

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24800088

研究課題名(和文) Ptf1a 遺伝子改変マウスを用いた視床下部の発生および機能の解析

研究課題名(英文) A genetic analysis of hypothalamic development and function using Ptf1a-genetically modified mice.

研究代表者

藤山 知之 (FUJIYAMA, Tomoyuki)

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・研究員

研究者番号：00635089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000 円、(間接経費) 690,000 円

研究成果の概要(和文)：Ptf1a 遺伝子は発生期の様々な神経領域において発現し、特定の種類の神経細胞の発生に関与することが報告されている。本研究成果において、視床下部を生み出す間脳神経上皮領域での Ptf1a 発現ドメインを特定した。また、Ptf1a 遺伝子座への Cre ノックインマウスを用いた遺伝学的細胞系譜標識実験の結果、視床下部の特定の神経核において Ptf1a 発現神経上皮に由来する神経細胞を同定した。また、Ptf1a cKO では顕著な体重増加が観察され、その原因としてエネルギー消費の低下が示唆された。以上から、Ptf1a が視床下部の一部の神経細胞の発生に関与すること、そして体重制御へ関与することなどが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Ptf1a, a bHLH-transcription factor, is known to be essential for the development of mammalian pancreas. Several groups and we have reported involvement of Ptf1a in neuron subtype specification in CNS regions. Here we report Ptf1a expression in the developing hypothalamus.

Hypothalamus is involved in the regulation of homeostasis; however, developmental mechanism and function of hypothalamic neurons remain to be understood. During development, we found Ptf1a was expressed in a part of diencephalic neuroepithelium, that is, a source of hypothalamic neurons. Using the Cre/loxP system, we identified many "Ptf1a lineage cells" in the several ventral hypothalamic nucleus. Conditional knockout (cKO) of this gene in the developing hypothalamus resulted in late-onset obesity caused by lower activity, and infertility. The present results suggest that Ptf1a in diencephalon is required for the normal development of function of hypothalamic neurons and the metabolic control, including body weight.

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：神経解剖学・神経病理学

キーワード：神経発生 視床下部 マウス エネルギー消費 Ptf1a 神経上皮

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 視床下部は様々な神経細胞を内包し、個体全身の恒常性を維持するための重要な神経領域であるといえるが、個々の神経細胞の発生メカニズムや機能に関しては未解明の部分が多い。bHLH 型転写因子 *Ptf1a* は、膵臓の発生に関与する PTF1 のコンポーネントとして発見された分子であり、近年、我々を含む世界各国のグループによって、*Ptf1a* 遺伝子が小脳・延髄・脊髄や網膜などの様々な神経領域において発現すること、特定の種類の神経細胞の発生に関与することが報告されている。最近、我々のグループは、実は *Ptf1a* 遺伝子が発生過程における視床下部原基においても発現していることを見いだした(図 1)。

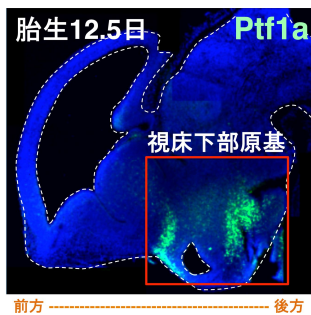


図 1 視床下部原基での *Ptf1a* 発現

(2) 視床下部における *Ptf1a* 遺伝子の役割について調べるため、*Ptf1a-flox* ノックインマウスと *Nkx2.1-cre* トランスジェニックマウスを用いて視床下部特異的に *Ptf1a* 遺伝子を欠失させたコンディショナルノックアウトマウス (*Ptf1a* cKO) を新規に作製したところ、驚くべきことに約 2 ヶ月齢以降で顕著な肥満症状を呈した。このことから、視床下部における *Ptf1a* 遺伝子が、視床下部の主要な機能として知られているもののうち、少なくともエネルギーバランスの調節に影響を与えている可能性が示唆された。

## 2. 研究の目的

(1) 一つ目の研究目的は、*Ptf1a* 遺伝子を切り口にして、細胞系譜を追跡することのできる *Ptf1a* 遺伝子改変マウスを用いて、これまで未解明な部分が多かった視床下部神経細胞の発生機構の一端を明らかにすることである。

(2) 二つ目の研究目的は、薬理遺伝学・光遺伝学的手法および視床下部特異的 *Ptf1a* 遺伝子欠失 (コンディショナルノックアウト) マウスなどを用いて、視床下部神経細胞のこれまでに知られていない機能およびエネルギーバランスの破綻が関わる遅発性肥満の発症機構を明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

(1) 発生期視床下部における *Ptf1a* 発現細胞の性質の解析

申請者らは、*Ptf1a* タンパクを検出するための感度の良い抗体を新たに作製し、免疫組織化

学染色法によって各発生段階における視床下部での *Ptf1a* の発現解析を行った。

(2) 正常発生下における *Ptf1a* 発現神経上皮から生み出される細胞の遺伝学的標識とその性質の解析

成体および胎生期において、*Cre/loxP* システムを用いた遺伝学的細胞系譜追跡法により *Ptf1a* リニエージの細胞を LacZ 蛋白などで標識し、各種神経細胞マーカーとの免疫二重染色により細胞種・性質の同定を行った。ここでは *Ptf1a-cre* ノックインマウスと *R26R-LacZ* などのレポーターラインを掛け合わせたマウスを用いた。さらには、細胞の形態をより精密に標識できる *hPLAP* レポーターを用いて、細胞形態や投射様式などについて調べた。

(3) *Ptf1a* KO および cKO マウスにおける *Ptf1a* 発現神経上皮から生み出される細胞の性質の解析

正常発生下における解析結果を基に、*Ptf1a* の発現を欠失した視床下部において、*Ptf1a* リニエージ細胞の性質にどのような変化・異常が生じるのかを前述の遺伝学的細胞系譜追跡法を用いて解析した。*Ptf1a* KO マウスにおいて、Caspase-3A 抗体による定量的なアポトーシス解析を行った。また、*Ptf1a* リニエージ細胞の生存や移動様式、運命決定などに変化があるかどうかを調べた。具体的には、免疫組織化学染色法を用いた LacZ 抗体と抗 Caspase-3A 抗体による細胞死の定量的な解析や、各種神経細胞マーカーとの二重染色を行い神経細胞種マーカーの発現に変化があるか、すなわち運命転換があるかについて調べた。さらには、*hPLAP* レポーターシステムを用いて軸索をラベルし、投射パターンに変化があるかどうか調べた。

(4) *Ptf1a* cKO マウスの表現型の原因の探索、およびその解析

視床下部特異的 *Ptf1a* 遺伝子ノックアウトマウス (cKO) では遅発性肥満が観察されたので、摂食量の変化、および代謝の変化について解析を行った。一般的に肥満の原因として考えられるのは、「摂食量の増加」もしくは「エネルギー消費の低下」の二つであるから、まずは cKO マウスの体重変化がこのどちらに起因するものかを調べた。前者に関しては、単位期間あたりの摂食量をコントロールと比較する方法で解析を行った。後者に関しては、呼吸ガス・運動量測定装置を用いて、個体レベルでの総活動量や総酸素消費量などを測定し比較した。さらに、潜在的な太り易さを調べるため、高脂肪食を与えた際に体重の増加具合に差があるかについても体重変化を比較することで調べた。

(5) *Ptf1a* cKO マウス視床下部において変化がみられた細胞と表現型との関わりについての解析

*Ptfla-cre* マウスと *R26R-DTR* ジフテリア毒素受容体発現マウスを掛け合わせ、*Ptfla* リニエージ細胞のみに薬理的急性障害を起こせる遺伝子改変マウスを作製し、ジフテリア毒素処理した場合の個体での行動・状態の変化を観察する実験を行う。同様に、*R26R-ChR2* チャネルロドプシン発現ラインとの組み合わせにより、光遺伝学的手法（オプトジェネティクス）により興奮させた場合の個体の行動についてどのような影響があるかを調べる。

#### 4. 研究成果

(1) 胎生期における抗 *Ptfla* 抗体を用いた免疫染色実験により、視床下部を生み出す特定の間脳神経上皮領域で *Ptfla* が発現していることを見だし、多数の分子マーカーとの多重免疫組織化学により、間脳神経上皮領域内の *Ptfla* 発現ドメインを特定した。具体的には、マウス胚発生期 E10.5~E16.5 の視床下部原基において、視索前野および視床下部腹側に相当する2ヶ所の領域に *Ptfla* の発現があることがわかった。また、E12.5 において神経上皮マーカーとの二重染色を行った結果、*Ptfla* は神経上皮細胞に一過性に発現していることがわかった。さらに、胎生期視床下部における各種神経領域マーカーを用いた多重免疫染色により、第三脳室周辺の脳領域において *Ptfla* を発現する神経上皮領域を詳細に同定した（図2）。

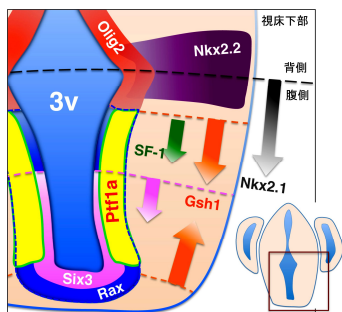


図2 視床下部原基の *Ptfla* 発現ドメイン

(2) *Ptfla* 遺伝子座への *Cre* ノックインマウスを用いて遺伝学的に細胞系譜を標識したところ、視床下部の特に腹内側核 (VMH) や内側視索前野 (MPA) 腹側などにおいて *Ptfla* 発現神経上皮に由来する神経細胞 (*Ptfla* リニエージ細胞) を同定した。*Ptfla* 発現神経上皮領域から生み出される細胞の分布を成体視床下部において詳細に調べた結果、主に内側視索前野 (MPA)、腹内側核 (VMH)、背内側核 (DMH)、隆起核 (TU)、弓状核 (ARC) に局在することを明らかにした（図3）。また、*lacZ* 抗体と各種神経細胞マーカーやグリア細胞マーカーとの二重染色により、*Ptfla* リニエージにある細胞のほとんどが神経細胞であることもわかった。成体期における *LacZ* 抗体との免疫二重染色により、神経伝達物質サブタイプの同定を行ったところ、神経核ごとに *Ptfla* リニエージ細胞の種類の分布

に違いがあることがわかり、特に腹内側核 (VMH) における *Ptfla* リニエージ細胞はそのほとんどが興奮性神経細胞であることが示された。また、Z/AP マウスを用いた hPLAP による *Ptfla* リニエージ標識実験より、視床下部からの軸索投射パターンを調べた結果、視床下部近傍の多数の神経領域に、*Ptfla* リニエージ細胞からの投射があることがわかった。

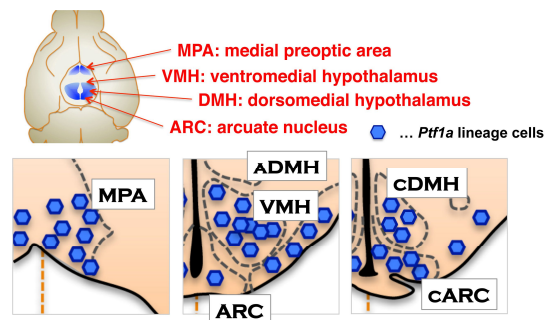


図3 成体視床下部における *Ptfla* リニエージ細胞の分布

(3) 胎生期 18.5 日目の *Ptfla* ノックアウトマウスの視床下部領域において細胞死の増加が観察された。さらに、*Ptfla* リニエージ内での解析も同様の結果が得られたことから、E18.5 でみられた細胞死は、細胞内因性に生じていることが示唆された。*Ptfla* KO を用いた *LacZ* 抗体と各種マーカーとの二重染色より、興奮性 (*Vglut2*) および抑制性 (*GAD67*) の側面においては細胞の運命転換が起きていないことが示された。今後は、*Ptfla* KO 個体において、hPLAP を用いて細胞の投射様式に変化がないかを調べる予定である。

(4) *Ptfla-flox* ノックインマウスおよび *Nkx2.1-Cre* Tg マウスを用いて、視床下部領域特異的に *Ptfla* 遺伝子を欠失させた変異体における解剖学的・生理学的表現型の解析を行った。胎生期における細胞死から予想される影響と反して、視床下部の構造に顕著な変化はみられなかった。しかしながら、雌雄共に性腺機能不全 (雄における停留睾丸、雌における子宮発達不全) がみられた。また、摂食量は変化していないにもかかわらず、顕著な体重増加 (遅発性肥満) が雌のみで観察され、高栄養下での易肥満性、その原因としてエネルギー消費の低下 (暗期における活動性の低下) が示唆された（図4）。以上から、胎生期における *Ptfla* 遺伝子および *Ptfla* タンパクの発現が消失することで、成体期視床下部の一部の神経細胞の機能に影響を及ぼすこと、そして性発達過程やエネルギー消費、そして体重のコントロールへ関与することなどが示唆された。

(5) *Ptfla-cre* ノックインマウスと各種 *R26R* レポーターマウスを掛け合わせ、光遺伝学実験や薬理遺伝学実験に用いる遺伝子改変マウスを作成した。現在進行中のプロジェクトで

あり、機材のセットアップおよびマウス繁殖により個体数確保に努めている段階であるため、現時点で具体的なデータを報告することはできないが、今後、実験が進行すれば、*Ptfla* リニエージ細胞が持つ視床下部神経細胞としての機能について、非常に良いデータが得られるのではないかと期待している。

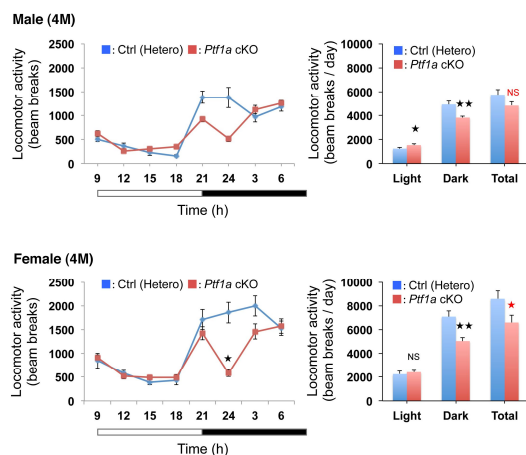


図4 *Ptfla* cKO マウスの時間毎の活動量

## 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)

Seto Y, Nakatani T, Masuyama N, Taya S, Kumai M, Minaki Y, Hamaguchi A, Inoue YU, Inoue T, Miyashita S, Fujiyama T, Yamada M, Chapman H, Campbell K, Magnuson MA, Wright CV, Kawaguchi Y, Ikenaka K, Takebayashi H, Ishiwata S, Ono Y, Hoshino M; Temporal identity transition from Purkinje cell progenitors to GABAergic interneuron progenitors in the cerebellum. *Nature Communications*, (査読有り), 5:3337. 2014. doi: 10.1038/ncomms4337.

Chonko KT, Jahan I, Stone J, Wright MC, Fujiyama T, Hoshino M, Fritsch B, Maricich SM; Atoh1 directs hair cell differentiation and survival in the late embryonic mouse inner ear. *Developmental Biology*, (査読有り), Elsevier Inc., 381(2): 401-10, 2013. doi: 10.1016/j.ydbio.2013.06.022.

[学会発表](計6件)

Fujiyama T, Nagaoka M, Kumanogoh H, Hayase Y, Funato H, Yanagisawa M, Tanaka T, Imura A, Yanagawa Y, Magnuson MA, Wright CVE, Obata K, Nabeshima Y, Hoshino M; A genetic analysis of hypothalamic development and function by using *Ptfla*-genetically modified mice, 43<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Nov 9, 2013, San Diego

藤山知之, 長岡麻衣, 熊ノ郷晴子, 早瀬ヨネ子, 船戸弘正, 田中智洋, 伊村明浩, 柳川右千夫, Mark Magnuson, 小幡邦彦, 川口義弥, 鍋島陽一, 星野幹雄; *Ptfla* 遺伝子改変マウスを用いた視床下部の発生および機能の解析, 第6回神経発生討論会, 2013年3月15日, 和光

藤山知之, 長岡麻衣, 熊ノ郷晴子, 早瀬ヨネ子, 船戸弘正, 川口義弥, 鍋島陽一, 星野幹雄 “*Ptfla* 遺伝子改変マウスを用いた視床下部の発生および機能の解析” 平成24年度国立精神・神経医療研究センター神経研究所発表会, 2013年3月21~22日, 東京

藤山知之, 長岡麻衣, 熊ノ郷晴子, 船戸弘正, 田中智洋, 伊村明浩, 柳川右千夫, Mark Magnuson, 小幡邦彦, 川口義弥, 鍋島陽一, 星野幹雄; *Ptfla* 遺伝子改変マウスを用いた視床下部の発生および機能の解析, 第35回日本分子生物学会, 2012年12月11日, 福岡

藤山知之, 早瀬ヨネ子, 長岡麻衣, 熊ノ郷晴子, 柳川右千夫, Mark Magnuson, 小幡邦彦, 田中智洋, 伊村明浩, 船戸弘正, 川口義弥, 鍋島陽一, 星野幹雄; *Ptfla* 遺伝子改変マウスを用いた視床下部の発生および機能の解析, 第35回日本神経科学大会, 2012年9月18日, 名古屋

藤山知之, 早瀬ヨネ子, 長岡麻衣, 熊ノ郷晴子, 柳川右千夫, Mark Magnuson, 小幡邦彦, 田中智洋, 伊村明浩, 川口義弥, 鍋島陽一, 星野幹雄; *Ptfla* 遺伝子改変マウスを用いた視床下部の発生および機能の解析, 包括脳・夏のワークショップ, 2012年7月26日, 仙台

[その他]

ホームページ等

[http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r\\_diag/Publications.html](http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r_diag/Publications.html)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

藤山 知之 (FUJIYAMA, Tomoyuki)

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・研究員

研究者番号: 00635089