

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月12日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22390036

研究課題名（和文）kirrel ファミリーによる神経回路網形成の制御と高次脳機能

研究課題名（英文）The kirrel family regulates neural circuits formation and higher brain functions.

研究代表者

森川 吉博 (MORIKAWA YOSHIHIRO)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60230108

研究成果の概要（和文）： kirrel3 の高次脳機能における役割を検討するため、kirrel3 欠損マウスを作製し、そのヘテロマウスを用いて中枢神経系や感覚器系における詳細な発現解析を行った。その結果、kirrel3 が生後の発達過程の脳や網膜、嗅上皮等に強く発現していることを見いだした。成獣の脳では、嗅覚（嗅球、嗅皮質、扁桃体）-大脳辺縁系（海馬、線条体、前頭前皮質）回路、聴覚路、小脳-前庭系回路等に強い発現がみられた。また kirrel3 欠損マウスの行動学的解析の結果、新規環境における行動異常が認められたことから、kirrel3 が神経回路の形成とその機能の維持に重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）： To gain insights into the role of kirrel3 in the brain, we investigated the expression pattern of kirrel3 in the sensory organs and brain using *kirrel3-lacZ* knockin mice. The intense expression of kirrel3 was observed in the brain, retina, and olfactory epithelium during postnatal stages. In the adult brain, kirrel3 was intensely expressed in the olfactory-limbic, auditory, and vestibulo-cerebellar circuits. In addition, we observed that kirrel3-knockout mice displayed increased locomotor activities in a novel environment. These results suggest that kirrel3 plays important roles in the formation and maintenance of neural circuits in the brain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2011年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2012年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：細胞接着因子、免疫グロブリンスーパーファミリー、脳、神経細胞、シナプス

1. 研究開始当初の背景

神経系の発生過程において機能する細胞接着因子として、免疫グロブリンスーパーファミリー (IgSF) は最も大きなファミリーを形成しているが、一部の分子以外については十分な知見が得られていない。IgSF のメンバ

ーである *kirre* はショウジョウバエの筋組織の発生過程において必須であることが報告されているが、神経系における役割は不明である。我々は SST-REX 法 (Kojima and Kitamura, Nat Biotechnol, 1999) を用いて *kirre* のマウスホモログである *kirrel3* をクローニング

し(Ueno et al, Nat Immunol, 2003)、神経系における発現を検討してきた。その結果、kirrel3 は感覚系の神経回路を形成している神経核の神経細胞で発現し、ホモフィリックな結合のみならず、ネフリンとのヘテロフィリックな結合を示唆する発現パターンを示した(Morikawa et al., Neuroscience, 2007)。

2. 研究の目的

マウスの kirrel3 の遺伝子座に核移行シグナルを付加したβ-ガラクトシダーゼを挿入することにより kirrel3 欠損マウスを作製し、そのヘテロ欠損マウスを用いて、kirrel3 の正確な時間的・空間的発現を検討する。また、二重免疫染色法により kirrel3 発現細胞を同定する。さらに、kirrel3 発現細胞の関連していた神経回路に異常がないかを野生型マウス、ヘテロ欠損マウス、ホモ欠損マウスを用いて、組織学的・行動学的に解析することにより、kirrel3 が神経回路網形成と高次脳機能の制御に関与するメカニズムを解明する。

3. 研究の方法

(1) kirrel3 の発達過程、及び成獣神経系における発現解析

kirrel3 ヘテロ欠損マウスの感覚器組織や脳組織から切片を作成し、LacZ 染色により kirrel3 の発現パターンを検討した。

(2) 発達過程、及び成獣神経系における kirrel3 発現細胞の同定

kirrel3ヘテロ欠損マウスの感覚器組織や脳組織から切片を作成し、β-ガラクトシダーゼに対する抗体と種々の細胞のマーカー分子に対する抗体を用いた二重免疫染色法により kirrel3発現細胞を同定した。

(3) kirrel3 ホモ欠損マウスの組織学的解析

野生型、及び kirrel3 ホモ欠損マウスの感覚器組織や脳組織から切片を作成し、HE 染色、及び神経細胞のマーカーである NeuN やシナプスマーカーである synaptophysin、PSD-95、VGLUT1 などに対する抗体を用いた免疫染色法により組織学的異常の有無を検索した。

(4) kirrel3 ホモ欠損マウスの行動学的解析

野生型、及び kirrel3 ホモ欠損マウスの高次脳機能の異常の有無を、視覚性前肢置き直しテスト、嗅覚性埋没餌探索テスト、聴覚テスト、24時間ホームケージ活動テスト、オープンフィールドテスト、高架式十字迷路テスト、明暗選択テスト、ロータロッドテスト、受動的回避テスト、音声驚愕反応テスト、超音波音声解析テスト等により検討した。

4. 研究成果

(1) kirrel3 の発達過程、及び成獣神経系に

おける発現

①成獣神経系における kirrel3 の発現

kirrel3 ヘテロ欠損マウスを用いて、成獣神経系における kirrel3 の発現を LacZ の発現レベルを指標に検討したところ、嗅覚路(嗅球、嗅皮質、扁桃体)、聴覚路(蝸牛神経節、下丘、内側膝状体、聴覚皮質)、大脳辺縁系(海馬、線条体、前頭前皮質)、小脳などにおいて強い発現が認められた(図1)。

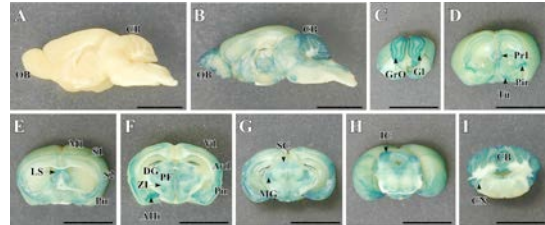


図1 kirrel3 ヘテロ欠損マウス(B-I)、及び野生型マウス(A)の脳の LacZ 染色(A,B; 矢状断面、C-I; 冠状断面)。スケールバーは5 mm (A-I)。

さらに kirrel3 ヘテロ欠損マウスの組織切片を用いた LacZ 染色により kirrel3 の発現を詳細に検討した結果、海馬では歯状回の顆粒細胞層に強く、大脳皮質では、嗅皮質、聴覚皮質の神経細胞に広く LacZ の発現がみられたのに対して、前頭前皮質、運動皮質、視覚皮質、一次体性感覚皮質では II 層と V 層に発現が多く認められた(図2)。

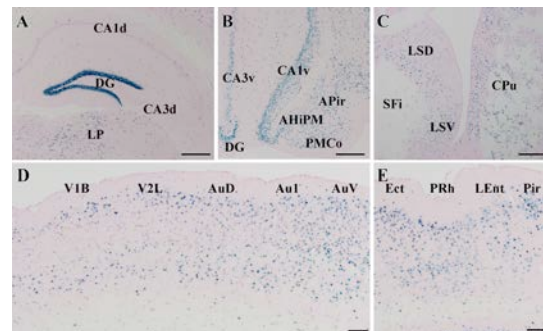


図2 kirrel3 ヘテロ欠損マウスの海馬(A, B)、中隔(C)、大脳皮質(D, E)における LacZ 染色。スケールバーは 200 μm (A-C)、100 μm (D,E)。

嗅球では嗅神経層を除く全層に、線条体では腹側に多く発現を認めた(図3)。小脳皮質では、分子層及び顆粒細胞層に広く LacZ の発現がみられた。一方、プルキンエ細胞層では、後葉、片葉小節葉(前庭性小脳)のごく一部の細胞にのみ発現がみられた(図4)。

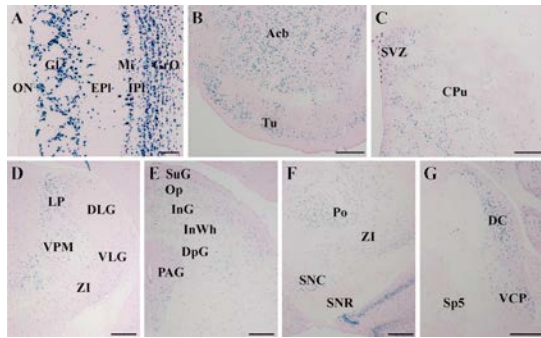


図3 kirrel3 ヘテロ欠損マウスの嗅球(A)、線条体(B, C)、視床(D)、上丘(E)、黒質(F)、蝸牛神経核(G)における LacZ 染色。スケールバーは 100 μ m (A)、200 μ m (B-G)。

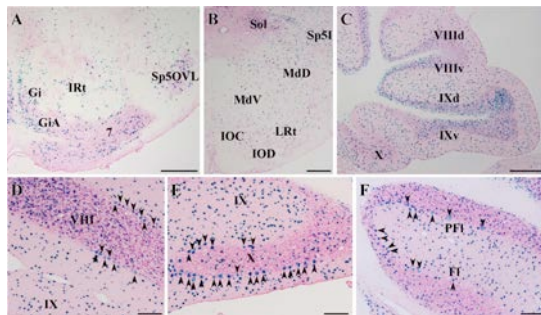


図4 kirrel3 ヘテロ欠損マウスの延髄(A, B)、小脳(C-F)における LacZ 染色。スケールバーは 200 μ m (A-C, F)、100 μ m (D, E)。

②発達過程の神経系における kirrel3 の発現

kirrel3 ヘテロ欠損マウスを用いて、発達過程の脳における LacZ の発現を検討した結果、胎生 9.5 日齢で後脳の神経上皮の辺縁層において発現を認め、嗅球、線条体、大脳皮質、小脳では胎生 13.5 日齢から、海馬では胎生 17.5 日齢から、主に分化した神経細胞が分布する部位に発現を認めた(図 5、6)。

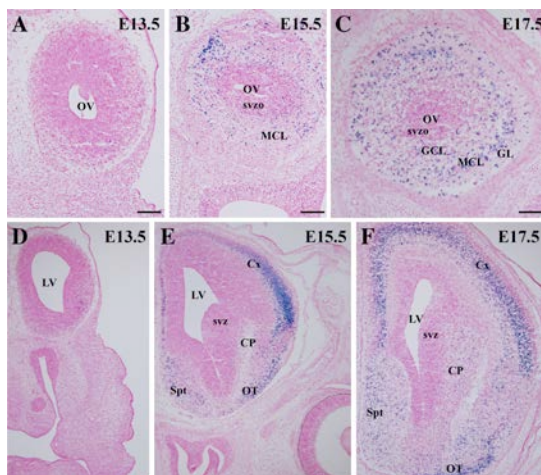


図5 kirrel3 ヘテロ欠損マウスの胎生 13.5 日齢(A, D)、15.5 日齢(B, E)、17.5 日齢(C, F)の嗅球(A-C)、前脳(D-F)における LacZ 染色。スケールバーは 100 μ m (A-C)、200 μ m (D-F)。

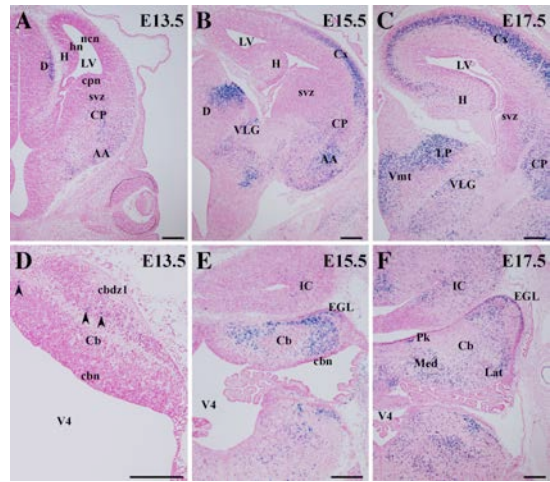


図6 kirrel3 ヘテロ欠損マウスの胎生 13.5 日齢(A, D)、15.5 日齢(B, E)、17.5 日齢(C, F)の海馬(A-C)、小脳(D-F)における LacZ 染色。スケールバーは 200 μ m (A-F)。

海馬歯状回での LacZ の発現は、生後 7 日齢では分化した神経細胞が存在する表層部のみ認められたが、生後 14 日齢から 21 日齢にかけては歯状回の深層にもその発現がみられるようになり、成獣においては歯状回の全層で発現が認められた(図 7)。

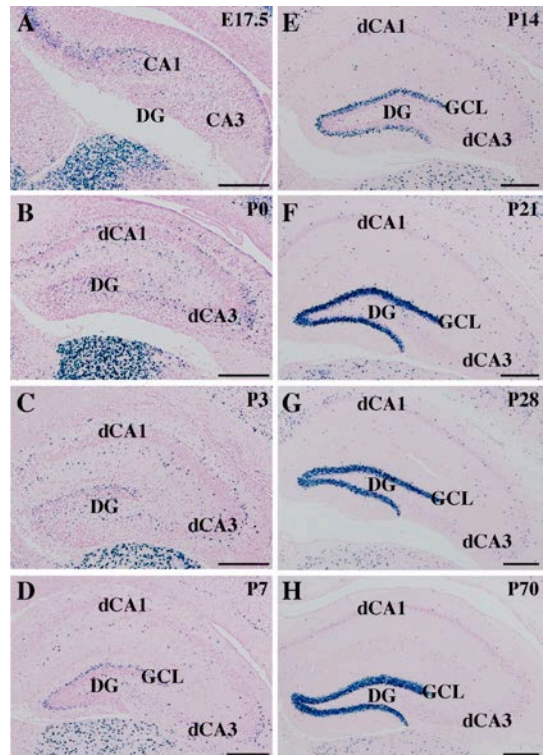


図7 kirrel3 ヘテロ欠損マウスの胎生 17.5 日齢(A)、及び生後 0 日齢(B)、3 日齢(C)、7 日齢(D)、14 日齢(E)、21 日齢(F)、28 日齢(G)、70 日齢(H)の海馬歯状回における LacZ 染色。スケールバーは 100 μ m (A-H)。

小脳では、生後 7 日齢から 14 日齢にかけて、分子層、顆粒細胞層における LacZ 発現細胞数が増加した(図 8、9)。

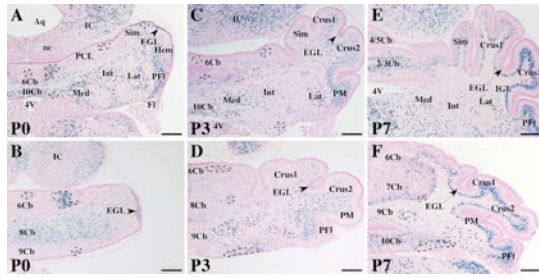


図 8 kirrel3ヘテロ欠損マウスの生後0日齢(A, B)、3日齢(C, D)、7日齢(E, F)の小脳前側(A, C, E)、及び後側(B, D, F)におけるLacZ染色。スケールバーは100µm(A-F)。

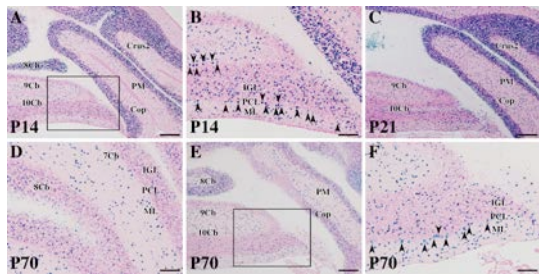


図 9 kirrel3ヘテロ欠損マウスの生後14日齢(A, B)、21日齢(C)、70日齢(D-F)の小脳におけるLacZ染色。矢尻はプルキンエ細胞を示す。スケールバーは200µm(A, C, E)、100µm(B, D, F)。

③ 発達過程、及び成獣の網膜における kirrel3 の発現

発達過程の網膜では、胎生 15.5 日齢でLacZ の発現を認め、胎生 17.5 日齢では多くの網膜神経節細胞、及び内顆粒細胞層の一部にその発現が認められた(図 10)。

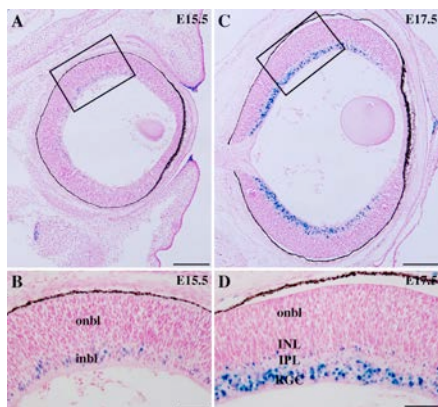


図 10 kirrel3ヘテロ欠損マウスの胎生15.5日齢(A, B)、17.5日齢(C, D)の網膜におけるLacZ染色。図B, Dは図A, Cの四角内の拡大像。スケールバーは200µm(A, C)、50µm(B, D)。

生後 7 日齢から 14 日齢にかけては、内顆粒細胞層における発現が増加し、成獣においてもその発現が持続していた(図 11)。

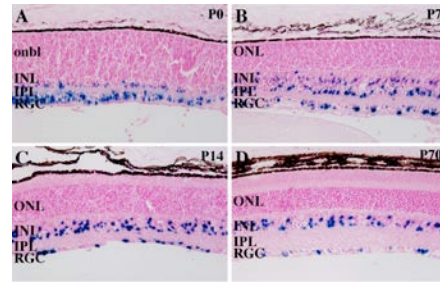


図 11 kirrel3ヘテロ欠損マウスの生後0日齢(A)、7日齢(B)、14日齢(C)、70日齢(D)の網膜におけるLacZ染色。スケールバーは50µm(A-D)。

(2) 発達過程、及び成獣の神経系における kirrel3 発現細胞の同定

kirrel3ヘテロ欠損マウスの海馬歯状回において、生後7日齢以降でNeuNやcalbindin陽性の成熟顆粒細胞にLacZの発現が認められ、Ki67陽性の増殖細胞やdoublecortin陽性の神経前駆細胞にはその発現はみられなかった(図 12-14)。

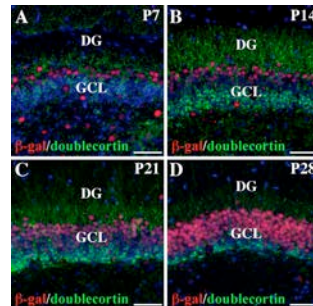


図 12 生後7日齢(A)、14日齢(B)、21日齢(C)、28日齢(D)の海馬歯状回のdoublecortin陽性の神経前駆細胞とkirrel3陽性細胞の発現パターン。スケールバーは100µm(A-D)。

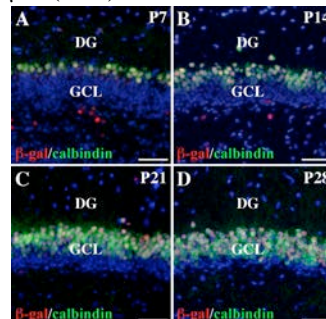


図 13 生後7日齢(A)、14日齢(B)、21日齢(C)、28日齢(D)の海馬歯状回のcalbindin陽性の成熟顆粒細胞におけるkirrel3の発現。スケールバーは100µm(A-D)。

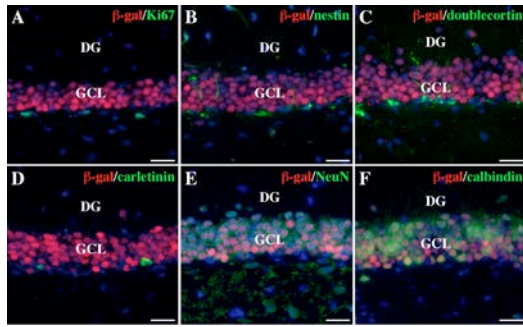


図 1 4 成獣海馬歯状回の NeuN 陽性 (E)、calbindin 陽性 (F) の成熟顆粒細胞における kirrel3 の発現。Ki67 陽性増殖細胞 (A) や nestin (B)、doublecortin (C) 陽性神経前駆細胞、carletinin 陽性未成熟顆粒細胞 (D) には kirrel3 の発現は認めなかった。スケールバーは 100 μm (A-F)。

また、胎生 13.5 日齢の kirrel3 ヘテロ欠損マウスの小脳原基において、LacZ の発現は Ki67 陽性の増殖細胞には認められず、 β III-tubulin 陽性の分化した神経細胞に認められた。胎生 15.5 日齢から成獣にかけては、Tbr-1 陽性の小脳深部核投射神経細胞に加え、Foxp2 陽性の Purkinje 細胞において縦縞状の発現を認めた。生後から成獣にかけても、calbindin 陽性の Purkinje 細胞において、縦縞状の発現を認めた。さらに NeuN 陽性の顆粒細胞や parvalbumin 陽性の介在神経細胞においてもその発現を認めた (図 1 5)。

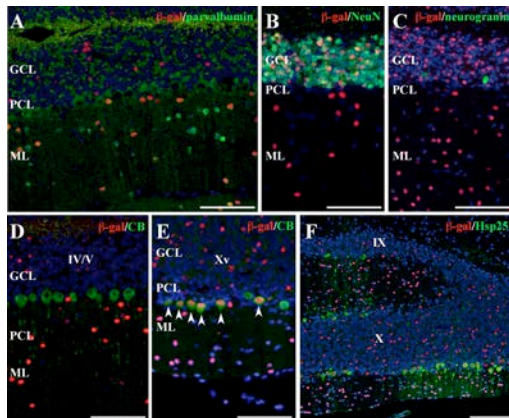


図 1 5 成獣小脳の Parvalbumin 陽性介在神経細胞 (A)、NeuN 陽性顆粒細胞 (B)、及び calbindin (E) や Hsp-25 (F) 陽性のプルキンエ細胞における kirrel3 の発現。スケールバーは 100 μm (A-F)。

生後 7 日齢の kirrel3 ヘテロ欠損マウスの網膜では、LacZ 発現細胞は Brn3b 陽性、syntaxin-1 陽性、Chx10 陰性、calbindin 陰性であり、kirrel3 は網膜神経節細胞、アマクリン細胞に発現していると考えられた。生後 14 日齢から成獣では、Chx10 陽性の双極細胞

にも LacZ の発現が認められた (図 1 6)。

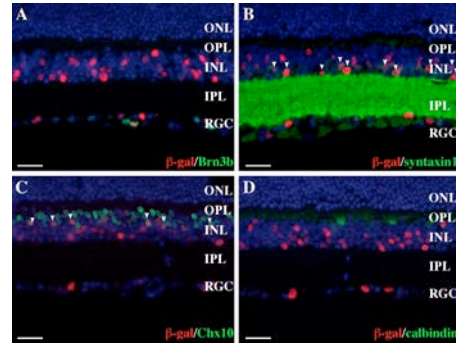


図 1 6 成獣網膜の Brn3b 陽性神経節細胞 (A)、Syntaxin1 陽性アマクリン細胞 (B)、Chx10 陽性双極細胞 (C) における kirrel3 の発現。スケールバーは 50 μm (A-D)。

(3) kirrel3 ホモ欠損マウスの組織学的解析

kirrel3 ホモ欠損マウスの脳の肉眼的所見、HE 染色所見、及び神経細胞のマーカーである NeuN やシナプスマーカーであるシナプトフィジン、PSD-95、VGLUT1 などに対する抗体を用いた免疫染色法を行った結果、野生型マウスと明らかな差は認められなかった。

(4) kirrel3 ホモ欠損マウスの行動学的解析

視覚性前肢置き直しテスト、嗅覚性埋没餌探索テスト (図 1 7)、24 時間ホームケージ活動量テスト (図 1 7) において、野生型マウスと有意な差は認められなかった。

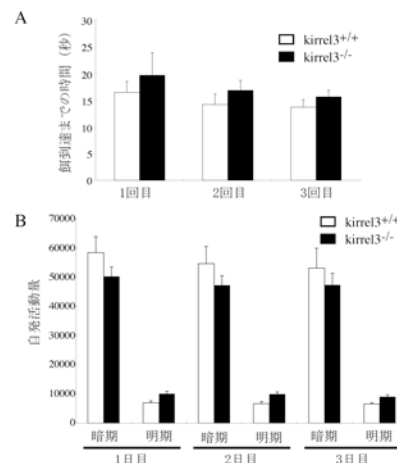


図 1 7 kirrel3 ホモ欠損マウスの嗅覚性埋没餌探索テスト (A)、及び 24 時間ホームケージ活動量テスト (B)。

高架式十字迷路テスト、及び明暗選択テストでは、不安傾向の指標となるオープンアーム滞在時間や明室滞在時間には野生型マウスと有意な差は認められなかった (図 1 8) が、運動量の指標となる総移動距離、及び明室・暗室間横切り回数がホモ欠損マウスで有意に亢進していた (図 1 8)。さらにオープ

ンフィールドテストにおける総移動距離もホモ欠損マウスにおいて有意に亢進しており、特に最初の 10 分間における移動距離が亢進していた (図 19) ことから、新規環境における活動性の過剰な亢進が示唆された。

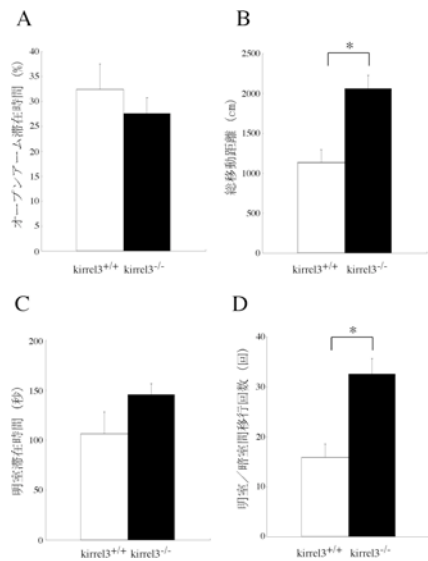


図 18 kirrel3 ホモ欠損マウスの不安行動テスト。高架式十字迷路テスト(A, B)、明暗選択テスト(C, D)。

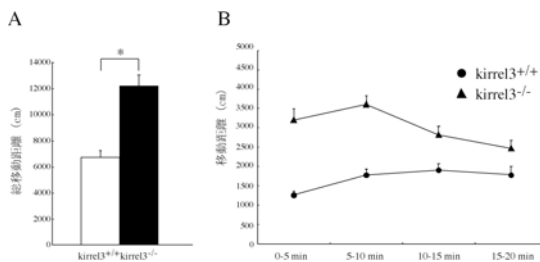


図 19 kirrel3 ホモ欠損マウスのオープンフィールドテスト。総移動距離(A)、及び 5 分間毎の移動距離 (B)。

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)

[学会発表] (計 8 件)

①久岡朋子、小森忠祐、北村俊雄、仙波恵美子、森川吉博：発達過程の海馬歯状回における kirrel3 発現細胞の同定。第 118 回解剖学会総会 2013.3.28 高松

②久岡朋子、形部裕昭、小森忠祐、板東高功、北村俊雄、仙波恵美子、森川吉博：Developmental expression pattern of kirrel3 in the hippocampus. 第 55 回日本神経化学会・第 11 回アジア・太平洋神経化学合同大会 2012.9.30 神戸

③久岡朋子、形部裕昭、藤本幸太、北村俊雄、仙波恵美子、森川吉博：マウスの中樞神経系における kirrel3 の時空間的発現解析。第 117

回解剖学会総会 2012.3.26 甲府

④森川吉博、形部裕昭、久岡朋子、小森忠祐、北村俊雄、仙波恵美子：成獣、及び発達過程のマウス後根神経節における kirrel3 の発現パターンの解析。第 117 回解剖学会総会 2012.3.26 甲府

⑤久岡朋子、形部裕昭、小森忠祐、藤本幸太、北村俊雄、仙波恵美子、森川吉博：成獣マウスの中樞神経系における kirrel3 の発現パターン。第 54 回日本神経化学会大会 2011.9.27 加賀

⑥森川吉博、形部裕昭、久岡朋子、小森忠祐、北村俊雄、仙波恵美子：発達過程の後根神経節における kirrel3 の発現。第 54 回日本神経化学会大会 2011.9.27 加賀

⑦久岡朋子、森川吉博、小森忠祐、北村俊雄、仙波恵美子：成獣マウスの中樞神経系における kirrel3 発現細胞の詳細な解析。第 116 回解剖学会総会 2011.3.28 横浜 (誌上開催)

⑧Hisaoka T, Komori T, Kitamura T, Senba E, Morikawa Y. Identification of Kirrel3-expressing cells in the central nervous system of adult mice. 40th Annual Meeting of Society for Neuroscience. 2010.11.16, San Diego, CA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森川 吉博 (MORIKAWA YOSHIHIRO)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60230108

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

北村 俊雄 (KITAMURA TOSHIO)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：20282527

久岡 朋子 (HISAOKA TOMOKO)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：00398463

小森 忠祐 (KOMORI TADASUKE)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：90433359

板東 高功 (BANDO TAKAYOSHI)

和歌山県立医科大学・医学部・学内助教(基礎)

研究者番号：00423963