

平成23年 4月 1日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21792050

研究課題名 (和文) 摂食・嚥下機能の発達に関与する分子の組織学的解析

研究課題名 (英文) Histological analysis of a molecule involved in development of function for eating and swallowing

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 (和文) : ニューロンの細胞体に密着して存在するニューロン周囲オリゴデンドロサイトがどのような化学的特性をもつ細胞であるのか不明な点が多い。今回、口腔周囲の皮膚感覚領域を含む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を解析した。その結果、この細胞はニューロンのエネルギー代謝や栄養に関わる分子を高率に発現し、発達段階では、シナプスの成熟期にニューロンの核周囲部により密着して存在することが判明した。よって、ニューロン周囲オリゴデンドロサイトは口腔周囲の皮膚感覚領域を含めた主要なニューロンの成熟に伴って分化し、そのエネルギー代謝の支援に関わることが示唆された。

研究成果の概要 (英文) : Perineuronal oligodendrocytes are unmyelinating oligodendrocytes attaching to large neurons in various neural regions. However, little is known about their cellular characteristics. In this study, we examined their cytochemical properties in the mouse cerebral cortex. Almost all perineuronal oligodendrocytes expressed glia-specific or glia-enriched metabolic enzymes. Interestingly, they attached more to glutamatergic principal neurons, when the cerebral cortex develops and matures. These cytochemical properties suggest that perineuronal oligodendrocytes are so differentiated as to fulfill metabolic support to the associating principal cortical neurons.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：大脳皮質, ニューロン周囲オリゴデンドロサイト, マウス, クレアチン合成酵素, セリン合成酵素, グルタミン合成酵素

1. 研究開始当初の背景

マウスなど齧歯類において、顔面の触覚毛が生えている領域は、ヒトにおいては口唇周囲領域に相当し、口唇は吸啜、摂食など重要な生体機能に関与している。一方、ニューロンの細胞体に密着して存在するグリアはサテライト細胞とよばれ、そのひとつとして、髄鞘を形成しないオリゴデンドロサイトの存在が古くから知られている (Browson, J. Neuropathol. Exp. Neurol., 19, 407-414, 1960; Ogawa et al., Cell Tissue Res., 240, 541-552, 1985)。大脳皮質において、ニューロン周囲オリゴデンドロサイトの割合は加齢とともに増加することが知られている (Browson, 1960)。また、アストロサイトのように、ニューロン周囲オリゴデンドロサイトはグルタミン合成酵素 (GS) を発現する (Cammer, J. Neuroimmunol., 26, 173-178, 1990; D' Amelio et al., Glia, 3, 335-341, 1990)。さらに、ニューロン周囲オリゴデンドロサイトにはリポカリン型プロスタグランジンD合成酵素の著しい上方制御を通して神経細胞死から保護する働きもある (Taniike et al., J. Neurosci., 22, 4885-4896, 2002)。しかし、このニューロン周囲オリゴデンドロサイトが、一体どのような化学的特性と機能的役割をもち合わせる細胞であるのか、未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

今回、口腔領域と関わりの深い大脳皮質体性感覚野を含めた大脳皮質において、ニューロン周囲オリゴデンドロサイトの発現特性を、グリア細胞に発現する代謝酵素のうち、その代謝産物がニューロンの機能発現や生存に関わる分子を中心に、免疫組織化学的に検討して、ニューロン周囲オリゴデンドロサイトがどのような化学的特性を持ち合わせる細胞なのかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 動物と切片前処理

生後 0、7、14、21 日 (P0、P7、P14、P21) と成体の C57BL マウスと GAD67-GFP (緑色蛍光タンパク) (Δ neo) マウス (Tamamaki et al., J. Comp. Neurol., 467, 60-79, 2003) を用いた。動物の取り扱いは「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」に準じた。ペントバルビタールで十分麻酔を行った後、4%パラホルムアルデヒド/リン酸緩衝溶液で経心的灌流固定を行った。抜脳後、マイクロスライサー (VT1000S、ライカ社) にて $40\ \mu\text{m}$ の切片を、あるいは 30%スクロースで後固定した後、クリオスタット (CM1900、ライカ社) にて $30\ \mu\text{m}$ の切片を作製した。免疫電顕には、成体マウスを 4%パラホルムアルデヒド/0.5%グルタルアルデヒド/リン酸緩衝溶液で灌流固定後、 $150\ \mu\text{m}$ の冠状断切片をマイクロスライサーにて作製した。

(2) 抗体

グルタミン合成酵素 GS (アミノ酸残基 331-373、GenBank Accession No. X16314) 抗体を作製し、抗体特異性を免疫ブロットと抗原吸収試験で確認した。 *Neisseria gonorrhoeae* GFP (全配列、YP002302326) 抗体を作製し、GAD-GFP マウスで抗体特異性を確認した (いずれもデータは示さず)。

また、ヤギ微小管関連タンパク 2 (MAP2) 抗体 ($1\ \mu\text{g/ml}$) (Miura et al., J. Neurochem., 97, 1431-1446, 2006)、マウス 2', 3'-環状ヌクレオチド 3'-ホスホジエステラーゼ (CNP) 抗体 (1:600; C5922; シグマ社)、モルモット S-アデノシルメチオニン: グアジニノアセテート Nメチルトランスフェラーゼ (GAMT) 抗体 ($1\ \mu\text{g/ml}$) (Tachikawa et al., Eur. J. Neurosci., 20, 144-160, 2004)、ウサギとモルモット 3-ホスホグリセリン酸脱水素酵素

(Phgdh)抗体(1 μ g/ml) (Yamasaki et al., J. Neurosci., 21, 7691-7704, 2001)、グルタミン酸トランスポーターのウサギとモルモット GLAST抗体(1 μ g/ml) (Shibata et al., J. Neurosci., 17, 9212-9219, 1997)、ウサギ GLT-1抗体(1 μ g/ml) (Yamada et al., J. Neurosci., 18, 5706-5713, 1998)、ウサギ脳型脂質結合タンパク(BLBP)抗体(1 μ g/ml) (Yamada et al., J. Comp. Neurol., 418, 106-120, 2000)、ウサギグリア線維酸性タンパク(GFAP)抗体(1 μ g/ml) (Hisano et al., J. Anesth., 23, 363-369, 2009)、ウサギNG2+グリア(NG2)抗体(1:200; AB5320; ケミコンインターナショナル社)、ウサギイオン化カルシウム結合アダプター分子-1(Iba-1)抗体(1 μ g/ml) (1:500; 和光純薬工業)を使用した。

(3) 免疫組織化学

全ての免疫反応は室温(25°C)で行った。正常10%ロバ血清によるブロッキング後、一次抗体と一晚反応させ、Alexa488-, Cy3-, Cy5-を標識した種特異的な二次抗体で2時間反応させた。蛍光ニッスル染色として、一部の切片はNeuroTrace 500 / 525 Green (NTG) (モレキュラプローブ社)で15分間反応させた。蛍光像は、共焦点レーザー顕微鏡(FV1000, オリンパス)を用いて画像化した。免疫電顕は、モルモットGAMT抗体(1 μ g/ml)と一晚反応させた後、通法に従い、金コロイド銀増感法を行った。エポン包埋とウルトラミクロトーム(ライカ社)による超薄切片の作製を行い、透過型電子顕微鏡(H7100, 日立)で観察した。

(4) 免疫プロット

通法に従い行った。

4. 研究成果

(1) ニューロン周囲オリゴデンドロサイトの同定

ニューロンのマーカーであるMAP2とオリゴデンドロサイトに特異的で髄鞘関連分子のCNPによってニューロン周囲オリゴデンドロサイトを同定した(矢頭、図1A)。CNP陽性細胞に対する各グリアマーカー陽性細胞数は、アストロサイトのマーカー-BLBPあるいはGFAPが0/61あるいは0/60、ミクログリアのマーカー-Iba-1が0/62、NG2+グリアのマーカー-NG2が0/61であった(図1B-E)。したがって、CNP陽性ニューロン周囲オリゴデンドロサイトは他のグリアのマーカーをいずれも発現せず、オリゴデンドロサイト特異的であった。

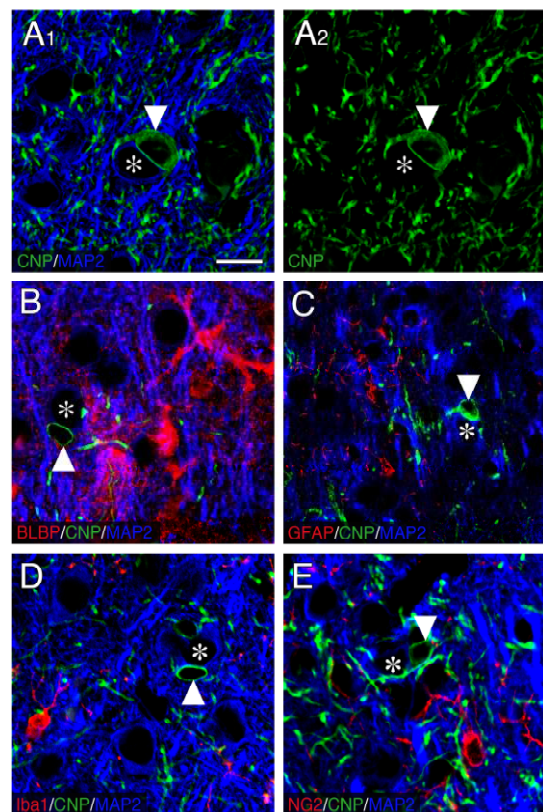


図1 成体マウス大脳皮質体性感野においてCNP陽性ニューロン周囲オリゴデンドロサイトは他のグリアのマーカーを発現しない。A,オリゴデンドロサイトのマーカー-CNP(緑)とニューロンのマーカー-MAP2(青)との二重免疫蛍光染色。B-E, CNP(緑)、MAP2(青)、他グリアマーカー(赤) (B:アストロサイトのマーカーである脳型脂質結合タンパク(BLBP), C:アストロサイトのマーカーであるグリア線維酸性タンパク(GFAP), D:ミクログリアのマーカーであるイオン型カルシウム結合アダプター分子-1(Iba1), E:NG2+グリア(NG2)との三重免疫蛍光染色。矢頭はMAP2陽性ニューロン(☆)に密着するCNP陽性ニューロン周囲オリゴデンドロサイトを示す。スケールバー: A, 100 μ m; B-E,

(2) ニューロン周囲オリゴデンドロサイトはグリア代謝型酵素を高率に発現する

ニューロン周囲オリゴデンドロサイトの化学的特性をグリア特異的あるいはグリアに豊

富な代謝酵素を中心にして免疫組織化学的に検討した。具体的には、クレアチン合成酵素 (GAMT)、L-セリン合成酵素 (Phgdh)、グルタミン合成酵素 (GS)、細胞膜型グルタミン酸トランスポーター (GLAST, GLT-1) である。それぞれの抗体特異性は脳皮質組織片を用いた免疫ブロットで確認した(データは示さず)。

三重免疫蛍光染色で、CNP陽性ニューロン周囲オリゴデンドロサイトはGAMT(矢印、図2A)とPhgdh(矢印、図2B)の強いシグナルを示した。陽性細胞数のカウントでは、CNP陽性ニューロン周囲オリゴデンドロサイトに対して、GAMTとPhgdhはそれぞれ100%(61/61)と98%(59/60)で検出された。GAMT免疫蛍光染色によってニューロン周囲オリゴデンドロサイトを同定した時、CNPはGAMT陽性ニューロン周囲オリゴデンドロサイトの95%(61/64)で、ほとんどのニューロン周囲オリゴデンドロサイトがCNPとGAMTを共発現していた。ニューロン周囲オリゴデンドロサイトには、GS陽性の集団(矢印、図2C)とGS陰性(矢頭、図2D)の集団があった。GSを発現したニューロン周囲オリゴデンドロサイトの割合はCNP陽性ニューロン周囲オリゴデンドロサイトに対して57%(36/63)であった。

一方、細胞膜型グルタミン酸トランスポーターGLASTはニューロン周囲オリゴデンドロサイトで全く検出されなかった(矢頭、0/60、図2E)。また、もう一つの細胞膜型グルタミン酸トランスポーターGLT-1(矢頭、0/62、図2F)も同様に全く検出されなかった。したがって、ニューロン周囲オリゴデンドロサイトはニューロン-グリアの代謝相互関係を媒介する酵素を豊富にもつが、シナプス伝達を調節する細胞膜型グルタミン酸トランスポーターを欠落する。

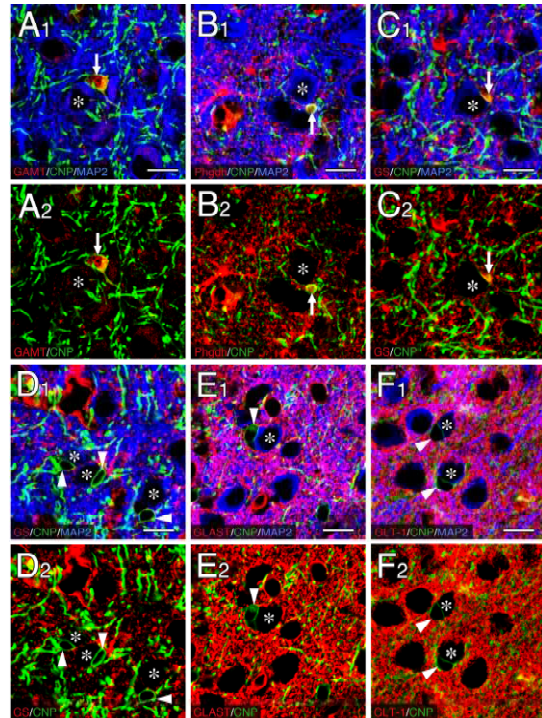


図2 成体マウス脳皮質性感覚野のCNP陽性ニューロン周囲オリゴデンドロサイトにおけるグリア代謝酵素とグルタミン酸トランスポーターの二重免疫染色。切片は、CNP(緑)とMAP2(青)とグリアの酵素やトランスポーター(赤)：GAMT(A)、Phgdh(B)、GS(C)とD)、GLAST(E)、GLT-1(F)で免疫染色された。矢印と矢頭はそれぞれ、グリアの代謝酵素とグルタミン酸トランスポーターを発現している、あるいは欠失しているニューロン周囲オリゴデンドロサイトを示す。*はニューロン周囲オリゴデンドロサイトが密着した神経細胞体を示す。スケールバー：A-F, 10 μm。

(3) ニューロン周囲オリゴデンドロサイトの細胞学的特性

ニューロン周囲オリゴデンドロサイトの微細構造的特徴を、GAMT抗体を使用して銀増感した免疫電顕によって調べた。GAMTの金属粒子は暗いヘテロクロマチンが豊富な丸い核を持つ楕円形あるいは多角形の細胞に沈着した(図3A)。過去の報告に一致して (Peters et al., The Neurons and Supporting Cells. 231-263, 1976)、ニューロン周囲オリゴデンドロサイトは大きな薄暗い核を持つニューロンに直接密着し、これらの接触部位に他の細胞要素が密着する余地を与えなかった(図3A-D)。強い密着は接触するニューロンに作られた長く曲がったあるいはくぼんだ印象から認識され(図3A)、また、狭い細胞内空間と二つの細胞膜の平行した配列からも確認された(図3C)。

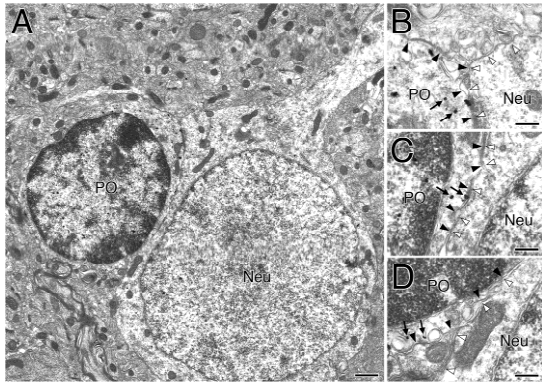


図3 成体マウス大脳皮質体性感覚野におけるGAMTの金コロイド銀増感免疫電顕。
A、ニューロン(Neu)の細胞体に強く密着しているGAMTを標識したニューロン周囲オリゴデンドロサイト(PO)の低倍免疫電顕像を示す。B-D、Aの高倍像を示す。黒矢頭と白矢頭はそれぞれ、ニューロン周囲オリゴデンドロサイト(PO)とニューロン(Neu)の細胞膜を示す。矢印はGAMTの金標粒子を示す。スケールバー: A, 100 μ m; B-D, 200nm。

(4) ニューロン周囲オリゴデンドロサイトは 大脳皮質の成熟とともに分化する

ニューロン周囲オリゴデンドロサイトとしての表現型分化の個体発生をP0からP21まで調べた。核周囲部のCNPとMAP2の発現は新生児期の
大脳皮質で非常に弱いため、ニューロン周囲オリゴデンドロサイトの標識としてCNPのかわりにGAMTを、ニューロンの核周囲部にMAP2免疫蛍光染色とともにNTGも使用した(図4A-D)。GAMT陽性細胞はP0とP7の大脳皮質です
すでに散在し、NTG/MAP2で標識されたニューロンに弱く接着していた(図4AとB)。P14とP21で、GAMT陽性細胞はしばしば成体期に観察されるものと同様に、NTG/MAP2で標識されたニューロンに特徴的なカーブを示して密着した(図4CとD)。したがって、ニューロン周囲オリゴデンドロサイトの細胞学的分化はおそらく大脳皮質の生後成熟とともに進むのだろう。

(5) ニューロン周囲オリゴデンドロサイトは 抑制性介在ニューロンよりもグルタミン酸作 動性ニューロンに優先的に付随する

グルタミン酸作動性ニューロンは皮質ニューロンの2/3を構成する主要なニューロンである。一方、GABA作動性抑制性介在ニューロンはその残りを構成する(Sloper et al., Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.,

285, 141-171, 1979; Gabbott & Somogyi, Exp. Brain Res., 61, 323-331, 1986)。最後に、ニューロン周囲オリゴデンドロサイトが付随する皮質ニューロンはどのタイプのニューロンかを調べた。P14と成体期のGAD67-GFPノックインマウスGFP、CNP、MAP2による三重免疫蛍光染色を行い、GFP-陽性GABA作動性ニューロンとGFP-陰性グルタミン酸作動性ニューロンを区別した(図4E-H)。

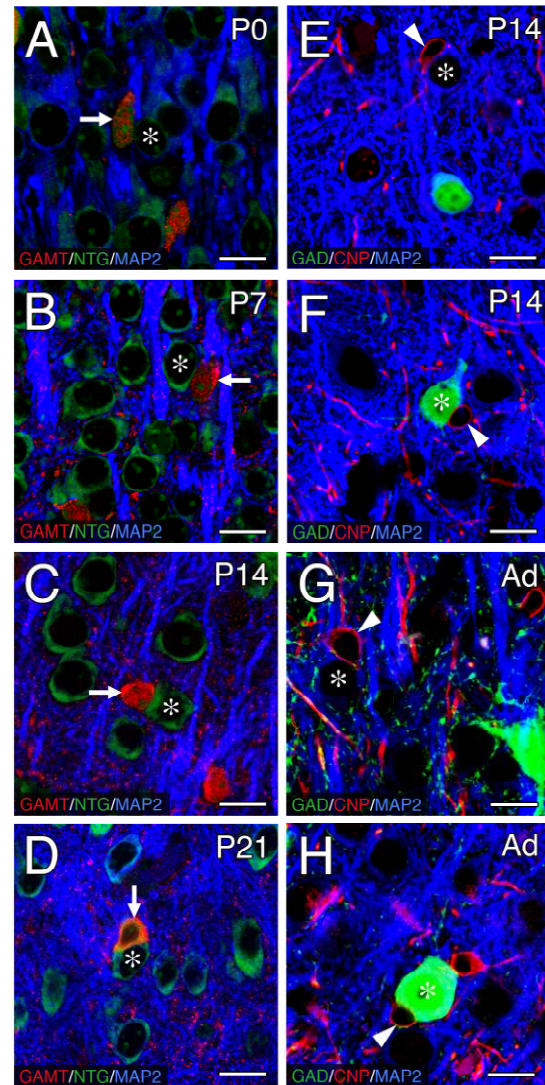


図4 ニューロン周囲オリゴデンドロサイトの生後分化(A-D)と主要な皮質ニューロンへの優先的
密着(E-H)。
A-D、P0(A)、P7(D)、P14(C)、P21(D)での大脳皮質のGAMT陽性ニューロン周囲オリゴデンドロサイト。切片はMAP2(青)、NTG(緑)、GAMT(赤)で免疫染色された。*はニューロン周囲オリゴデンドロサイトが密着した神経細胞体を示す。E-H、ニューロン周囲オリゴデンドロサイトはグルタミン酸作動性ニューロンに優先的に密着する。CNP(赤)、MAP2(青)、GFP(緑)の三重免疫蛍光染色はP14(EとF)と成体期(GとH)でGAD67-GFPマウスの大脳皮質で使用した。EとGで示されるように、GFP-陰性グルタミン酸作動性ニューロン(*)はしばしばニューロン周囲オリゴデンドロサイト(矢頭)に密着する。FとHは、GFP-陽性GABA作動性ニューロンがニューロン周囲オリゴデンドロサイトに密着するまれな例である。スケールバー: 10 μ m。

CNP-陽性ニューロン周囲オリゴデンドロサイトはしばしばGFP-陰性/MAP2-陽性グルタミ

ン酸作動性ニューロンに密着していた(図4EとG)。ニューロン周囲オリゴデンドロサイトに直接密着しているグルタミン酸作動性ニューロンの割合はP14で2.8%(2123のグルタミン酸作動性細胞に対して60)、成体期で3.6%(3265のグルタミン酸作動性細胞に対して119)であった。一方、ニューロン周囲オリゴデンドロサイトに密着しているGABA作動性ニューロンの割合はP14で0.27%(374のGABA作動性細胞に対して1)、成体期で0.80%(627のGABA作動性細胞に対して5)であった(図4FとH)。よって、ニューロン周囲オリゴデンドロサイトはGABA作動性皮質ニューロンよりも、むしろグルタミン酸作動性ニューロンに優先的に密着するサテライト細胞であることが判明した。

以上の(1)～(5)の結果をまとめると、大脳皮質体性感覚野でのニューロン周囲オリゴデンドロサイトは、ニューロンのエネルギー代謝や栄養に関わる分子の、GAMTやPhgdhを高率に発現していることがわかった。これに対して、興奮性ニューロンのシナプス伝達に関わる分子のGS、GLASTは中等度に発現、もしくは発現陰性であった。また、GABA作動性抑制性介在ニューロンよりも、グルタミン酸作動性ニューロンに対して優先的に付随していた。発達段階では、ニューロン周囲オリゴデンドロサイトは、P0から出現し、シナプスが成熟する、P14からP21にかけて、ニューロンの核周囲部に、より密着して存在するようになった。

大脳皮質体性感覚野のニューロン周囲オリゴデンドロサイトがエネルギー代謝や栄養に関わる分子を発現し、シナプス成熟期にニューロンの核周囲部に密着するようになることから、ニューロン周囲オリゴデンドロサイトは、口腔領域の主要なニューロンの成熟に伴って分化し、そのエネルギー代謝の支援に関わ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)

Takasaki C, Yamasaki M, Uchigashima M, Yanagawa Y, Konno K, Watanabe M: Cytochemical and cytological properties of perineuronal oligodendrocytes in the mouse cortex. *European Journal of Neuroscience*, 32, 2010, 1326-1336. (査読有)

[学会発表] (計2件)

① Takasaki C, Uchigashima M, Yamasaki M, Yanagawa Y, Watanabe M: Cytochemical and cytological properties of perineuronal oligodendrocytes in the mouse cortex. 7th FENS Forum of European Neuroscience, July 6, 2010, Amsterdam, Holland.

② 高崎千尋, 大島昇平, 岡田理恵子, 八若保孝: マウス大脳皮質体性感覚野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48回日本小児歯科学会大会, 2010年5月20日, 名古屋国際会議場(名古屋).

[図書] (計1件)

Miyazaki T, Takasaki C, Watanabe M, Springer Japan, Neural circuit development and plasticity shaped by glutamate transporters. In: *Molecular Imaging for Integrated Medical Therapy and Drug Development* (eds. Tamaki N, Kuge Y), 2009, 207-221.

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等
なし

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