

平成21年 5月20日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19890010

研究課題名（和文） 摂食機能発達の臨界期を制御する分子の組織学的解析

研究課題名（英文） Histological analysis of a molecule regulating critical period in developing function of eating

研究代表者

高崎 千尋（TAKASAKI CHIHIRO）

北海道大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：60451449

研究成果の概要： 子どもの脳が刺激を受けて構造を変える臨界期に、特定のタンパク質が重要な働きを担っていることをつきとめた。マウスは顔のひげから受ける神経回路が発達している。臨界期のうち皮膚感覚の能力に関わる生後4日目までは特定のひげを抜いて刺激の伝わり方を変えると、神経回路の配線パターンら接続数が変化して脳の構造が変わる改築がおこる。今回、脳の情報伝達物質グルタミン酸を細胞に取り込む働きのあるタンパク質 GLT1 に注目した。GLT1 をもたないマウスでは、臨界期の外部刺激に対して改築がほとんど起こらなかった。ヒトの脳の臨界期にも同じ仕組みがあることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,320,000	0	1,320,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,670,000	405,000	3,075,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 矯正・小児系歯学

キーワード： グルタミン酸トランスポーター、GLT1、バレル、臨界期可塑性、体性感覚系

1. 研究開始当初の背景

摂食・嚥下機能に障害を持つ人は、発達障害児、高齢者など少なくない。脳性麻痺、精神発達遅滞など運動機能の発達や知的発達に障害をきたす心身障害児ではその多くに摂食障害が認められる。摂食機能は感覚刺激に対して引き出される種々の運動を食べる目的にあった動作に統合させることで営まれる随意運動である。摂食機能発達障害に関与する因子の一つとして、生後間もない時期

の感覚刺激体験不足が考えられる。歯科界において摂食機能発達を解明することは重要な課題であるが、分子レベルでは未だ明らかにされていない点も多い。

そこで本研究者は、口腔領域の体性感覚系の解析モデルであるバレルの発達・臨界期可塑性とグルタミン酸トランスポーターに着目した。

バレルはげっ歯類に存在する、触覚毛の配列と相同なモジュール構造である。体性感覚

系の脳幹三叉神経核ではバレット、視床VPM核ではバレロイド、大脳皮質体性感覚野ではバレルと呼ばれている。この構造は、電気生理学的だけでなく形態学的にも可視化できるため実験解析に適している。バレルは生後まもなく出現する中枢シナプスの構築形態であり、出現してしばらくの間は、末梢からの感覚刺激に応じて変化したり維持され、臨界期と呼ばれる。臨界期を過ぎると、バレル構造は変化を受けにくい永続的な構築へと成熟してゆく (Van der Loos and Woolsey, *Science*, 179:395-398, 1973)。例えば、臨界期に顔面の触覚毛を支配する眼窩下神経を切断あるいは触覚毛除毛処置を行うと、それに対応したバレル構造は消失あるいは面積減少し周囲の健全な触覚毛に対応するバレルの拡大が起こるが、臨界期終了後に同様の処置を行っても、バレル構造は永続的に保たれる (Weller and Johnson, *Brain Res*, 83:504-508, 1975; Woolsey and Wann, *J Comp Neurol*, 170:53-66, 1976; Belford and Killackey, *J Comp Neurol*, 193:335-350, 1980)。グルタミン酸は体性感覚シナプスでの神経伝達物質で、グルタミン酸受容体の遺伝子ノックアウトマウスの解析から、グルタミン酸シナプス伝達機構がバレルの形成に不可欠であることが明らかにされている (Li *et al.*, *Cell*, 76:427-437, 1994; Fox *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:5584-5589, 1996; Kutsuwada *et al.*, *Neuron*, 16:333-344, 1996; Iwasato *et al.*, *Neuron*, 16:333-344, 1997; Iwasato *et al.*, *Nature*, 406:726-731, 2000; Hannan *et al.*, *Nat Neurosci*, 4:282-288, 2001)。

また、新生児期の吸啜運動は口唇付近への感覚刺激により惹起される感覚運動反射で哺乳類の栄養摂取とそれによる個体の生存成長に不可欠である。この反射弓では、感覚性の三叉神経が求心路となり、運動性の三叉神経・顔面神経・舌下神経が求心路となって、乳頭に対する適切な顎関節、表情筋、舌の共同運動が行われている。ラット新生仔脳幹標本を用いた実験から、グルタミン酸受容体の一つである NMDA 受容体の刺激により、吸啜反射時の舌筋収縮に類似した舌下神経のリズミカルな発火が誘発される (Katakura *et al.*, *Neuroreport*, 6:601-604, 1995)。NMDA 受容体の欠損マウスでは、吸啜反射に障害をきたし、生まれるとまもなく死亡する (Kutsuwada *et al.*, *Neuron*, 16:333-344, 1996)。

一方、細胞膜型グルタミン酸トランスポーターは、シナプス間隙や細胞外のグルタミン酸濃度を低く保ち、シナプスにおけるグルタミン酸受容体の活性化を終結させたり、グル

タミン酸による興奮毒性から神経を保護する機能分子である (Danbolt, *Prog Neurobiol*, 67:1-105, 2001)。遺伝子クローニングの研究から、これまで5つのサブタイプ (GLAST, GLT1, EAAC1, EAAT4, EAAT5) が同定されている (Storck *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89:10955-10959, 1992; Pines *et al.*, *Nature*, 360:464-467, 1992; Kanai and Hediger, *Nature*, 360:467-471, 1992; Fairman *et al.*, *Nature*, 375:599-603, 1995; Arriza *et al.*, *J Proc Natl Acad Sci U S A*, 94:4155-4160, 1997)。従って、NMDA 受容体の活性化を調節するこれらのグルタミン酸トランスポーターが、NMDA 受容体依存的な新生児期の吸啜反射系や体性感覚系のシナプス回路発達を制御している可能性が十分に考えられる。

GLT1 は、成熟段階ではグリアに選択的に発現する大脳皮質に優性なグルタミン酸トランスポーターである。GLT1 欠損マウスは、生後第3週までにてんかん発作を引き起こし80%のGLT1 欠損マウスが死亡する (Tanaka *et al.*, *Science*, 276(5319):1699-1702, 1997)。GLT1 は胎生期では成長軸索に一過性に発現するが、成熟段階ではアストログリアに特異的発現を示すサブタイプである (Yamada, *et al.*, *J Neurosci*, 18:5706-5713, 1998)。しかし、どのような発達段階で軸索からグリアへスイッチするか、神経発達での役割については、未だ不明な点が多い。またバレルの形成とグルタミン酸受容体の関連性は報告されているが (Iwasato *et al.*, *Neuron*, 16:333-344, 1997; Iwasato *et al.*, *Nature*, 406:726-731, 2000; Hannan *et al.*, *Nat Neurosci*, 4:282-288, 2001)、グルタミン酸受容体の活性化を終結させる働きのあるグルタミン酸トランスポーターと大脳皮質体性感覚野バレルの発達との関連についての報告や臨界期可塑性に関わる分子なのかについては今まで報告がない。

2. 研究の目的

大脳皮質体性感覚野における GLT1 の細胞発現スイッチとバレル発達の関係、さらには GLT1 と臨界期可塑性との関連性について解析して、グリアへの GLT1 発現スイッチがグルタミン酸除去機能を介して、神経活動依存性のシナプス再構築に対して積極的な役割を演じているのか、このような機能が新生児期の口腔や顎顔面における感覚運動反射や成長に伴う神経系の発達変化に寄与しているのか解析することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) グルタミン酸トランスポーターGLT1 の体性感覚系における発現解析

麻酔下にて妊娠マウスから、胎生 15 日～18 日の胎仔を分離し、低温麻酔後直ちに 4% パラホルムアルデヒド溶液にて浸漬固定を行う。生後 0～15 日のマウスは 4% パラホルムアルデヒド溶液にて灌流固定を行い脳を摘出し、後固定する。切片は、マイクロスライサーで作製、あるいは 30% シュークロース溶液に浸漬後、クライオスタットで作製する。GLT1 の細胞発現を調べるため、蛍光抗体法を行う。得られた発達段階の切片を用いて、GLT1 抗体とマーカー抗体との免疫二重染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察する。マーカー抗体には、GAP43 を成長軸索のマーカーとして、neurofilament160 を軸索のマーカーとして、MAP2 を樹状突起のマーカーとして、VGluT2 を神経終末のマーカーとして、GLAST を発達から成熟までのグリアのマーカーとして用いる。隣接切片はバレルの検出を目的としてチトクロームオキシダーゼ酵素組織化学によって可視化する。さらに金コロイド銀増感法による post-embedding の免疫電顕を行い、透過型電子顕微鏡で観察し、GLT1 の細胞内局在についても解析を行う。

(2) ノックアウトマウスを用いた臨界期可塑性およびバレル形成時期の解析

GLT1 ノックアウトマウスのヘテロ同士をかけ合わせ、生まれてきた同腹子マウスを、生後 0 日、2 日、4 日に触覚毛の C 列を電気マスを焼灼あるいは眼窩下神経切断処置を行い、生後 15 日にパラホルムアルデヒド溶液にて灌流固定する。固定後、マイクロスライサーにて切片を作製し、バレルの検出を目的として、チトクロームオキシダーゼ酵素組織化学を行い可視化する。画像取り込み後、可塑性の度合いを数値化するために、IPlab (ソフト) にて、面積測定を行う。遺伝子型は PCR により判定する。GLT1(-/-)マウスと GLT1(+/-)マウスでは、数値に有意差があるかをマンホイットニーの U テストで検定する。また、プレシナプス、ホストシナプスのそれぞれのマーカーで免疫染色して、プレ側、ポスト側で差があるかも検討する。GLT1(-/-)マウスと GLT1(+/-)マウスの間にバレルの出現時期、形成に違いがないかを生後 0 日～5 日まで灌流固定後、マイクロスライサーにて切片を作製、チトクロームオキシダーゼ酵素組織化学を行い、比較検討する。

4. 研究成果

平成 19 年度は、グルタミン酸トランスポーターGLT1 の体性感覚系における発現解析を野生型マウスで行った。胎生 15 日から生後第 2 週までの C57/B6J マウスを固定し脳を摘出、切片を作製し、GLT1 抗体とマーカー抗体 (成長軸索のマーカー: GAP43; 軸索のマーカー: neurofilament160; 樹状突起のマーカー: MAP2; グルタミン酸作動性神経終末のマーカー: VGluT2; 発達から成熟までのグリアのマーカー: GLAST) との二重染色を行い共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、脳幹三叉神経核バレットでは、GLT1 は胎生 15 日において成長軸索に発現するが、その後、次第に軸索での発現は減少し、グリアに発現するようになり、生後 6 日までにグリアへの発現スイッチが完了した (Fig.1)。

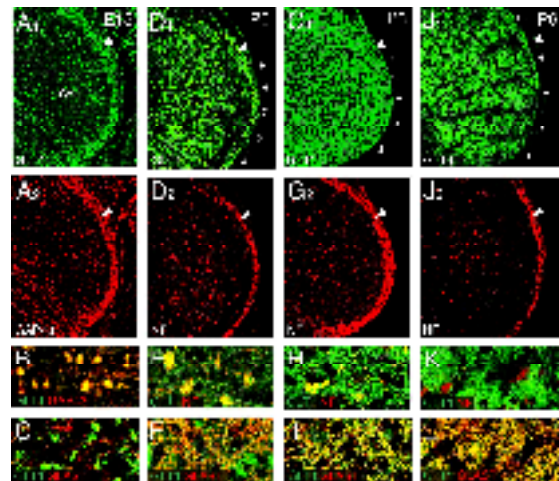


Fig.1 脳幹三叉神経核における GLT1 の発現スイッチ

脳幹三叉神経核でのニューロンからアストログリアへの GLT1 の細胞発現スイッチは生後 6 日 (P6) までに完了する。

A-C: E15 GLT1 細胞発現は E15 では成長軸索のマーカー-GAP43 と共陽性を示すが、グリアのマーカー-GLAST とは全く重ならない。

D-F: P0, G-I: P3, J-L: P6 P0, P3, P6 と日齢が増すにつれ、軸索のマーカー-neurofilament (NF) との重なりが減少する一方、GLAST 陽性グリア細胞との重なりが増加する。J: GLT1 陽性細胞は P6 でバレット様のパッチ状構造を呈する。

a-e はバレットの 5 列に対応する。

B, C, E, F, H, I, K, L: GLT1 と GAP43 (B)、GLT1 と NF (E, H, K)、GLT1 と GLAST (C, F, I, L) との蛍光免疫二重染色高倍像

A (D, G, J): スケールバー=100 μm

B (C, E, F, H, I, K, L): スケールバー=10 μm

同様に、視床 VPM 核バレロイドでは生後 2 日までに (Fig.2)、大脳皮質体性感覚野バレルでは生後 4 日までに GLT1 のグリアへの発現スイッチが完了していた (Fig.3)。これは眼窩下神経を切断した時のバレット、バレロイド、バレルの臨界期終了時期 (バレット: 生後 6~8 日; バレロイド: 生後 3 日; バレル: 生後 5 日) に先立つタイミングで起きていた。バレット、バレロイド、バレルの出現時期 (バレット: 生後 1~2 日; バレロイド: 生後 4 日; バレル: 生後 4 日) とは連動していなかった。以上の結果から GLT1 のグリアへの発現スイッチがグルタミン酸除去機能を介して、神経活動依存性のシナプス再構築に対して積極的な役割を演じていることが示唆された。

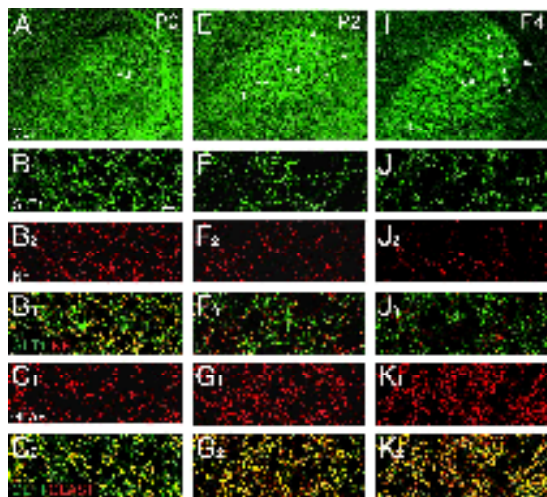


Fig.2 視床 VPM 核における GLT1 の発現スイッチ

視床 VPM 核でのニューロンからアストログリアへの GLT1 の細胞発現スイッチは生後 2 日 (P2) までに完了する。

A-C : P0 GLT1 細胞発現は P0 では軸索のマーカ-NF、グリアのマーカ-GLAST のいずれとも重なりを示す。

E-G : P2 P2 では軸索発現は消失してグリアのみの発現となる。

I-K : P4 I : GLT1 陽性細胞は P4 でバレロイド様のパッチ状構造を呈する。

a-e はバレロイドの 5 列に対応する。UL, LL はそれぞれ上唇、下唇のバレロイドを示す。

B, C, F, G, J, K : GLT1 と NF (B, F, J)、GLT1 と GLAST (C, G, K)との蛍光免疫二重染色高倍像
A (F, I) : スケールバー=100 μ m

B (C, F, G, J, K) : スケールバー=10 μ m

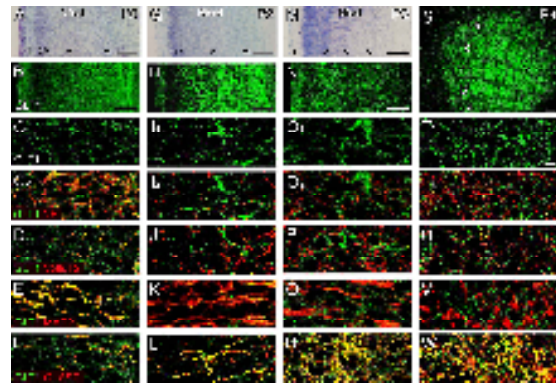


Fig.3 大脳皮質体性感覚野における GLT1 の発現スイッチ

大脳皮質でのニューロンからアストログリアへの GLT1 の細胞発現スイッチは生後 4 日 (P4) までに完了する。

A-F : P0, G-L : P2, M-R : P3, S-W : P4

A, B, G, H, M, N, S : 体性感覚野の低倍像

A, G, M は冠状断切片の Nissl 染色像であり、I-VI はそれぞれ大脳皮質の I-VI 層を、CP は皮質板を示す。B, H, N は A, G, M の隣接切片を、S は大脳皮質 IV 層の水平断切片を GLT1 抗体で染色した像である。GLT1 細胞発現は P2 までに neurofilament (NF) 陽性軸索や VgluT2 陽性神経終末から、P4 までに MAP2 陽性樹状突起から消失する。一方、GLAST 陽性グリア細胞との重なりは日齢が増すにつれ増加する。また、GLT1 陽性細胞は P4 でバレル様のパッチ状構造を呈する。a-e は皮質バレルの 5 列に対応する。

C-F, I-L, O-R, T-W は GLT1 と NF (C, I, O, T)、GLT1 と VgluT2 (D, J, P, U)、GLT1 と MAP2 (E, K, Q, V)、GLT1 と GLAST (F, L, R, W) との蛍光免疫二重染色高倍像

A, B, G, H, M, N, S : スケールバー=100 μ m

T (C-F, I-L, O-R, T-W) : スケールバー=10 μ m

平成 20 年度はグルタミン酸トランスポーター GLT1 ノックアウトマウスを用いて、GLT1 と臨界期可塑性との関連性について解析した。

触覚毛 C 列を焼灼した場合の臨界期可塑性を GLT1 ノックアウトマウスと野生型マウスで比較した。生後 0 日に C 列を焼灼すると、野生型マウスでは、それに対応した障害側 C 列バレルが縮小・癒合し、隣接する B, D 列バレルが相補的に拡大した (Fig. 4B1)。これに対し、ノックアウトマウスでは、バレル構造の変化の度合いが小さかった (Fig. 4A1)。生後 2 日に C 列を焼灼した場合も、同様にノックアウトマウスでは構造変化の度合いが小さかった (Fig. 4C1 vs D1)。臨界期が終了する生

後4日にC列を焼灼したものは、いずれもバレル構造は保たれており、有意差はなかった (Fig.4E1 vs F1)。健常側では、いずれの場合も有意差は認められなかった (Fig.4A2-F2)。また可塑性の度合いを Map Plasticity Index (MPI) = (B2 + B3 + D2 + D3) / 2(C2 + C3) にて評価した (Fig.4G)。生後0日にC列を焼灼した場合の障害側 MPI は、GLT1 ノックアウトマウス 1.61 ± 0.34 (n=11)、野生型マウス 3.80 ± 2.21 (n=8) となり、ノックアウトマウスで有意に低かった (p < 0.01)。生後2日も同様に、GLT1 ノックアウトマウス 1.34 ± 0.21 (n=10)、野生型マウス 2.79 ± 1.79 (n=10) となり、ノックアウトマウスで有意な減少が認められた (p < 0.01)。しかし、臨界期が終了する生後4日に焼灼した場合は、GLT1 ノックアウトマウス、野生型マウスの間に有意差は認められなかった (p > 0.05)。

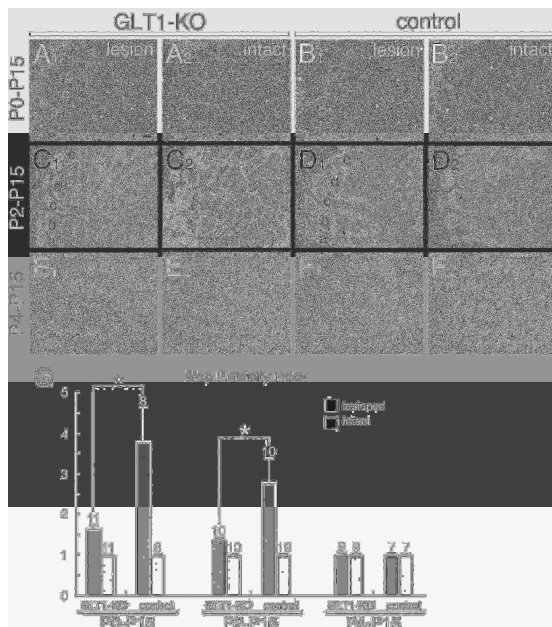


Fig.4 障害誘導性の臨界期可塑性

C列焼灼による活動依存的臨界期可塑性はGLT1 ノックアウトマウスで減少する。

GLT1-KO (GLT1 ノックアウトマウス: A, C, E) と control (野生型マウス: B, D, F) を比較した。P0 (A, B), P2 (C, D), P4 (E, F) にC列を焼灼し、P15 で固定してチトクロームオキシダーゼ酵素組織化学を行った (A-F)。

a-e は皮質バレルの a-e 列を示す。

スケールバー: 100 μm

G, Map Plasticity Index = (B2 + B3 + D2 + D3) / 2(C2 + C3)

black bar: 損傷側、pale bar: 非損傷側、

Error bar: SEM、*p < 0.01、

bar 上の数字はそれぞれ使用したマウス数。

以上の結果より、GLT1 は臨界期可塑性を制御する分子の一つであることが判明し、これの機能は、新生児期の口腔や顎顔面における感覚運動反射や成長に伴う神経系の発達変化に寄与していることが示唆された。

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 1 件)

- ① 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. *The Journal of Neuroscience*, 28:4995-5006, 2008. (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 高崎千尋, 内ヶ島基政, 渡辺雅彦: 成体マウス大脳皮質におけるニューロン周囲オリゴデンドロサイトの化学的特性の検討. 第114回解剖学会総会・全国学術集会, 2009年3月28~30日, 岡山理科大学.
- ② Takasaki C, Okada R, Mitani A, Fukaya M, Fujihara Y, Shirakawa T, Tanaka K, Watanabe M: Glutamate transporters magnify critical period plasticity in developing somatosensory cortex. 6th FENS Forum of European Neuroscience, Jul 12~16, 2008, Geneva, Switzerland.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高崎 千尋 (TAKASAKI CHIHIRO)

北海道大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号: 60451449

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし