

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年5月31日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K06747

研究課題名(和文)ニューロンおよびグリア細胞における核膜構築タンパク質の多様性

研究課題名(英文)Variety of the composition of nuclear membrane proteins in neurons and the glial cells

研究代表者

高森 康晴 (TAKAMORI, YASU HARU)

関西医科大学・医学部・研究員

研究者番号：50309233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：成獣ラットの終脳に存在するニューロンおよび各種グリア細胞において、核ラミナ構築タンパク質であるラミン・サブタイプ(A/C, B1, B2)の構成パターンを免疫組織学的に解析した。ニューロンおよび各種グリア細胞におけるラミン・サブタイプの構成パターンは、非神経系細胞のものと異なっており、さらにニューロンおよび各種グリア細胞における構成パターンも細胞種の間で異なっていることが明らかになった。またオリゴデンドロサイトの細胞分化過程において構成パターンが変動することも明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ラミン・サブタイプの組織分布については種々の臓器で報告があったが、中枢神経系のニューロンおよび各種グリア細胞におけるラミンの網羅的な免疫組織学的解析は申請者の報告が初めてである。申請者が過去に報告した、ニューロンの分化過程におけるラミン・サブタイプの変動パターンの解析と本研究の成果を合わせることにより、ニューロンの分化とグリア細胞の分化における共通性も明らかになった。本研究により、ラミンの遺伝子変異で発症する神経変性疾患の標的細胞の予測が可能となり、疾患の発症機序の解明、標的細胞の保護や再生、疾患進行のコントロール、また創薬など、治療法の探索や開発が進むと予想される。

研究成果の概要(英文)：In this study, I investigated the composition of lamin subtypes (A/C, B1, B2), which are nuclear lamina proteins, in neurons and various glial cells of adult rat cerebral cortex using an immunohistochemical staining method. The constitution patterns for lamin subtypes in neurons and glial cells were different from those of non-neuronal cells. The constitution of lamin subtypes was also different between neurons and various cell types of glial cells. In addition, the constitution patterns for lamin subtypes fluctuated during oligodendrocyte differentiation process.

研究分野：ニューロンおよびグリア細胞の細胞分化と核膜構築、脊椎動物における成体ニューロン新生

キーワード：神経科学 細胞・組織 蛋白質 脳・神経 発生・分化 核膜 核ラミナ ラミン

## 1. 研究開始当初の背景

核膜は核外膜と核内膜から構成され、核内膜は核ラミナといわれる網の目状の構造で裏打ちされている。核ラミナを構成する主要なタンパク質は中間径フィラメントの1種であるラミンであり、哺乳類のゲノム上にはA/C、B1、B2の3種類の遺伝子が存在する。核膜構築タンパク質の解析はラミンを中心に進んできたが、その後、ラミンと相互作用する膜貫通タンパク質が複数同定され、さらに2000年代からこれらのタンパク質をコードする遺伝子変異によって体内のさまざまな組織に先天性疾患が起きることが報告された。これらには神経変性疾患も含まれ、ラミンA/C遺伝子の変異ではCharcot-Marie-Tooth病(type 2B1)、ラミンB1遺伝子の重複変異では成人発症型白質ジストロフィーが発症する。これらの疾患の発症機序の解明には、核膜構築タンパク質の神経系細胞における分布パターンの詳細な解析が必要と考えられる。

申請者らは、中枢神経系におけるニューロンおよびグリア細胞とラミンに関する一連の研究を行ってきた。哺乳類の成個体には、側脳室壁の脳室下層および海馬歯状回の2か所のニューロン新生領域が存在するが、申請者らはラットのニューロン新生領域におけるラミン・サブタイプの発現パターンを解析した。神経幹細胞、神経前駆細胞、成熟ニューロンではラミン・サブタイプの発現は異なっており、ニューロンの分化にともなってサブタイプの構成パターンが変動することを明らかにした(引用文献)。また食肉目フェレットの成個体におけるニューロン新生領域の組織構築を解析し、脳室構造などはげっ歯類と一部異なるものの、ニューロン分化に伴うラミンA/CとB1の変動パターンは種を超えて保存されていることを確認した(引用文献)。さらに申請者らは成獣ラットの網膜におけるラミン・サブタイプの分布パターンを解析し、成熟ニューロン間にもサブタイプの構成に違いがあり、ラミンA/Cのスプライシング産物のうち、ラミンCが優位に発現していることを見出した(引用文献)。

## 2. 研究の目的

脳内の成熟ニューロンおよび各種グリア細胞におけるラミン・サブタイプの構成パターンを解析する。またラミンと結合する核膜構築タンパク質の構成パターンについても解析を行なう。さらに成熟ニューロンの脳内分布領域やニューロンのタイプによってラミン・サブタイプの構成に多様性が見られるか、また最近明らかになってきた成個体における種々のニューロン新生領域において多様性が見られるか解析する。また*in vitro*の培養条件で、グリア系細胞の分化における核膜構築タンパク質の挙動を解析し、核膜構築タンパク質の変異導入実験の準備を開始する。

## 3. 研究の方法

研究目的(当初の予定)のうち、論文(引用文献)として発表した研究内容の方法について述べる。動物としては成獣ラット(オス、8週齢)を主に用いた。固定法や免疫染色の条件検索のために他種の動物を用いることもあった。動物組織の固定法は4%ホルムアルデヒド固定と熱処理による抗原不活化、および1%ホルムアルデヒド弱固定のみ、の2種の方法を用いた。脳の浮遊切片はクライオスタットで作成した。抗ラミン抗体と細胞種特異的なマーカータンパク質に対する抗体を組み合わせ、免疫多重染色を行なった。抗体は市販のものを用いた。ラミン・サブタイプ(A、C、B1、B2)に特異的な抗ラミン抗体は、主に先行実験で用いていたものを使用した。ニューロンの同定には抗NeuN抗体およびTOPRO-3(核酸に対する染色物質)を用いた。グリア系細胞に関して、アストロサイトの同定には抗GFAP抗体、成熟オリゴデンドロサイトの同定には抗GST-pi抗体、抗olig2抗体、抗RIP抗体、未成熟オリゴデンドロサイトの同定には抗NG2抗体、抗olig2抗体、ミクログリアの同定には抗Iba1抗体を用いた。非神経系細胞に関して、マクロファージの同定には抗Iba1抗体、抗CD68抗体、毛細血管の同定には抗RECA-1抗体、抗ネスチン抗体、抗ビメンチン抗体、髄

膜の同定には抗ピメンチン抗体を用いた。蛍光標識 2 次抗体を用いて免疫多重染色を行ない、切片は共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

#### 4、研究成果

抗ラミン抗体は、通常の 4 %ホルムアルデヒド固定では適切な染色性が見られないため、各抗体に応じて熱処理による抗原不活化や 1 %ホルムアルデヒドの弱固定を使い分けるなど条件検索を行なう必要があった。一方の各細胞種のマーカータンパク質に対する抗体にも適切な固定法の条件があるため、使用抗体の組み合わせの検索に時間がかかった。さらに脳内に存在する非神経系細胞との比較解析の必要性が出て来たため、当初の研究予定を一部変更し、脳内の各種細胞におけるラミン・サブタイプの網羅的な比較解析を中心に行なった（引用文献）。

スプライシング・バリエーションであるラミン A とラミン C は非神経系細胞である血管系細胞とは異なり、ニューロン、アストロサイト、成熟オリゴデンドロサイトではラミン A は陰性で、ラミン C のみ陽性であった。未成熟なオリゴデンドロサイト（OPC）ではラミン C も陰性であった。ミクログリアは髄膜内のマクロファージと異なり、ラミン A、C とともに陰性であった。ラミン B1 は未成熟なオリゴデンドロサイトではニューロンや他のグリア細胞に比べて強陽性であった。ラミン B2 は、ニューロンでは強陽性、他のグリア細胞では弱陽性であった。

ニューロンやグリア細胞などの神経系細胞では他の組織における細胞とは異なりラミン A が陰性である点がユニークであり、しかもニューロンとグリア細胞の間でもラミン・サブタイプの存在パターンに差が見られた。またオリゴデンドロサイトの分化過程においてラミン C と B1 が変動することがわかった。このパターンは申請者が以前に報告していたニューロンの分化過程の変動と類似したパターンであった。またミクログリアとマクロファージにおいてラミン A の存在に差が見られた。中枢神経系のニューロンおよび各種グリア細胞におけるラミン・サブタイプの網羅的な免疫組織学的解析は申請者の報告が初めてである。本研究により、ラミンの遺伝子変異で発症する神経変性疾患の標的細胞の予測が可能となり、疾患の発症機序の解明、治療法の探索や開発が進むと予想される。

	OPC	oligodendrocyte	astrocyte	neuron	microglia	macrophage
Lamin A	-	-	-	-	-	+
Lamin C	-	+	+	++	-	+
Lamin B1	++	+	+	+	+	++
Lamin B2	+	+	+	++	+	+

++, highly positive; +, positive; -, negative.

#### < 引用文献 >

Takamori Y, Tamura Y, Kataoka Y, Cui Y, Seo S, Kanazawa T, Kurokawa K, Yamada H. Differential expression of nuclear lamin, the major component of nuclear lamina, during neurogenesis in two germinal regions of adult rat brain. Eur J Neurosci. 2007 Mar;25(6):1653-62.

Takamori Y, Wakabayashi T, Mori T, Kosaka J, Yamada H. Organization and cellular arrangement of two neurogenic regions in the adult ferret (*Mustela putorius furo*) brain. J Comp Neurol. 2014 Jun 1;522(8):1818-38. doi: 10.1002/cne.23503.

Wakabayashi T, Mori T, Hirahara Y, Koike T, Kubota Y, Takamori Y, Yamada H. Nuclear lamins are differentially expressed in retinal neurons of the adult rat retina.

Histochem Cell Biol. 2011 Oct;136(4):427-36. doi: 10.1007/s00418-011-0853-8. Epub 2011 Aug 14.

Takamori Y, Hirahara Y, Wakabayashi T, Mori T, Koike T, Kataoka Y, Tamura Y, Kurebayashi S, Kurokawa K, Yamada H.

Differential expression of nuclear lamin subtypes in the neural cells of the adult rat cerebral cortex.

IBRO Rep. 2018 Nov 5;5:99-109. doi: 10.1016/j.ibror.2018.11.001.

## 5 . 主な発表論文等

### [ 雑誌論文 ](計 2 件)

Tanaka S, Honda Y, Takaku S, Koike T, Oe S, Hirahara Y, Yoshida T, Takizawa N, Takamori Y, Kurokawa K, Kodama T, Yamada H.

Involvement of PLAGL1/ZAC1 in hypocretin/orexin transcription.

Int J Mol Med.

査読有

43(5), 2019, 2164-2176

DOI: 10.3892/ijmm.2019.4143

Takamori Y, Hirahara Y, Wakabayashi T, Mori T, Koike T, Kataoka Y, Tamura Y, Kurebayashi S, Kurokawa K, Yamada H.

Differential expression of nuclear lamin subtypes in the neural cells of the adult rat cerebral cortex.

IBRO Reports

査読有

5, 2018, 99-109

DOI: 10.1016/j.ibror.2018.11.001

### [ 学会発表 ](計 1 1 件)

平原幸恵、若林毅俊、小池太郎、高森康晴、山田久夫

視神経損傷モデルにおける網膜の炎症反応と脂質変化

第 59 回日本組織細胞化学会総会・学術集会

2018

大江総一、田中進、平原幸恵、小池太郎、高森康晴、山田久夫

翻訳抑制因子 CPEB1 は 3' 非翻訳領域を介して Auf1 による RNA 安定性制御と自己翻訳抑制をうける

第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会

2018

小池太郎、田中進、平原幸恵、大江総一、高森康晴、山田久夫

CLEM Array tomography 小池 太郎 を用いた後根神経節におけるグリア細胞の解析

第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会

2018

田中進、本多芳子、高久静香、小池太郎、大江総一、平原幸恵、滝澤奈恵、高森康晴、黒川清、

児玉亨、山田久夫  
PLAGL1/ZAC1 によるオレキシン転写制御  
第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会  
2018

高森康晴、平原幸恵、若林毅俊、森徹自、小池太郎、山田久夫  
グリア細胞における核ラミナ主要成分ラミンのサブタイプ  
第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会  
2018

平原幸恵、若林毅俊、小池太郎、高森康晴、山田久夫  
視神経損傷モデルにおける視神経と網膜の質量顕微鏡解析  
第 58 回日本組織細胞化学会総会・学術集会  
2018

Oe S, Tanaka S, Hirahara Y, Koike T, Takizawa N, Takamori Y, Yamada H  
CPEB1 interacts with FMR1 mRNA and regulates its expression levels through 3' untranslated region.  
第 40 回日本神経科学大会  
2017

Tanaka S, Honda Y, Takizawa N, Takamori Y, Oe S, Hirahara Y, Koike T, Kodama T, Yamada H  
Hypocretin/orexin loss changes the hypothalamic immune response.  
第 40 回日本神経科学大会  
2017

小池太郎、片岡洋祐、前田光代、齊藤育、高森康晴、山田久夫  
基盤吊り下げ型補助具を用いた超薄連続切片回収法  
第 57 回日本組織細胞化学会総会・学術集会  
2016

平原幸恵、小池太郎、高森康晴、山田久夫  
TOF-SIMS 法を用いたマウス成獣脳におけるスルファチドバリエーションの局在解析  
第 57 回日本組織細胞化学会総会・学術集会  
2016

森徹自、若林毅俊、平原幸恵、高森康晴、小池太郎、黒川清、川島史祥、山田久夫  
ニューロン過剰興奮が誘発する神経前駆細胞の応答  
第 56 回日本組織細胞化学会総会・学術集会  
2015

6 . 研究組織  
( 1 ) 研究分担者  
なし

( 2 ) 研究協力者

研究協力者氏名：平原 幸恵  
ローマ字氏名 (HIRAHARA, yukie)

研究協力者氏名：若林 毅俊  
ローマ字氏名 (WAKABAYASHI, taketoshi)

研究協力者氏名：森 徹自  
ローマ字氏名 (MORI, tetsuji)

研究協力者氏名：小池 太郎  
ローマ字氏名 (KOIKE, taro)

研究協力者氏名：山田 久夫  
ローマ字氏名 (YAMADA, hisao)

研究協力者氏名：黒川 清  
ローマ字氏名 (KUROKAWA, kiyoshi)