

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22650071

研究課題名（和文） “生まれ”の機構を利用した線条体投射ニューロンサブタイプの分子・形態学的解析

研究課題名（英文） In vivo analyses of morphologies of distinct neuronal subtypes in the developing striatum by *in utero* electroporation-mediated gene transfer method

研究代表者

田辺 康人 (TANABE YASUTO)

大阪大学・生命機能研究科・准教授

研究者番号：10311309

研究成果の概要（和文）：線条体における striosome/matrix 構造を形成するそれぞれの線条体投射ニューロンサブタイプに対する選択的な分子・細胞レベルでの解析系を確立した。それぞれのサブタイプの産生時期が異なるといった生まれの機構の違いを利用して、それぞれの産生時期において電気穿孔法による遺伝子導入を行うことにより、それぞれが選択的に解析対象となりうることを見出した。更に、この遺伝子導入系を用いて striosome ニューロンの神経形態獲得過程を解析したところ、生後発達早期において striosome ニューロンは既に成熟した樹状突起形態を獲得していることを示した。

研究成果の概要（英文）：The acquisition of unique morphological characteristics by distinct neuronal subtypes underlies the development of neuronal network formation and brain functions. Medium spiny neurons (MSNs), that are principle projection neurons in the striatum, consist of several distinct neuronal subtypes, including the striosome and matrix MSNs that are generated from the lateral ganglionic eminence (LGE) during the protracted period of striatum development. Despite crucial roles played distinctively by the striosome and matrix MSNs in the control of motor and cognitive brain functions, how the striosome and matrix MSN acquire and maintain their characteristic features remains to be elucidated. Here, we established a system where we can selectively label either the striosome or matrix MSNs by employing *in utero* electroporation-mediated gene transfer methods. Previous works were not able to focus the analyses selectively on the striosome MSNs, because they comprise only less than 10~15% of total MSN population. Our system, in contrast, enabled us to analyze selectively the way striosome MSNs acquire their characteristic features during development, and revealed that they acquire the matured morphological features even at the early postnatal development of the striatum.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	0	1,500,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	420,000	3,320,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：分子神経生物学

## 1. 研究開始当初の背景

線条体は、脳機能の発現に中心的な役割を演じる中枢神経系の一領域であり、大脳皮質や視床との神経回路形成を通じて様々な脳機能の発現に重要な役割を果たす (Gerfen, 1992; Kawaguchi, 1997, Nambu, 2008)。線条体を中心とした皮質—線条体—視床—皮質をつなぐ神経回路は脳高次機能発現のプロセスにおいて核となる中心的な役割を担う神経ネットワークとして位置づけられている。また、線条体に対する海馬、扁桃体、中脳（黒質、腹側被蓋野）などからの入力に認知・記憶、情動、意志発現といった機能的側面から、皮質—線条体—視床—皮質をつなぐ神経回路に対して修飾的な作用を及ぼすことが知られている (Nambu, 2008)。一方、統合失調症・パーキンソン病・ハンチントン舞踏病などの多くの主要な精神・神経疾患においては、線条体を中心とした神経回路網の破綻が報告されている (Crittenden & Graybiel, 2011)。このように線条体を中心とした神経回路は脳機能発現の上で非常に重要な機能的役割を持ち、線条体の構築がどのように細胞・分子レベルでのメカニズムにより調節されているのかは非常に重要な問題であると位置づけられる。

線条体を構成する主要な神経細胞（9割以上を占める）は線条体投射ニューロンである。線条体投射ニューロンは投射先の違いから、線条体—黒質経路 (direct pathway) と線条体—淡蒼球経路 (indirect pathway) を構成するサブタイプに、一方、線条体投射ニューロンは striosome・matrix 区画から成るモザイク構造を形成することからそれぞれの区画を構成するサブタイプに分けられる (Graybiel, 1990, Gerfen, 1992)。また、過去の解剖学的・電気生理学的研究から線条体投射ニューロンは興味深い特徴的な神経形態（樹状突起の選択的な受容野形成、局所的に発達した軸索分枝形成など）を持つことが示されている (Kawaguchi et al., 1989)。さらに、線条体投射ニューロンと入力線維との間での形成されるシナプスには顕著な樹状突起ドメイン選択性があることも報告されている (Nakano et al., 2000)。個々の線条体投射ニューロンサブタイプにおいて示されるこのような特徴的な性質が線条体を中心とした神経回路形成の根本となるが、ど

のように発生・発達段階においてそれら個々の性質が獲得されるのかの理解は遅れている。これは、それぞれのサブタイプに選択的に解析の焦点を当てることが可能な方法論の開発が遅れていることが一つの原因であると考えることができる。

## 2. 研究の目的

本研究においては、線条体において特に特徴的なそのモザイク構造の構築過程に焦点を当て、モザイク構造を形成する striosome と matrix ニューロンの二つのサブタイプに着目した (Graybiel, 1990)。Striosome ニューロンは線条体において複数のパッチ状集合体を形成し、そのまわりを matrix ニューロンが取り囲むといった構造をとる。二つのサブタイプを構成するニューロンは産生時期が異なることが知られており、ラットにおいては胎生12~15日目において striosome ニューロンの産生が多く見られ、胎生17日目以降においては主に matrix ニューロンが産生されることが報告されている (van der Kooy and Fishell, 1987)。さらに、胎生期から生後発達期にかけて異なる時期に神経入力を受けはじめることも知られている (Nakamura et al., 2005)。このようにそれぞれのサブタイプの発生や神経入力の時期が異なるにもかかわらず、それら二つのサブタイプを区別することなく線条体投射ニューロンの発生・発達機構の研究が進められてきたことが、その理解を遅らせていた一つの原因として考えられる。さらに、線条体投射ニューロンを可視化し発生時期から継続的に時間軸に沿って *in vivo* で解析するための実験系や、それぞれのサブタイプ選択的に解析するための実験系が欠如していたことも一因にあると考えられる。

本研究においては、線条体投射ニューロンの神経形態獲得過程をサブタイプ選択的に解析する目的で、まず *in vivo* 電気穿孔法により蛍光タンパク質を発現させることで線条体投射ニューロンを可視化し単一細胞レベルで樹上突起形態解析をおこなうための遺伝子導入法を確立した。時期特異的な遺伝子導入を行う事で、生まれの早い striosome と生まれの遅い matrix を構成する線条体投射ニューロンをそれぞれいつ可視化するのかを明らかにした。次に、この遺伝子導入

系を用いて、striosome/matrix 構造を構成する線条体投射ニューロンに関して、サブタイプ選択的に個々の神経細胞形態を解析することを旨とした。

### 3. 研究の方法

マウス胎仔を用いた *in vivo* 電気穿孔法により線条体投射ニューロンが発生する外側基底核原基に遺伝子導入をおこない蛍光タンパク質によって標識された神経細胞を免疫抗体染色により同定し共焦点顕微鏡および NeuroLucida を組み合わせて神経形態（樹状突起）の定量的形態解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) 子宮内電気穿孔法を用いた外側基底核原基 (LGE) への遺伝子導入

線条体投射ニューロンの形態解析において、過去の研究においてはゴルジ染色や HRP 染色といった解剖学的な手法もしくはウイルスを用いた染色が用いられてきた。このような方法においては、個々の細胞形態について詳細な解析を進めることが可能であるが、線条体におけるサブタイプ選択的な解析は困難であった。本研究において用いた子宮内電気穿孔法は、マウス母体の胎仔に対して *in vivo* で遺伝子導入を行う方法として様々な中枢神経系の領域において広く用いられてきた。子宮内電気穿孔法を用いる利点として、*in vivo* で神経細胞の発生発達過程を解析できること、さらに部位や生まれの時期を選択して遺伝子を導入できることから解析対象とする細胞の母集団を限定できること、そして従来の方法に比べて簡便であることが挙げられる。また、将来的には複数の遺伝子を同時に導入することにより、発現タンパク質や入力に関する機能的な解析も進めることができると思われる。

今回、外側基底核原基に対して遺伝子導入を行うために、これまでにも報告されている内側基底核原基（胎生 12.5 日目）に対する電気穿孔法を用いた遺伝子導入の実験条件を参考に、外側基底核原基に対する電気穿孔法による遺伝子導入を試みた。まず、電極の位置や胎仔に対する相対的角度を様々に変えて高感度緑色蛍光蛋白質 (EGFP) をコードしている遺伝子を導入し、数日後に蛍光標識される遺伝子導入娘細胞を解析した。電気穿孔を施したマウス胎仔は正常に成長するこ

とが確認された。解析の結果、大脳皮質外側部、皮質-皮質下領域境界部

(pallial-subpallial border ; PSB)、外側基底核原基、内側基底核原基、中隔にいたるまで、それぞれの条件に依存して様々な皮質-皮質下領域に導入されてしまうことが観察された。電極の角度や電気穿孔の条件（電圧、パルス間隔等）を変えて何度か試みた結果（表 1）、比較的効率よく外側基底核原基に遺伝子を導入することができ、線条体において多くの細胞が標識された。しかしながら、線条体には線条体投射ニューロンの他に、MGE において産生される線条体介在ニューロンや移動途中の大脳皮質 GABA 作動性介在ニューロンが存在することが知られている (Marin et al., 2000, Wichterle et al., 2001)。LGE に対する電気穿孔法によって近接する MGE に対しても同時に遺伝子が導入される場合があるため、線条体領域で観察された蛍光タンパク質による標識細胞は MGE 由来の各種介在ニューロンを含む可能性が考えられる。そこで、このような可能性を検証するために、胎生 11.5 日目に遺伝子導入し、細胞体配置をほぼ終わると考えられる胎生 18.5 日目において線条体投射ニューロンのマーカーである CTIP2 (CoupTFI-interacting protein *typ2*) に対する免疫染色を行った。CTIP2 は線条体においては線条体投射ニューロンに発現され、他の介在ニューロンにおいては発現されないことが知られている (Arlotta et al., 2008)。定量的な解析の結果、標識細胞の  $91.3 \pm 2.0\%$  ( $n=208$  cells in 3 embryos) が CTIP2 陽性の線条体投射ニューロンであった。

	電圧	パルス (ミリ秒)	パルス間隔 (ミリ秒)	回数
胎生 10.5 日	25	50	950	5
胎生 11.5 日	25	50	950	5
胎生 13.5 日	40	50	950	5

表 1: 各 age における電気穿孔法の条件

(2) 子宮内電気穿孔法を用いた時期特異的な遺伝子導入による striosome/matrix 選択

## 的な遺伝子導入

上記の実験方法において、電気穿孔法の特徴である生まれの時期を選択して遺伝子導入できることを利用し、線条体投射ニューロンのうち比較的産生時期の早い striosome ニューロンと比較的産生時期の遅い matrix ニューロンを選択的に解析することを試みた。

線条体投射ニューロンの発生の比較的早い時期である胎生 10.5 日目、11.5 日目および比較的遅い時期である胎生 13.5 日目のマウス胎仔に EGFP 遺伝子を導入した。その後線条体を構成する神経細胞の細胞体移動・配置がほぼ終了していると考えられる胎生 18.5 日目以降において解析を行った。線条体の発生・発達期において DARPP32 (dopamine-and adenosine3' :5' -monophosphate-regulated phosphoprotein-32000) は、striosome ニューロンに発現されていることが知られている (Foster et al., 1987)。そこで、固定した標本において DARPP32 の発現パターンと EGFP による標識細胞とを比較した (図 1)。その結果、胎生 10.5 日目において遺伝子導入を行った場合には多くの EGFP 陽性細胞が局所的に集積し、DARPP32 陽性であった (図 1 A-F)。また、胎生 11.5 日目の場合には集積した構造をとり DARPP32 陽性の細胞と、その周りに位置し DARPP32 を発現していない細胞も観察された (図 1 G-L)。そして、胎生 13.5 日目の場合には、多くの細胞が集積する分布は示さず、DARPP32 陰性であることが観察された (図 1 M-R)。この結果を受け、実際に標識細胞のうちどれだけが DARPP32 陽性の striosome ニューロンであるかを調べた。上記の実験において用いた EGFP では、神経細胞の樹状突起や軸索まで標識されてしまうため、細胞数を数えることや、DARPP32 との重なりを判断することが難しいことから、核移行型赤色蛍光タンパク質である H2B mCherry を導入したサンプルにおいて定量解析を行った。その結果、胎生 11.5 日目に遺伝子導入した場合には線条体において H2B mCherry で標識された細胞のうち  $42.6 \pm 2.9\%$  ( $n=203$  cells in 3 embryos) が DARPP32 陽性であり、胎生 13.5 日目の場合はその割合は  $8.2 \pm 1.6\%$  ( $n=493$  cells in 4 embryos) だけであった。

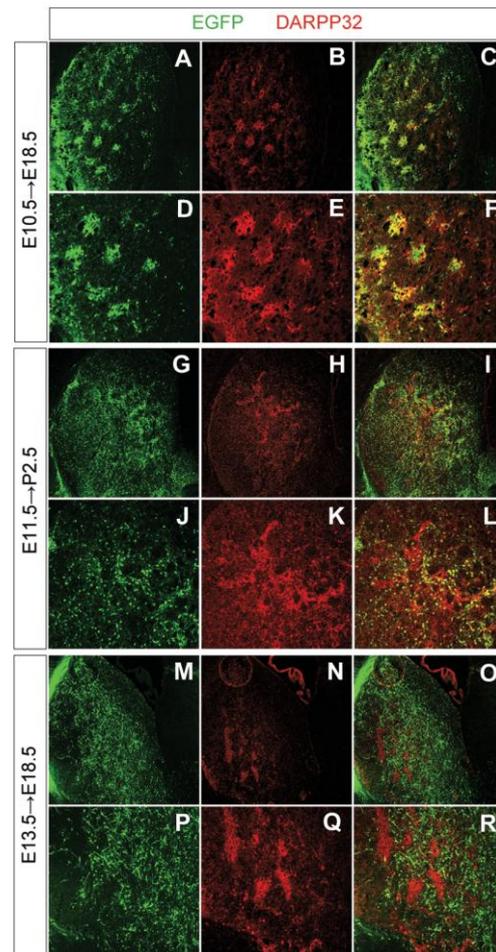


図 1: 電気穿孔法を用いた striosome/matrix 構成細胞の選択的標識

(3) cre-loxp system を用いた striosome ニューロンの単一細胞レベルでの形態解析  
以上のような電気穿孔法を用いた遺伝子導入により、striosome/matrix を構成する細胞を比較的選択的に解析することが可能になったといえる。しかしながら上記の方法では細胞が蜜に重なりあって標識されるため、単一細胞レベルでの神経形態を解析することは難しい。そこで、細胞を疎に標識できるようにするために、cre-loxP system を用いた。Cre-loxP system とは、DNA 組み換え酵素である Cre とその認識配列である loxP 配列を用いたもので、loxP 配列の下流に位置する任意の遺伝子の発現を誘導することができる。この系において、ドライバーである Cre に比べ、レスポンス遺伝子を過剰に導入することにより、蛍光強度を保ったまま、細胞を疎に染めることができることが、中枢神経

系の他の領域における実験で報告されている。今回、ドライバー遺伝子として Cre (pCAG-nls -Cre) と、レスポナー遺伝子として loxP 配列の下流に EGFP を組み込んだ EGFP 発現ベクター (PCALNL-EGFP) を同時に、胎生 11.5 日のマウスの LGE に遺伝子導入し、striosome/matrix 区画構造ができあがる生後 0 日目の striosome 細胞の形態に関して実際に解析をおこなった。EGFP で標識され、かつ DARPP32 陽性である細胞を解析対象として、neuroLucida を使用した定量的な形態解析をおこなった。その結果、striosome 細胞は生後発達期の早い段階においてすでに複雑な形態を示すこと、細胞体・樹状突起・枝分かれの数といった指標に関して NeuroLucida を用いた定量解析を行った結果、生後 0 日において既に成熟形態にちかい数値を示すということが示唆された (図 2)

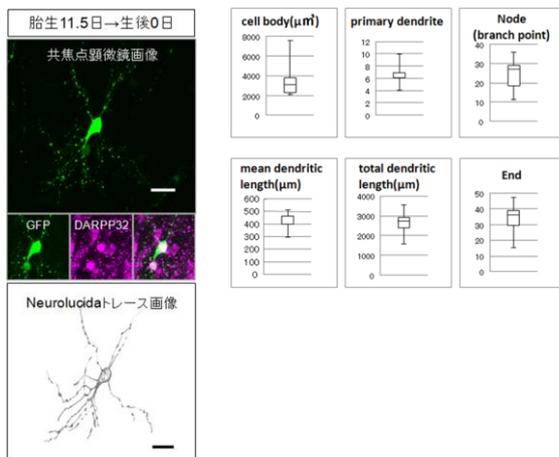


図 2 : NeuroLucida を用いた striosome 選択的な遺伝子導入による神経形態の定量的解析

## 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)

[学会発表] (計 1 件)

Kazuya Hagimoto, Saki Takami, Makio Torigoe, Fujio Murakami and Yasuto Tanabe, Distinct developmental features exhibited by the early- and late-generated striatal medium spiny neurons in the striosome/matrix compartmentalization, The 33rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2011. 9. 16, Yokohama, JAPAN

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

田辺 康人 (TANABE YASUTO)

大阪大学・生命機能研究科・准教授

研究者番号：10311309

(2) 研究分担者  
無し

(3) 連携研究者  
無し