

短 報

生後発達に伴うマウス小脳皮質の外顆粒層の消長と 1型ヒストン脱アセチル化酵素免疫陽性反応の変化

松嶋美正¹, 漆畑俊哉¹, 澤田和彦²

¹つくば国際大学医療保健学部理学療法学科

²保健栄養学科

【要 旨】 生後4～21日齢のマウス小脳の外顆粒層の消長と1型ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC1)の発現動態について免疫組織化学的に検討した。小脳皮質において増殖細胞核抗原(PCNA)陽性細胞からなる外層と、神経細胞核抗原(NeuN)陽性細胞からなる内層で構成される外顆粒層は、生後14日齢まで観察された。外顆粒層では分裂細胞は外層のPCNA陽性細胞にみられ、その頻度は4日齢で高く、齢とともに減少した。生後14日齢では外顆粒層の外層および内層はともに薄くなり、分裂細胞は観察されなくなった。HDAC1陽性反応は、生後4～10日は外顆粒層の外層および内層でみられ、生後7日齢以降はNeuN陽性内顆粒細胞でも観察された。以上の結果から、エピジェネティクス制御に関与するHDAC1は、発生中の小脳では増殖・分化過程の外顆粒細胞で発現され、外顆粒層消失後は皮質神経細胞で発現されることが明らかになった。

キーワード： エピジェネティクス, HDAC, 小脳, 免疫組織化学

序 論

小脳は姿勢維持、平衡覚調節、筋の協調運動の調節など、感覚と運動機能を統合する働きをもつ(Altman and Bayer, 1997)。近年では、自閉症や統合失調症といった神経発達障害において小脳の形態的・機能的異常が報告されており(Kulynych et al., 1997; Vogeley et al., 2000; Levitt et al., 2003; Sallet et al., 2003; Harden et al., 2004; Stoodley, 2016)、また、小脳の認知機

能への関与が注目されている(Noroozian, 2014)。これら神経発達障害では障害の重症度にもよるが、療育が認知機能の回復に一定の効果があると考えられている。

エピジェネティクスとは、DNAのメチル化やヒストンのアセチル化などDNA塩基配列の変化を伴わない遺伝子転写調節が細胞の世代を超えて受け継がれることをいう。小脳形態形成の研究は、自然発生ミュータントや遺伝子改変動物を用いて遺伝因子からその解明を試みる研究が主流であったが、近年、DNAメチル化、microRNAs、皮質神経細胞死(Marzbán et al. 2015)、sonic hedgehog およびその関連因子の発現動態(Yoo et al. 2013; Tichy et al. 2015)などエピジェネティクスという観点からの研究も進められている。本研究では、小脳皮質の組織

連絡責任者：澤田和彦

〒300-0051 茨城県土浦市真鍋6-8-33

つくば国際大学医療保健学部保健栄養学科

TEL: 029-883-6032

FAX: 029-826-6776

E-mail: k-sawada@tius-ac.jp

構築過程における外顆粒細胞の消長とエピジェネティクス制御に関わる1型ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC1)の発現動態について免疫組織化学的に調べ、小脳皮質を構成する神経細胞の分化および皮質形態形成へのHDAC1発現を介したエピジェネティクス機構の関与を明らかにすることを目的とした。

材料と方法

動物

本実験は、つくば国際大学動物実験委員会で実験計画の承認後に実施した。生後4, 7, 10, 14, 21日齢の雄マウス(各2例)を日本エスエルシー株式会社(静岡)から購入した。動物に過剰容量(400 μ g/g体重)の抱水クロラル(和光純薬工業, 大阪)を腹腔内投与し、4%パラホルムアルデヒド溶液(pH 7.4)で経心性に灌流固定した。小脳を取り出し、同固定液で2日以上浸漬固定した。

組織切片の作製

小脳を30%スクロース／リン酸緩衝食塩水(PBS)溶液に一晩浸した後、超低温槽中-70℃下でOCTコンパウンド(サクラファインテック・ジャパン、東京)に包埋した。40 μ m厚の前頭断凍結切片を冷エレクトロフリーズ(MC-802A; 大和光機工業、埼玉)を装備したリトラトーム(REM-700; 大和光機)を用いて作製した。

一次抗体

一次抗体は、小脳外顆粒細胞マーカー抗体であるマウス抗増殖細胞核抗原(Proliferating cell nuclear antigen; PCNA)抗体(MAB424R; Millipore, Billerica, CA, USA)、分裂M期細胞マーカー抗体であるラット抗phospho-Histone H3 (PH3)抗体(ab10543; Abcam, Cambridge,

UK)、神経細胞マーカー抗体であるウサギ抗神経細胞核抗原(NeuN)抗体(ABN78; Millipore)、マウス抗HDAC1抗体(HDAC1-21) (ab12168; Abcam)を用いた。

免疫蛍光三重染色

免疫染色は、浮遊切片として以下(1)～(19)の手順で行った。抗原賦活化を除いたすべての工程において反応は室温で行った。(1)切片をAntigen Retrieval Reagent UNIVERSAL(R&D system, Minneapolis, MN, lot #950512)中で湯煎にて90℃で30分間、加熱処理し、抗原を賦活化させた。(2)PBSで3回洗浄した。(3)一次抗体①を添加し、一晩インキュベートした。(4)PBSで3回洗浄した。(5)二次抗体①を添加し、2時間インキュベートした。(6)PBSで3回洗浄した。(7)蛍光標識streptavidin液①を添加し、1時間インキュベートした。(8)PBSで3回洗浄した。(9)Avidin液(1:50)(Vector Labs., Inc., Burlingame, CA)を添加し、1時間インキュベートした。(10)PBSで3回洗浄した。(11)一次抗体②を添加し、一晩インキュベートした。(12)PBSで3回洗浄した。(13)二次抗体②を添加し、2時間インキュベートした。(14)PBSで3回洗浄した。(15)蛍光標識streptavidin液②を添加し、1時間インキュベートした。(16)PBSで3回洗浄した。(17)切片をAPSコートスライドガラス(FF-801; 松浪硝子工業、大阪)に載せて乾燥させ、貼り付けた。(18)スライドガラスをPBSに2分間浸した。(19)グリセリン(和光純薬)を封入剤として切片をカバーガラスで封入した。

免疫染色は、PH3/PCNA/NeuNとHDAC1/PCNA/NeuNの2種類の蛍光三重染色を行った。PH3/PCNA/NeuN三重染色では、一次抗体①として抗NeuN抗体(1:1,000)を、一次抗体②として抗PCNA抗体(1:1,000)と抗PH3抗体(1:1,000)の混合液を使用した。二次抗体①としてビオチン標識抗ウサギIgG(1:200)(BA-1000; Vector Labs)を、二次抗体②としてビオ

チン標識抗ラット IgG (1:200) (BA-4000; Vector Labs) と Alexa 488 (緑色蛍光色素) 標識抗マウス IgG (1:500) (A21202; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) の混合液を使用した。また、蛍光標識 streptavidin 液① (抗 NeuN 抗体を可視化) には、Texas Red (赤色蛍光色素) 標識 streptavidin 液 (1:100) (Vector Labs) を、蛍光標識 streptavidin 液② (抗 PH3 抗体を可視化) には、AMCA (青色蛍光色素) 標識 streptavidin 液 (1:100) (Vector Labs) を用いた。

HDAC1/PCNA/NeuN 三重染色では、一次抗体①として抗 HDAC1 抗体 (1:1,000) を、一次抗体②として抗 PCNA 抗体 (1:1,000) と抗 NeuN 抗体 (1:1,000) の混合液を使用した。二次抗体①としてビオチン標識抗マウス IgG (1:200) (BA-1000; Vector Labs) を、二次抗体②としてビオチン標識抗ウサギ IgG (1:200) (BA-9200; Vector Labs) と Alexa 488 標識抗マウス IgG (1:500) の混合液を使用した。また、蛍光標識 streptavidin 液① (抗 HDAC1 抗体を可視化) には、Texas Red 標識 streptavidin 液 (1:100) (Vector Labs) を、蛍光標識 streptavidin 液② (抗 NeuN 抗体を可視化) には、AMCA 標識 streptavidin 液 (1:100) (Vector Labs) を用いた。

一次抗体①の希釈には、10%正常馬血清(NHS)

(S-2000; フナコシ, 東京)/0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA)/PBS 溶液を、一次抗体②の希釈には Biotin 液 (1:50) (Vector Labs)/PBS 溶液をそれぞれ用いた。また、二次抗体①と②、Texas red および AMCA 標識 streptavidin の希釈には、PBS を用いた。

蛍光染色された切片で、小脳半球の皮質を蛍光顕微鏡 (Axio imager A1; Zeiss, Gottingen, Germany) を用いて観察し、蛍光画像を取得した。

結 果

PH3/PCNA/NeuN 免疫蛍光三重染色

染色は両側の小脳半球で行い、その結果は左右で差がなかった。また、使用した各齢2例のマウスにおいて同等の結果(再現性)が得られた。生後4日齢のマウスでは、小脳半球の外顆粒層は、外層2/3が PCNA 免疫陽性を、内層1/3が NeuN 免疫陽性を示した(図1A)。分裂M期細胞マーカーである PH3 に対する免疫陽性反応は、外顆粒層外層の PCNA 陽性細胞でみられたほか、内顆粒層では中大型の NeuN 陰性細

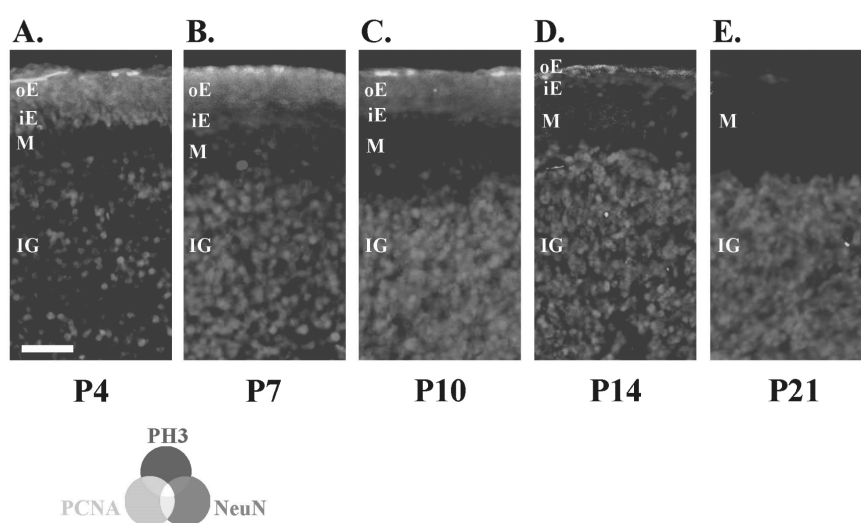


図1. 生後4～21日齢マウスの小脳半球の PH3/PCNA/NeuN 免疫蛍光三重染色。
oE, 外顆粒層外層; iE, 外顆粒層内層; M, 分子層; IG, 内顆粒層
(カラーの図は、<http://www.ktt.ac.jp/tiu/hs-study/posted-images/hs-study8-1.jpg> からダウンロードして下さい。)

胞でも観察された(図1A)。外顆粒層の外層(PCNA 陽性)および内層(NeuN 陽性)の厚さは10日齢まではほぼ同じであったが(図1B,C)、外層中の分裂細胞(PH3 陽性)の頻度は齢とともに少なくなった(図1B,C)。また、内顆粒層では NeuN 陽性内顆粒細胞の数が21日齢まで齢とともに増加したが(図1B-E)、NeuN 陰性細胞の分裂(PH3 陽性)は7日齢まで観察され(図1B)、10日齢以降ではみられなくなった(図1C-E)。14日齢では、外顆粒層は PCNA 陽性の外層と NeuN 陽性の内層から成るものの、その厚さは劇的に薄くなり、外層では分裂細胞(PH3 陽性)もみられなくなった(図1D)。さらに21日齢では、外顆粒層は完全に消失した(図1E)。

HDAC1/PCNA/NeuN 免疫蛍光三重染色

染色は両側の小脳半球で行い、その結果は左右で差がなかった。また、使用した各齢2例のマウスにおいて同等の結果(再現性)が得られた。生後4日齢の小脳半球の皮質では、HDAC1 免疫陽性は、外顆粒層の外層(PCNA 陽性)および内層(NeuN 陽性)の両方でみられた(図2A)。外顆粒層の外層および内層における HDAC1 陽性は、外顆粒層が急激に薄くなる14日齢では観

察されなくなった(図2B-D)。また、7日齢には、内顆粒層の一部の NeuN 陽性内顆粒細胞で弱い HDAC1 陽性が出現した(図2B)。その後、NeuN 陽性内顆粒細胞での HDAC1 陽性は齢とともに強くなり、21日齢ではほとんどの NeuN 陽性内顆粒細胞が強い HDAC1 陽性を呈するようになった(図2E)。

考 察

発生中の小脳では、皮質の最外層に外顆粒層が一時的に出現し、皮質の内顆粒層を形成する神経細胞(内顆粒細胞)の供給源になっている(Fujita et al., 1966; Altman, 1969, 1972)。外顆粒層はさらに神経前駆細胞からなる外層と分化中の遊走前神経細胞からなる内層に分けられる(Tanaka and Marunouchi, 1998)。本研究では、外顆粒層の外層を抗 PCNA 抗体によって、内層を抗 NeuN 抗体によって標識することで小脳皮質の外顆粒細胞の消長を免疫組織化学的に明らかにした。外顆粒層外層の PCNA 陽性神経前駆細胞の分裂は、生後10日齢を境にみられなくなり、同時に外顆粒層の厚さも劇的に薄くなった。マウス小脳では、外顆粒層神経前駆細胞のアポ

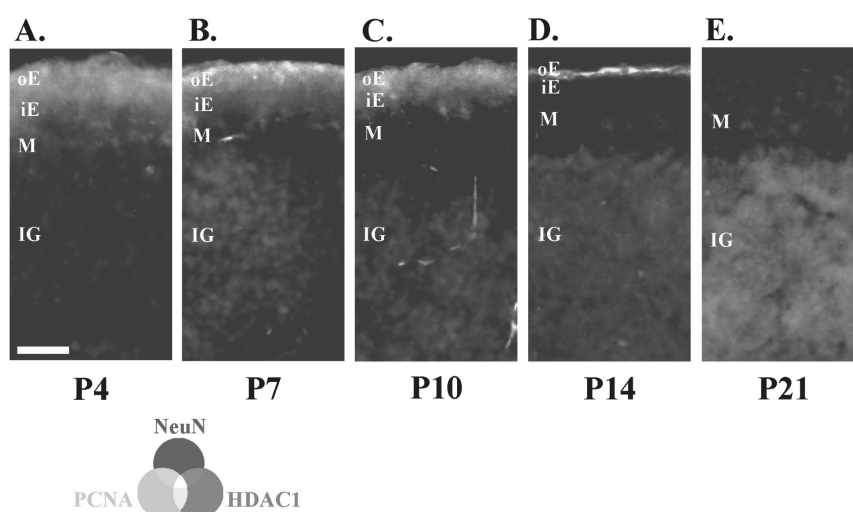


図2. 生後4～21日齢マウスの小脳半球のHDAC1/PCNA/NeuN免疫蛍光三重染色。
oE, 外顆粒層外層; iE, 外顆粒層内層; M, 分子層; IG, 内顆粒層
(カラーの図は、<http://www.ktt.ac.jp/tiu/hs-study/posted-images/hs-study8-2.jpg> からダウンロードして下さい。)

トーシスの頻度が生後9日齢に最も高いことから(Tanaka and Marunouchi, 1998)、本研究における10日齢以降の外顆粒層の急激な消失は、外顆粒層を構成する神経前駆細胞の分化・遊走だけでなく、自身のプログラム細胞死も関与していることが示唆された。

Yoo et al. (2013) は、生後10日齢のマウス小脳の外顆粒層においてエピジェネティクス制御因子である HDAC1 の強い免疫陽性反応を観察した。本研究では、発生中の小脳において HDAC1 発現が生後4～10日齢の外顆粒層の外層および内層の両方でみられることを免疫組織化学的に明らかにした。この様に外顆粒細胞の増殖・遊走および細胞死が盛んな齢で HDAC1 発現がみられたことは、HDAC1 が外顆粒層の維持と消失の両方に関与している可能性を示している。HDAC1 は、HDAC3 との共発現で神経細胞死を誘導し、HDAC9 との共発現で神経細胞の生存を維持させる(Bardai et al., 2012)。今後は、外顆粒層消長の分子メカニズムを明らかにするために、外顆粒層における HDAC3 や HDAC9 の発現や、外顆粒細胞のアポトーシスについても調べる必要がある。

本研究では、発生中の小脳皮質において外顆粒層の神経前駆細胞の増殖制御にエピジェネティクス因子である HDAC1 が関与している可能性が示された。このようなエピジェネティクス機構の小脳発生への関与は、近年注目されている小脳の形態的・機能的な異常が関与する神経発達障害について、細胞発生レベルでの解明を可能にする。本研究結果は、神経発達障害の成因解明だけでなく、療育を含め外的環境要因による刺激の有効性を細胞発生レベルで示すことになり、障害の種類や重症度に合った適切な療育法の開発や創薬に繋がる可能性を秘めている。

謝 辞

本研究は、平成27年度つくば国際大学共同研究費の助成により行われた。

参考文献

- Altman J (1969) Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. III. Dating the time of production and onset of differentiation of cerebellar microneurons in rats. *J Comp Neurol* 136: 269-294.
- Altman J (1972) Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. I. The external germinal layer and the transitional molecular layer. *J Comp Neurol* 145: 353-397.
- Altman J, Bayer SA (1997) Basic cellular organization and circuitry of the cerebellar cortex. In: J. Altman, & S. A. Bayer (Eds), *Development of the cerebellar system* (pp. 26-43). Boca Raton, USA: CRC press.
- Bardai FH, Price V, Zaayman M, Wang L, D'Mello SR (2012) Histone deacetylase-1 (HDAC1) is a molecular switch between neuronal survival and death. *J Biol Chem* 287: 35444-35453.
- Fujita S, Shimada M, Nakamura T (1966) 3H-Thymidine autoradiographic studies on the cell proliferation and differentiation in the external and the internal granular layer of the mouse cerebellum. *J Comp Neurol* 128 191-208.
- Harden AY, Jou RJ, Keshavan MS, Varma R, Minshew NJ (2004) Increased frontal cortical folding in autism: a preliminary MRI study. *Psychiatry Res* 131: 263-268.
- Kulynych JJ, Luevano LF, Jones DW, Weinberger DR (1997) Cortical abnormality in schizophrenia: an in vivo application of the gyrification index. *Biol Psychiatry* 41: 995-999.
- Levitt JG, Blanton RE, Smalley S, Thompson PM, Guthrie D, McCracken JT, Sadoun T, Heinichen L, Toga, A. W. (2003). Cortical sulcal maps in autism. *Cerebral Cortex* 13: 728-735.
- Marzban H, Del Bigio MR, Alizadeh J, Ghavami S, Zachariah RM, Rastegar M (2015) Cellular commitment in the developing cerebellum. *Front Cell Neurosci* 8:450.

- Noroozian M (2014) The role of the cerebellum in cognition: beyond coordination in the central nervous system. *Neurol Clin* 32: 1081-104.
- Sallet PC, Elgis H, Alves TM, Oliveira JR, Sassi E, de Castro CC, Busatto GF, Gattaz WF (2003). Reduced cortical folding in schizophrenia: an MRI morphometric study. *Am J Psychiatry* 160: 1606-1613.
- Stoodley C (2016) The cerebellum and neurodevelopmental disorders. *Cerebellum* 15: 34-37.
- Tanaka M, Marunouchi T (1998) Immunohistochemical analysis of developmental stage of external granular layer neurons which undergo apoptosis in postnatal rat cerebellum. *Neurosci Lett* 242: 85-88.
- Tichy J, Zinke J, Bunz B, Meyermann R, Harter PN, Mittelbronn M (2015) Expression profile of sonic hedgehog pathway members in the developing human fetal brain. *Biomed Res Int*. 2015: 494269.
- Vogeley K, Schneider-Axmann T, Pfeiffer U, Tepest R, Bayer TA, Bogerts B, Honer WG, Falkai P (2000). Disturbed gyrification of the prefrontal region in male schizophrenic patients: a morphometric postmortem study. *Am J Psychiatry* 157: 34-39.
- Yoo JY, Larouche M, Goldowitz D (2013) The expression of HDAC1 and HDAC2 during cerebellar cortical development. *Cerebellum* 12: 534-546.

Short Communication**Ontogenetic trajectories of external granular layer and expression of histone deacetylase 1 immunoreactivity in the mouse cerebellar cortex**Yoshimasa Matsushima¹, Toshiya Urushihata¹, Kazuhiko Sawada²¹Department of Physical Therapy²Department of Nutrition, Faculty of Medical and Health Sciences, Tsukuba International University**Abstract**

The present study examined immunohistochemically changes in laminar aspects and histone deacetylase 1 (HDAC1) expression in the mouse cerebellar cortex during postnatal days (PDs) 4 to 21. The external granular layer (EGL) was divided into two substrata during PDs 4 to 10: outer substratum defined by proliferating nuclear antigen (PCNA) immunostaining; and inner substratum defined by NeuN immunostaining. Phospho-Histone H3-immunoreactive mitotic cells were observed in the PCNA-immunopositive EGL outer substratum. They were most frequent at PD 4, declined gradually with postnatal ages, and then disappeared by PD 14 by drastically thinning of both outer and inner substratum. HDAC1 immunostaining appeared in both outer and inner substrata of the EGL during PDs 4 to 10, and was also found in NeuN-immunopositive neurons in the internal granular layer at PD 7 and thereafter. The present results suggest that HDAC1, which is known to be involved in epigenetic regulation, is expressed in proliferating and differentiating EGL cells and also in differentiated cerebellar cortical neurons following the disappearance of the EGL.

Keywords: epigenesis, HDAC, cerebellum, immunohistochemistry