

平成 22 年 5 月 26 日現在

研究種目：若手研究 B

研究期間：2008 ~ 2009

課題番号：20700291

研究課題名（和文）：大脳皮質 GABAニューロンとオリゴデンドロサイト前駆細胞の分化制御機構の解析

研究課題名（英文）：Analysis of differentiation system in cerebral GABAergic neuron and oligodendrocyte progenitors.

研究代表者：

江角 重行 (ESUMI SHIGEYUKI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：90404334

研究成果の概要（和文）： GABAニューロンとオリゴデンドロサイトの発生運命を調べるため、GAD67-creノックインマウスを用いて解析したところ、99.9%以上のGABAニューロン様の形態を持つ細胞と少数のグリア細胞が認められた。この結果はグリア細胞マーカーとGABAニューロンマーカーを共発現する細胞も、最終的にはGABAニューロンに分化していることを示唆している。しかしながら、GABAニューロン前駆細胞は全て同じ性質を持っているのではなく、一部ではグリア細胞に分化するポテンシャルを秘めた細胞が存在することがわかった。

研究成果の概要（英文）： GABAergic neurons and oligodendrocyte share many characters in the forebrain development. Both cell types have been reported to originate in the medial ganglionic eminence and migrate to the neocortex. Previously, it has been reported that GABAergic neuron progenitors express not only of GABAergic neuron markers but also ones of oligodendrocytes progenitors, such as NG2 and CNP (Belachew et al., 2003; Aguirre et al., 2004; Dayer, et al., 2005). Moreover, NG2/Olig2 positive glial progenitors generate both oligodendrocyte and astrocyte in the developing forebrain using NG2creBAC transgenic mouse (Zhu et al., 2008) and Olig2-CreER knock-in mouse (Ono et al., 2008). These previous data raise a possibility that some GABAergic neuron progenitors produce glial cells in the developing forebrain. To test this possibility, here we have performed immunohistochemistry, single-cell RT-PCR, single-cell microarray analysis and immunocytochemistry analyses with glial markers in GAD67-GFP positive cells from GAD67-GFP knock-in mouse brain. As a result, we found that the neuronal markers and glial markers are co-localized in the GAD67-GFP-positive cells at mRNA and protein level. To further investigate cell lineage(s) from GABAergic neuron progenitors in vivo and in vitro, we utilized GAD67-Cre knock-in mice and Z/EG reporter mice. As a result, we found that the neuronal markers and glial markers are co-localized in the GAD67-GFP-positive cells at mRNA and protein level. Finally, to investigate GAD67 lineage in vivo and in vitro, we utilized GAD67-Cre knock-in mice and Z/EG reporter mice. We observed the most of

recombined GFP positive cells were GABAergic neuron, but a few cells were oligodendrocyte and astrocyte. At present, we can not completely rule out the possibility that leaky or weak expression of GAD67 gene occur in the small subset of glial progenitors during cell-type specification.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：神経科学一般

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：分子・細胞神経科学

1. 研究開始当初の背景

大脳皮質は記憶、認知、判断といった高次脳機能が発現されるきわめて重要な働きを担う部位である。大脳皮質の神経細胞は興奮性のグルタミン酸ニューロンと抑制性のGABAニューロンの二種類の細胞によって構成されており、その数は厳密に調節されている。大脳皮質のGABAニューロンは主に内側基底核原基に由来しており、産生されたGABAニューロンは、接線方向に移動して大脳皮質に加わると考えられている。また、近年の報告からGABAニューロンはオリゴデンドロサイトと共通の前駆細胞を起源としていることが示されている。

我々はGAD67ノックインマウスを用いた単一神経細胞レベルの解析から、生後0日目のマウス大脳皮質の脳室下帯にGABAニューロンマーカーとオリゴデンドロサイトマーカーを発現する前駆細胞が存在することを見出した。そこで、GABAニューロンとオリゴデンドロサイトの分化制御機構を解析するため、このGABAニューロンとオリゴデンドロサイト共通の前駆細胞に注目し、異なった分化段階にある前駆細胞を分類し、その増殖過程や分化制御過程の分子基盤を明らかにするするという着想に至った。

2. 研究の目的

我々の最近の研究で、大脳皮質の脳室下帯のGAD67を発現する細胞のうち約2割がオリゴデンドロサイトマーカーの発現と共存することが分かった。申請者らはこの細胞は、GABAニューロンとオリゴデンドロサイトを生み出せる共通の前駆細胞であると考えている。本研究では、この前駆細胞を異なる分化段階ごとに、単一細胞マイクロアレイで解析し、その増殖過程や分化制御の分子基盤を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1)単一細胞マイクロアレイ法

蛍光マーカーで標識された細胞を倒立顕微鏡下で単離し、我々がこれまでに開発した単一細胞マイクロアレイ法を用いてcDNAを増幅して、発現プロファイリングを解析した。

(2)セルソーターを用いた解析

蛍光マーカーで標識された細胞をセルソーターを用いて単離しBrdUを含む培地で数日間培養を行う。その後、免疫組織化学染色を行って解析することで、ソーティングされた細胞に含まれる分裂能を持った細胞の比率や分裂後の形態を解析した。

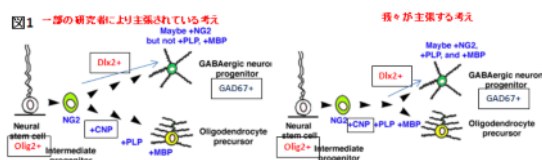


図1 一部の研究により主張されている考え (blue) と我々が主張している考え (red)。

(3) GAD67 発現細胞の細胞運命の解析

新潟大学脳研究所の崎村建司先生より GAD67-cre ノックインマウスを供与していただき、生後一ヶ月齢の GAD67-cre ノックインマウスを用いて免疫組織化学染色を行うことで、GAD67 発現細胞の細胞運命を解析した。

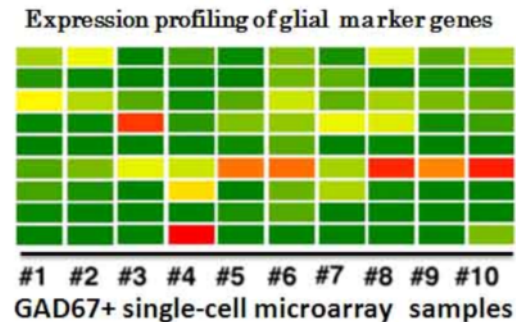
(4) 初代培養を用いた GAD67 発現細胞の分化能の解析

生後 2 日齢の GAD67-cre ノックインマウスより、脳組織を単離し、初代分散培養系を用いて in vitro で 1 週間培養し、その後免疫組織化学染色を行って、その分化能を解析した。

4. 研究成果

(1) 単一細胞マイクロアレイ法による解析

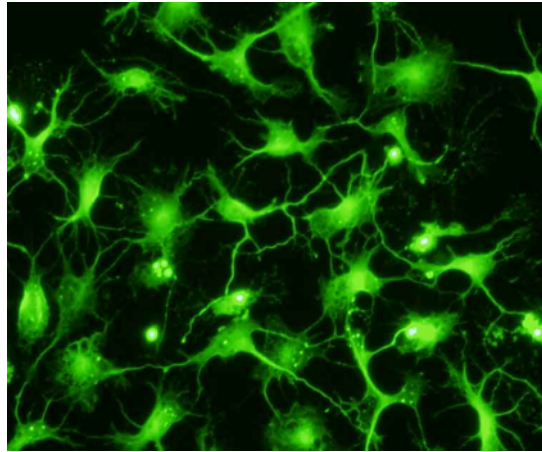
生後 0 日目の GAD67-GFP ノックインマウスより単離した GAD67 陽性細胞を用いて単一細胞マイクロアレイを行い GABA ニューロンの発現プロファイリングを調べたところ、GABA ニューロンに特徴的な遺伝子群に強いシグナルを認めることができた。一方グルタミン酸ニューロンを特徴づける遺伝子の発現シグナルは弱かった。また、解析した 10 細胞のうち複数の細胞で GABA ニューロンマーカーだけでなく、グリア細胞マーカーを発現している細胞が認められた。



(2) セルソーターを用いた解析

GAD67-GFP ノックインマウスの胎生 12.5 日目の内側基底核原基と生後 0 日目のマウス大脳皮質の GFP 陽性細胞をセルソーターを用いて単離し、その分裂能を解析した結果、どちらの細胞群においても、分裂能を含む GFP 陽性細胞が存在することが明らかになった。驚くべきことに胎生 12.5 日目の内側基底核原基を由来とする GFP 陽性細胞は生後 0 日目の大脳皮質を由来とする GFP 陽性細胞と比べ、約 50 倍以上の分裂能を保持していた。この結果は、GABA ニューロンが分化した直後は、まだ分裂能を保持した細胞が多数存在しており、これらの細胞が GABA ニューロンとオリゴデンドロサイト生み出せる共通の前駆

細胞であると考えられる。



E12.5 内側基底核原基由来の GAD67-GFP 陽性細胞をソーティングし、4 日間の培養後の写真

(3) GAD67 発現細胞の細胞運命の解析

新潟大学脳研究所の崎村建司先生より GAD67-cre ノックインマウスを供与していただき、GAD67-cre ノックインマウスとレポーターマウスを掛け合わせて、GAD67 遺伝子発現細胞の細胞系譜の解析を行った結果、生後 1 か月齢マウスの大脳皮質においては、GFP 陽性細胞の 99.9%以上は GABA ニューロン様の形態を持つ細胞であった。しかしながら腹側大脳皮質では、少数の S100 陽性のアストロサイトが認められた。さらに、脳梁や、大脳脚、視床において少数の APC 陽性、MBP 陽性のオリゴデンドロサイトや NG2 陽性のオリゴデンドロサイト前駆細胞が認められた。

(現在論文準備中)

(4) 初代培養を用いた GAD67 発現細胞の分化能の解析

上記(3)と同じマウスを用いて初代培養実験を行ったところ、GFP 陽性細胞のほとんどは神経細胞に分化していたが一部の細胞はオリゴデンドロサイトやアストロサイトに分化していた。また、興味深いことに線条体由来の GFP 陽性細胞は背側大脳皮質由来の細胞に比べ、グリア細胞に分化しやすいことがわかった。これは、同じ GAD67 遺伝子発現細胞の細胞系譜であっても、細胞を分化させるポテンシャルは部位特異的に異なっているためであると考えられる

以上の結果をまとめると、GABA ニューロン前駆細胞は完全に同じ性質を持っているのではなく、一部はグリア細胞に分化するポテンシャルを秘めており、その細胞は部位特異的に存在していることを示唆している。(現在論文準備中)

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2件)

The protocadherin-alpha family is involved in axonal coalescence of olfactory sensory neurons into glomeruli of the olfactory bulb in mouse.

Hasegawa S, Hamada S, Kumode Y, Esumi S, Katori S, Fukuda E, Uchiyama Y, Hirabayashi T, Mombaerts P, Yagi T
Molecular and Cellular Neuroscience, 2008, 38(1)66-79 (査読有り)

Method for single-cell microarray analysis and application to gene-expression profiling of GABAergic neuron progenitors.

Esumi S, Wu SX, Yanagawa Y, Obata K, Sugimoto Y, Tamamaki N.
Neuroscience Research, 2008, 60(4)439451 (査読有り)

[学会発表](計3件)

第32回日本神経科学学会大会

2009年9月16日 名古屋国際会議場

渡辺啓介、竹林浩秀、江角重行、玉巻信章

“グルタミン酸作動性神経細胞系譜に特異的に発現する遺伝子の検索”

第38回北米神経科学学会(The 38th annual meeting of Society for Neuroscience.)

2008年11月15日 ワシントン DC コンベンションセンター, ワシントン DC, USA

”Intermediate GABAergic - neuron progenitors express neuronal-markers and proliferate in the mouse neocortex”

Wu SX, Esumi S, Watanabe K, Nakamura K, Nakamura K, Tamamaki N

第31回日本神経科学学会大会

2008年9月16日 東京国際フォーラム

江角重行、中村和弘、武勝昔、柳川右千夫、玉巻伸章

“In vitro における GABA ニューロン前駆細胞の分裂能の解析”

[その他]

ホームページ等

http://srv02.medic.kumamoto-u.ac.jp/dep/morneuro/mem_esum.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

江角 重行 (ESUMI SHIGEYUKI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：90404334