

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25830035

研究課題名(和文) ペリニューロナルネットによる神経回路の制御機構の解明

研究課題名(英文) Subclass-specific expression of perineuronal nets in parvalbumin-containing GABAergic neurons in the mouse hippocampus

研究代表者

山田 純 (Jun, Yamada)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70582708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ペリニューロナルネットは、パルブアルブミン(PV)陽性GABAニューロンの周囲を覆うコンドロイチン硫酸プロテオグリカンである。近年、ペリニューロナルネットが神経可塑性や神経保護に関与していることが報告され、注目が集まっている。本研究では、マウス海馬を対象として、ペリニューロナルネットを有するPVニューロンの存在様式についてステレオロジー法を用いた解析を試みた。その結果、PV陽性バスケット細胞の周囲にWFAレクチンで標識されるペリニューロナルネットが存在していた。本研究の結果は、ペリニューロナルネットによる神経回路の制御機構の解明のための基礎的な知見となるものである。

研究成果の概要(英文)：The perineuronal nets (PNNs) surround the soma of a subset of neurons, and is considered to play a critical role in regulation of neural plasticity. Seminal works using immuno/lectin histochemistry reported that PNNs were associated with parvalbumin-expressing (PV+) GABAergic neurons. Although later reports have shown that PV+ neurons consist of at least five subclasses (basket cells, axo-axonic cells, bistratified cells, oriens-lacunosum-moleculare (O-LM) cells and hippocampo-septal projection (H-S) cells), the relationship between PNNs and classification of PV+ neurons remains unclear. We clarify whether PNNs are associated with specific subclasses of PV+ neurons in the mouse hippocampus. The vast majority of PV+ basket cells were surrounded by PNNs, while only a minor population of PV+ axo-axonic, O-LM, and H-S cells were enwrapped with PNNs. These data provide evidence that PNNs may critically regulate hippocampal neuronal activity via subclass specific expression in PV+ neurons.

研究分野：神経解剖学

キーワード：海馬 GABAニューロン ペリニューロナルネット パルブアルブミン

## 1. 研究開始当初の背景

糖鎖はタンパク質・核酸に次ぐ第三の生命鎖として知られ、多様な生命活動を制御している。癌や感染症などの分野においては、生化学的研究や構造解析によって成果が上がり、癌細胞の糖鎖を認識する腫瘍マーカーの普及やタミフルなどの医薬品開発といった産業的な応用も進んでいる (Magnani et al., Cancer Res, 1983; Weis et al., Nature, 1988)。一方で、非常に多様な糖鎖構造と遺伝子に依存しない発現機構、複雑な脳構造のために、糖鎖による脳機能制御に関してはいまだ十分に分かっていない。

神経系において糖鎖が形成する構造の一つに、ペリニューロナルネットがある。ペリニューロナルネットは、パルプアルブミン (PV) 含有 GABA ニューロン周囲を覆う細胞外基質で、レクチンによって可視化される (Kosaka and Heizmann, Brain Res, 1989)。近年、ペリニューロナルネットが眼優位性可塑性や記憶の維持に関与していることが報告されている (Pizzorusso et al., Science, 2002; Gogolla et al., Science, 2009)。すなわち、ペリニューロナルネットの完成に伴い可塑性の高い状態が消失し、臨界期は閉鎖される。その結果、外部入力に対して高い可塑性を示す幼少期の「やわらかい脳」から、可塑的な変化が起こりにくい大人の「かたい脳」へと移行する。ペリニューロナルネットは可塑性の抑制に寄与しているということは広く受け入れられるようになっている。

神経糖鎖研究に関しては、眼優位性可塑性の研究を端緒として、2000年代になって多くに分子レベル、個体レベルの研究が行われており一定の成果が挙げられている。一方で、神経回路レベルの研究は少なく、ペリニューロナルネットが神経回路の「どこに」「どれだけ」存在するのかについての解剖学的な知見は依然として不足したままである。

## 2. 研究の目的

ペリニューロナルネットは神経可塑性や記憶の維持に関与する可能性が示唆されているが、その具体的な作動原理は明確にされ

ていない。そこで本研究では、ペリニューロナルネットによる神経回路の制御機構を明らかにすることを目的とする。具体的には、ペリニューロナルネットが、神経回路の「どこに」「どれだけ」存在するのかについての解剖学的な知見を得ることで、この点についてアプローチを行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験動物

C57BL/6J 系統の雄マウス (2 カ月齢, 計 8 頭) を使用。全てのマウスは、深麻酔下に 4% パラホルムアルデヒドと 0.05% グルタルアルデヒドを含むリン酸緩衝液 (30 ml) を用いて灌流固定した。2 時間後に脳を取り出し、30% スクロースで置換した。OCT Compound で包理後、ドライアイスで急速凍結し、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。 $-15^{\circ}\text{C}$  に戻した後、クライオスタットで  $40\ \mu\text{m}$  厚の冠状断切片 (背側海馬を含む) と水平断切片 (腹側海馬を含む) を作製した。全ての動物実験は九州大学動物実験委員会の承認を得て行われた。

### (2) 中隔野へのトレーサーの投与

マウスを麻酔下に脳定位装置に固定し、逆行性トレーサーであるフルオロゴールド (FG, 2% in 0.9% 生理食塩水) を内側中隔に注入した。

### (3) 免疫組織化学

脳切片は 1% 牛血清アルブミンと 0.3% Triton、0.05% アジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝液によってブロッキングを行った。その後、以下に示す一次抗体・レクチンに、蛍光色素標識二次抗体を組み合わせる免疫蛍光四重染色を行い、免疫組織化学を行った。

ウサギポリクローナル抗フルオロゴールド抗体

ヤギポリクローナル抗ニューロペプチド Y (NPY) 抗体

モルモットポリクローナル抗パルプアルブミン (PV) 抗体

ウサギポリクローナル抗パルプアルブミン (PV) 抗体

ウサギポリクローナル抗 special AT-rich sequence-binding protein-1

(SATB1) 抗体

ラットモノクローナル抗ソマトスタチン

(SOM) 抗体

ビオチン化 WFA レクチン

#### (4) オプティカルダイセクター解析

5頭のマウスの背側海馬と腹側海馬からそれぞれ4枚の切片をランダムに選択し、上記の免疫蛍光染色を行った。中等倍の対物レンズ ( $\times 20$ , NA 0.8) を装着したセクショニング顕微鏡 (Apotome.2, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) を用いて、海馬歯状回の光学切片のZスタックを取り込んだ。画像解析アプリケーション ImageJ (NIMH, Bethesda, MD) とオリジナルのマクロプログラムを用いて、オプティカルダイセクター法により、PNNを有するニューロン群の空間分布密度を求めた。各段階の細胞の空間分布密度 (Numerical density; ND) は以下の式で算出した。

$$ND = Q- / (h \times a(\text{fra}) / SV)$$

Q-: ダイセクター法によってカウントされた細胞数

h: サンプリングに使用する切片内の領域。本研究では、切片作成時の物理的ダメージを考慮して 40  $\mu\text{m}$  厚の切片の表面から 2  $\mu\text{m}$  までをサンプリングから除外し、内部の 36  $\mu\text{m}$  厚だけを使用した。

a(fra): フレームカウンティング法によって算出される歯状回の面積

SV: 切片の縮小率 (0.65)

・統計解析と画像処理

統計解析には Origin8.5 (OriginLab, Northampton, MA) を使用し、Welch の t 検定を行った。 $p < 0.05$  の場合に有意とした。画像処理には Photoshop CS4 (Adobe Systems, Mountain View, CA) を使用した。

#### 4. 研究成果

##### (1) GABA ニューロンのサブクラスの同定

ペリニューロナルネットは、PV 陽性 GABA ニューロン周囲を覆う細胞外基質である。近年の研究によって、PV 陽性 GABA ニューロンには少なくとも 5 つのサブクラス (basket, axo-axonic, bistratified, 0-LM, H-S) 存

在することが明らかとなっている。本研究では、マウス海馬アンモン角を対象として、古典的なペリニューロナルネットのマーカーである WFA レクチンと PV のサブクラスの関係を明らかにすることを試みた。PV のサブクラスは、分子発現プロファイル、細胞の存在場所と中隔野へのトレーサー投与による標識から、以下のクライテリアに基づいて同定した。

1. Axo-axonic 細胞: 錐体細胞層に存在する PV+/SATB1-/NPY-細胞
2. Basket 細胞: 錐体細胞層に存在する PV+/SATB1+/NPY-細胞
3. Bistratified 細胞: 錐体細胞層に存在する PV+/SATB1+/NPY+細胞
4. 0-LM 細胞: 上昇層に存在する PV+/FG-/SOM+細胞
5. H-S 細胞: 上昇層に存在する PV+/FG+/SOM+細胞

(2) Axo-axonic 細胞、Basket 細胞、Bistratified 細胞における WFA+ ペリニューロナルネットの発現

WFA/PV/SATB1/NPY の免疫組織化学を行い、海馬アンモン角を対象として、Axo-axonic 細胞、Basket 細胞、Bistratified 細胞における WFA+ ペリニューロナルネットの発現を調べた。その結果、90%以上の Basket 細胞が WFA+ ペリニューロナルネットを有していたのに対して、Axo-axonic 細胞で WFA+ ペリニューロナルネットを持つものは 10%程度であった。また、約 25-50%の Bistratified 細胞が WFA+ PNN を持っていた。

(3) 0-LM 細胞、H-S 細胞における WFA+ ペリニューロナルネットの発現

続いて、中隔野にトレーサー-FG を投与したマウスの組織切片を用いて、WFA/PV/FG/SOM の免疫組織化学を行い、海馬アンモン角を対象として、0-LM 細胞と H-S 細胞における WFA+ PNN の発現を調べた。その結果、0-LM 細胞、H-S 細胞でペリニューロナルネットを有する者は 10%以下であった。

##### (4) まとめ

本研究の結果は、サブクラス特異的に WFA+ ペリニューロナルネットが存在することを示したものであり、ペリニューロナルネット

による神経回路制御機構を解明するうえで、重要な解剖学的知見である。

#### 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 6 件)

Jun Yamada, Shozo Jinno (2013) A novel objective classification of reactive microglia following hypoglossal axotomy using hierarchical cluster analysis. *Journal of comparative neurology*, 521, 1184-1201

Jun Yamada, Shozo Jinno (2013) Spatio-temporal differences in perineuronal net expression in the mouse hippocampus, with reference to parvalbumin. *Neuroscience*, 253, 368-379.

Jun Yamada, Shozo Jinno (2014) S100A6 (calcyclin) is a novel marker of neural stem cells and astrocyte precursors in the subgranular zone of the adult mouse hippocampus. *Hippocampus*, 24, 89-101.

Jun Yamada, Shozo Jinno (2014) Age-related differences in oligodendrogenesis across the dorsal-ventral axis of the mouse hippocampus. *Hippocampus*, 24, 1017-1029.

Jun Yamada, Tomohiro Ohgomori, Shozo Jinno (2015) Perineuronal nets affect parvalbumin expression in GABAergic neurons of the mouse hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, 41, 368-378.

Jun Yamada, Shozo Jinno (2015) Subclass-specific formation of perineuronal nets around parvalbumin-expressing GABAergic neurons in the Ammon's horn of the

mouse hippocampus. *Journal of comparative neurology*, 523, 790-804.

[学会発表](計 9 件)

Jun Yamada, Shozo Jinno.

Perineuronal nets restrict synaptic plasticity in the CA2 region of the mouse hippocampus.

第36回日本神経科学大会 (Neuro2013) 京都、2013年、6月

山田純、神野尚三

加齢によるオリゴデンドロサイト前駆細胞とオリゴデンドロサイトのホメオスタシスの変化

包括脳ネットワーク夏のワークショップ、名古屋国際会議場、名古屋、2013年 8 月

Jun Yamada, Shozo Jinno.

Subclass-specific expression of parvalbumin-containing GABAergic neurons in the mouse hippocampus.

International Symposium on Glyco-Neuroscience, 淡路島夢舞台、兵庫、2014年1月

山田純、神野尚三.

ペリニューロナルネットはPV陽性GABAニューロンのサブクラス特異的に発現している。第119回日本解剖学会総会・全国学術集会、栃木、自治医科大学、2014年3月

Jun Yamada, Shozo Jinno.

Molecular heterogeneity of perineuronal nets and regulation of neuronal circuits in the hippocampus. 第37回日本神経科学大会 (Neuro2014) 横浜、2014年、9月

Jun Yamada, Shozo Jinno.

Subclass-specific expression of perineuronal nets around parvalbumin-expressing GABAergic neurons in the mouse hippocampus. 2015年3月23日、第120回日本解剖学会総会・全国学術集会、神戸国際会議場

Jun Yamada, Shozo Jinno.

Versican-immunoreactive perineuronal  
nets may be formed around ivy cells or  
neurogliaform cells in the hippocampus.

第38回日本神経科学大会 (Neuro2015)、  
神戸国際会議場、2015年7月

山田純、大籠友博、神野尚三. 加齢に伴  
うアグリカンコアタンパク質とCat-315  
糖鎖の発現変動とメマンチンによる制御  
第71回日本解剖学会九州支部学術集会、  
熊本大学、2015年10月31日

山田純、神野尚三.  
ペリニューロナルネットによる海馬神経  
回路の制御

第121回日本解剖学会総会・全国学術集会、  
ビックパレット福島、2016年3月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者 山田純 (YAMADA Jun)

九州大学医学研究院助教