

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08486

研究課題名(和文) 脳脊髄液のフルイドダイナミクスにおける転写因子Pax6の機能解明

研究課題名(英文) Analysis of transcription factor Pax6 function in the dynamics of cerebrospinal fluid

研究代表者

稲田 仁 (Inada, Hitoshi)

東北大学・医学系研究科・講師

研究者番号：60419893

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Pax6は脳の交連下器官(SCO)の胎生期の発生に重要な役割を果たしている転写因子である。成体マウスにおけるSCOでのPax6の発現を解析するとともに、SCOを構成する細胞がどのような性質を持つか解析した。SCOにおいて各種細胞の分子マーカーに対する蛍光免疫染色を行った結果、幹細胞マーカーの強い発現が観察された。BrdUの取り込みを指標とした分裂細胞はほとんど観察されなかった。以上より、SCOにおいてPax6の強い発現が生後も維持されており、神経幹細胞のマーカーも発現していることから、SCOは神経幹細胞様もしくは神経上皮細胞様の特徴を持つことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに、動物モデルにおいて交連下器官(SCO)の形成不全が水頭症様の症状を引き起こすことから、SCOの機能と水頭症発症との関連が報告されている。よって、SCOの機能がどのように維持されているか明らかにすることは、先天性水頭症の発症メカニズムを理解する上で極めて重要である。SCOの胎生期の発生に必要な転写因子Pax6が、成体のSCOにおいてもその発現が強く維持されているということは、Pax6が成体SCOの機能維持に必須であることを強く示唆している。SCOにおけるPax6の役割を理解することで、先天性水頭症の発生メカニズムに対する理解が進むと期待される。

研究成果の概要(英文)：Pax6 is a transcription factor essential for the development of subcommissural organ (SCO) in the brain during embryogenesis. Pax6 expression in the adult SCO was investigated and cells which consists of the SCO were characterized. Immunostaining for the several cell markers revealed that the SCO cells strongly expressed molecules of neural stem cell markers. A few BrdU labeled cells were observed. These results suggest that Pax6 expression is maintained in the adult SCO and that cells in the SCO have a feature of neural stem cells or neuroepithelial cells

研究分野：神経科学

キーワード：Pax6 Sox2 交連下器官 神経幹細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

転写制御因子 Pax6 は胎生期の神経幹細胞からの神経発生や成体での神経新生に重要な役割を果たしている。Pax6 の発現は分化した神経細胞では低下するが、アストロサイトや神経幹細胞など一部の細胞で出生後も発現が維持される。しかし、出生後の脳の発達における Pax6 の役割は未だ不明の点が多い。

本申請者は、出生後 30 日齢 (P30) のマウス脳の交連下器官 (Subcommissural Organ, SCO) において、Pax6 が強く発現していることを見出した (図 1. 稲田ら、未発表)。SCO は脊椎動物で高度に保存され、前脳と中脳の境界に位置する脳室周囲器官である。SCO は脳室上衣細胞で構成され、甲状腺ホルモンの輸送タンパク質であるトランスサイレチン (TTR) や Reissner 糸を構成する糖タンパク質である SCO-spondin を分泌することが報告されており、CSF の恒常性維持に関与すると考えられているが、SCO の役割は未だ不明な点が多い。SCO は、E12.5 にその形成が開始し、E18.5 にははっきりとした分化が観察される (Estivill-Torrús *et al.*, 2001)。胎児脳での SCO での Pax6 の発現は E14.5 から観察され、その後、E18.5 において周辺組織の Pax6 の発現が低下した後も SCO での発現は維持される (Estivill-Torrús *et al.*, 2001)。Pax6 の自然発生変異体 *Sey* では SCO の形成に異常をきたしていることから Pax6 の重要性が示唆されているが、*Sey* ホモ変異体は出生致死のため、出生後の SCO における Pax6 の機能は未だ不明のままである。

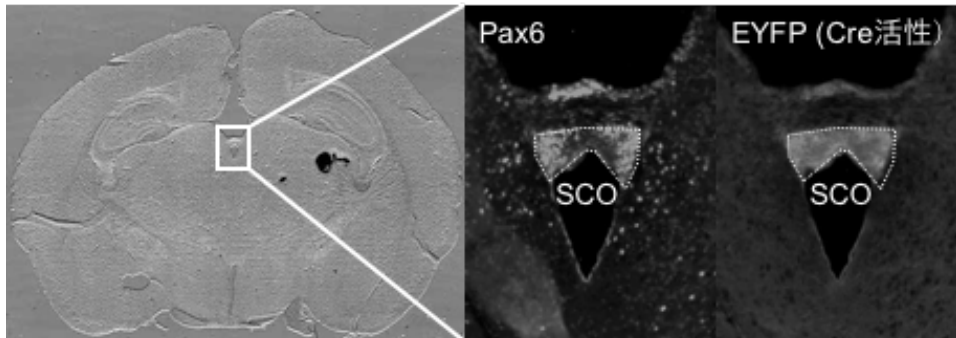


図 1. *hGFAP-Cre;EYFP* レポーターマウスの SCO における Pax6 の発現と Cre 活性

出生後の脳の SCO における Pax6 の役割を明らかにするために、グリア系の細胞で Cre リコンビナーゼを発現するマウス (*hGFAP-Cre* マウス) と *Pax6-flox* マウスを交配させ、SCO を含む細胞特異的に Pax6 を欠損したマウス (*Pax6cKO* マウス) を作成したところ、離乳前のマウス (P0~P21) では外見上の異常は観察されなかったが、P30 の *Pax6cKO* マウスでは同腹の対照マウスに比べて顕著な生育不良や運動失調、小脳の発達異常が観察された (稲田ら、未発表)。さらに、組織化学的解析の結果、*Pax6cKO* マウスでは小脳の形成異常、脳梁など繊維領域の減少、脳室の拡大を呈することが明らかになった (稲田ら、未発表)。これらの結果より、Pax6 が神経の初期発生のみならず、生後の脳の発達に重要な役割を果たしていることが示唆された。

2. 研究の目的

- (1) **Pax6cKO** マウスを用いた組織化学的解析
細胞特異的および薬剤誘導的に Pax6 を欠損させた遺伝子改変マウス (*Pax6cKO* マウス) を用い、SCO における TTR および SCO-spondin といった分泌タンパク質や繊毛を構成するタンパク質の発現を、組織免疫染色によって解析する。また、後交連や脳梁における軸索の形成や髄鞘化を、色素トレーサー法や組織免疫染色によって解析する。
- (2) 脳室上衣細胞特異的に Pax6 を欠損させた個体の組織化学的解析
Pax6-flox マウスの脳室内に Cre リコンビナーゼを発現するアデノ随伴ウイルスを注入し、脳室上衣細胞特異的に Pax6 を欠損させた遺伝子改変マウスを作成し、TTR および SCO-spondin といった分泌タンパク質や繊毛を構成するタンパク質の発現を組織免疫染色によって解析する。また、脳梁および後交連における軸索の形成や髄鞘化を、色素トレーサー法や組織免疫染色によって解析する。
- (3) SCO の器官培養による機能解析
対照マウスおよび *Pax6cKO* マウスから SCO 単離・培養し、TTR および SCO-spondin の分泌能を ELISA 法によって解析する。

3. 研究の方法

- (1) **Pax6cKO** マウスを用いた組織化学的解析 (研究代表者、研究分担者)
Pax6cKO マウス (*hGFAP-Cre;Pax6-floxed*) の胎仔 (E12.5、E14.5、E16.5、E18.5) および出生後の若齢個体 (P0、P7、P14、P21、P28) から脳を摘出し、凍結切片を作成後、KB 染色による脳構造の解析と免疫染色による SCO における TTR および SCO-spondin といった分泌タンパク質の発現解析を行う。また、脳梁および後交連および髄鞘において、色素トレーサー法による軸索の形成の解析や組織免疫染色による髄鞘化の解析も行う。さらに、*Pax6cKO* マウス (*CAG-CreEsrl;Pax6-floxed*) において、異なる胎生期 (E12.5、E14.5、E16.5、

E18.5) の母マウスまたは出生後の若齢個体 (P0、P7、P14、P21) にタモキシフェンを腹腔内に投与し、Pax6 の欠損を誘導する。P28 または P56 において脳を摘出し、TTR および SCO-spondin といった分泌タンパク質の発現および脳の構造を組織免疫染色によって解析する。また、脳梁および後交連において、色素トレーサー法による軸索の形成や組織免疫染色による髄鞘化も解析する。

- (2) 脳室上衣細胞特異的 Pax6 欠損マウスの組織化学的解析 (研究代表者、研究分担者)
胎児脳の異なる発達ステージ (E12.5、E18.5) において、Pax6-flox マウスの脳室内に Cre リコンビナーゼを発現するアデノ随伴ウイルス(AAV)を注入し、脳室上衣細胞特異的に Pax6 を欠損させた遺伝子改変マウスを作成する。P28 または P56 において脳を摘出し、TTR および SCO-spondin といった分泌タンパク質の発現および脳の構造を組織免疫染色によって解析する。また、脳梁および後交連において、色素トレーサー法による軸索の形成や組織免疫染色による髄鞘化も解析する。さらに、生後の脳の異なる発達ステージ (P0、P7、P14、P21) において、Pax6-flox マウスの脳室内に Cre リコンビナーゼを発現するアデノ随伴ウイルス(AAV)を注入し、脳室上衣細胞特異的に Pax6 を欠損させた遺伝子改変マウスを作成する。P28 または P56 において脳を摘出し、TTR および SCO-spondin といった分泌タンパク質の発現および脳の構造を組織免疫染色によって解析する。また、後交連において、色素トレーサー法による軸索の形成や組織免疫染色による髄鞘化も解析する。
- (3) 器官培養による SCO の機能解析
対照マウスおよび Pax6cKO マウスから SCO 単離・培養し、SCO の形成と構造、TTR および SCO-spondin 等の分泌タンパク質の発現を免疫染色法によって解析する。

4. 研究成果

- (1) 対照である野生型マウスにおいて、出生後の異なるステージ (0 日目、7 日目、14 日目、21 日目および 28 日目) での交連下器官 (SCO) における Pax6 の発現を免疫染色法によって観察した。0 日目において、SCO および第 3 脳室周辺の領域で、Pax6 の強い発現が観察された。Pax6 の発現は、SCO ではステージが進行するに連れて (14 日目以降) 強くなるのに対して、第 3 脳室周辺領域では著しく低下した (図 2. 稲田ら、未発表)。

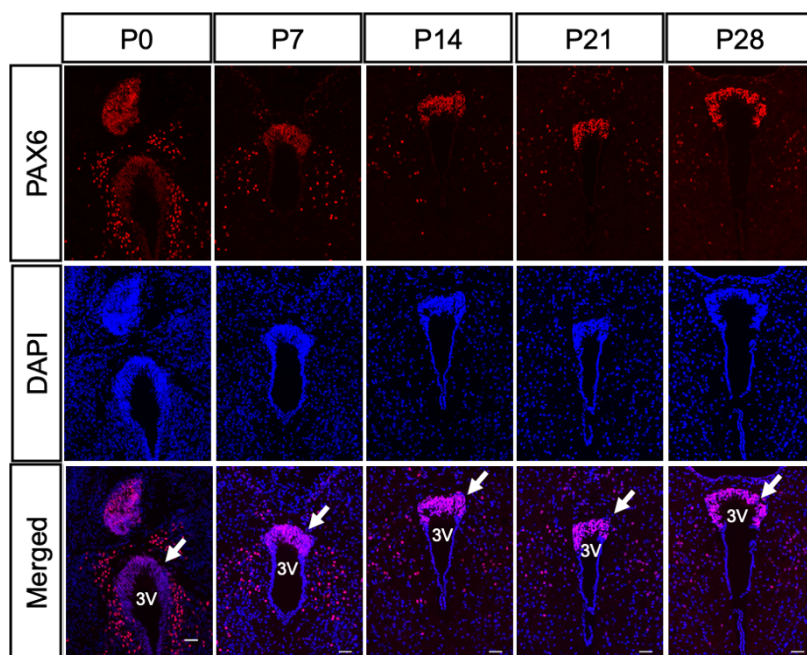


図 2. 出生後の SCO 周囲領域の発達における Pax6 発現の変化 (矢印: SCO、3V: 第 3 脳室)

- (2) 側脳室および第 3 脳室腹側領域の上衣細胞における Pax6 の発現を、生後の異なるステージにおいて観察した結果、Pax6 の一過性の発現が観察された。側脳室では、0 日目において Pax6 の強い発現が上衣細胞で観察されたが、28 日目では発現が著しく低下した。一方、第 3 脳室の腹側領域では、0 日目で Pax6 の発現は観察されなかったが、7 日目では強い発現が観察された。以降のステージ (14 日目および 21 日目) では、Pax6 の発現は著しく低下した。
- (3) Pax6 が発現している交連下器官領域がどのような細胞から構成されているか、免疫染色法によって解析した。生後 84 日目のマウス脳において、各種細胞の分子マーカー (ニューロン: NeuN、アストロサイト: GFAP、オリゴデンドロサイト: Olig2、ミクログリア: Iba1、幹細胞: Sox2・Vimentine・PCNA・Ki67、オリゴデンドロサイト前駆細胞: PDGFR α) に対する免疫染色を行った結果、交連下器官における Sox2・Vimentine・PCNA の強い発現が観察された。NeuN、および Olig2 の発現は観察されず、わずかな Iba1 の発現が観察された (図 3)。

稲田ら、未発表)。

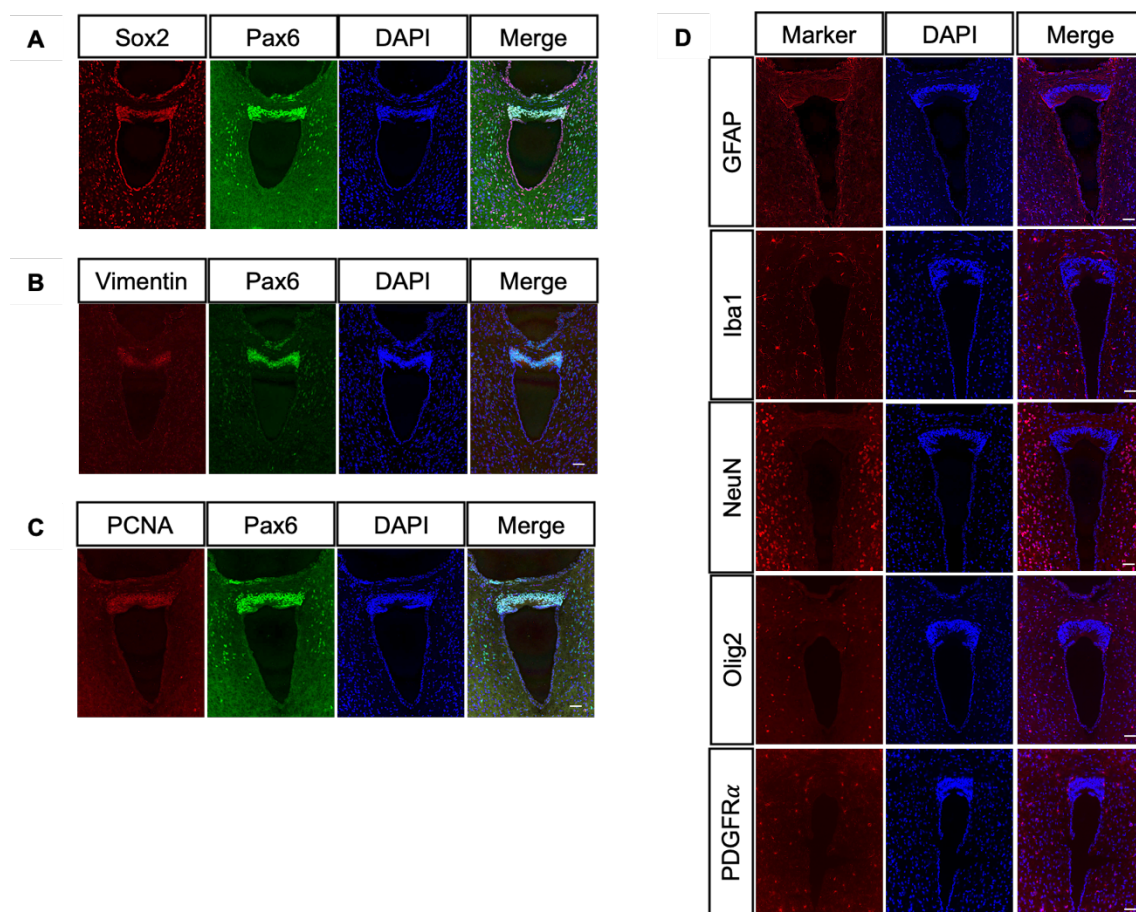


図3. SCOにおける各種細胞マーカー分子の発現

- (4) 以上の結果より、交連下器官において Pax6 の強い発現が生後も維持されており、神経幹細胞のマーカーも発現していることが明らかになった。しかし、BrdU の取り込みや Ki67 マーカーの発現はほとんど観察されず、分裂細胞は存在するとしてもごく僅かであることが明らかになった。また、上皮細胞における Pax6 の発現は一過性であることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Shun Araki, Shinya Yamanaka, Hitoshi Inada, and Noriko Osumi
2. 発表標題 Pax6 is expressed in the choroid plexus and subcommissural organ (SCO) during brain development of juvenile mouse.
3. 学会等名 Annual meeting of SfN, Neuroscience 2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 稲田仁、荒木峻、山中慎也、大隅典子
2. 発表標題 細胞特異的Pax6欠損マウス(GFAP-cre;Pax6-floxマウス)における表現型の解析
3. 学会等名 次世代脳プロジェクト冬のシンポジウム2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hitoshi Inada, Kotaro Hiraoka, Shun Araki, and Noriko Osumi
2. 発表標題 Pax6 expression in the subcommissural organ during brain development of juvenile mice.
3. 学会等名 第42回日本神経科学会（新潟）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Laarni Grace Mauro Corales, Hitoshi Inada, and Noriko Osumi
2. 発表標題 Characterization of the subcommissural organ (SCO) in adult mouse.
3. 学会等名 第16回 成体脳ニューロン新生懇談会・「個性」創発脳共催研究会 in 仙台2020
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	大隅 典子 (Osumi Noriko) (00220343)	東北大学・医学系研究科・教授 (11301)	