

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012

課題番号：24650202

研究課題名（和文） 脳部位特異的な神経細胞の分化制御

研究課題名（英文） Regulation of brain region-dependent differentiation of neurons

研究代表者

仲嶋 一範 (NAKAJIMA KAZUNORI)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：90280734

研究成果の概要（和文）：マウス胎仔由来の大脳皮質抑制性神経細胞前駆細胞、すなわち内側基底核原基の細胞を、出生直後の大脳皮質前部または後部の細胞と混合して共培養する実験を行った。その結果、大脳皮質前部の細胞と共培養すると、後部の細胞と共培養したときに比べてソマトスタチン陽性の抑制性神経細胞が有意に多く分化してくることが見いだされた。そこで次に、セルカルチャーインサートによって大脳皮質細胞と内側基底核原基細胞を隔てた状態で共培養を行った。その結果、大脳皮質前部の効果は分泌性因子による可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We have performed co-culture experiments of embryonic mouse-derived medial ganglionic eminence (MGE) cells (cortical interneuron progenitors) and neonatal anterior or posterior cortical cells. When the MGE cells were co-cultured with anterior cortical cells, more somatostatin-positive interneurons had been differentiated compared to those cultured with posterior cortical cells. We then used cell culture inserts to avoid direct contact between the MGE cells and cortical cells. As the result, we observed similar results to the above, suggesting that the anterior cortical cells might affect the differentiation of interneuron progenitors via some unknown secretory factor.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学、神経薬理学

キーワード：脳・神経、神経科学、発生・分化、細胞分化

1. 研究開始当初の背景

(1) 神経微小回路内の興奮と抑制のバランスが崩れて興奮状態に傾くと、てんかんの原因になったり、統合失調症や自閉症のような精神神経疾患における重篤な行動障害や認知機能障害等に結びつく可能性が近年報告され、注目されている。

(2) イオン透過型グルタミン酸受容体の一つである NMDA 受容体の阻害薬であるフェンサイクリジン (PCP) は、統合失調症における陽性症状、陰性症状、認知機能障害と良く似

た症状を引き起こすことができるため、その投与動物は統合失調症の動物モデルとして広く使われている。我々は先行研究により、大脳皮質抑制性神経細胞の前駆細胞、すなわち内側基底核原基 (Medial Ganglionic Eminence, MGE) の細胞をマウスの新生仔時にあらかじめ内側前頭前野 (medial prefrontal cortex, mPFC) に移植しておくこと、移植 6 週間後の解析で PCP に対する抵抗性が高くなり発症を予防できることを見いだした (Tanaka et al., *J. Neurosci.* 2011)。同じ前駆細胞

を後頭葉に移植してもその効果はなかった。また、mPFCに大脳皮質興奮性神経細胞を移植してもやはり予防効果は観察されなかった。従って、PCP投与に対して予防効果を付与するためには、移植細胞は抑制性細胞である必要があり、かつ、移植部位はmPFCである必要があると考えられた。

(3) 大脳皮質の後頭葉や頭頂葉に移植した時と違い、mPFCにMGE細胞を移植すると、なぜかリーリン陽性/ソマトスタチン陽性の抑制性神経細胞に多く分化することを発見した。

具体的には、胎生13.5日目のマウスのMGE細胞を新生仔マウスに移植し、6週間後に固定して、移植細胞由来の抑制性神経細胞のサブタイプの割合を調べたところ、mPFCに移植した場合はソマトスタチン陽性神経細胞が $64.1 \pm 4.3\%$ 、パルブアルブミン陽性神経細胞が $11.2 \pm 4.9\%$ 認められた。それに対して、同じMGE細胞を後頭葉に移植した場合、ソマトスタチン陽性神経細胞は $37.1 \pm 3.2\%$ 、パルブアルブミン陽性神経細胞は $50.6 \pm 3.6\%$ という結果が得られた。

2. 研究の目的

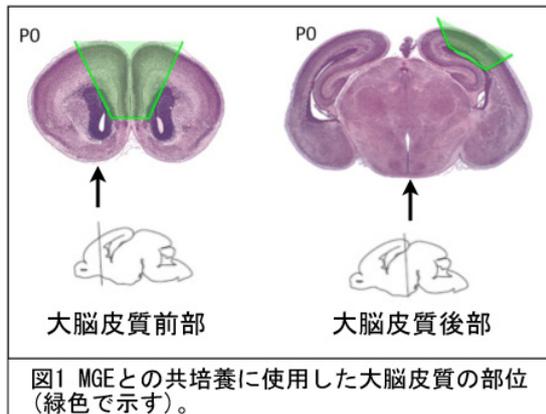
細胞移植実験における上記の抑制性神経細胞のサブポピュレーションの脳部位による違いは、出生早期のmPFCに他の大脳皮質領域、特に後頭葉には乏しい特殊な細胞外環境が存在し、MGE細胞から抑制性神経細胞に分化する際にその分化方向にバイアスをかける可能性を示唆する。それによってPCPに対する抵抗性が付与された可能性も想定できるため、そのようなmPFC特有の細胞外環境を同定できれば、基礎研究としてのみならず臨床的にも大きなインパクトがあると期待される。

そこで本研究では、大脳皮質抑制性神経細胞の前駆細胞であるMGE細胞を大脳皮質の前部または後部の細胞と共培養することにより、抑制性神経細胞としての分化方向に*in vivo*と同様のバイアスがかかるかを明らかにすることを目指した。すなわち、大脳皮質の部位特異的に抑制性神経細胞の分化方向を制御する機構が存在することを培養系で実証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) まず最初に、新生仔マウスの大脳皮質のmPFC（以下では大脳皮質前部と表記）と後頭葉（以下では大脳皮質後部と表記）の組織を実体顕微鏡下でそれぞれ切り出した（図1）。次に、組織を分散させ、ポリリジンコートしたチャンバースライドに播種して培養を行った。翌日に、胎生13.5日目のマウス胎仔から脳を摘出し、実体顕微鏡下でMGE領域を切り出して大脳皮質と同様に分散させた。MGE細胞については、さらに緑色蛍光タンパク質

（green fluorescent protein, GFP）発現ベクターをエレクトロポレーションで導入して、蛍光標識した。このGFP標識したMGE細胞を、前日に準備した大脳皮質の培養細胞の上に播種して両者が混在した状態で共培養を行った。2週間培養を続けた後に細胞を4%パラホルムアルデヒド（PFA）で固定し、抗ソマトスタチン抗体染色を行って、GFP標識されたMGE細胞中のソマトスタチン陽性細胞を計数した。

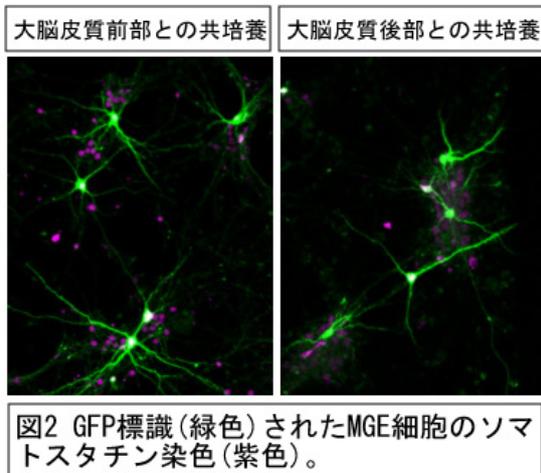


(2) 次に、MGE細胞由来の抑制性神経細胞のパルブアルブミン陽性細胞の計数を行った。パルブアルブミン陽性細胞は*in vivo*において生後2週間目以降に免疫組織化学染色で確認することができるので、今回は(1)と同じ条件で培養を行い、3週間目に4%PFAで固定して、抗パルブアルブミン抗体で免疫染色を行った。

(3) 上記の共培養実験での大脳皮質前部との共培養の効果が分泌性因子によるものであるかを明らかにするため、セルカルチャーインサートを用いた共培養を行った。すなわち、ポリリジンコートしたセルカルチャーインサート内に新生仔マウスの大脳皮質前部または大脳皮質後部から分散させた細胞を播種し、翌日に、EGFP発現ベクターをエレクトロポレーションした胎生13.5日目のMGE細胞をポリリジンコート済みカバーガラス上に播種した。1時間後、MGE細胞がカバーガラスに十分貼り付いた所で、前日から大脳皮質細胞を培養しておいたセルカルチャーインサートをカバーガラス上にのせ、大脳皮質細胞とMGE細胞をセルカルチャーインサートにて隔てた状態にして共培養を行った。このようにお互い直接に接触することのない培養環境を作り出し、(1)と同様に2週間後に固定して抗ソマトスタチン抗体染色を行って、GFP標識されたMGE細胞中のソマトスタチン陽性細胞を計数した。培地はNeurobasal MediumにB27サプリメントを添加したものを使用し、培地交換は(1)、(2)、(3)共に1週間に1回ずつ行った。

4. 研究成果

(1) チャンバー・スライド上で大脳皮質細胞と混在したまま共培養した、GFP 標識された MGE 細胞中のソマトスタチン陽性細胞を計数した (図 2)。



その結果、大脳皮質前部と共培養された場合、MGE 細胞に由来するソマトスタチン陽性の抑制性神経細胞の割合は $63.9 \pm 3.6\%$ であるのに対し、大脳皮質後部と共培養された場合は $45.2 \pm 2.8\%$ であった。すなわち、大脳皮質前部と共培養された場合の方が、MGE 細胞から有意に多くソマトスタチン陽性細胞が分化してくることがわかった (図 3)。

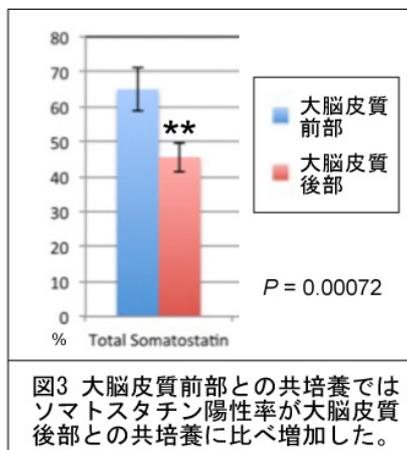


図3 大脳皮質前部との共培養ではソマトスタチン陽性率が、大脳皮質後部との共培養に比べ増加した。

(2) 上述の細胞移植実験で解析を行ったパルブアルブミン陽性細胞の割合も調べるため、同様の培養条件下で3週間の培養を試みた。その後、抗パルブアルブミン抗体で染色を試みたが、3週間の培養期間では、MGE 細胞由来の抑制性神経細胞においてパルブアルブミン陽性細胞を観察することはできなかった。これ以上培養日数を増やすと、細胞の状態が悪化し、死ぬ細胞が増えてきたため、これ以上の培養は行わなかった。

また、3週間培養した時のソマトスタチン陽性細胞の割合を調べてみたところ、大脳皮

質前部と共培養した場合は 65.2% に対し、大脳皮質後部と共培養した場合は 59.2% であり、2週間培養の時ほど大きな差はなかった。実験回数はまだ2回のみであるため有意差検定はできていないが、この結果に関しては、培養日数が増えることにより大脳皮質由来の神経細胞の数が減り、グリア細胞が著しく増加するなど、*in vivo* とは違った環境に変化していくことが原因の一つである可能性が考えられる。

(3) 次に、セルカルチャーインサートを使った培養においても、同様に GFP 標識された MGE 細胞由来のソマトスタチン陽性細胞を計数した。その結果、大脳皮質前部と共培養された方が大脳皮質後部との共培養に比べてソマトスタチン陽性の抑制性神経細胞の割合が増加する傾向がみられた。今後データを追加して再現性を確認し、統計学的に有意差があるかを検討する予定である。

(4) 以上の結果から、大脳皮質前部には、大脳皮質抑制性神経細胞の前駆細胞である MGE 細胞から有意に多くのソマトスタチン陽性神経細胞を分化させる細胞外環境が存在することが示唆された。そしてその効果は、分泌性因子による可能性が考えられた。すなわち、大脳皮質の部位特異的に抑制性神経細胞の分化方向を制御する機構が細胞外環境に存在することが示唆された。

今後は、分化方向にバイアスを与える分子が何であるのか、共培養する大脳皮質前部または後部の神経細胞や、神経以外の細胞 (アストログリアなど) から分泌される可能性のある分子の影響等を検討する必要がある。また、今回は特にソマトスタチン陽性細胞に注目して影響を調べたが、今後はさらにソマトスタチン陽性/リーリン陽性細胞の変化についても同様に解析を進める予定である。

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 0 件)

〔学会発表〕 (計 7 件)

(1) Kazunori Nakajima, “Evolution and functional significance of inhibitory interneurons in the cerebral cortex”, ワークショップ: “Functions and dysfunctions of inhibitory neurons (抑制性ニューロンの機能と病態)” (オーガナイザー: 有賀純、仲嶋一範), 第 35 回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡、福岡 (福

岡山)、2012年12月11-14日

(2) 仲嶋一範, “動く細胞がみせる大脳皮質層形成のメカニズム”, 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科セミナー、奈良 (奈良県)、2012年12月7日

(3) 仲嶋一範, 大脳皮質の形作りのしくみ”, 奈良先端科学技術大学院大学動物科学特論講義、奈良 (奈良県)、2012年12月7日

(4) Kazunori Nakajima, “Keynote Lecture: Neuronal migration and layer formation in the developing cerebral neocortex”, Symposium “Cell migration and histogenesis” (organizer: Woong Sun), Annual Meeting of Korean Associations of Anatomists, Buyeo, Korea, 2012年10月17-20日

(5) 仲嶋一範, “大脳皮質神経細胞社会の形成機構”, 東京大学大学院医学系研究科 医学共通講義 VII 「神経科学入門」、東京大学本郷キャンパス、東京、2012年9月11日

(6) Kazunori Nakajima, “Neuronal migration and layer formation in the developing cerebral cortex”, The 4th Biennial Symposium on Brain and Mind Research in the Asia-Pacific (APRU*-BMAP 2012/FIRST 2012 Symposium) “Diseases and Evolution of the Brain and Mind”, Mita Campus, Keio University, Tokyo, 2012年8月29-31日 (*Association of Pacific Rim Universities)

(7) Kazunori Nakajima, “Development of the cerebral cortex”, Keio-Karolinska-Peking Joint Summer School 2012, Shinanomachi Campus, Keio University, Tokyo, 2012年8月3日

[図書] (計2件)

(1) 山川真以、田畑秀典、仲嶋一範、神経細胞の移動と皮質の構築、改訂第3版 脳神経科学イラストレイテッド (真鍋俊也・森寿・渡辺雅彦・岡野栄之・宮川剛 編)、羊土社、120-129 (2013).

(2) 楠澤さやか、仲嶋一範、分散した神経細胞へのキューベット電極を用いた遺伝子導入 (エレクトロポレーション法による神経細胞への導入)、実験医学別冊 目的別で選べ

る遺伝子導入プロトコール (仲嶋一範、北村義浩、武内恒成 編)、羊土社、137-140 (2012).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仲嶋一範 (NAKAJIMA KAZUNORI)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号: 90280734

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし