

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830033

研究課題名(和文)サブプレートニューロンに起きる選択的細胞死の意義とは

研究課題名(英文)What is the reason why subplate neurons die selectively.

## 研究代表者

平井 志伸(HIRAI, Shinobu)

公益財団法人東京都医学総合研究所・脳発達・神経再生研究分野・研究員

研究者番号：00625189

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)：サブプレートニューロン(SPn)は、人では疾患の種類によりその数が増減していることが知られている(アルツハイマー病患者では減、自閉症や統合失調症患者では増)。そこで、マウスを用いて、SPnの数が脳機能に及ぼす影響を検証した。

まず我々は、今まで困難だった、SPn特異的な遺伝子操作の系を確立した。具体的には、アデノ随伴ウイルス(血清型9)を用いて、胎児期の適切なタイミングで脳室にウイルスを投与するという手法である。現在、この系を用いてSPn数を人工的に増減させた際の脳機能の変化を、組織学的、行動学的に解析中である。

研究成果の概要(英文)：It is known that the numbers of subplate neurons (SPn) have variety in some diseases. It's decreasing in Alzheimer's disease and increasing in Autism and Schizophrenia. We tried to confirm that the brain function might be changed depending on the number of SPn.

We established how to induce the target genes to SPn specifically. In particular, we injected adeno-associated Virus (type 9) into the fetus ventricle to express target genes. Using this systems, we are analyzing the histological and behavioral changes of brain function associated with the number of SPn.

研究分野：神経科学

キーワード：サブプレートニューロン 神経発生

## 1. 研究開始当初の背景

(1) サブプレートニューロンは大脳皮質を構成する細胞の中で最も早期に成熟するニューロン群である。その運命や機能にはまだ謎が多い。また、大脳皮質が形成されていく過程で様々な重要な役割を担っている。興味深いことに、げっ歯類では生後、サブプレートニューロンには徐々に選択的細胞死が起こることにより、成体になると一部を残してその数は激減するといわれている。しかし、死を運命づけられるサブプレートニューロンとそうでないニューロンを分ける決定因子は不明であった。そもそも、本当に細胞死が起きているのか否かについても、未だに議論の渦中であり、決着はついていない。SPnを選択的、継続的、かつ広範にラベルするマーカーが同定されていないことが、上記の謎の解明を妨げていた。

(2) ヒトでは、いくつかの疾患で、サブプレートニューロンの数が変化していることが報告されている。アルツハイマー病患者では減少し、自閉症や統合失調症患者では増加している。しかし、増減したサブプレートニューロンは大まかな解剖学的な位置と、残存細胞の大きさによって、もしくは、ごく一部のSPnをラベルするマーカーでの抗体染色像を根拠として、患者特異的に数が変化する細胞が“SPn”であると結論づけている。その為、それが本当に目的のニューロンであるかの確実性は低かった。例えば、細胞移動障害により、他層のニューロンが、より下層のSPn層に残存しているだけの可能性も考えられた。仮に、増減していた細胞が、実際にサブプレートニューロンであったとして、その数の増減が上記の疾患の症状にどのような影響をもたらすのかは不明であった。

## 2. 研究の目的

(1) 既存のサブプレートニューロンのマーカーは、あるものは胎児期にのみ発現、またあるものは成体における一部のサブプレートニューロンにのみ発現といったように、発現時期やパターンがバラバラであるため、サブプレートニューロンが死んだのか、単にマーカーが消失しただけなのかが分かりにくい。まず、その問題を解消するために、時間的にも空間的にも、安定して全てのサブプレートニューロンにおける発現を維持しているマーカーの探索を試みた。

(2) ヒトの疾患によっては、サブプレートニューロンの数が増減していることが報告されているわけだが、確実性が低い為、報告されている結果の検証を行う。また、サブプレートニューロンの数の増減と、上記疾患の症状との因果関係は全くわかっていない。そ

こで、人工的にサブプレートニューロンを増減させたマウスを作成し、組織学的、行動学的に観察することで、サブプレートニューロンの数と症状との因果関係を明らかにすることを試みた。

## 3. 研究の方法

(1) 生きたまま胎児の大脳皮質に目的の遺伝子を発現するプラスミドを導入できる、子宮内エレクトロポレーション法を用いてサブプレートニューロンの網羅的なラベリングを試みた。胎生期 11.5 日目のマウスに子宮内エレクトロポレーション法により GFP を大脳皮質の興奮性神経前駆細胞に導入した。生後すぐに FACS によって GFP 陽性細胞を回収した。当初は、それらの細胞の転写産物プロファイルを、マイクロアレイを用いて解析することを計画していた。

(2) (1)での網羅的マーカー同定を待つ間、アデノ随伴ウイルス血清型 9 を用いて大多数のサブプレートニューロンに目的の遺伝子を導入する方法の確立を試みた。これにより、例えば、胎生期 11.5 日目に GFP でラベルされたサブプレートニューロンが、個体の成長過程のどのタイミングで細胞死に至るのか、確認することが可能となる。

目的の時期にサブプレートニューロンを消失させる為に、Cre依存性ジフテリアトキシン受容体を発現するマウスを入手した。このマウスはCreリコンビネースを任意の細胞に発現させた後、任意の時期にジフテリアトキシンを母体、もしくは生後の仔マウスに投与することで、Creリコンビネース発現細胞のみで細胞死を誘導させることができる。早期にサブプレートニューロン数を減少させると、脳の発達や、細胞の成熟、行動にどのような変化が生じるのかを解析することができる。

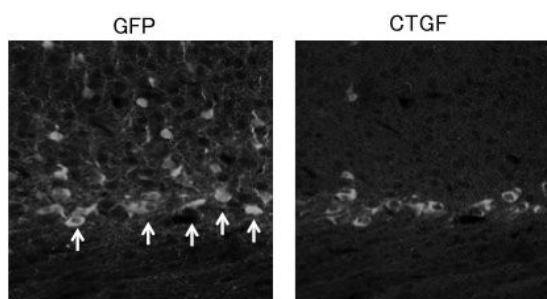
また、逆にサブプレートニューロンの死滅を防ぐ方法として、サブプレートニューロンの一部をラベルするマーカーの一つであるキヌレニンアミノトランスフェラーゼ1 (KAT1) を利用した。KAT1 はキヌレニンからのキヌレイン酸(KYNA)の生合成を触媒し、生後7日目あたりまでにサブプレートニューロンでの発現が消失してしまう。キヌレイン酸はグルタミン酸受容体であるNMDA 受容体の選択的ブロッカーであり、Csillik らはKAT1 陽性サブプレートニューロンが選択的にアポトーシスを起こすことを報告している。つまり、サブプレートニューロンの死因がKAT1の発現消失によるキヌレイン酸合成能の消失。それに引き続くブロックがはずれたNMDAR からのカルシウムの過剰流入であることを予想した。その仮説を確認しつつ、残存サブプレートニューロンの数を人工的に増加させる為

に、サブプレートニューロンにKAT1を外来的に恒常的に発現させ、選択的細胞死の抑制を試みた。成体に至るまで正常より多くのサブプレートニューロン数を残存させることで、脳の発達や、細胞の成熟、行動にどのような変化が生じるのかを解析することができる。

#### 4. 研究成果

(1) サブプレートニューロンに、時間的にも空間的にも、網羅的かつ特異的に発現するマーカー遺伝子の同定を試みたが、別のグループから、サブプレートニューロンの新規マーカーの同定を試みた論文が発表されてしまった。彼らの結果によると、サブプレートニューロンは、発現プロファイル的には非常にヘテロな集団であり、その全体を網羅的にカバーできるようなマーカーは発見されなかったとのことであった。この時点で、継続中だった FACS によってエレクトロポレーション後の細胞を回収し、マイクロアレイによる発現プロファイル解析という計画を一旦中止し、(2)の実験の方へ、重心をシフトさせることとした。よほどの実験手法の転換がなければ、彼らとほぼ同じ結果に行き着くことが想定された為である。

(2) 我々は、プレリミナリーな実験から、胎生期のマウスの脳室にアデノ随伴ウイルスを注入すると、注入時に細胞周期を完全に離脱した神経細胞及び、神経前駆細胞群に、目的の遺伝子を導入できる事実を発見していた。また、サブプレートニューロンは大脳皮質において、最も早期に成熟する神経細胞群である。それら二つの性質を利用することで、サブプレートニューロン特異的に目的遺伝子を導入することを試みた。具体的には胎生期 12.5 日目のマウス胎児の脳室に目的の遺伝子(テスト段階では GFP)を発現するアデノ随伴ウイルス 9 を注入した。すると、多少他の層への発現漏れも見受けられるが、ほぼ大多数の遺伝子導入細胞はサブプレートニューロンであることが確認できた。(既存のサブプレートニューロンのマーカーと細胞の存在位置、および細胞の大きさによりサブプレートニューロンであることを同定した)。図



図①: 胎生期13.5日目でGFP発現AAV9を胎児脳室に導入後、一部のサブプレートニューロンのマーカーであるCTGFと共染色を行った図。矢印がCTGFが染まっているサブプレートニューロンにGFPを導入できていることを示す。

次に、Cre 誘導性ジフテリアトキシン受容体の発現系が予想通り機能するかを確認する為、現在ダブルコルチン Cre(Dcx-cre) マウスと交配中である。Dcx が発現する新生ニューロンにおいて、ジフテリアトキシン受容体が特異的に発現し、かつジフテリアトキシンの投与によってその細胞群特異的に細胞死が誘導されるか否かを検討中である。確認ができ次第、Cre 発現アデノ随伴ウイルスを用いて、Cre 誘導性ジフテリアトキシン受容体マウスのサブプレートニューロンのみ Cre を導入し、任意の時期にジフテリアトキシンを投与して、サブプレートニューロンが早期に消失してしまったマウスの、組織学的、行動学的検証を試みる。

逆に、過剰なサブプレートニューロンを残存させる系の作成のため、KAT1 発現アデノ随伴ウイルスを作成した。マウス全脳由来の cDNA から KAT1 をクローニングした。現在、そのウイルスを胎生期 12.5 日目で野生型マウスに導入し、任意の時期で脳を回収観察することで、軸索の投射や大脳皮質の構造等に異常がないかを観察中である。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

##### 包括脳シンポジウム

2014 年 12 月 17 日～12 月 19 日、  
一橋大学一橋講堂学術総合センター(東京都千代田区)

発表者: 岡戸晴生

タイトル: ウイルスベクター

##### 包括脳シンポジウム

2015 年 12 月 11 日～12 月 13 日、  
一橋大学一橋講堂学術総合センター(東京都千代田区)

発表者:岡戸晴生  
タイトル: ウイルスベクター

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.igakuken.or.jp/differentiation/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

平井 志伸 (HIRAI, Shinobu)  
東京都医学総合研究所・脳発達神経再生研究分野・研究員  
研究者番号: 00625189

### (2)研究分担者

(なし)

### (3)連携研究者

(なし)