

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：13401
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2011～2012
課題番号：23659092
研究課題名（和文）人工誘導型神経細胞と脳内神経細胞の直接分化転換による難治疾患治療への新展開
研究課題名（英文）Experimental approach for direct transformation of GABAergic neurons
研究代表者 佐藤 真（SATO MAKOTO） 福井大学・医学部・教授 研究者番号：10222019

## 研究成果の概要（和文）：

- (1) Ptf1a を導入した細胞は GABA 作動性ニューロンに特徴的な接線方向への移動様式を示した。
- (2) Ptf1a を胎児の大脳皮質に導入してもグルタミン酸作動性ニューロンから GABA 作動性ニューロンへの転換は観察できなかった。
- (3) Ptf1a を導入した細胞をセルソーターで回収し、RNA を抽出後にマイクロアレー解析を進めた。その結果、Ptf1a により誘導されると遺伝子を数種同定した。

## 研究成果の概要（英文）：

- (1) Cortical neurons that had been transfected with Ptf1a expressing vector migrated tangentially into the cortex, of which migratory behavior is typical for GABAergic neurons.
- (2) Ptf1a expression did not result in transformation of glutamatergic neurons into GABAergic neurons; no specific GABAergic neuronal markers were newly expressed in glutamatergic neurons by Ptf1a expression.
- (3) We collected RNAs from Ptf1a expressed neurons and searched for any Ptf1a-induced genes, then we identified several candidate genes.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：解剖学、分化、細胞・組織、神経科学

## 1. 研究開始当初の背景

大脳皮質には多様な GABA 作動性ニューロンが存在するが、その GABA 作動性ニューロンの分化の分子機構は近年、急速に解明が進みつつある。一方、形成期の大脳皮質において、転写因子 Ptf1a (Pancreas specific transcription factor 1a) を、強制的に発現させることで、グルタミン酸作動性ニューロンを GABA 作動性ニューロンに変えうるこ

も報告されている (Hoshino et al. Neuron 47: 201; 2005)。ただし、Ptf1a は、大脳皮質外においてのみ発現し、本来大脳皮質内で働くものではなく、その点で、この研究は正常発生でこのような転換が生じうることを示したものではない。しかしながら、グルタミン酸作動性ニューロンに GABA 作動性ニューロンに変化するポテンシャルがあることを示した点で画期的と考えられた。げっ歯類

の大脳皮質では、大脳皮質脳室帯・脳室下帯にて発生・分化したグルタミン酸作動性ニューロンが法線方向に移動し (radial migration)、大脳皮質外で生まれた GABA 作動性ニューロンが皮質表面に平行に移入し形成されることはよく知られている。研究代表者は、従来より radial migration に係る分子・細胞機構とその破綻に伴う疾患を研究対象としてきた (Nagano et al., Nature Cell Biol., 2002。また、共同研究にて、Yamada et al., Nature Med., 2009 など)。その過程で上記の転写因子発現により、radial migration を行う神経細胞がその向きを変え、GABA 作動性ニューロンに特徴的な移動様式を示すことを見出してきた。同時にこの疾患に特徴的な難治性てんかんの原因を探る過程で、グルタミン酸作動性ニューロンの偏在によるてんかん発生の可能性とその治療法の開発を探ってきた。

## 2. 研究の目的

本研究では、

(1) グルタミン酸作動性ニューロンを、脳内で GABA 作動性ニューロンに再分化させるプロトコルを開発することを目指す。(2) 上記成果が得られた暁には、難治性てんかんのうち、グルタミン酸作動性ニューロンの偏在・過興奮が原因と考えられる一群の疾患治療に応用し、てんかん原性となっているグルタミン酸作動性ニューロン群を GABA 作動性に変化させることを目指す。

このことで、過興奮を制御しひいては難治性てんかんの根本的治療を開発することが期待される。ただし、本研究は挑戦的萌芽研究であり、(2) は可能であれば進めることとする。

## 3. 研究の方法

(1) グルタミン酸作動性ニューロンを GABA 作動性に変化させる Ptf1a により作製した GABA 作動性ニューロンの性質の解析を進める。

(2) Ptf1a 以外の因子が同様の効果、すなわちグルタミン酸作動性ニューロンから GABA 作動性ニューロンへの転換をもたらすか検討する。

(3) 上記結果が得られた暁には、成体脳への遺伝子導入により、GABA 作動性ニューロンへの転換を in vivo にて図る。

(4) 脳形成の異常による (グルタミン酸作動性ニューロンの過度の集積による) てんかんを発生するモデル動物に対して、脳内遺伝子導入により、てんかん原生部位のグルタミン酸作動性ニューロンを GABA 作動性ニューロンに変え、治療への展開を図る。

## 4. 研究成果

以下に研究成果を記す。

(1) Ptf1a を導入した細胞は GABA 作動性ニューロンに特徴的な接線方向への移動様式を示した。

子宮内遺伝子導入法により、マウス胎児大脳皮質脳室帯の神経細胞 (将来の興奮性神経細胞) に Ptf1a 遺伝子を導入した。通常であれば、radial migration の様式により法線方向に移動するが、一部 GABA 細胞と同様に接線方向に移動する細胞を見出した。

(2) Ptf1a を胎児の大脳皮質に導入してもグルタミン酸作動性ニューロンから GABA 作動性ニューロンへの転換は観察できなかった。

上記 (1) により、移動様式を変えた細胞が GABA 作動性であるか検討するため、GABA 作動性細胞のマーカーである GAD67 を発現すれば蛍光を発するようになる GAD67-GFP マウスを導入し、Ptf1a 遺伝子発現細胞が GFP 蛍光の有無により、グルタミン酸作動性から GABA 作動性への形質転換の評価を試みた。しかしながら、想定とは異なり、移動様式は変えても、蛍光は発せず、形質転換と移動様式の制御は異なるものと考えられた。

(3) Ptf1a を導入した細胞をセルソーターで回収し、RNA を抽出後にマイクロアレイ解析を進めた。その結果、Ptf1a により誘導されると遺伝子を数種同定した。

上記 (2) で想定外の結果を得たので、Ptf1a 遺伝子の制御がどのような遺伝子群に及んでいるのかをまず明らかにする必要があると考え、それら遺伝子群の探索を行い、幾つかの特徴的な遺伝子の同定に至った。

当初の想定とは異なる結果となったが、得られた遺伝子群は特徴的な細胞移動様式を制御するものとして、全く新たな視点を提供する。そのような観点での遺伝子群の探索・解析は行われておらず、別の観点ではあるが、全く新たな知見が得られた点で十分な成果が得られたと考えている。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Xie, M.-J., Yagi, H., Kuroda, K., Wang C.-C., Komada, M., Zhao, H., Sakakibara, A., Miyata, T., Nagata, K., Oka, Y., Iguchi, T. and Sato, M. WAVE2-Abi2 complex controls growth cone activity and regulates the multipolar-bipolar transition as well as the initiation of glia-guided migration. *Cerebral Cortex* 23(6):1410-1423 doi: 10.1093/cercor/bhs123. (2013) (査読有).
- ② Toba, S., Tamura, Y., Kumamoto, K., Yamada, M., Takao, K., Hattori, S., Miyakawa, T., Kataoka, Y., Azuma, M.,

- Hayasaka, K., Amamoto, M., Tominaga, K., Wynshaw-Boris, A., Wanibuchi, H., Oka, Y., Sato, M., Kato, M. and Hirotsune, S. Post-natal treatment by a blood-brain-barrier permeable calpain inhibitor, SNJ1945 rescued defective neuronal migration and neuronal circuit formation in lissencephaly. *Sci. Rep.* 3:1224. doi: 10.1038/srep01224. (2013) (査読有).
- ③ Kosaka, H., Munesue, T., Ishitobi, M., Asano, M., Omori, M., Sato, M., Tomoda, A. and Wada, Y. Long-term oxytocin administration improves social behaviors in a girl with autistic disorder. (case report) *BMC Psychiatry* 12(1):110. (2012) (査読有).
- ④ Takitoh, T., Kumamoto, K., Wang C.-C., Sato, M., Toba, S., Wynshaw-Boris, A. and Hirotsune, S. Activation of Aurora-A is essential for neuronal migration via modulation of microtubule organization. *J. Neurosci.* 32(32):11050-11066. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5664-11.2012 (2012) (査読有).
- ⑤ Omata, N., Murata, T., Narita, K., Maruoka, N., Mitsuya, H., Mita, K., Nishimoto, T., Sato, M. and Wada, Y. Effects of antidepressants and mood stabilizers on serum levels of adiponectin. *NeuroEndocrinol. Lett.* 33(1):1-2. (2012) (査読有).
- ⑥ Komada, M., Asai, Y., Morii, M., Matsuki, M., Sato, M. and Nagao, T. Maternal bisphenol A oral dosing relates to the acceleration of neurogenesis in the developing neocortex of mouse fetuses. *Toxicology.* 16;295(1-3):31-8, doi: 10.1016/j.tox.2012.02.0132012. (2012) (査読有).
- ⑦ Iguchi, T., Yagi, H., Wang, CC. and Sato, M. A tightly controlled conditional knockdown system using the tol2 transposon-mediated technique. *PLoS ONE* 7(3):e33380, doi: 10.1371/journal.pone.0033380. (2012) (査読有).
- ⑧ Urano, T., Shiraki, M., Yagi, H., Ito, M., Sasaki, N., Sato, M., Ouchi, Y. and Inoue, S. GPR98/Gpr98 Gene Is Involved in the Regulation of Human and Mouse Bone Mineral Density. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97(4):E565-74. doi: 10.1210/jc.2011-2393. (2012) (査読有).
- ⑨ 黒田一樹, 佐藤 真: iPS 細胞研究とその周辺技術、「特集 I 神経系における iPS 細胞 (iPS 細胞の活用も含めた神経機能修復の現状と将来)」: 脳 21 Vol.14 №3. 金芳堂, 30(234)-34(238), 2011 年 7 月.
- [学会発表] (計 27 件)
- ① 岡 雄一郎, 猪口徳一, 佐藤 真: マウス大脳皮質長連合ニューロン軸索の可視化の試み. ポスター (3P-G011) 第 118 回日本解剖学会全国学術集会, 2013 年 3 月 30 日, 高松市.
- ② 黒田一樹, 謝 敏カク, 猪口徳一, 岡 雄一郎, 尾身 実, 王 振吉, 八木秀司, 佐藤 真: 神経細胞の棘突起 (スパイン) 形成における FILIP 関連分子の機能解析. ポスター (3P-G020) 第 118 回日本解剖学会全国学術集会, 2013 年 3 月 30 日, 高松市.
- ③ 八木秀司, 野口光一, 佐藤 真: 非筋肉型ミオシン分子の細胞内局在を調節する新たな機構. ポスター (1P-G054) 第 118 回日本解剖学会全国学術集会, 2013 年 3 月 28 日, 高松市.
- ④ Yagi, H., Kuroda, K., Xie, M.-J., Ikeda, H., Iguchi, T., Komada, M., Murase K., Okabe M., Noguchi, K. and Sato, M. : Filip is involved in the morphological control of dendritic spine through actomyosin regulation. ポスター (636.11/B30) Society For Neuroscience 2012, 2012 年 10 月 16 日, ニューオリンズ (U.S.A) .
- ⑤ Wang, C.-C., Kuroda, K., Xie, M.-J., Oka, Y., Iguchi, T., Matsuyama, T., and Sato, M. A2-pancortins especially Pancortin-4, are involved in the neuronal cell death after the ischemic stroke during the growth period. ポスター (P02-1) The 11<sup>th</sup> Biennial Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry / 55<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, 2012 年 9 月 30 日, 神戸.
- ⑥ Iguchi, T., Oka, Y., Kuroda, K., Wang, C.-C., Xie, M.-J., Yagi, H., and Sato, M. Analyses on the potential candidates of collateral branch inducing factor that are specifically expressed in the targets of axon collaterals from the corticospinal projection. ポスター (P01-14) The 11<sup>th</sup> Biennial Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry / 55<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, 2012 年 9 月 29 日, 神戸.
- ⑦ Kuroda, K., Yagi, H., Xie, M.-J., Oka, Y., Iguchi, T., and Sato, M. FILIP-related molecule controls spine maturation in the hippocampal neuron via non-muscle myosin IIb. ポスター (P01-36) The 11<sup>th</sup> Biennial Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry / 55<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, 2012 年 9 月 29 日, 神戸.
- ⑧ 岡 雄一郎, 猪口徳一, 佐藤 真: マウ

ス大脳皮質長連合ニューロン特異的遺伝子の同定. ポスター (P2-c13) 第 35 回日本神経科学大会, 2012 年 9 月 19 日, 名古屋.

- ⑨ 八木秀司, 黒田一樹, 謝 敏カク, 永野隆, 池田 弘, 猪口徳一, 村瀬一之, 岡部 勝, 佐藤 真: FILIP によるアクチンミオシン調節能の棘突起動態変化への関与. ポスター (P2-f22) 第 35 回日本神経科学大会, 2012 年 9 月 19 日, 名古屋.
- ⑩ 謝 敏カク, 八木秀司, 黒田一樹, 王 振吉, 駒田致和, 岡 雄一郎, 猪口徳一, 佐藤 真: WAVE-Abi2 複合体は radial migration 時の成長円錐の活性化および multipolar-bipolar transition と glia-guided migration の開始を制御する. ポスター (P4-d05) 第 35 回日本神経科学大会, 2012 年 9 月 21 日, 名古屋.
- ⑪ 佐藤 真: 大脳皮質形成とスパイン形成の新たな共通分子基盤とその展開. シンポジウム (S19-3) 「神経発生・形成における細胞骨格の意義」第 117 回日本解剖学会全国学術集会, 2012 年 3 月 28 日, 甲府市.
- ⑫ 佐藤 真: Molecular aspects shared by the cortical development and the spine formation, and their potential involvement in the network remodeling. AACL -2011 (Asian Aging Core for Longevity) 長崎シンポジウム Japan-Korea Joint Conference on Brain Aging and Neurodegeneration 2011 年 11 月 21 日, 長崎.
- ⑬ Xie, M.-J., Yagi, H., Kuroda, K., Wang C.-C., Komada, M., Iguchi, T. and Sato, M.: Dendritic growth cone activities, regulated by Abl kinase and Cdk5 via WAVE2-Abi2, are essential for completing multipolar-bipolar transition and starting glia-guided locomotion. ポスター (A4 540.04) Society For Neuroscience 2011, 2011 年 11 月 15 日, ワシントン (U.S.A).
- ⑭ 佐藤 真: dendritic growth cone activity regulated by Abl kinase and Cdk5 via WAVE2-Abi2 is essential for completing the multipolar-bipolar transition and initiating glia-guided locomotion. シンポジウム (S06-2) 「神経形態制御から機能へ-スペーシャルセルバイオロジーの観点から」第 54 回日本神経化学学会大会, 2011 年 9 月 27 日, 石川県山代.

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.u-fukui.ac.jp/KAIBOU2/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤 真 (SATO MAKOTO)  
福井大学・医学部・教授  
研究者番号: 10222019

### (2) 研究分担者

黒田 一樹 (KURODA KAZUKI)  
福井大学・医学部・助教  
研究者番号: 60557966  
駒田 致和 (KOMADA MUNEKAZU)  
愛知学院大学・歯学部・助教  
研究者番号: 90523994