する Nav1.2 を無髄線維のマーカーとして採用した。免疫組織化学染色において抗 Nav1.2 抗体で軸索がびまん性に染色された脳梁と分界条に注目した。これらは軸索起始部、軸索末端を含まない mid-axon の軸索束からなり、長い投射を担う (Ku and Torii, 2020, Dong et al., 2001)。抗 Nav1.2 抗体でびまん性に染色された軸索を免疫電子顕微鏡解析により構造を詳細に観察したところ、無髄線維に Nav1.2 が特異的に局在していた。これより、mid-axon において Nav1.2 がびまん性に存在することが無髄線維の有用なマーカーになりうることが示唆された。

次に、脳内ネットワークにおける無髄線維の役割を調べるために、その起始細胞の位置を推定した。先行研究より、脳梁は大脳皮質 (Ku and Torii, 2020)、分界条は扁桃体 (Bienkowski et al., 2013) から投射している事が分かっているが、候補となる場所が広く、起始細胞の位置の特定のために細胞体の大きさで候補を絞り込んだ。海馬の苔状線維や小脳の平行線維の起始細胞は、顆粒細胞と呼ばれる小さな細胞体であり、線条体投射線維の起始細胞は中型有棘細胞である (Wyatt et al., 2005, Henze et al., 2000)。どちらも細胞体の大きさが 10μm 前後で、比較的細胞体の直径が小さい。したがって、脳梁や分界条の無髄線維の起始細胞は、大脳皮質や扁桃体の小型細胞ではないかと仮説を立てた。免疫組織化学染色にて脳梁と分界条の Nav1.2 陽性の軸索を

たどって、起始細胞の位置を推定した。その結果、脳梁の無髄線維の一部は脳皮質一次視覚野に由来し、分界条の無髄線維の一部は扁桃体中心核に存在することが示唆された。脳皮質一次視覚野からの投射を可視化するために、まず、脳皮質一次視覚野に順行性トレーサーを打ち、軸索を蛍光標識した。脳皮質一次視覚野の小さい細胞体から投射する線維の一部は Nav1.2 陽性線維と共局在することがわかった。次に、脳皮質の6層のうち、どの層から投射しているのかを解明するために、脳皮質において時に小さい細胞体を有する脳皮質一次視覚野4層に着目した。脳皮質一次視覚野4層の細胞体を蛍光標識する *Scnn1a^{cre}-tdTomato* マウスを用い、軸索を蛍光標識した。脳皮質一次視覚野4層の小さい細胞体からの軸索の一部は Nav1.2 陽性線維と共局在していた。しかし、免疫電子顕微鏡解析によると、脳皮質一次視覚野4層から投射される軸索は無髄線維と細い有髄線維が混在していた。よって脳皮質一次視覚野4層の小さい細胞体からの投射線維の一部が無髄線維であることが示唆された。分界条についても扁桃体中心核からの線維について扁桃体中心核小型細胞特異的にマーカーを発現するマウスを用いては脳梁と同様の実験を行い、検討すべきである。

本研究では、Nav1.2 を無髄線維のマーカーと仮説を立て、脳梁と分界条に Nav1.2 陽性の無髄線維の存在を明らかにし、Nav1.2 陽性の軸索をたどることでこれらの起始細胞候補の位置を明らかにした。しかし、現在のところ脳梁と分界条におけるすべての無髄線維の起始細胞の位置を特定することはできていない。これらの無髄線維の元となるニューロンを特定するには、さらなる研究が必要である。Nav1.2 は、海馬、小脳、線条体など、哺乳類の脳の多くの領域で発現している (Gong et al., 1999, Yamagata et al., 2017)。発達過程において、初期には Nav1.2 が軸索にびまん性に存在し、その後有髄化の過程でランビエ絞輪に Nav1.2 が集積し、これが Nav1.6 に徐々に置き換えられていくことが知られている (Boiko et al., 2001)。したがって Nav1.2 は有髄化しない無髄軸索 mid-axon に持続して存在していると考えられる。中枢神経系における無髄線維の機能的役割はまだよくわかっていない。Nav1.2 をコードする *Scn2a* 遺伝子の変異は、てんかん、自閉症スペクトラム障害、知的障害、統合失調症などの神経疾患と関連している (Hoischen et al., 2014)。また *Scn2a* ヘテロノックアウトマウスが軽度の社会行動障害、恐怖条件付けの強化、恐怖の減衰の欠損を示すことが報告された (Tatsukawa et al., 2019)。しかし、これらの病態が Nav1.2 の無髄線維軸索への分布とどのような関係をもつのかについての検討はない。また、脳梁と分界条はさまざまな神経疾患や精神疾患と関連している。脳梁はてんかん、認知障害、発達遅延と関連しており、分界条は不安障害や心的外傷後ストレス障害と関連している (Velagapudi et al., 2021, Lebow and Chen et al., 2016)。脳疾患の病態解明や治療法の開発に中枢神経系における無髄線維の局在とその役割を調べるのが重要である。