

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16111

研究課題名(和文) 脳幹における抑制性神経細胞の発生

研究課題名(英文) Distribution of inhibitory neurons during development in the brain stem

研究代表者

小林 しおり (Kobayashi, Shiori)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・特命助教

研究者番号：60747905

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)：脳の情報を伝える神経伝達物質には興奮性と抑制性がある。抑制性伝達物質として、-アミノ酪酸(GABA)とグリシンが知られている。本研究ではその中でも成体の脊髄と脳幹において主要で、知見の少ないグリシン作動性ニューロンに焦点を当て、抑制性ニューロンが胎生初期から生後にかけてどのように分化し移動するのか調べた。GEPとtdTomato 2つの蛍光タンパク質を用いて、GABAニューロンとグリシンニューロンを別々の色で可視化することで、これらのニューロンの胎生期から出生後にかけての発生・移動を調べた。その結果、GABAニューロンは胎齢10日目から、グリシンニューロンは胎齢12日目から現れることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グリシンニューロンに関して、その細胞体がどこから発生するのかなど詳細な情報はこれまで得られていなかった。本研究では、個々の細胞を可視化することで発達に伴う細胞分化と移動を調べるという点で、抑制性神経の研究に貢献した。また、GABAとグリシンは単なる抑制性伝達物質というだけでなく、呼吸機能や神経再生などにも重要な役割を担っていることが近年明らかになってきた。このようなGABAとグリシンニューロンの起源を探り、その相互関係を追うことは、非常に意義深い。

研究成果の概要(英文)：Glycine has a role as an inhibitory neurotransmitter in the adult vertebrate nervous system. While its role in adult neurotransmission is relatively well characterized, less is known about glycinergic signaling during development. In this study, we investigated how inhibitory neurons differentiate and migrate from early embryonic to postnatal stages. As a result, GABAergic neurons were found to appear from day 10 of embryonic days, and glycinergic neurons from day 12 of embryonic days in the brainstem of mouse.

研究分野：神経解剖学

キーワード：抑制性神経細胞 グリシンニューロン GABAニューロン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の脳の抑制性神経伝達物質として、 γ -アミノ酪酸(GABA)とグリシンが知られている。特に成体の脊髄と脳幹において、グリシンは主要な抑制性伝達物質である。近年、GABA 合成酵素(GAD65/67)の欠損マウスは生直後に死亡するが、神経終末に存在し細胞外に放出されたグリシンを再び取り込むグリシントランスポーター2(GlyT2)の欠損マウスは生後2週間後に死亡することがわかっており、これら2つの抑制性神経伝達物質の働きが異なることが示唆されてきた。これまでに、GADとGlyT2を指標として、脊髄や視床下部におけるGABA作動性神経終末とグリシン作動性神経終末の発達を、免疫組織学的手法を用いて明らかにしてきた結果、胎生期にGABA作動性神経終末が発現を開始し、やがてGABA/グリシン共放出終末になり、前角では、生後にグリシン作動性神経終末に変化することを明らかにした。さらに、プルキンエ細胞から小脳核へのGABA作動性入力を消失させたコンディショナルノックアウトマウスでは、生後の小脳核におけるグリシン作動性神経を含めた抑制性神経回路の形成が影響を受けることを形態的に明らかにした。

胎生初期から生後にかけて、GABA及びグリシンニューロンがどのように分化し、移動するのか、また両者がどのように関わりあってくるのか、ほとんど明らかにされていない。特に、グリシンは、運動ニューロン、脊髄・脳神経反射に重要な働きをしていることがわかっているにも関わらず、胎生期のグリシンニューロンの発生・移動については情報が皆無である。終末レベルの解析では、GABA/GABA/グリシン/グリシンと変化することを明らかにしたが、細胞レベルでは、脳室層のどこから発生し、どの段階で伝達物質を変えるかなど、抑制性ニューロンの発生過程に関する知見はほとんどない。

2. 研究の目的

本研究では、GFPとtdTomatoの2つの蛍光タンパク質を用いて、GABAニューロンとグリシンニューロンを同時に別々の色で可視化することで、脳幹におけるこれらのニューロンの胎生期から出生後にかけての発生・移動を詳細に調べ、ニューロンならびに軸索末梢の両方、抑制性神経回路の発達過程を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) GAD67-GFP ノックインマウス

GAD67-GFP ノックインマウスは、GABAニューロンに緑色蛍光タンパク質(GFP)が発現し、GABAニューロンを可視化して確認することができる。胎齢(E)10日目から生後(P)21日目までの脳幹におけるGABAニューロンの発生過程を明らかにするために、GAD67-GFP ノックインマウスの凍結精子から個体を作出し、ヘテロオスマウスとC57BL/6Jメスマウスを交配させ、胎生期の10日目、12日目、13日目、14日目、15日目、16日目、18日目にかけてサンプリングを行った。

(2) GlyT2-Cre/VGAT-stop-tdTomato ダブルトランスジェニックマウス

グリシンニューロンの発生過程を調べるために、グリシンニューロン特異的に蛍光タンパク質を発現するトランスジェニックマウスを作製した。具体的には、グリシンニューロンにCre活性が起きるGlyT2-Creノックインマウスと、Creの存在下で抑制性ニューロン特異的に赤色蛍光タンパク質(tdTomato)を発現するVGAT-stop-tdTomatoレポーターマウスをそれぞれ繁殖させて交配させることで、GlyT2-Cre/VGAT-stop-tdTomatoダブルトランスジェニックマウスを作製した。このマウスでは、グリシンニューロンが標識され、グリシン作動性神経回路を可視化できる。GlyT2-tdTomatoダブルトランスジェニックマウスを胎生期の10日目、12日目、13日目、14日目、15日目、16日目から出生後0日目、4日目、28日目(成体)にかけてサンプリングを行い、脳幹の凍結切片を作製した。共焦点顕微鏡を用いて切片を観察し、発達過程におけるグリシンニューロンの発生・移動を調べた。

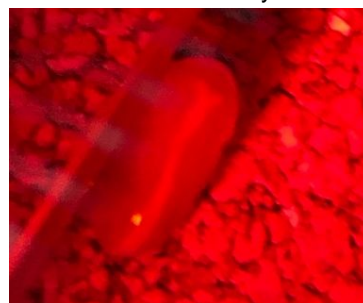


図1 GlyT2-tdTomato マウス

4. 研究成果

(1) GABAニューロンは胎齢10日目から脊髄を中心に発現した。その後胎齢12日目には顔面神経核を除き延髄全体に密集して発現した。胎齢14日目では舌下神経核や三叉神経脊髄路核に特に多くGABAニューロンが見られた。胎齢16日目では特に三叉神経脊髄路核にGABAニューロンが多く見られた。これらの結果はInternational journal of molecular sciencesに掲載された。

(2)胎齢12日の個体の脊髄にいくつかグリシンニューロンが発現していることがわかった。その後胎齢14日から15日にかけて急激に脊髄と延髄でグリシンニューロンが増加した。特に胎生初期では散在していたニューロンがいくつかの神経核に集合し、局在していた。胎齢15日目に三叉神経脊髄路核や孤束核に特に密集してニューロンが見られた。胎齢18日目には内側前庭核と三叉神経脊髄路核などに集中してグリシンニューロンが見られた。胎齢18日以降、ニューロンの局在は変化しないことから、この

時期までにある程度グリシンニューロンの移動が完了したと考えられる。生後は胎齢期ほど密集してグリシンニューロンは見られなかった。

(3)過去の研究から、免疫組織化学的手法を用いて GABA 作動性神経終末とグリシン作動性神経終末の発達を調べてきた結果、胎生期では GABA 作動性神経終末が発現を開始し、やがて GABA とグリシンの共放出終末になり、前角では、生後にグリシン作動性神経終末に変化することがわかってきた。今回の結果において、胎齢 10 日目頃に GABA ニューロンが発現し、GABA ニューロンが増加して移動を始める胎齢 12 日目にグリシンニューロンが発現した。GABA ニューロンは胎齢 15 日、グリシンニューロンは胎齢 18 日に遅れて移動が完了すると考えられる。

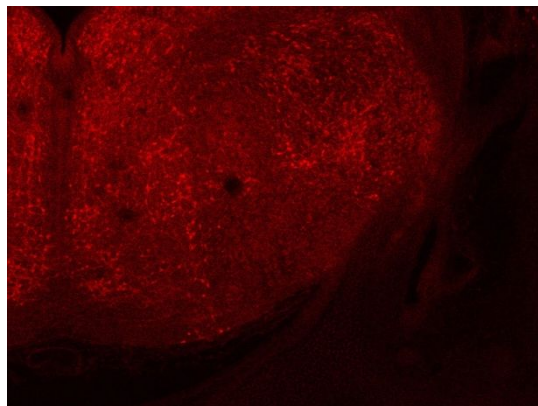


図 2 胎齢 15 日目の延髄におけるグリシンニューロンの局在

(4)今後の展望として、本研究では脳幹全体におけるグリシンニューロンの局在を調べたため、個々の神経核における局在の変化まで詳細に追えなかった。今後はいくつかの神経核に的を絞って、胎齢期の発達や生後発達におけるグリシンニューロンの分化や移動を調べる必要がある。さらに、発生過程において GABA ニューロンとグリシンニューロンのがどのように関わりを持つか解析する。方法としては、GAD67-GFP マウスと GlyT2-Cre/VGAT-stoptdTomato マウスを交配させ、ダブルレポーターマウス GAD67GFP/GlyT2Tomato マウスを作製する。GABA ニューロンは GFP、グリシンニューロンは tdTomato で標識され、発生過程における相互関係を追うことができる。

(5)抑制性ニューロンの発生についての研究はこれまで GABA ニューロンがほとんどであった。本研究のように、GABA 及びグリシンニューロン両者の発生とその関係性に着目した研究はこれまでになく、特に生命維持に必要不可欠な領域である脳幹における発生過程は、機能的な解析を進めるうえでも必要性が高く、波及効果が高い。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Chigusa Shimizu-Okabe, Shiori Kobayashi, Jeongtae Kim, Yoshinori Kosaka, Masanobu Sunagawa, Akihito Okabe, Chitoshi Takayama.	4. 巻 23
2. 論文標題 Developmental Formation of the GABAergic and Glycinergic Networks in the Mouse Spinal Cord.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International journal of molecular sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23020834	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Shiori Kobayashi, Chigusa Shimizu-Okabe, Jeongtae Kim, Yoshinori Kosaka, Masanobu Sunagawa, Akihito Okabe, Chitoshi Takayama	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 750
3. 書名 Factors Affecting Neurodevelopment - Genetics, Neurology, Behavior, and Diet	

〔産業財産権〕

〔その他〕

http://molanatomy.blogspot.com

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
---------	---------