

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700327

研究課題名(和文) 大脳皮質GABAニューロンサブタイプであるシャンデリア細胞特異的マーカーの探索

研究課題名(英文) Search for the marker of chandelier cells in cerebral cortex

研究代表者

江角 重行 (Esumi, Shigeyuki)

熊本大学・生命科学研究部・助教

研究者番号：90404334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では精神疾患との関連が示唆されているシャンデリア細胞の前駆細胞を単離し、マイクロアレイ解析を行って特異的なマーカーを探索し同定すること試みた。当初の計画で予定していたPV-creマウスではシャンデリア細胞を効率的にラベルすることができなかったため、Nkx2-1CreERマウスを入手し、解析を行った。これまでの結果で、胎生17.5日目にタモキシフェンを投与した生後0日目のNkx2-1CreER;Rosa26YFPマウスにおいて、脳室下帯近辺にYFPラベルされた細胞が認められた。今後はこれらの細胞をピックアップして単一細胞マイクロアレイ解析を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：The chandelier cells are the most distinct GABAergic neurons that innervate the axon initial segment of pyramidal neurons. In spite of particular morphology and function, there is no chandelier neuron markers were found. Recently, it has been reported that the chandelier cell is enriched in transplants from the vMGE at embryonic day 15 (Inan et al., 2012). In addition, a number of cortical chandelier cells were labeled in Nkx2-1CreER mouse (Taniguchi et al., 2013). To search chandelier neuron marker, we transplanted the E15.5 vMGE cells that derived from BAC- PV- Cre transgenic mouse to P0 mouse cortex. Nonetheless, there are no chandelier cells were found in the transplanted adult mouse cortex. Next, we injected tamoxifen to E17.5 Nkx2-1CreER; R26-YFP mouse for labeling chandelier cells. As the results, GFP positive progenitor cells were found in VZ and SVZ in the P0 mouse. In future, we plan to pick up GFP positive progenitor and try single-cell microarray analysis.

研究分野：神経科学一般

科研費の分科・細目：分子・細胞神経科学

キーワード：大脳皮質GABAニューロン シャンデリア細胞 マイクロアレイ 大脳皮質 抑制性神経細胞 細胞系譜

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。これらの機能は、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支えられている。グルタミン酸ニューロンは入出力の点で多様性を示すが、GABA ニューロンは、樹状突起とその周辺の軸索側枝の形態や発火様式、内在するタンパク質やペプチドの違いにより多様なサブタイプに分類されている。これまでに統合失調症患者において GABA ニューロンのサブタイプの一つである parvalbumin(PV) 陽性細胞数が減少している(Beasley et al, Biol Psychiatry. 2002)(Hashimoto et al, J Neurosci. 2003)ことがわかっている。PV 陽性細胞に含まれているシャンデリア細胞(図 1)(Kawaguchi and Kubota, Cereb Cortex. 1997)(Kawaguchi and Kondo, J Neurosci. 2002)は、その形態や電気生理学的特性から多くのグルタミン酸ニューロンを強く抑制すると考えられており、てんかん(Defelipe, Brain. 1999)や統合失調症との関与が示唆されている(Lewis, Dev Neurobiol. 2010)にも関わらず特異的なマーカーが知られていないため、これまで思うように研究が進んでいなかった。申請者は、これまでに単一神経細胞レベルで遺伝子発現調節機構の研究を行ってきた(Esumi et al, Nat Genet. 2005)(Esumi et al, Nat Protoc. 2006)が、近年、この研究によって得た単一神経細胞レベルの分子的アプローチ技術を生かし、単一細胞マイクロアレイ解析法を独自に開発した(Esumi et al, Neurosci Res. 2008)。この方法を用いて GAD67-GFP ノックインマウスの生後 0 日目の大脳皮質の脳室下帯の GABA ニューロンの解析を行ったところ、大脳皮質に移動してもまだ分裂する能力を持った GABA 神経細胞前駆細胞 Intermediate progenitors of GABAergic Neuron (IPGNs)の存在が明らかになった。(Wu et al., Development. 2011)。一方、最近の報告で胎生 15.5 日目のマウスの腹側の内側基底核原基(vMGE)を生後 0 日目の大脳皮質に移植すると 25%以上の細胞がシャンデリア細胞に分化することがわかった(Inan et al, Cereb Cortex, 2011)。そこで申請者は、この論文において用いられた実験手法とこれまで私が行ってきた単一神経細胞のような極微量の初発材料からでもマイクロアレイ解析を行うことができる技術を組み合わせ、GABA ニューロンのサブタイプであるシャンデリア細胞特異的なマーカーを探索するという着想に至った。これまでに申請者の所属する研究室では、大脳皮質 PV 陽性細胞をラベルすることができる BAC-PV-Cre transgenic マウスが作製されており(Tanahira et al, Neurosci Res. 2009)、GFP Cre-reporter mouse と掛け合わせたマウスで、効率よくシャンデリア細胞を

単離し遺伝子発現プロファイルを取得できる。また、申請者が行ってきた単一 GABA ニューロンのマイクロアレイ解析の知見をそのまま同研究に導入し発展させることができると考えた。

2. 研究の目的

大脳皮質 GABA ニューロンのサブタイプであるシャンデリア細胞は統合失調症やてんかんなどの精神疾患との関連が示唆されているにもかかわらず、特異的なマーカーが知られていないことから、研究の進展が遅れている。申請者はこれまでに確立してきた技術や知見を利用して、シャンデリア細胞を単離し、マイクロアレイ解析を行うことで、シャンデリア細胞特異的なマーカーを探索し同定することを目的としている。有効な特異分子が見つかった場合は、同遺伝子座に Cre または GFP を挿入した遺伝子改変マウスを作製して解析し、シャンデリア細胞の機能やその異常に起因すると考えられている精神疾患との関連を明らかにする。

3. 研究の方法

課題を達成するために BAC-PV-Cre transgenic マウスと GFP Cre-reporter マウスを掛け合わせて得たマウスを利用して大脳皮質のシャンデリア細胞を GFP でラベルする。次にラベルされた細胞をセルソーターで単離しマイクロアレイ解析を行い、シャンデリア細胞の遺伝子発現プロファイリングを取得する。得られた発現プロファイルとこれまでに我々の研究室で蓄積したマウス大脳皮質神経細胞の遺伝子発現プロファイリングや、公表されているデータを利用して、シャンデリア細胞特異的に発現している遺伝子を探索する。特異的な遺伝子が明らかになった後は、その遺伝子の発現動態を免疫組織化学染色や、In situ Hybridization 法によって解析すると同時に抗体の作製を試みる。最終的には、シャンデリア細胞特異的な発現遺伝子座に Cre または GFP を挿入した遺伝子改変マウスを作製し解析を行うことで、シャンデリア細胞の機能や精神疾患との関連を明らかにする。

<平成 24 年度>

シャンデリア細胞特異的な遺伝子発現プロファイルの取得と特異的なマーカーの探索

BAC-PV-Cre transgenic マウスとリポーターマウスである CAG-lox-LacZ-lox-GFP マウスと掛け合わせ、胎生 15.5 日目の vMGE 部位を生後 0 日目野生型マウスの大脳皮質に移植することでシャンデリア細胞を GFP でラベルする。移植後、生後 30 日目のマウスの大脳皮質より、セルソーターまたは細胞のピックアップによって GFP 陽性細胞のみ単離し、mRNA を抽出後マイクロアレイ解析を行う。次に、これまでに我々の研究室で蓄積したマウス大脳皮質神経細胞の遺伝子発現プロ

ロファイリングや、公表されているデータ
を利用し、取得したシャンデリア細胞の発現
プロファイリングと比較することで、シャン
デリア細胞特異的に発現している遺伝子を
探索する。

<平成 25 年度>

Nkx2-1CreER マウスを用いたシャンデリア
細胞のラベルと遺伝子発現プロファイルの
取得

平成 24 年度の研究結果から、当初計画して
いた BAC-PV-Cre transgenic マウスと
CAG-lox-LacZ-lox-GFP マウスを用いた神経
細胞の移植実験では、シャンデリア細胞をラ
ベルし、解析することは難しいことが明らか
になった。そこで、Nkx2-1-CreER ノックイ
ンマウス(Taniguchi et al., Science, 2013)を
ジャクソン研究所より購入し、実験を行うこ
とにした。

具体的に Nkx2-1-CreER; Rosa26 -floxed
-YFP マウスを掛けあわせ、胎生 17.5 日目に
タモキシフェンを投与し、生後 1 日目に陽性
細胞が多数存在する脳室下帯領域を切り出
し、YFP 陽性細胞の単離を試みる。ピックア
ップした YFP 陽性細胞を用いて、シングル
セルマイクロアレイ解析を行うことで、大脳
皮質 GABA ニューロンサブタイプである、シ
ャンデリア細胞の発現プロファイリングを
取得し解析する。

4. 研究成果

平成 24 年度は、移植実験の条件や手法を確
立するために全身の細胞で GFP を発現する
胎生 15.5 日目の Green マウスの vMGE 部位
を生後 0-2 日目野生型マウスの大脳皮質に移
植しその形態や細胞数を観察した。その結果、
移植された細胞が大脳皮質において、生着し
ていること一部の神経細胞は PV 陽性である
ことが確認できた。この結果から、移植実験
の手法は確立出来たと考え、BAC-PV- Cre
transgenic マウスとリポーターマウスであ
る CAG-lox-LacZ-lox-GFP マウスと掛けあ
わせ、胎生 15.5 日目の vMGE より調整した細胞
を生後 0-2 日目の野生型マウスの大脳皮質
に移植した(1 個体あたり 1-4x1000000 個の
細胞を移植した)。移植後、生後 30 日目のマ
ウスを固定し、免疫組織化学染色により、
GFP、PV を染色しその形態を観察した。そ
の結果、シャンデリア細胞様の形態を持った
細胞や、PV 陽性細胞はほとんど観察するこ
とができなかった。これは移植した細胞懸濁
液中に含まれる、将来 PV 細胞やシャンデリ
ア細胞に分化する前駆細胞が予想以上に少
なかったことや、大脳皮質への移植細胞の生
着率が低かったためであると考察できる。こ
の問題点を解決するために、移植実験の検討
や改善を行ったが、PV 陽性細胞やシャン
デリア細胞数を増加させることはできな
かった。そこで、このまま PV-Cre;GFP マウス

を用いた実験系では、課題を達成することは
難しいという結論に至り、研究計画を修正す
ることにした。

平成 25 年度は研究計画を修正し、胎生 17.5
日目にタモキシフェンを投与することで多
数の大脳皮質のシャンデリア細胞を標識す
ることができる Nkx2-1-CreER ノックイ
ンマウス(Taniguchi et al., Science, 2013)を
ジャクソン研究所(CA,USA)より購入し、実
験を行うことにした。このマウスは PV-cre
マウスを用いるよりもより効率的にシャン
デリア細胞をラベルすることができる点や、
シャンデリア細胞を生み出している前駆細
胞をラベルすることができる点で非常に
優れている。まず、このマウスを輸入し熊本
大学生命資源研究支援センターにおいてク
リーンアップを行い熊本大学の動物飼育施
設における飼育できるようにした。この
Nkx2-1-CreER ノックインマウスと
Rosa26-floxed-YFP マウスを掛けあわせ、胎
生 17.5 日目にタモキシフェンを投与し、生
後 1 日目に観察を行い、YFP 陽性細胞の分布
を観察した。(図 1)

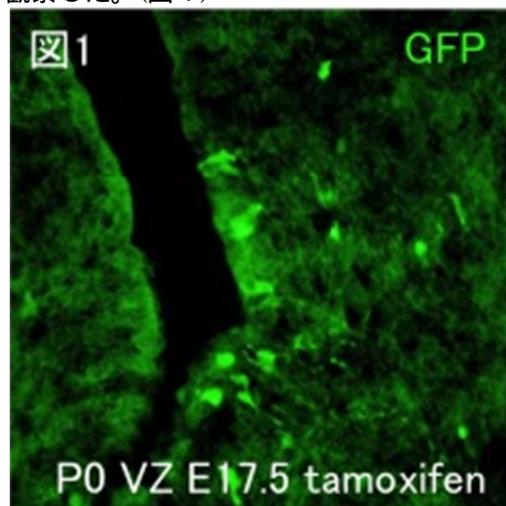


図 1 Nkx2-1CreER;R26YFP マウスの
E17.5 に tamoxifen を投与して生後 0 日目の
脳室周囲の免疫染色の結果。GFP 陽性細胞が
認められる。

その結果、吻側側脳室の腹側に YFP 陽性細
胞を認めることができた。この細胞群は胎
生 17.5 日目に Nkx2.1 を発現していた細胞で
ある。シャンデリア細胞の特徴的な形態は 2
週齢以降でなければ観察できないため、3 週
齢において、同様に免疫染色を試みた。その
結果、一部の GFP 陽性細胞が PV 陽性であ
ることが確認できた(図 2)。現在は DAB 染
色を用いてこれらの細胞がシャンデリア細
胞に特徴的な形態を持っている解析してい
る。このマウスの大脳皮質において、シャン
デリア細胞が観察できれば、今後は、この細
胞を蛍光顕微鏡下でピックアップして、シ
ングルセルマイクロアレイ解析を行う予定
である。

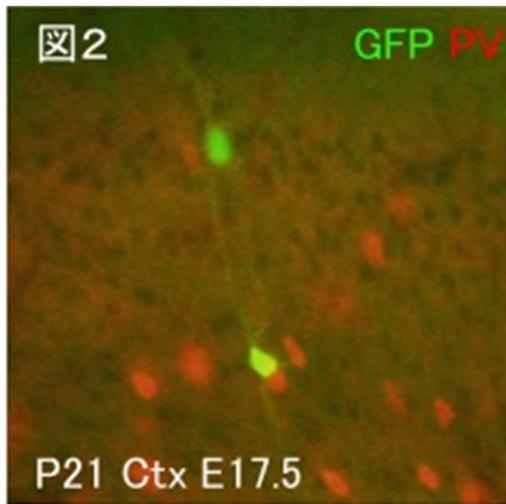


図2 Nkx2-1CreER;R26YFP マウスのE17.5にtamoxifenを投与して3週齢のマウスの大脳皮質の2重免疫染色の結果。GFP陽性でPV陽性の細胞が認められる。

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1件)

Ninomiya S, Esumi S, Ohta K, Fukuda T, Ito T, Imayoshi I, Kageyama R, Ikeda T, Itohara S, Tamamaki N.

Amygdala kindling induces nestin expression in the leptomeninges of the neocortex.

Neuroscience Research, 2013,75(2)121-129 (査読有)

[学会発表](計5件)

内側扁桃体における Dbx 1 由来神経細胞の解析 [第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会]

(2014年03月27日 - 2014年03月29日, 栃木県下野市薬師寺 自治医科大学キャンパス)

江角重行, Yasmin Kamal, Katie Sokolowski, 平田務, Peijun Li, Alessandra Pierani, Molly Huntsman, Nirao Shah, 玉巻伸章 and Joshua G. Corbin

内側扁桃体における Dbx 1 由来神経細胞の解析 [第 7 回神経発生討論会]

(2014年03月13日 - 2014年03月14日, 大阪府吹田市 大阪大学吹田キャンパス銀杏会館)

江角重行, Yasmin Kamal, Katie Sokolowski, 平田務, Peijun Li, Alessandra Pierani, Molly Huntsman, Nirao Shah, 玉巻伸章 and Joshua G. Corbin

Generation of sexually dimorphic limbic system neuronal populations from Dbx1+ embryonic progenitor pools [Gordon Research Conference (Amygdala and Health)] (2013年07月28日 - 2013年08月02日, Stonehill college, Boston USA)
Shigeyuki Esumi, Yasmin Kamal, Katie Sokolowski¹, Tsutomu Hirata, Peijun Li, Alessandra Pierani, Nobuaki Tamamaki, Molly Huntsman, Nirao Shah and Joshua G. Corbin

内側扁桃体における Dbx 1 由来神経細胞の解析 [第 19 回日本行動神経内分泌学研究会全国集会] (2013年07月05日 - 2013年07月06日, 鹿児島県桜島横山町レインボー桜島)

江角重行

内側扁桃体における Dbx 1 由来神経細胞の解析 [熊本シンポジウム 神経発生を多角的に討論する会] (2013年06月25日 - 2013年06月26日, 熊本大学発生医学研究所、グリーンピア阿蘇)

江角重行

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

http://srv02.medic.kumamoto-u.ac.jp/dep t/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・生命科学研究部・助教

研究者番号: 90404334

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: