

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24650176

研究課題名(和文) 線条体モザイク構造構築の力学的特性

研究課題名(英文) Striosome and matrix cell migration during mosaic formation in the developing striatum

研究代表者

田辺 康人 (Tanabe, Yasuto)

京都大学・医学(系)研究科・研究員

研究者番号：10311309

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：線条体を特徴づけるモザイク構造形成の調節機構を明らかにするため、striosome/matrix細胞(S/M細胞)の細胞移動・分布を前方視的に解析した。モザイク構造形成初期ではS細胞は既に静止状態だが互いに神経突起を介して接近し集合体を形成する。一方、M細胞は活発な多方向性の細胞移動を示す。これはM細胞が細胞移動を通じてS細胞と混和するその様式により、Sの数、分布、位置が決定される調節機構の存在を示唆した。(2)後期過程になりM細胞はS集合体に対して反発性を示した。これにより、2種の異なる細胞集団がお互いに分離され均一な細胞集団をそれぞれ形成しモザイク構造構築につながると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Our analyses revealed that, at the initial stages of striosome/matrix mosaic formation, striosome cells were mostly stationary whereas matrix cells were actively migrating in multi-directions. Despite their restricted migratory capability, striosome cells formed patchy clusters through their mutual homophilic interactions, mediated apparently by their intertwined extended processes. Actively migrating matrix cells, on the other hand, occupied the space in between striosome cells, suggesting that the way actively migrating matrix cells intermingle with mostly stationary striosome cells may determine the size, number and position of patchy clusters of striosome cells within the striatum. Our results also revealed that, at late-embryonic stages, actively migrating matrix cells exhibited repulsive migratory behaviors against patchy clusters of striosome cells, presumably contributing to the segregation and eventual formation of dichotomous homogeneous striosome/matrix compartments.

研究分野：神経発生 神経内科

キーワード：線条体 モザイク構造

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系を構成する個々の神経領域は、例えば大脳皮質における層構造、皮質下領域の神経核、脊髄運動ニューロンのカラム、プールといった、それぞれの神経領域に特有の細胞構築学的構造を示し、それぞれに特徴的な機能発現に結びついている。線条体は、脳の運動系機能、認知機能発現に重要な役割を果たす大脳基底核の一領域を成し、神経構築学的には striosome および matrix のコンパートメントからなるモザイク構造をもつ構造体として位置づけられる。Striosome および matrix は、線条体の9割以上を占める中型有棘投射細胞 (medium spiny projection neurons) からなる。Striosome は約15%のMSN からなり格子状または迷路状の連続した集合体を形成するコンパートメント(2次元の切片上ではパッチ状に認められる)として、一方、matrix は残り約85%のMSN からなり striosome を取り囲むコンパートメントとして同定される。両者は異なるコンパートメントを形成するのみならず、その入力元/投射先がそれぞれ異なる神経回路を構成しており、線条体機能発現の中で未解明の機能的分担を担うことが予測されている。

過去の研究から striosome/matrix は発生時期の異なるMSN として外側基底核原基 (lateral ganglionic eminence; LGE)から発生してくることが示されてきた。Striosome は早生まれ、matrix は遅生まれのMSN として位置づけられる。過去のBrdU 標識実験、逆行性標識、オピオイド受容体発現解析から、striosome 予定細胞はまず、均一に線条体に分布し、そのあとでパッチ状に集合体を形成することが示された。In vitro において striosome 予定細胞は選択的にお互いに集合体を形成することが示されている。さらにはパッチ・マトリクス構成細胞に発現される eph-ephrin を介した反発誘因作用により自己組織化が進み線条体のモザイク構造が

形成されうる理論モデルまたそれを支持する実験的データが示されてもいる (Honda & Mochizuki, 2002; Passante et al., 2008)。しかしながらこれらの後方視的研究においては、striosome/matrix が空間的・時間的にどのようにその分布を変化させるのかの理解は進んだが、細胞レベルにおいてどのようにそれぞれが細胞移動様式を示すのか、またその結果どのような相対的な動きの違いが潜在的に striosome 集合体の線条体における空間的位置、数、大きさを調節しうるのかといった striosome/matrix モザイク構造形成機構についての理解は未だ遅れていた。

最近では、線条体 striosome/matrix 構造・機能の不均衡が、統合失調症、ハンチントン舞踏病や薬物依存症といった様々な精神・神経疾患の発症に結び付いていることが示唆されており (Crittenden & Graybiel, 2011)、striosome/matrix 構造の構築機構そのものの解明はそれらの発症機構の究明にもつながる可能性が考えられていた。

2. 研究の目的

本研究では、神経細胞の運動性がどれだけまたどのようにモザイク構造構築に影響を及ぼすのか、細胞の「動き」といった物理的観点から線条体の組織構築機構を明らかにすることを試みた。

3. 研究の方法

線条体を構成する striosome 細胞および matrix 細胞をそれぞれ選択的に同時に標識する実験系を組み立て、スライス培養系と組み合わせることで前方視的に striosome/matrix 構造構築に至るそれぞれの細胞運動および細胞移動像を空間的・時間的に解析した。

4. 研究成果

(1) *in vivo* electroporation を用いた striosome/matrix 細胞の選択的標識系の確立

過去の研究からマウスにおいては striosome 細胞は胎生期 11.5-13.5 日 (E11.5-13.5) に matrix 細胞は E13.5 日に多くのものが発生してくることが示されていた。それぞれの神経細胞の発生の時間的特異性に着目して、まず、striosome 細胞および matrix 細胞が果たして選択的に標識しうるのか、E10.5、E13.5 のマウス胎仔の LGE に対して *in vivo* electroporation (IEP) 法を用いて EGFP 遺伝子を導入した。E18.5 において striosome の分子マーカーである DARPP-32 陽性細胞と EGFP 標識細胞との分布を解析したところ、約 8 割が一致した ($80.2 \pm 4.0\%$ 、DARPP-32 陽性細胞集団内への分布では $72.9 \pm 4.5\%$)。一方、E13.5 での IEP を行ったところ、E18.5 ではほとんど共局在が認められなかった。さらに生後 21 日目において striosome の分子マーカーである μ -opioid 受容体との分布を解析したところ、E10.5 での標識では数多くの EGFP 陽性細胞が μ -opioid 受容体発現細胞と一致した。これらの結果は、E10.5/E13.5 においてそれぞれ IEP をおこなうことで striosome 構成細胞および matrix 構成細胞を優位に標識できることを示す。

過去の研究よりトランスポゾン発現ベクターは宿主 DNA に取り込まれて細胞分裂によってもそのまま継続的に子孫細胞に発現が継続することが示されている。我々はトランスポゾンベクター (EGFP 発現) を通常の一過性発現を許容するプラスミド発現ベクター (tdTomato 発現) と組み合わせることで E10.5 単独の IEP によりはたして早生まれの striosome 細胞と遅生まれの matrix 細胞を異なる蛍光色素により同定できるかどうかを解析した。EGFP かつ tdTomato 陽性細胞は、E10.5 での IEP によりおもに DARPP-32 陽性の striosome に主に局在することが示された。

一方、トランスポゾンベクター由来の EGFP 単独で標識される細胞は、DARPP-32 陽性 striosome 以外において主として分布していることが示された ($24.7 \pm 3.4\%$ が DARPP-32 陽性細胞と一致)。これらの結果は、E10.5 IEP により striosome および matrix 細胞が比較的選択的に標識しうることを示す。すなわち、プラスミド由来かつトランスポゾン由来の蛍光色素標識細胞 (W 細胞) として striosome 構成細胞が、トランスポゾン由来蛍光色素単独標識細胞 (T-only 細胞) として matrix 構成細胞が主に同定されることが示された。

(2) striosome/matrix 構成細胞の空間的・時間的分布

上記の標識系を用いて次に我々は striosome および matrix 構成細胞がどのように継時的に striatum の神経細胞層 (マントル層) において分布していくのかを解析した。E14.5 においては W 細胞および T-only 細胞はマントル層に均一に分布していることが示された。その後、E16.5 において W 細胞はパッチ状の集合体を形成し、それらは主に DARPP-32 を発現していた。W 細胞はお互いに神経突起を絡み合わせており、この長く伸長した神経突起によりお互いが近接し集合体を形成する可能性が示唆された。E17.5 においてはさらに W 細胞の集合体が数多く観察されるようになり、いくつかの T 細胞もその集合体に認められた。これらの結果は、E17.5 においては striosome 細胞と matrix 細胞は明確な区画形成を終えていないことを示唆した。さらにこれらの結果は、マウスにおいては E16.5 において striosome 形成が開始されることを示唆した。

(3) striosome 集合体形成初期過程における striosome/matrix 細胞の細胞移動像

次に我々は striosome 形成過程における striosome/matrix 細胞の細胞移動様式を解析する目的で、上記の実験で形成初期過程として

捉えられた E16.5 において解析を進めた。E10.5IEP 以降、E16.5 において胎仔を取出し脳切片を作成しスライス培養を行い、W 細胞および T 細胞のタイムラプスビデオモニタリングを行った。

E16.5 において W 細胞はマントル層に分布し、主としては (約 6 割) 非常にゆっくりとした細胞移動もしくは細胞静止の状態を示していた。細胞静止期においては W 細胞は活発に神経突起を伸縮させ、そのような一見多極性細胞はその後、双極性細胞の形態をとり、細胞体を saltatory 様式により移動させ細胞移動の様子が観察された。一部の偶然に近接していた W 細胞はお互いに神経突起を伸ばしあいそれらを絡み合わせた後にその神経突起を通じてお互いの細胞体をさらに近接させる様子が観察された。

一方、T 細胞は非常に活発に多方向性に細胞移動を示す様子が観察された。W 細胞と同様にその細胞移動様式は saltatory 様式であり、先導突起となる神経突起を伸長させた後にその方向へ細胞体 (神経核) が移動し、後方の神経突起をその方向へ収縮させて細胞全体を移動させる様子が観察された。W 細胞と異なり、T 細胞同士または W 細胞との間で誘因性または反発性の細胞移動像を示さなかった。

(4) striosome 集合体形成後期過程における matrix 細胞の細胞移動像

上記の実験より matrix 細胞は striosome/matrix 形成初期過程においては非常に活発に細胞移動像を示すことが明らかとなったが、strisome/matrix 形成後期過程においてはどのような細胞移動像を示すのかを解析した。matrix 細胞の発生は継続的であることから、striosome/matrix 形成後期過程である P0 において、E13.5 でトランスポゾンおよびプラスミドベクターを用いて早生まれの

matrix 細胞(E13.5W 細胞)と遅生まれの matrix 細胞 (E13.5T 細胞) を解析対象とした。

P0 において E13.5W 細胞および E13.5T 細胞両者ともに striosome 集合体に対して汎発性の細胞移動様式を示すことが明らかとなった。E13.5W 細胞は静止状態にあるものもあった (約 4 割) が、いくつかは細胞移動を示しており striosome 集合体から神経突起を介して汎発性に細胞体を移動させていた。E13.5T 細胞はより活発に動き回りマントル層を striosome 集合体を避けるように細胞移動していた。後者においても神経突起を介して周りの環境を検出し striosome 集合体をさ避ける様子が観察された。

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計 2 件)

Neuro2013 日本神経科学会 京都

The origin, distribution and fate of subplate neurons in the neocortex 新皮質サブプレートニューロンの発生源、分布及び運命

片山悠司、萩本和也、村上富士夫、田辺康人

Neuro2014 日本神経科学会 横浜

A prospective study of striosome/matrix mosaic formation in the developing striatum

線条体におけるモザイク構造形成の前方視的解析

田辺康人、萩本和也、高見紗季、村上富士夫

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

京都大学・神経内科・医員

研究者番号 : 10311309