

令和元年6月20日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07031

研究課題名(和文) 線条体の機能局在化を制御する分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms that control the functional localization of the striatum

研究代表者

高橋 将文 (Takahashi, Masanori)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20361074

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)：本研究では、ラット大脳基底核回路におけるCdh20発現とCDH20タンパク質局在様式を解析した。Cdh20は大脳皮質5層のPT-type 投射ニューロン、中脳ドーパミンニューロン、淡蒼球外節ニューロンに発現するが、視床束傍核ニューロンおよび中脳網様部ニューロンには発現しなかった。線条体では、CDH20タンパク質陽性細胞の数は、Cdh20発現細胞に比べて少なかった。また、Cdh20 ノックダウンのためのshRNA AAVベクターの構築と検定を行い、高力価のウイルスを得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

背外側線条体には、身体の各部位が脳の領域に対応する「体部位局在地図」が存在し、後肢、前肢、および舌などの運動機能が異なるサブドメインにおいて制御されている。しかしながら、線条体サブドメイン形成や機能局在化を制御する分子機構は未解明である。本研究で明らかにした大脳基底核におけるCdh20発現やタンパク質局在様式からCdh20が線条体サブドメイン形成や神経回路形成に関わることが示唆される。また本研究で構築したCdh20 shRNA AAVベクターを用いることで、生体内でのCdh20の機能を明らかにすることができ、複雑な随意運動の制御機構の一端を解明できる可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)： In this study, I analyzed Cdh20 expression patterns and CDH20 protein localization in the basal ganglia circuit in rats. Cdh20 was expressed in layer 5 PT-type cortical projection neurons, midbrain dopamine neurons, and external globus pallidus neurons, but not in thalamic parafascicular nucleus neurons and midbrain reticular neurons. In the striatum, the number of CDH20-positive cells was lower than in Cdh20 expressing cells. In addition, we constructed shRNA AAV vectors for Cdh20 knockdown and obtained high titer virus.

研究分野：神経発生生物学

キーワード：線条体 領域化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々の歩行や手の使用などの随意運動は、自らの意志や外部環境に応じて、実に巧妙に制御されている。その中心的な制御機能を担うのが、線条体である。線条体は、大脳皮質や視床からの情報を受け取り、再び大脳皮質へ情報を戻すことで運動を制御する。線条体区画のうち、背外側線条体 (Dorsolateral striatum: DLS) には、身体の各部位が脳の領域に対応する「体部位局在地図」が存在し、後肢、前肢、および舌などの運動機能が異なる線条体サブドメインにおいて制御されている。

しかしながら、個々の体部位局在サブドメインに特異的に発現する分子は未だ同定されておらず、線条体の機能局在化を制御する分子機構は、ほとんど明らかにされていない。

申請者は先行研究において、生後1週 のラット DLS の腹外側領域に、カドヘリン 20 遺伝子 (*Cdh20*) を特異的に発現する新規線条体サブドメインを見出していた。このサブドメインは、舌を含む顔の体部位領域に重なり、成長にともない背側方向に拡大し、成体では前肢体部位局在領域の一部にも重なっていた。DLS の腹外側領域が傷害されると、前肢および舌到達運動の頻度や速度に影響がでることから (Pisa & Schranz, Behav Neurosci., 1988) *Cdh20* の発現と前肢および舌の到達運動の制御機構に何らかの関連性があると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、大脳基底核回路ニューロンにおける *Cdh20* 発現細胞の分布およびその性質と神経回路形成における *Cdh20* の機能に焦点を当て、線条体における体部位局在化を制御する分子機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

以下の3つ課題に取り組んだ。1) 大脳基底核回路ニューロンにおける *Cdh20* の発現様式を解析した。2) 抗ラット CDH20 モルモット抗体を作製し、CDH20 タンパク質の局在様式を解析した。3) *Cdh20* 発現ノックダウンのための shRNA 発現 AAV ベクターの構築と検定を行った。

4. 研究成果

1) 大脳基底核回路ニューロンにおける *Cdh20* の発現様式の解析

DLS には、抑制性の介在ニューロンである medium spiny neuron (MSNs) が存在する。申請者の先行研究において、背外側線条体の腹側領域に局在する *Cdh20* 陽性細胞の大部分は、ドーパミン受容体 D1 (*Drd1*) 陽性の直接路ニューロンであることを明らかにしていた。*Cdh20* 陽性線条体ニューロンがホモフィリックな結合により特定の神経路形成に関わる可能性を検証するために、ラット成体において、大脳基底核回路に関係する他の脳領域における *Cdh20* の発現様式を解析した。

大脳皮質から線条体へ入力する投射ニューロンの大部分は皮質第 5(V)層 intratelencephalically projecting type (IT-type) および pyramidal tract type (PT-type) 投射ニューロンであることが知られている。そこで、各種大脳皮質層マーカーを用いて組織学的解析を行った。ラット大脳体性感覚野において *Cdh20* 陽性細胞は、*Plexnd1* を発現する Va 層には少なく、Vb 層にその多くが存在していた。PT-type のマーカータンパク質である CTIP2 と *Cdh20* の二重染色を行うと、*Cdh20* 陽性細胞のほとんどが CTIP2 陽性であった。また、線条体へ入力する中脳黒質緻密部のドーパミンニューロンでは *Cdh20* の発現が検出された。一方、線条体へ入力する視床の parafascicular nucleus (FR 核) (束傍核) のニューロンでは *Cdh20* の発現は検出されなかった。このことから、大脳皮質および中脳黒質緻密部の興奮性ニューロンと線条体 *Cdh20* 陽性ニューロンとの間には、ホモフィリックなカドヘリンサブタイプ結合が存在する可能性が示唆された。

また、線条体の出力回路について解析を進めたところ、ドーパミン受容体 D1 (*Drd1*) を発現する線条体直接路ニューロンが投射する中脳網様部ニューロンには *Cdh20* の発現は検出されず、ドーパミン受容体 D2 (*Drd2*) を発現する線条体間接路ニューロンが投射する淡蒼球ニューロンには *Cdh20* 発現が検出された。DLS の腹外側領域の *Cdh20* 陽性ニューロンのごく少数は *Drd2* 陽性であったことから、線条体からの出力回路においては、淡蒼球ニューロンとの間にホモフィリックなカドヘリンサブタイプ結合が存在することが示唆された。

2) 抗ラット CDH20 モルモット抗体の作製とタンパク質局在の解析

CDH20 タンパク質の生体内での局在様式を明らかにするために、2種類の抗ラット CDH20 モルモット抗体を作製した。ラット CDH20 細胞内ドメイン-GST 融合タンパク質およびラット

CDH20 細胞外ドメイン(EC4)-GST 融合タンパク質を大腸菌に発現後精製し、抗原としてモルモットに数回免疫した。抗血清を回収し、CDH20-MBP 融合タンパク質カラムにより抗体を精製した(北里大学医学部 阪上 洋行 博士の協力を得た)。

還流固定した 8 週齢ラット脳から 30 μm の凍結切片を作製し、CDH20 の細胞内および細胞外ドメインに対する抗体を用いて浮遊法により免疫染色を行った。両抗体ともに、大脳皮質 4, 5 層、梨状皮質において、*Cdh20* mRNA の分布と同様にタンパク質局在が認められた。これらの抗体では、細胞内ドメインに対する抗体の方が強い発現が観察された。しかしながら、ラット DSL 腹外側領域では、CDH20 陽性細胞の数は、*Cdh20* mRNA 発現細胞の数と比較して極めて少数であった。*Cdh20* を発現させた HEK293 細胞およびラット線条体、大脳皮質、小脳の組織からの細胞抽出サンプルを用いたウエスタンブロット法では、少なくとも、CDH20 細胞内ドメインに対する抗体では、すべてにおいて発現が検出されたことから、線条体での CDH20 タンパク質の局在については、さらに染色条件等を詳しく検討する必要性がある。

3) *Cdh20* 発現ノックダウンのための shRNA 発現 AAV ベクターの構築と検定

ラット *Cdh20* 遺伝子の線条体におけるノックダウンを行うために、ラット *Cdh20* の 4 か所 (*rCdh20*(114), *rCdh20*(522), *rCdh20*(1330), *rCdh20*(1426)) に shRNA をデザインし、発現プラスミドを作製した。これらの発現プラスミドと外来性ラット *Cdh20* 発現プラスミドを、電気穿孔法によりラット胎児脳に導入し、生体内環境における発現抑制効果を検討した。高い抑制効果が得られた 2 種類の shRNA (*rCdh20*(114), *rCdh20*(522)) を選択し、dual promoter により GFP を同時に発現する組換え AAV ウイルス (*AAV9-U6-Cdh20(114)shRNA-GFP*, *AAV9-U6-Cdh20(522)shRNA-GFP*) を作製した(東京都医学総合研究所、岡戸 晴生 博士の協力を得た)。これらのウイルスとランダムな shRNA 配列を導入したコントロール組換え AAV ウイルス (*AAV9-U6-NCshRNA-GFP*) を HEK293 細胞に感染させ、36 時間後に GFP 発現レベルを解析し感染効率を検討した。すべてのウイルスについて、高効率を確認でき、脳への遺伝子導入で利用できる高力価ウイルスの産生が確認できた。

ウイルス注入および注入後の神経回路の標識の予備実験として、逆行性神経トレーサーである Alexa488-CTB を 8 週齢ラットの DLS の腹外側領域に圧注入法により注入し、2 週間後に還流固定した(福島県立医大、深堀 良二 博士の協力を得た)。50 μm の凍結切片を作製し、スライドガラス上にマウント後、スライドスキャナーにより脳全体を撮影し、前後軸方向での標識細胞の分布を解析した。この方法で、DLS の腹外側領域へ入力するニューロンを特定でき、ウイルス注入のための方法を確立できた。

研究計画の遅れにより、当初予定していた AV ベクターによる *Cdh20* ノックダウンについては検討することができなかった。今後、本研究で作製することができたツールや確立した実験手法を用いて、DLS のサブドメイン形成や大脳基底核回路形成における *Cdh20* の機能を明らかにしていく必要がある。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

1. Takahashi, M., Tamura, M., Sato, S., and Kawakami, K. Mice doubly deficient in *Six4* and *Six5* show ventral body wall defects reproducing human omphalocele. *Dis. Model Mech.* 2018; 11, dmm034611 (2018). 査読あり
2. Yamashita, W., Takahashi, M., Kikkawa, T., Gotoh, H., Osumi, N., Ono, K., and Nomura, T. Conserved and divergent functions of Pax6 underlie species-specific neurogenic patterns in the developing amniote brain. *Development* 145, dev159764 (2018). 査読あり
3. Kikkawa, T., Takahashi, M., Osumi, N. Electroporation in the rodent embryonic brain using whole embryo culture system. *Current Protocols in Neuroscience*, 78: 3.30.1-3.30.16 (2017). 査読あり
4. Kawasaki, T., Takahashi, M., Yajima, H., Mori, Y., and Kawakami, K. Six1 is required for mouse dental follicle cell and human periodontal ligament-derived cell proliferation. *Dev. Growth Differ.* 58, 530-545 (2016). 査読あり

〔学会発表〕(計5件)

1. Takahashi, M. and Kawakami, K. *Six1* regulates *Six1* regulates initial knot formation and lingual-labial asymmetry in incisor development. 第51回日本発生生物学会年会 2018年5月8日、東京
2. 高橋将文、田村勝、若菜茂晴、川上潔 *Six4/Six5* 二重遺伝子変異マウスを用いた臍帯ヘルニア発症機序の解析 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会、2018年3月30日 東京
3. Takahashi, M. and Kawakami, K. *Six1* regulates growth of dental papilla and lingual-labial asymmetry in the developing mandibular incisor. 第50回日本発生生物学会年会 2017年5月10-12日、東京
4. Takahashi, M., Tamura, M., and Kawakami, K. Mice defective of *Six4* and *Six5*, show abnormal growth and epithelialization of the primary body wall, resulting in omphalocele with no severe defects in abdominal muscle differentiation. 第39回日本分子生物学会年 2016年11月30日、横浜
5. Takahashi, M. and Kawakami, K. *Six4* and *Six5* are required for ventral body wall closure and morphogenesis of the primary body wall. JSDB Special Symposium: Frontier of Developmental Biology、2016年6月2日、東京

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。