

平成21年 4月 10日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19300127
 研究課題名（和文） 小脳分子層抑制性ニューロンの発生・分化機序および機能的役割の解明
 研究課題名（英文） The differentiation and function of molecular-layer interneurons in the cerebellum
 研究代表者
 田中 光一（TAKANO KOHICHI）
 東京医科歯科大学・大学院疾患生命科学部・教授
 研究者番号：80171750

研究成果の概要：

小脳は運動学習の中枢であり、その機能的役割は詳細に解析されてきたが、小脳形成過程の分子機序は不明な点が多い。我々は、細胞特異的遺伝子改変マウスを用い、小脳抑制性介在神経細胞の神経前駆細胞において、RBP-J シグナルは神経前駆細胞から神経細胞への分化を促進する役割をもつことを明らかにした。さらに、小脳抑制性介在神経細胞を同定できるマーカーの組み合わせを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2007年度 | 7,800,000 | 2,340,000 | 10,140,000 |
| 2008年度 | 7,000,000 | 2,100,000 | 9,100,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 14,800,000 | 4,440,000 | 19,240,000 |

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：小脳、抑制性神経細胞、ノッチ、遺伝子欠損マウス、籠細胞、星状細胞

1. 研究開始当初の背景

小脳は運動の制御を担う部位で、2種類の興奮性神経細胞（顆粒細胞、大型小脳核神経細胞）と5種類の抑制性神経細胞（プルキンエ細胞、ゴルジ細胞、籠細胞、星状細胞、小型小脳核神経細胞）から構成されており、その

神経回路網は形態学的・電気生理学的に詳細に解析されている。しかし、完成された神経回路網の解析に比べ、これらの神経細胞がいかなる遺伝子・分子機構で生み出され、神経回路網が形成されるかについては、ほとんど不明である。星状細胞・籠細胞の発生・分化

機構に関しては、生後、白質で前駆細胞が増殖すること以外不明である。

2. 研究の目的

本研究では、申請者が作成した星状細胞、籠細胞の数が激減する遺伝子改変マウスを用い、星状細胞、籠細胞の発生・分化の遺伝的プログラムを明らかにする。

3. 研究の方法

アストロサイト特異的な分子である GFAP のプロモーター下流に Cre 酵素をつないだ遺伝子改変マウスを作成している際に、小脳においてアストロサイトの他に星状細胞・籠細胞にのみ Cre 酵素が発現している系統を見つけた。このマウスを用い、小脳アストロサイト・星状細胞・籠細胞から Notch シグナルの下流分子である RBP-J を欠損したマウス²⁾を作成した(ミュータント A)。ミュータント A は、星状細胞・籠細胞の数が激減していた。星状細胞・籠細胞の数の減少の原因を解析するため、星状細胞・籠細胞の前駆細胞の数の測定、増殖能やアポトーシスの変化を BrdU ラベル、TUNER 染色で解析した。

4. 研究成果

小脳分子層にある星状細胞・籠細胞の数をマーカーである parvalbumin の発現を指標に調べたところ、ミュータント A ではその数が、コントロールに比べ著名に減少していた(図1)。

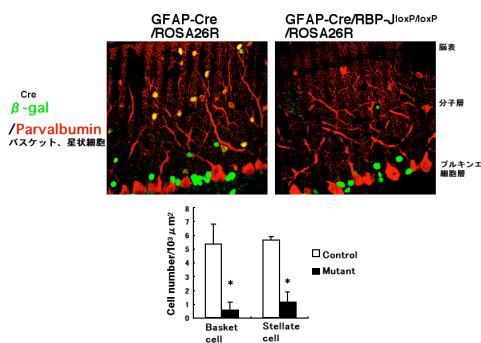


図1 星状細胞・籠細胞特異的 RBP-J 欠損マウス (GFAP-Cre/RBP-J^{loxP/loxP}) およびコントロールマウスの小脳における星状細胞・籠細胞の数

星状細胞・籠細胞数の減少の機序を調べるため、星状細胞・籠細胞の前駆細胞である白質に存在する pax2 陽性の数を調べた³⁾。Pax2 陽性細胞の数は、胎生 18.5 日 (E18.5) まではコントロールと差はないが、生後 2 日 (P2) になると減少していた (図 2、3)

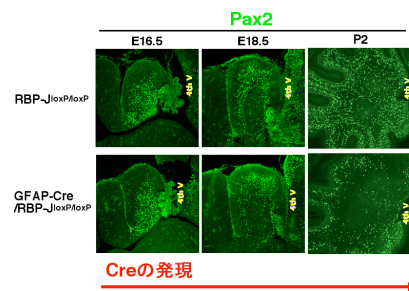


図2 星状細胞・籠細胞特異的 RBP-J 欠損マウス (GFAP-Cre/RBP-J^{loxP/loxP}) およびコントロールマウスの小脳における pax2 陽性細胞

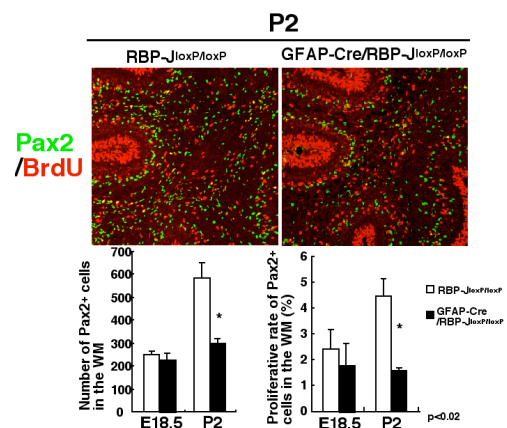


図3 星状細胞・籠細胞特異的 RBP-J 欠損マウス (GFAP-Cre/RBP-J^{loxP/loxP}) およびコントロールマウスの小脳における pax2 陽性細胞及び pax2 陽性/BrdU 陽性細胞の数

前駆細胞数の減少の原因を調べるため、pax2 陽性細胞の増殖能を解析した。BrdU 陽性・pax2 陽性細胞の数は E18.5 までは変化なかったが、P2 になると減少していた (図 3)。また、ミュータントではアポトーシスを起こしている白質の細胞 (TUNEL 陽性細胞) が P1 から増加していた (図 4)。このことは RBP-J の欠損により、星状細胞・籠細胞前駆細胞の増殖能減少及びアポトーシスの亢進が起き、星状細胞・籠細胞の数が減少することを示している。

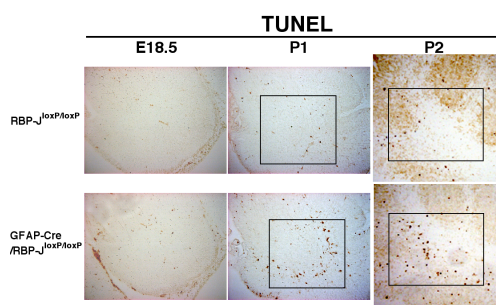


図 4 星状細胞・籠細胞特異的 RBP-J 欠損マウス (GFAP-Cre/RBP-J^{loxP/loxP}) およびコントロールマウスの小脳における TUNEL 陽性細胞

小脳分子層抑制性神経細胞である星状細胞・籠細胞の増殖・分化には RBP-J シグナルが必要であることがわかった。現在、RBP-J の上流としてどの細胞が発現しているどの Notch 受容体が重要なのか解析中である。小脳における唯一の出力細胞はプルキンエ細胞であり、その細胞に対する抑制性入力、籠細胞・星状細胞からのみしかない。従って、このミュータントは、抑制ニューロンの情報処理における機能的役割を解析することにも役立つ。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 15 件)

1. Soma, M., Aizawa, H., Ito, Y., Maekawa, M., Osumi, N., Nakahira, E., Okamoto, H., Tanaka, K., Yuasa, S. Development of the mouse amygdala as revealed by enhanced green fluorescent protein gene transfer by means of in utero electroporation. *J Comp Neurol* 513. 113-128, 2009. 査読有
2. Karlsson, RM., Tanaka, K., Saksida, LM., Bussey, TJ., Heilig, M., Holmes, A. Assessment of glutamate transporter GLAST (EAAT1) deficient mice for phenotypes relevant to the negative and executive/cognitive symptoms of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* (in press) 査読有
3. Karlsson, RM., Tanaka, K., Heilig, M., Holmes, A. Loss of Glial Glutamate and Aspartate Transporter (Excitatory Amino Acid Transporter 1) Causes Locomotor Hyperactivity and Exaggerated Responses to Psychotomimetics: Rescue by Haloperidol and Metabotropic Glutamate 2/3 Agonist. *Biol Psychiatry* 64. 810-814, 2008. 査読有
4. Takasaki, C., Okada, R., Mitani, A., Fukaya, M., Yamasaki, M., Fujihara, Y., Shirakawa, T., Tanaka, K., Watanabe, M. Glutamate transporters regulate lesion-induced plasticity in the developing somatosensory cortex. *J Neurosci* 28. 4995-5006, 2008. 査読有
5. Kiryk, A., Aida, T., Tanaka, K., Banerjee, P., Wilczynski, G.M., Meyza, K., Knapska, E., Filipkowaski, R.K.,

- Kaczmarek, L., Danysz, W. Behavioral characterization of GLT1(+/-) mice as a model of mild glutamatergic hyperfunction. *Neurotox Res* 13. 19-30, 2008. 査読有
6. Nikkuni, O., Takayasu, Y., Iino, M., Tanaka, K., Ozawa, S. Facilitated activation of metabotropic glutamate receptors in cerebellar Purkinje cells in glutamate transporter EAAT4-deficient mice. *Neurosci Res* 59. 296-303, 2007. 査読有
7. Komine, O., Nagaoka, M., Watase, K., Gutmann, D.H., Tanigaki, K., Honjo, T., Radtke, F., Saito, C., Chiba, S., Tanaka, K. The monolayer formation of Bergmann glial cells is regulated by Notch/RBP-J signaling. *Dev Biol* 311. 238-250, 2007. 査読有
8. Tanimoto, S., Suzuki, M., Ue, T., Okumichi, H., Aoyama, H., Souchelnytskyi, S., Tanaka, K., Agarwal, N., Mishima, H.K., Kanamoto, T. Proteomics in retina of Excitatory Acid Carrier 1(EAAC1) knockout mice. *Proteome Science* 5. 13, 2007. 査読有
9. Maekawa, F., Nakamori, T., Uchimura, M., Fujiwara, K., Yada, T., Tsukahara, S., Kanamatsu, T., Tanaka, K., Ohki-Hamazaki, H. Activation of cholecystokinin neurons in the dorsal pallium of the telencephalon is indispensable for the acquisition of chick imprinting behavior. *J Neurochem* 102. 1645-1657, 2007. 査読有
10. Harada, T., Harada, C., Nakamura, K., Qua, H-M. A., Okumura, A., Namekata, K., Saeki, T., Aihara, M., Yoshida, H., Mitani, A., Tanaka, K. The potential role of glutamate transporters in the pathogenesis of normal tension glaucoma. *J Clin Invest.* 117. 1763-1770, 2007. 査読有
11. Takatsuru, Y., Iino, M., Tanaka, K., Ozawa, S. Contribution of glutamate transporter GLT-1 to removal of synaptically released glutamate at climbing fiber-Purkinje cell synapses. *Neurosci Lett* 420. 85-89, 2007 査読有
12. 相田知海、田中光一：グルタミン酸トランスポーターの中樞神経系における役割、*Clinical Neuroscience*、26: 1072-1076, 2008 査読無
13. 相田知海、田中光一：グルタミン酸トランスポーターと精神神経疾患、*遺伝子医学MOOK*、12: 212-217, 2008 査読無
14. 田中光一：アストロサイトにおけるグルタミン酸トランスポーターの機能、*Brain and Nerve* 59:677-688 (2007). 査読無
15. 田中光一：神経幹細胞の分化過程のメカニズム、*分子精神医学* 7:86-91 (2007) 査読無
6. 研究組織
 (1)研究代表者
 田中 光一 (TANAKA KOHICHI)
 東京医科歯科大学・大学院疾患生命科学研究所・教授
 研究者番号：80171750
 (2)研究分担者
 なし
 (2)連携研究者
 なし