

## 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 25年 5月 31日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22700450

研究課題名（和文）サル大脳皮質初代培養神経ネットワークの確立

研究課題名（英文）The properties of primary cultured cortical neuronal networks from fetal cynomolgus monkeys

研究代表者

安本 史恵（YASUMOTO FUMIE）

富山大学・人間発達科学部・准教授

研究者番号：00455461

研究成果の概要（和文）：

高次脳機能関連遺伝子には、ヒトとサル類といった霊長類間でのみ、相同な遺伝子の配列類似性が高い遺伝子が存在する。そのような遺伝子の機能を解明するために、RNAi 法などの遺伝子発現制御技術が適用可能な、カニクイザル初代培養神経系を作成した。あわせて本実験系においては、げっ歯類の初代培養系と比較して神経ネットワークの発達が遅い傾向を見出し、神経突起の本数が少ないことが要因の一つである可能性を示した。神経細胞の一次突起の本数と含有する神経伝達物質の種類について、特に高次脳機能発現と密接に関連するとされる抑制性神経細胞について分類し、本実験系の特性を提示した。

研究成果の概要（英文）：

Nonhuman primates are useful models for the understanding of human brain development. In this study, I have established a primary culture of cortical neuronal cells from fetal cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) and focused on various morphological characteristics of the cells, particularly the gamma-aminobutyric acid (GABA)ergic neurons that significantly contribute to primate brain function.

The neurons that were prepared from the cerebral cortex of cynomolgus monkey fetuses at embryonic day 80 were immunocytochemically classified using several molecular markers of GABAergic neurons until two weeks *in vitro*. The number of glutamic acid decarboxylase (GAD)-65-positive neurons increased with time, suggesting the maturation of GABAergic neurons *in vitro*. Approximately 30% of calretinin-positive neurons at four days *in vitro* had three or more primary neurites and tended to have larger cell bodies, while most microtubule-associated protein (MAP)-2-positive neurons had one or two primary neurites and smaller cell bodies.

These results may be informative for the application of molecular biological techniques in exploring the development of cortical interneurons in primates.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：脳・神経、霊長類

1. 研究開始当初の背景

ヒトの高次脳機能に関連する遺伝子の中には、神経科学の研究において広く利用されている実験動物、げっ歯類の相同な遺伝子との間に配列類似性の低いものが存在する。近年、RNAi法などの遺伝子発現を制御する技術の発達に伴い、対象とした遺伝子の機能によってどのように神経細胞が変化するかという観点で多くの成果が得られているが、ヒトと実験動物の間で配列類似性の低い相同な遺伝子に着目する場合、げっ歯類の神経細胞を用いた従来の方法では解明が難しい可能性がある。

この問題の解決に向けたツール作りとして、これまでにわたしはヒトとDNAの塩基配列類似性が高いカニクイザルから大脳皮質由来初代培養神経系を作成することを試みた。ところが、そのカニクイザル初代培養神経系においては、げっ歯類の初代培養系と比較して、神経ネットワークが形成不全となる、もしくは発達に時間がかかる傾向が認められた。

2. 研究の目的

カニクイザル初代培養神経系でネットワーク形成不全となる要因を探る。

上記のように、カニクイザル初代培養神経系は高次脳機能に関連する遺伝子の解明に向けた有用なツールとなり得ると考えられるが、その際に本モデルにおいて、神経細胞の重要な特性である、ネットワークを介した神経伝達が評価できるか否かは、今後本モデル系を幅広いユーザーに利用してもらうための大きな要件となる。

カニクイザル初代培養神経系において神経ネットワークが形成不全もしくは発達遅延し、神経伝達が不十分となり得る要因は何

かを解析し、本実験系の将来的な応用につなげる。

3. 研究の方法

胎齢80日のカニクイザルの大脳皮質より初代培養神経系細胞を得る。

神経ネットワーク形成途上の神経細胞の形態を、複数のパラメータ（一次突起の数・二次突起の数、ブランチングポイントの数、突起の長さ、細胞体のサイズ、核のサイズ、培養日数に伴う突起伸展等発達度合の相違など）を用いて定量的に解析する。また免疫細胞化学の手法を用いて、たとえばどのような神経伝達物質を有する神経細胞の形態的特徴であるのかをあわせて検討し、機能的意味付けを行う。

4. 研究成果

進化的に高等な実験動物、カニクイザルの脳より神経系細胞を採取し、初代培養することに成功した。また、その初代培養系において、MAP-2陽性の神経細胞のうちに多様な形態（神経突起の数・細胞体のサイズ・核のサイズ）を確認した。

カニクイザル大脳皮質由来初代培養神経細胞は、マウスやラットにおける初代培養神経細胞と比較して、概して神経突起（一次突起）の本数が少なく、たとえば培養4日目においては平均して2本程度であった。このことがカニクイザル大脳皮質由来初代培養神経ネットワークの発達を遅らせる要因の一つであるかもしれないと考え、より詳細に形態的特徴を解析した。

その結果、MAP2陽性の神経細胞全体の一次突起は上述の通り平均すると2本程度であるのに対し、MAP2陽性神経細胞の中に少数ではあるが、一次突起の本数が4～6本に及ぶ

ものが散見された。またこれらの一次突起の本数が多い神経細胞の細胞体は、本数の少ない細胞体に比して体積が大きい傾向が見受けられた。このことは本実験系における個々の神経細胞のうちに、発火頻度などとも関連する形質において不均一性が存在することを意味する。そこで、それぞれの神経細胞の形態と、含有する神経伝達物質の種類などの性質を組み合わせることを試みた。

大脳皮質の神経細胞は、グルタミン酸作動性神経細胞を主体とした興奮性神経細胞とGABA作動性神経細胞を主体とした将来的な抑制性神経細胞に大別できる。それらの神経細胞のうち特に抑制性神経細胞は、全体に占める数的割合は低いものの、脳の体積が急速に拡大したサルやヒトといった霊長類の脳特有の高次脳機能発現と密接に関連することが知られている。このため、特に抑制性神経細胞に注目して解析を行った。

免疫細胞化学的手法によりGABA作動性神経細胞の同定を行った(図1)。GABA作動性神経細胞のマーカであるGAD65に陽性となる神経細胞は培養日数に伴って増加し、将来的な抑制性神経ネットワークの成熟を示した。

さらに、平均本数より優位に多い一次突起を有する神経細胞が、GABA作動性神経細胞のサブタイプであるカルレチニン陽性神経細胞に見られることを解明した(図2)。培養4日目においては、約30%のカルレチニン陽性神経細胞が3本以上の一次突起を有した。このことは、概して神経突起の本数の少ないカニクイザル神経ネットワークにおいて、カルレチニン陽性神経細胞が相対的に重要な役割を果たす可能性があることを示唆する。

(Asian Pacific Society for Neurochemistry, Japanese Society for Neurochemistry, 2012にて報告)

カニクイザル大脳皮質由来初代培養神経系は、霊長類間でのみ高い配列類似性を有する遺伝子の機能を検索する場合などに有用であると考えられるが、形態的な特徴といった本実験系の特性をあらかじめ明確にしておくことは、今後、本実験系を活用して応用研究を行うユーザーに対して重要な情報となると考えられる。総じて、本研究成果は、今後の高次脳機能研究や精神疾患研究に対して有用な基盤となることが期待される。

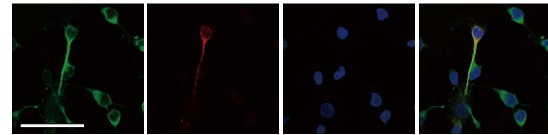
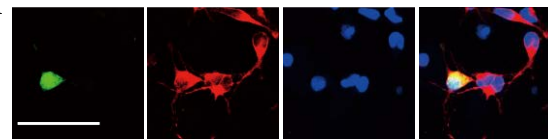


図1

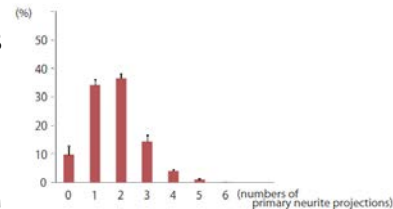
(写真左から)

- ・サル脳由来初代培養神経細胞 (MAP2 陽性神経細胞、神経細胞全般を意味する) (緑)
  - ・その中における GABA 作動性神経細胞 (赤)
  - ・全ての細胞の核染色 (青)
  - ・左の3枚の写真の重ね合わせ像
- スケールバー; 50 $\mu$ m

A



B



C

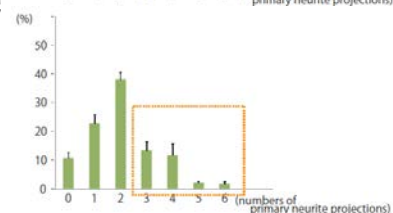


図2

A:

(写真左から)

- ・カルレチニン陽性神経細胞 (緑)
  - ・MAP2 陽性神経細胞 (神経細胞全般) (赤)
  - ・全ての細胞の核染色 (青)
  - ・左の3枚の写真の重ね合わせ像
- スケールバー; 50 $\mu$ m

B:

MAP2 陽性神経細胞の一次突起の本数のヒストグラム

C:

カルレチニン陽性神経細胞の一次突起の本数のヒストグラム

カルレチニン陽性神経細胞の一次突起の本数は神経細胞全般の一次突起と比較して有意に多い。

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)

Chi ZL, Yasumoto F, Sergeev Y, Minami M, Obazawa M, Kimura I, Takada Y, Iwata T. Mutant WDR36 directly affects axon growth of retinal ganglion cells leading to progressive retinal degeneration in mice 2010.7 vol.19(19):pp3806-3815. Human Molecular Genetics DOI: 10.1093/hmg/ddq299. 査読有

[学会発表] (計2件)

Yasumoto F, Takamura Y, Nishijo H, Negishi T. The morphological analysis of primary cultured monkey cortical interneurons The 11th Biennial Meeting of the Asian Pacific Society for Neurochemistry, The 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry 2012.9.30 Kobe

安本史恵

サル大脳皮質初代培養神経系細胞を利用してできること  
第38回北陸実験動物研究会  
2010.10.2  
富山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安本 史恵 (YASUMOTO FUMIE)  
富山大学・人間発達科学部・准教授  
研究者番号：00455461

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：