

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14843

研究課題名(和文)新規三次元解析法による海馬神経ネットワーク形成におけるApc遺伝子の機能解明

研究課題名(英文)Elucidation of the function of Apc gene in the formation of hippocampal neural networks using a novel three-dimensional analysis method

研究代表者

尾之内 高慶(Onouchi, Takanori)

藤田医科大学・研究推進本部 オープンファシリティセンター・講師

研究者番号：20632954

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)：Adenomatous polyposis coli (APC) タンパク質は最初、癌抑制因子として発見された。APCタンパク質のC末端が欠損した変異APCタンパク質 (APC1638T) を発現するAPC1638Tマウスでは、 $\beta$ -カテニンの結合領域が保存されているので、癌は発生しない。本研究において私は、APC1638Tマウスの海馬神経細胞の構造解析を行った。APC1638Tマウスは、野生型APCマウスと比べて、海馬神経細胞の樹状突起が細く、c-Fos陽性神経細胞数が少なかった。APC1638Tマウスの海馬神経細胞の後シナプスにおいて、APCとPSD-95が共局在していなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

APCタンパク質は最初、癌抑制因子として発見されたので、腫瘍研究者の間に非常に関心が集まり、発癌に関する研究が今まで盛んに行われてきた。APCタンパク質は脳にも多く発現しているが、脳腫瘍の発生に関与していない。これまで、脳におけるAPCタンパク質の働きは、よく分かっていなかった。本研究より、海馬に発現するAPCが海馬神経ネットワーク形成に関与していることが示唆された。本研究に用いたAPC1638Tマウスは、統合失調症様行動を示す。APC1638Tマウスを使った研究は、統合失調症の発症メカニズムの解明に前進をもたらし、統合失調症の新たな治療法の開発につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：APC (adenomatous polyposis coli) was originally identified as a tumor suppressor protein. APC1638T mutation encodes truncated APC lacking the C-terminal domains. This mutation does not affect the  $\beta$ -catenin-regulating functional motifs. Accordingly, APC1638T mice are tumor-free. To determine the functional role of the C-terminus of APC in the hippocampal neural networks, we performed morphological analysis in APC1638T mice. In APC1638T mice, the hippocampal neuronal dendrites were thinner, c-Fos-positive nerve cells were lower than that in wild-type mice. APC and PSD-95 were colocalized at post-synaptic site in the hippocampus of wild-type mice, while not colocalized in APC1638T mice.

研究分野：神経形態学

キーワード：APC APC1638T 海馬 神経細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) *Adenomatous polyposis coli (Apc)* 遺伝子は、家族性大腸腺腫症(Familial adenomatous polyposis: FAP)の原因遺伝子として発見された大腸癌抑制遺伝子である。*Apc* 遺伝子は、2,843個のアミノ酸からなる APC タンパク質をコードしている。大腸癌は、*Apc* 遺伝子の変異により、Wnt シグナル系の構成因子である  $\beta$ -catenin と結合できない異常な APC タンパク質が産生され、Wnt シグナル系が異常に促進した結果、発生する。

(2) APC には、Asef,  $\beta$ -catenin, Axin, 微小管, EB1, DLG, PSD-95 などが結合する。APC は、それら結合分子との相互作用を通じて、細胞の増殖, 分化, 成熟, 移動, 接着, 極性形成に関与することが、培養細胞レベルの研究で明らかとなっていた。*Apc* 遺伝子は大腸のみならず、脳にも多く発現している。*Apc* 遺伝子変異と脳腫瘍発生の関連は証明されておらず、FAP 患者で脳腫瘍が発生しやすいという報告はなかった。

(3) 研究代表者らは、脳に発現する APC の癌抑制以外の機能を調べるために、癌抑制に関与しない 1,639 番目以降のアミノ酸が欠損した変異 APC(APC1638T)タンパク質を発現する APC1638T マウスを作製した(Onouchi et al., *Mol Brain*, 2014)。APC1638T には癌抑制に関わる  $\beta$ -catenin の結合領域があるので、APC1638T マウスは癌を発生せずに天寿をまっとうする。研究代表者らは、APC1638T マウスに統合失調症様行動(過活動, 不安様行動の低下, うつ様行動の亢進, 学習記憶障害)がみられ、海馬におけるドーパミン, ノルアドレナリン, セロトニン含有量が減少しており、海馬神経細胞のシナプス伝達機能が低下していることを見つけた。APC1638T マウスのこれらの所見は、統合失調症患者にみられる症状と一致しており、APC1638T マウスは統合失調症の研究に有用であることを報告した(Onouchi et al., *Mol Brain*, 2014)。

### 2. 研究の目的

(1) 神経細胞はシナプス構造で互いに連絡し合い、三次元の神経ネットワーク構造を形成している。2016年に理化学研究所の柯孟岑研究員らが、光学顕微鏡レベルでの組織切片の深部の超解像イメージングを可能とする組織透明化法(SeeDB2法)を開発した。そして、SeeDB2法で処理したマウス脳を用いて、光学顕微鏡レベルでの脳組織切片の深部の神経細胞の三次元構造やタンパク質の三次元局在を解析できることを実証した。本研究では、SeeDB2法で処理した生後8週齢の野生型 APC マウスと APC1638T マウスの脳を用いて、光学顕微鏡レベルでの海馬組織切片の深部の神経細胞の三次元構造解析を行い、両マウス間の違いを明らかにする。

(2) 2016年に研究代表者らは、1枚のホルマリン固定パラフィン切片上の同じ場所を共焦点レーザー顕微鏡と走査型電子顕微鏡の両方で観察するという光-電子相関顕微鏡法を開発した。この光-電子相関顕微鏡法を用いると、組織切片の表面の細胞の三次元構造やタンパク質の三次元局在を光学顕微鏡から電子顕微鏡レベルまで連続して解析できる。本研究では光-電子相関顕微鏡法を用いて、生後8週齢の野生型 APC マウスと APC1638T マウスの海馬組織切片の表面の神経細胞の三次元構造解析を行い、両マウス間の違いを明らかにする。

(3) PSD-95 は、後シナプス(樹状突起側のシナプス)に存在する APC 結合タンパク質である。APC は PSD-95 と結合できる。APC1638T は APC の C 末端が欠損している変異 APC であるので、APC1638T は PSD-95 と結合できない。本研究では免疫電顕法(Post-embedding)を用いて、野生型 APC マウスと APC1638T マウスの海馬の後シナプスにおける APC と PSD-95 の発現, 局在解析を行い、両マウス間の違いを明らかにする。

(4) 研究代表者らのこれまでの解析により、APC1638T マウスには学習記憶障害が見られたり、海馬神経細胞のシナプス伝達機能が低下していることが分かった。c-Fos は、興奮した神経細胞で急速かつ一過的に発現するタンパク質である。本研究では蛍光免疫染色法を用いて、生後8週齢の野生型 APC マウスと APC1638T マウスの海馬における c-Fos の発現解析を行い、両マウス間の違いを明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) SeeDB2法で処理した野生型 APC マウスと APC1638T マウスの脳を用いた、光学顕微鏡レベルでの海馬組織切片の深部の神経細胞の三次元構造解析

生後8週齢の正常マウスを4%パラホルムアルデヒド固定液で灌流固定して、脳組織を同

液で浸漬固定して、ピブラトームを用いて前頭断の脳組織切片(厚さ 100  $\mu\text{m}$ , 300  $\mu\text{m}$ , 1,000  $\mu\text{m}$ )を作製した。厚さ 100  $\mu\text{m}$ , 300  $\mu\text{m}$ , 1,000  $\mu\text{m}$  の脳組織切片を、SeeDB2 を開発した理化学研究所の柯孟岑研究員らの発表論文(Ke MT, et al, *Cell Rep.* 2016)に従って透明化処理を行い、厚さ 1,000  $\mu\text{m}$  の脳組織切片まで透明化できるか否かを調べた。

生後 8 週齢の野生型 APC マウスと APC1638T マウスを 4%パラホルムアルデヒド固定液で灌流固定して、脳組織を同液で浸漬固定して、ピブラトームで脳組織切片を作製した。脳組織透明化処理、神経細胞の核マーカーである NeuN や樹状突起マーカーである MAP2 を検出する蛍光免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で NeuN と MAP2 の発現を観察した。

(2) 光-電子相関顕微鏡法を用いた、野生型 APC マウスと APC1638T マウスの海馬組織切片の表面の神経細胞の三次元構造解析

神経細胞の核マーカーである NeuN と樹状突起マーカーである MAP2 を検出するパラフィン切片を用いた免疫染色を行うために、NeuN 抗原と MAP2 抗原の賦活条件や、抗 NeuN 抗体と抗 MAP2 抗体の希釈条件の検討を行った。生後 8 週齢の正常マウスを 4%パラホルムアルデヒド固定液で灌流固定して、脳組織を同液で浸漬固定した。脳組織をパラフィン包埋後、ミクロトームで厚さ 3  $\mu\text{m}$  のパラフィン切片を作製した。その後、抗原賦活条件として、未処理、酵素処理(ProK 処理)、加熱処理(pH6 のリン酸緩衝液で加熱、pH7 のリン酸緩衝液で加熱、pH8 の EDTA 溶液で加熱)を検討した。抗体希釈条件として、100 倍希釈、300 倍希釈、900 倍希釈を検討した。

海馬組織に存在する結合組織の除去方法を検討した。生後 8 週齢の正常マウスを 4%パラホルムアルデヒド固定液で灌流固定して、脳組織を同液で浸漬固定した。脳組織をパラフィン包埋して、ミクロトームで厚さ 3  $\mu\text{m}$  のパラフィン切片を作製した。未処理、60 分の 3%水酸化カリウム(KOH)水溶液で 10 分、60 分の 10%水酸化カリウム(KOH)水溶液で 10 分、60 分の 30%水酸化カリウム(KOH)水溶液で 10 分を検討した。

抗 NeuN 抗体と抗 MAP2 抗体を用いた蛍光免疫染色と、水酸化カリウム(KOH)水溶液を使った結合組織除去を、どちらを先に行った方が良いかを検討した。生後 8 週齢の正常マウスを 4%パラホルムアルデヒド固定液で灌流固定して、脳組織を同液で浸漬固定した。脳組織をパラフィン包埋して、ミクロトームで厚さ 3  $\mu\text{m}$  のパラフィン切片を作製した。その後、抗 NeuN 抗体と抗 MAP2 抗体を用いた蛍光免疫染色を先に行い、水酸化カリウム水溶液を用いた結合組織除去を後で行った。または、水酸化カリウム水溶液を用いた結合組織除去を先に行い、抗 NeuN 抗体と抗 MAP2 抗体を用いた蛍光免疫染色を後で行った。NeuN と MAP2 の発現を蛍光顕微鏡で観察した。

～ の検討後、野生型 APC マウスと APC1638T マウスの解析を行った。生後 8 週齢の野生型 APC マウスと APC1638T マウスを 4%パラホルムアルデヒドで灌流固定して、脳組織を同液で浸漬固定した。脳組織をパラフィン包埋して、ミクロトームで厚さ 3  $\mu\text{m}$  のパラフィン切片を作製した。海馬組織に存在する結合組織の除去後、光-電子相関顕微鏡解析を行った。光-電子相関顕微鏡解析は、同じ場所を光学顕微鏡と電子顕微鏡の両方で解析する方法である。抗 NeuN 抗体と抗 MAP2 抗体を用いた蛍光免疫染色を行い、染色切片を凍結乾燥させて、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。共焦点レーザー顕微鏡観察後、プラチナを用いた金属コーティングを行い、走査型電子顕微鏡で観察した。共焦点レーザー顕微鏡画像と走査型電子顕微鏡画像を合成した光-電子相関顕微鏡画像から、海馬神経細胞の樹状突起構造を観察した。

(3) 免疫電顕法を用いた、野生型 APC マウスと APC1638T マウスの海馬の後シナプスにおける APC と PSD-95 の発現,局在解析

生後 8 週齢の野生型 APC マウスと APC1638T マウスを 4%パラホルムアルデヒド+0.1%グルタルアルデヒド固定液で灌流固定して、海馬を細切した。4%パラホルムアルデヒド+0.1%グルタルアルデヒド固定液で浸漬固定後、1%四酸化オスミウム固定液で浸漬固定して、エタノール脱水、QY-1 置換、エポキシ樹脂包埋を行った。ウルトラミクロトームで厚さ 100nm の超薄切片を作製して、抗 APC 抗体と抗 PSD-95 抗体を用いた免疫電顕(Post-embedding)法を行い、透過型電子顕微鏡で APC と PSD-95 の発現,局在を観察した。APC と PSD-95 の抗原賦活条件、抗 APC 抗体と抗 PSD-95 抗体の抗体希釈条件は、研究代表者らの以前の研究で明らかとなった最適条件(APC と PSD-95 の抗原賦活条件は pH7 のリン酸緩衝液で加熱処理、抗 APC 抗体の希釈条件は 50 倍希釈、抗 PSD-95 抗体の希釈条件は 100 倍希釈)で実施した。

(4) 蛍光免疫染色法を用いた、野生型 APC マウスと APC1638T マウスの海馬における c-Fos の発現解析

生後 8 週齢の野生型 APC マウスと APC1638T マウスに電気刺激(0.6mA, 125V)を 1 秒間、インターバルを 30 秒間のサイクルを 10 サイクル行った。電気刺激終了から 2 時間後に、マウ

スに 4%パラホルムアルデヒド固定液で灌流固定して、脳組織を同液で浸漬固定した。ビブラトームで厚さ 70  $\mu\text{m}$  の脳組織切片を作製して、抗 c-Fos 抗体を用いた蛍光免疫染色を行った。抗 c-Fos 抗体は 3,000 倍希釈で使用した。染色切片を蛍光顕微鏡で観察して、海馬に発現する c-Fos 陽性細胞数を調べた。

#### 4. 研究成果

(1) SeeDB2 法で処理した野生型 APC マウスと APC1638T マウスの脳を用いた、光学顕微鏡レベルでの海馬組織切片の深部の神経細胞の三次元構造解析

生後 8 週齢の正常マウスの脳組織を、SeeDB2 を開発した理化学研究所の柯孟岑研究員らの発表論文(Ke MT, et al, *Cell Rep.* 2016)に従って透明化処理した結果、厚さ 100  $\mu\text{m}$ , 300  $\mu\text{m}$ , 1,000  $\mu\text{m}$  の切片が透明になった(図 1)。透明度は、厚さ 100  $\mu\text{m}$  の切片が最も高かった。

生後 8 週齢の野生型 APC マウスと APC1638T マウスの脳組織を透明化処理して、神経細胞の核マーカーである NeuN や樹状突起マーカーである MAP2 を検出する蛍光免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察したが、野生型 APC マウスと APC1638T マウスとも明瞭な神経細胞画像を得ることができなかった。明瞭な神経細胞画像を得ることができなかった原因は、脳組織への抗 NeuN 抗体と抗 MAP2 抗体の浸透や、観察に用いた共焦点レーザー顕微鏡の性能に原因があったと考えられた。

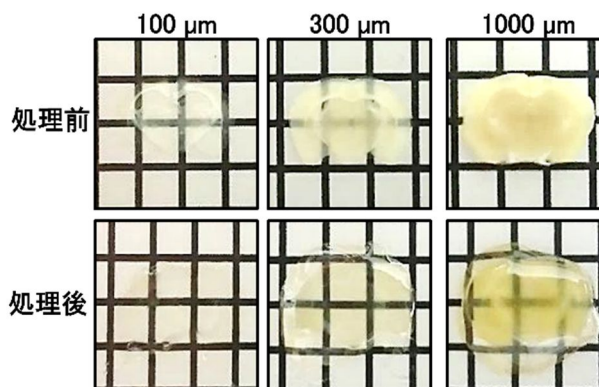


図 1 マウス脳の透明化

(2) 光-電子相関顕微鏡法を用いた、野生型 APC マウスと APC1638T マウスの海馬組織切片の表面の神経細胞の三次元構造解析

生後 8 週齢の正常マウスの脳組織のパラフィン切片を作製して、抗 NeuN 抗体と抗 MAP2 抗体を用いた免疫染色の条件検討を行った。抗原賦活条件として、未処理、酵素処理(ProK 処理)、加熱処理(pH6 のリン酸緩衝液で加熱, pH7 のリン酸緩衝液で加熱, pH8 の EDTA 溶液で加熱)を検討した。抗体希釈条件として、100 倍希釈, 300 倍希釈, 900 倍希釈を検討した。NeuN 抗原や MAP2 抗原を染色するには、pH6 のリン酸緩衝液での加熱処理が必要であった。抗 NeuN 抗体は 300 倍希釈、抗 MAP2 抗体は 900 倍希釈で用いると、非特異的な染色が少なく、明確に染色することができた。これらの結果から、NeuN 抗原や MAP2 抗原の抗原賦活処理は、pH6 のリン酸緩衝液での加熱処理が良いこと、NeuN 抗体は 300 倍希釈、抗 MAP2 抗体は 900 倍希釈で用いるのが良いということが分かった。

生後 8 週齢の正常マウスの脳組織のパラフィン切片を作製して、マウス海馬の結合組織の除去方法を検討した。未処理, 60 分の 3%水酸化カリウム(3% KOH)水溶液で 10 分, 60 分の 10%水酸化カリウム(10% KOH)水溶液で 10 分, 60 分の 30%水酸化カリウム(30% KOH)水溶液で 10 分を検討した。未処理, 60 分の 3%水酸化カリウム(3% KOH)水溶液で 10 分は、神経細胞の樹状突起と思われる線維が不明瞭であった。60 分の 10%水酸化カリウム(10% KOH)水溶液で 10 分は、未処理や 60 分の 3%水酸化カリウム(3% KOH)水溶液で 10 分と比べて、神経細胞の樹状突起と思われる線維が明瞭であった。60 分の 30%水酸化カリウム(30% KOH)水溶液で 10 分では、組織の破れが多くみられた。これらの結果から、厚さ 3  $\mu\text{m}$  のマウス海馬のパラフィン切片における結合組織の除去には、60 分の 10%水酸化カリウム(10% KOH)水溶液で 10 分が良いということが分かった(図 2)。

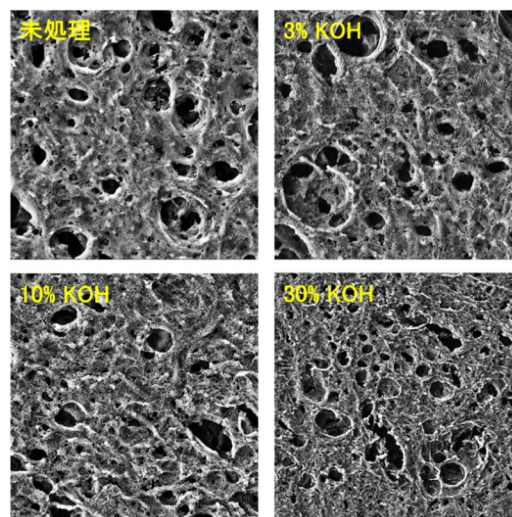


図 2 マウス海馬の結合組織の除去

生後 8 週齢の正常マウスの脳組織のパラフィン切片を作製して、抗 NeuN 抗体と抗 MAP2 抗

体を用いた蛍光免疫染色と、60 歳の 10%水酸化カリウム(10% KOH)水溶液で 10 分の結合組織除去を、どちらを先に行った方が良いか検討した。蛍光免疫染色後に結合組織除去を行うと、蛍光染色の陽性シグナルが低下した。結合組織除去後に蛍光免疫染色を行うと、蛍光染色の陽性シグナルの低下はみられなかった。また、結合組織が除去されたことにより、蛍光染色の陽性シグナルが鮮明になった。これらの結果から、結合組織除去後に蛍光免疫染色を行うのが良いということが分かった。

生後 8 週齢の野生型 APC マウスと APC1638T マウスの脳組織のパラフィン切片を作製して、60 歳の 10%水酸化カリウム(10% KOH)水溶液で 10 分の結合組織除去を行い、光-電子相関顕微鏡解析を行った。光-電子相関顕微鏡解析とは、同じ場所を光学顕微鏡と電子顕微鏡の両方で解析する方法である。抗 NeuN 抗体と抗 MAP2 抗体を用いた蛍光免疫染色を行い、染色切片を凍結乾燥させて、NeuN と MAP2 の発現を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。共焦点レーザー顕微鏡観察後、プラチナを用いた金属コーティングを行い、樹状突起の構造を走査型電子顕微鏡で観察した。共焦点レーザー顕微鏡画像と走査型電子顕微鏡画像を合成した光-電子相関顕微鏡画像を作成した。解析の結果、APC1638T マウスは野生型 APC マウスと比べて、海馬における神経細胞の樹状突起の走行密度が低く、太さが細いということが分かった。

(3) 免疫電顕法を用いた、野生型 APC マウスと APC1638T マウスの海馬の後シナプスにおける APC と PSD-95 の発現,局在解析

生後 8 週齢の野生型 APC マウスと APC1638T マウスの海馬組織の超薄切片を作製して、抗 APC 抗体と抗 PSD-95 抗体を用いた免疫電顕(Post-embedding)法を行い、透過型電子顕微鏡で APC と PSD-95 の発現,局在を観察した。野生型 APC マウスの海馬の後シナプス(樹状突起側のシナプス)では、APC と PSD-95 が共局在していた。しかし、APC1638T マウスの海馬の後シナプスでは、APC と PSD-95 は発現していたが、共局在していなかった。野生型 APC マウスと APC1638T マウスでは、海馬の後シナプスにおける APC と PSD-95 の局在が違うということが分かった。

(4) 蛍光免疫染色法を用いた、野生型 APC マウスと APC1638T マウスの海馬における c-Fos の発現解析

生後 8 週齢の野生型 APC マウスと APC1638T マウスに電気刺激を与えて、電気刺激終了から 2 時間後に、脳組織を摘出して、ピプラトームで脳組織切片を作製した。抗 c-Fos 抗体を用いた蛍光免疫染色を行い、海馬に存在する c-Fos 陽性細胞数を調べた。APC1638T マウスは野生型 APC マウスと比べて、海馬に存在する c-Fos 陽性細胞数が少ないということが分かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Li Chenguang, Onouchi Takanori, Hirayama Masaya, Sakai Kazuyoshi, Matsuda Shuji, Yamada Nami O., Senda Takao	4. 巻 54
2. 論文標題 Morphological and functional abnormalities of hippocampus in APC1638T/1638T mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology	6. 最初と最後の頁 31 ~ 40
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00795-020-00257-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirayama Masaya, Onouchi Takanori, Shiogama Kazuya, Katoh Yoshimitsu, Takahashi Kazuo, Abe Masato	4. 巻 71
2. 論文標題 Visualization of three-dimensional stigmoid body in FFPE and ultrathin sections of mouse	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microscopy	6. 最初と最後の頁 87 ~ 92
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jmicro/dfab052	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 李晨光、尾之内高慶、平山将也、酒井一由、松田修二、山田名美、千田隆夫
2. 発表標題 APC1638Tマウスの海馬における形態学的・機能的異常
3. 学会等名 第52回日本臨床分子形態学会総会・学術集会
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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------