

ラットおよびマウス線条体における Ca結合蛋白Secretagogin陽性ニューロン の解析

安田聖子 小坂克子 小坂俊夫

国際医療福祉大学福岡保健医療学部医学検査学科

【目的】

EFhandカルシウム結合蛋白は、細胞内カルシウムセンサーあるいはカルシウムバッファーとして機能している。その中で特に、parvalbumin (PV), calbindin (CR), calretininは様々な部位で特異的にニューロンに発現しニューロンサブタイプマーカーとして、ニューロン構成を 考える上で重視されている。興味深いことにこれらの 蛋白の分布はかなりの種差があり、機能を考えるには慎重でなければならない。Secretagogin (Scgn)は近年発見されたEFhandカルシウム結合蛋白でまだごく少数の報告しかなく不明な点が多い。我々の予備的研究でラットおよびマウスの線条体にこれまで報告されている4種の 介在ニューロン群とは異なるScgn陽性ニューロンが見つかった。そこで、このScgn陽性ニューロンと、線条体介在ニューロンのマーカーとされ、acetyltransferase (ChAT), NOS, PV, CRを用い、Scgnとの関連性を検討した。

【方法】

1) 動物の固定・切片作成

深麻酔下に固定液(リン酸緩衝4%パラフォルムアルデヒド:PFA)にて経心的に灌流固定後, 頭蓋骨から脳を取り出し, 同じ固定液にて更に1~数日固定した.

各脳は正中断して、左右に分断し、各片側の脳を冠状断(coronal)・水平断(horizontal)・矢状断(pre-sagittal)の3方向でビブラトームにて50 μ m厚の連続切片を作成した.

2) 免疫組織化学

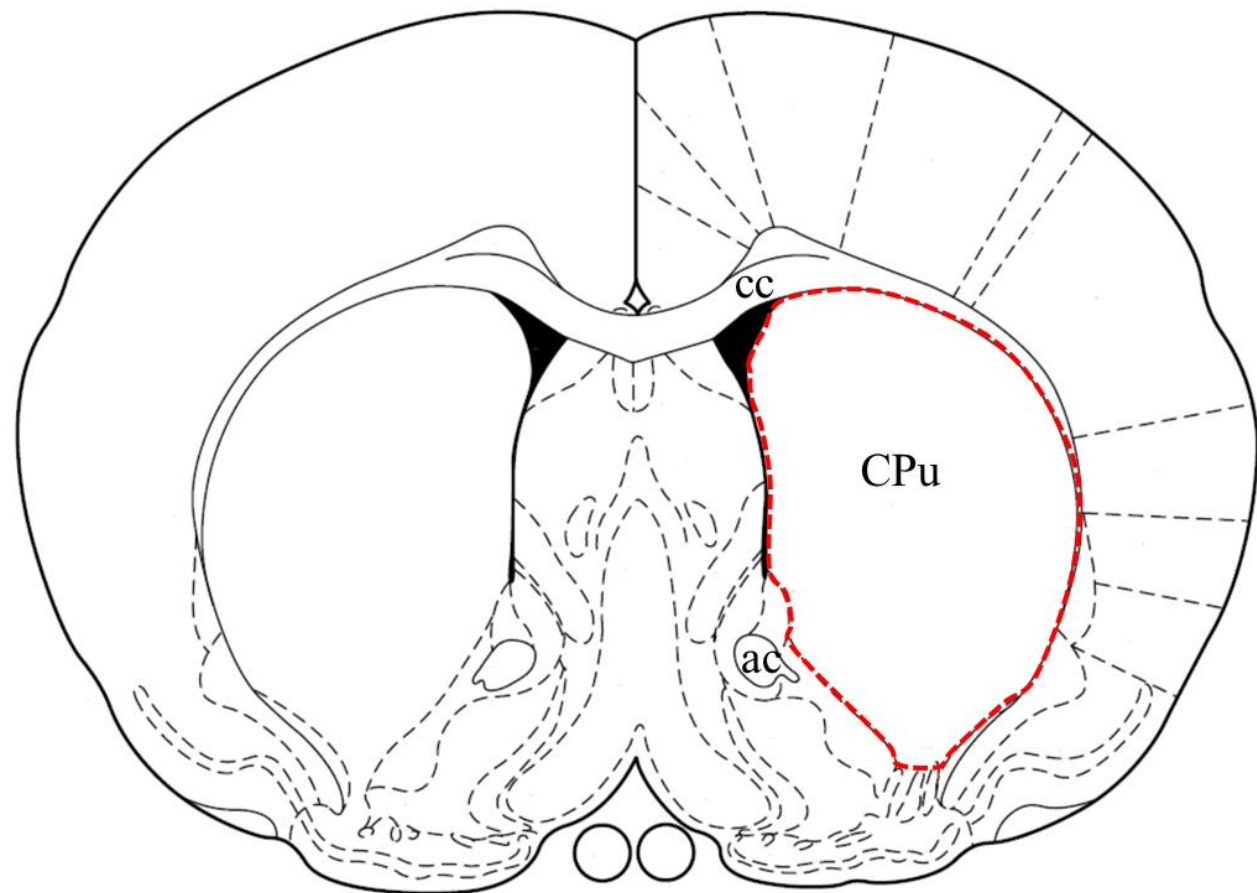
線条体介在ニューロンに対する一次抗体を用いた蛍光多重免疫染色標本を作製した.

- anti-secretagogin
(SCGN:ウサギ、ヒツジ)
- anti-parvalbumin
(PV:マウス、ウサギ、モルモット)
- anti-calretinin
(CR:マウス、ウサギ、ヤギ)
- anti-choline acetyl transferase
(ウサギ、ヤギ)
- anti-NOS
(ヒツジ)

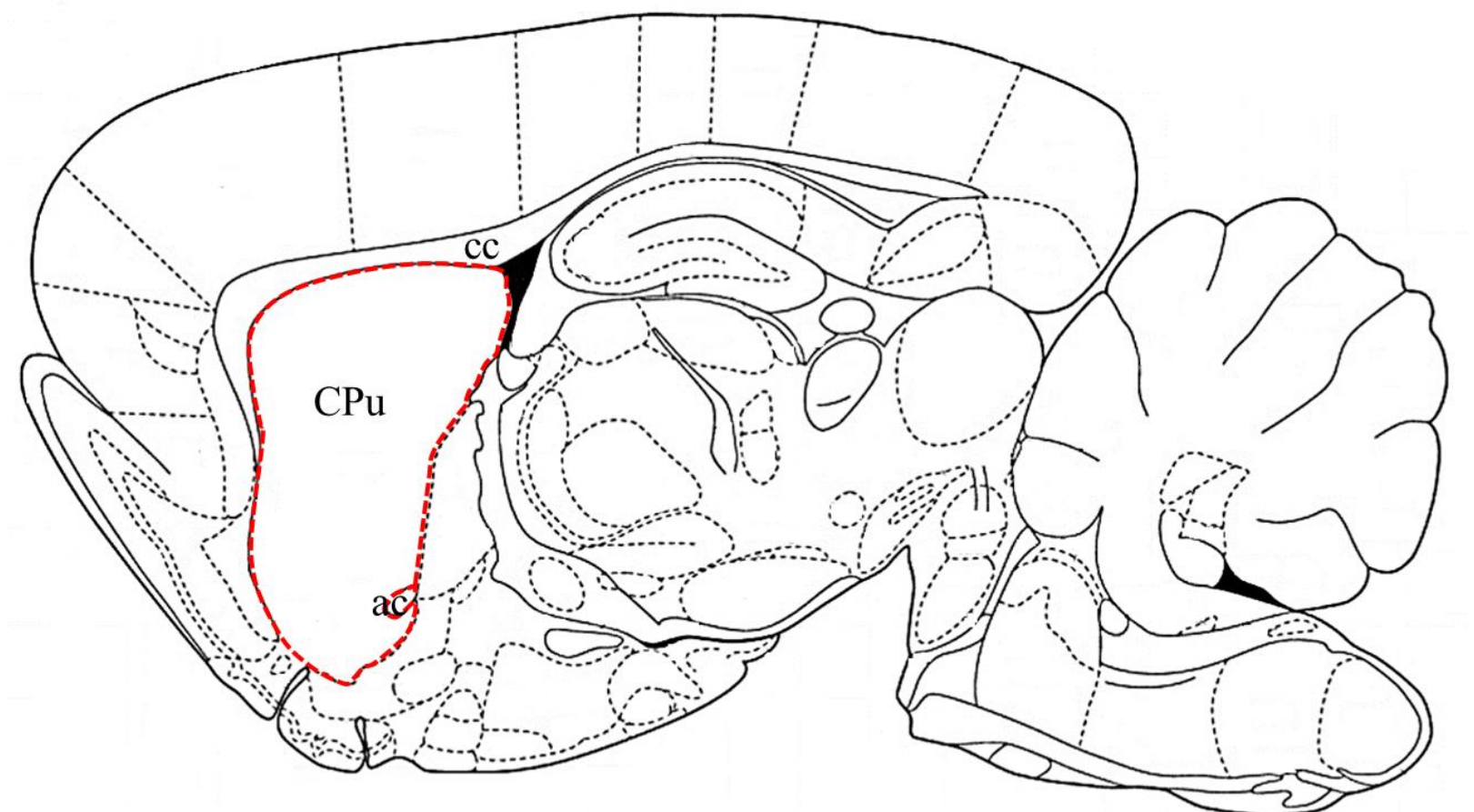
3) 蛍光画像解析

蛍光実体顕微鏡により切片全体を観察・記録あるいは比較的 low 倍（対物レンズ X4）でモントージュを作成してニューロンの分布を解析した。各マーカーの共存関係を中～高倍（対物レンズ X20 あるいは X40）にて解析した。

また分布評価は、Paxinos and Watson's brain atlas を元に以下の領域にてカウントを行った。



冠状断 (coronal)



矢状断 (pre-sagittal)

【結果】

ラットでは、線条体全体に多数のScgn陽性ニューロンが分布し、これらの細胞は大型細胞タイプと小型細胞タイプの2種類に分けられ、小型タイプは主に線条体辺縁に分布していた(図1)。二重染色では、Scgn陽性ニューロンの約60%は、PV, ChaAT, もしくはCRと共在発現しているが、NOSとは共在発現していなかった。また介在ニューロンの既知組成4タイプと明らかに異なり、Scgnのみ陽性を示す細胞が約40%みとめられた(図2,3,4,表1)。マウスでは、Scgn陽性ニューロンが少数のみ辺縁部にみられ、ChATおよびCRとのみ共在発現した(図1,表2)。

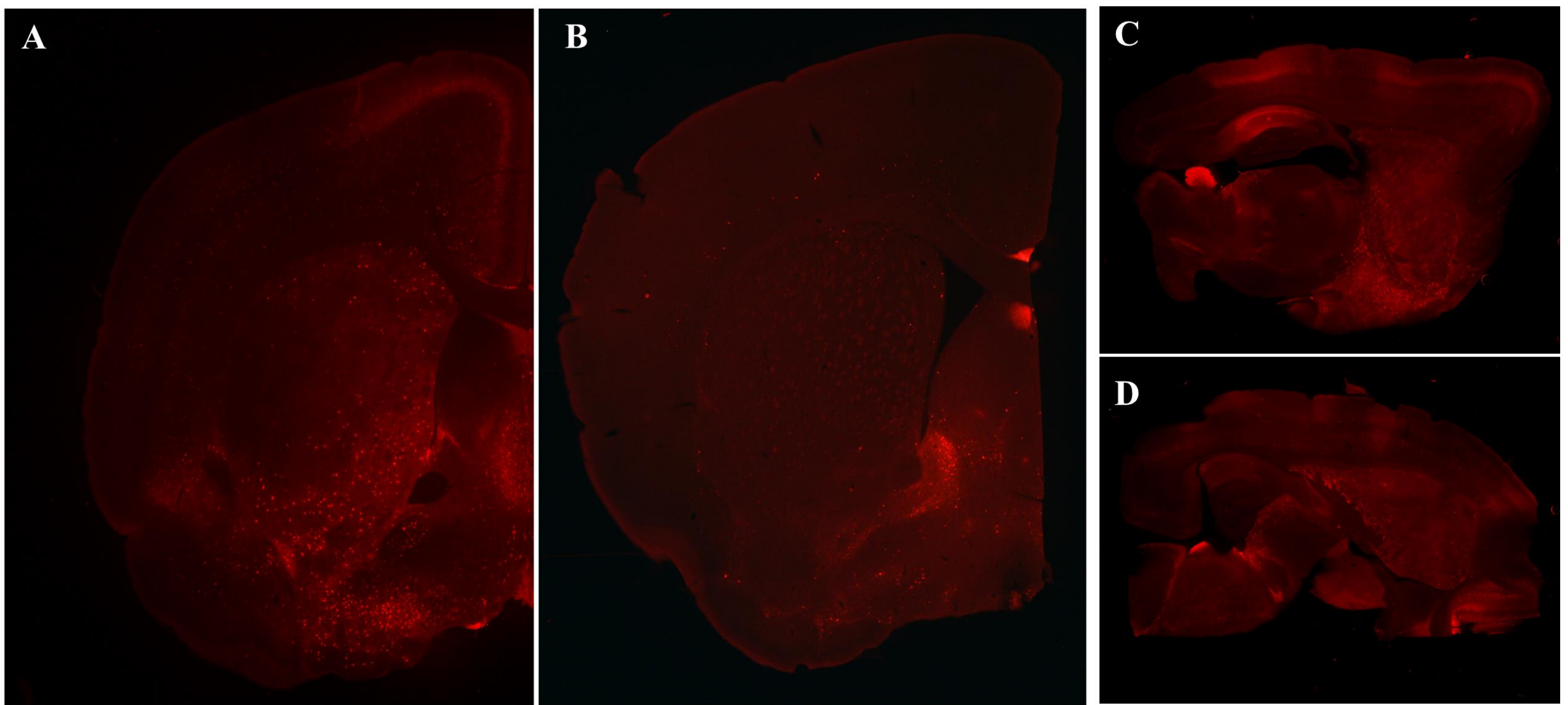


図1. SCGN陽性ニューロンの分布.

ラット(A)、マウス(B). 中隔部、前脳基底部においてはラット、マウスともに陽性ニューロンが見られるが、線条体においてはラットでは多くのSCGN陽性ニューロンが見られるが、マウスでは陽性ニューロンはきわめて少数であり、著明な差異を示している. C:矢状断(pre-sagittal)でのラット線条体におけるSCGN. D:水平断(horizontal)でのラット線条体におけるSCGN.

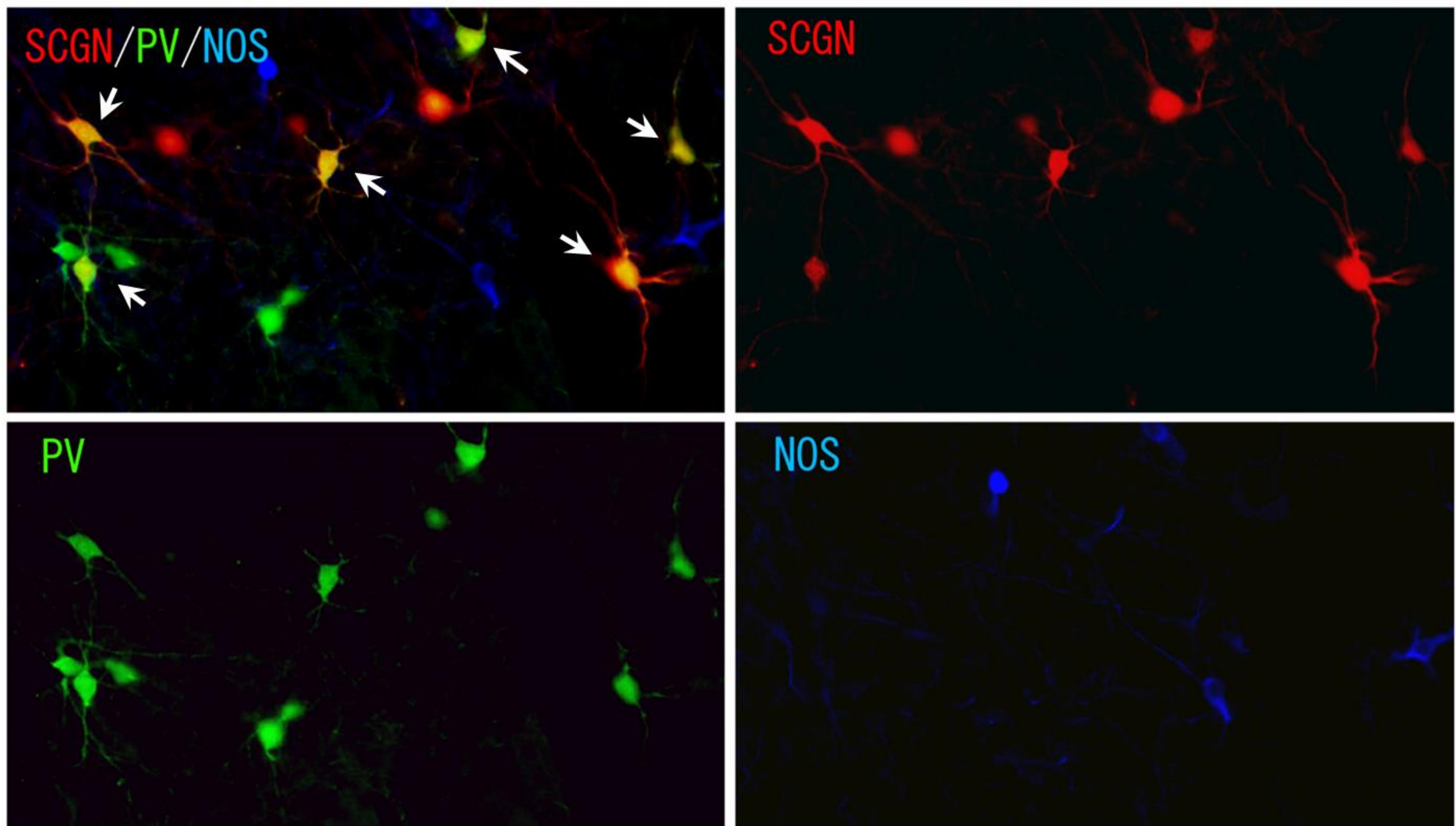


図2. ラット線条体における多二重染色像.

SCGN (red), PV(green), NOS(blue). 矢印はSCGNとPVとの共存を示す. SCGNとNOSとの共存はみられない.

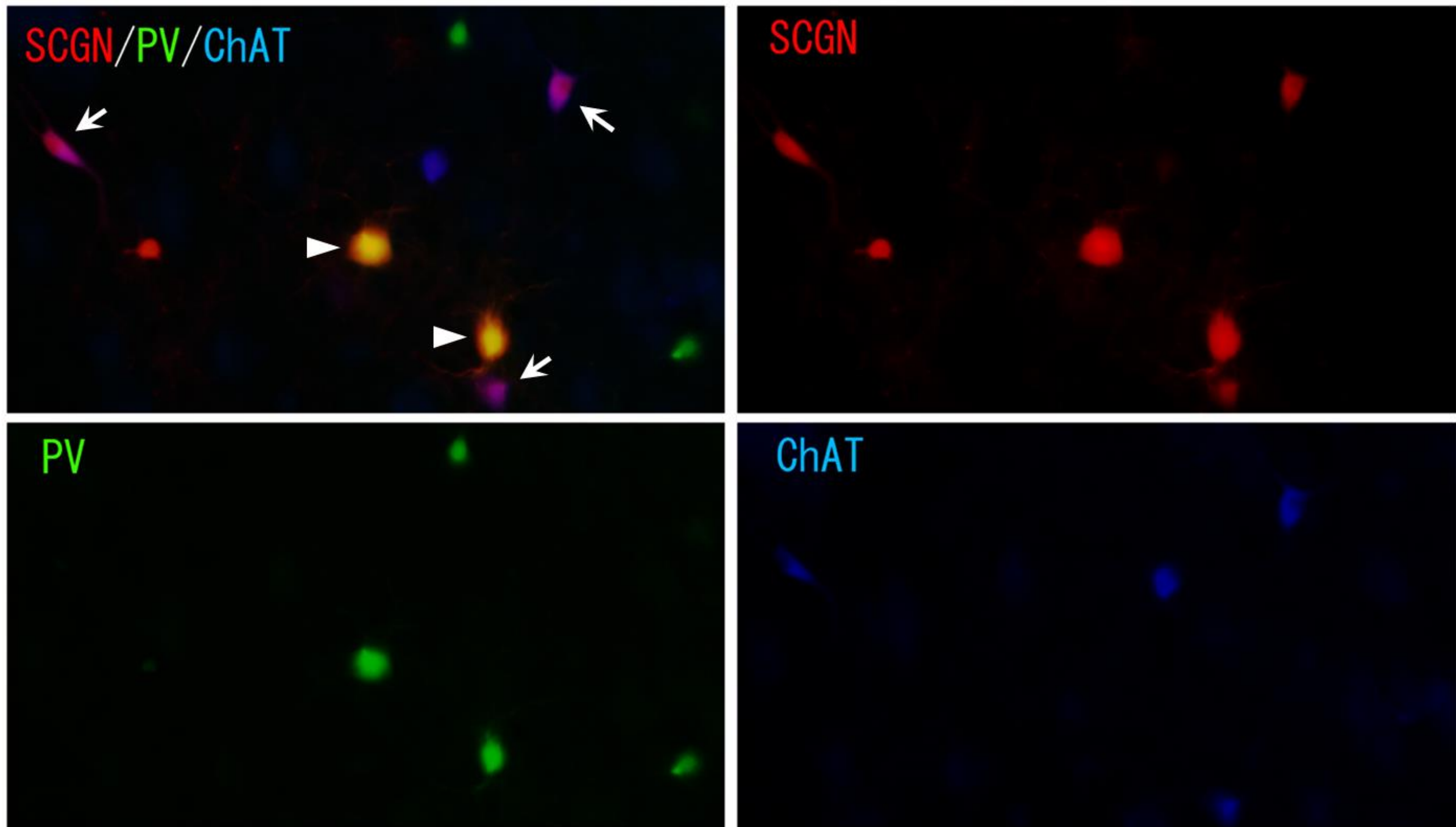


図3. ラット線条体における多二重染色像.

SCGN (red), PV(green), ChAT(blue). 矢印はSCGNとChATとの共存を示す. Δ はSCGNとPVとの共存を示す.

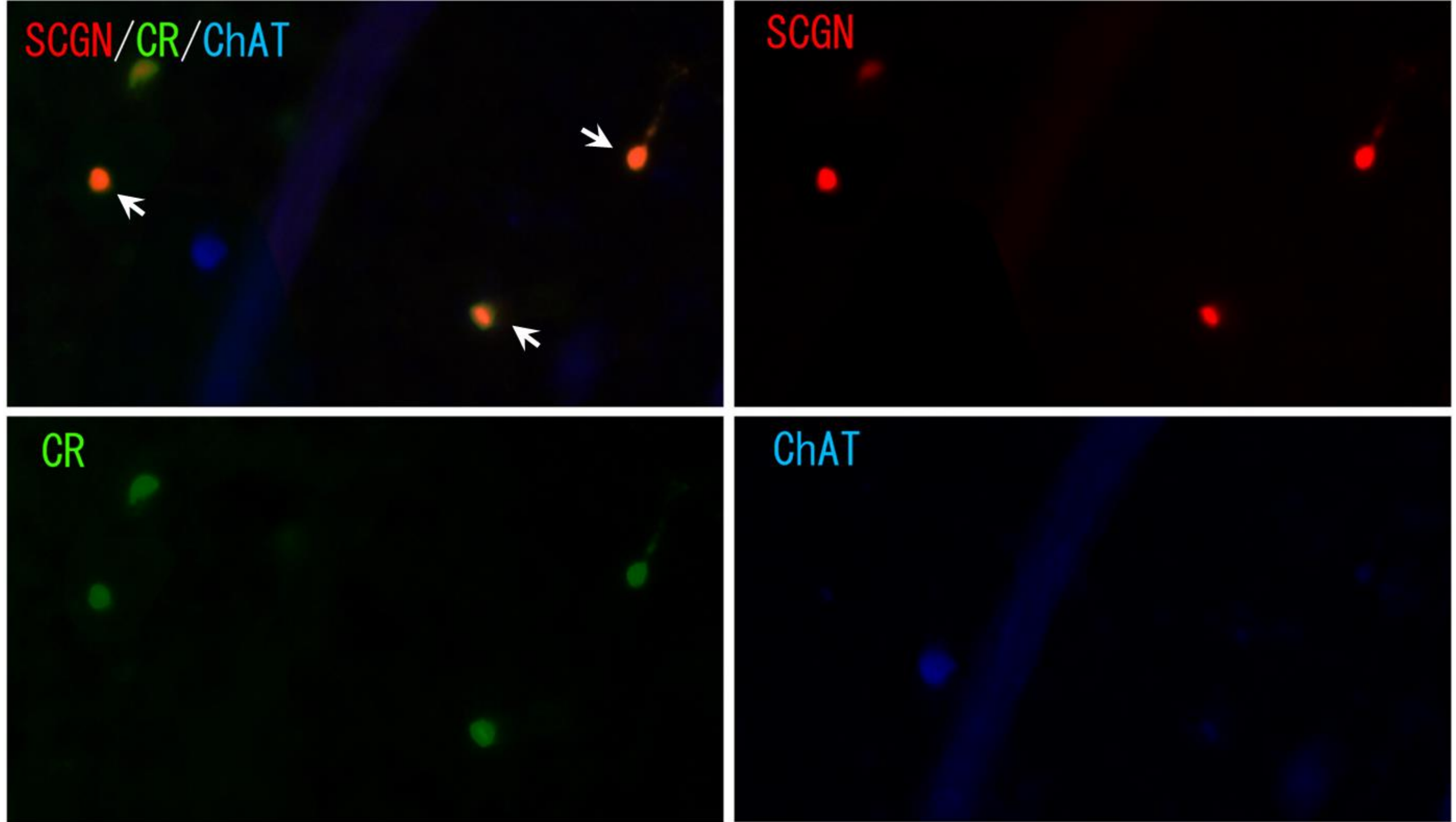


図4. ラット線条体における多二重染色像.

SCGN (red)、CR (green)、ChAT (blue) 蛍光3重染色標本. 2つの介在ニューロンマーカ―とSCGNの分布および共存関係を示す. 矢印はSCGNとCRとの共存を示す.

Rat (coronal)	SCGN only	PV only	NOS only	CR only	ChaT only
	167	208	592	46	143
	SCGN +PV	SCGN +NOS	SCGN +CR	SCGN +ChaT	
	92	0	31	12	
Rat (pre-sagittal)	SCGN only	PV only	NOS only	CR only	ChaT only
	121	420	634	64	124
	SCGN +PV	SCGN +NOS	SCGN +CR	SCGN +ChaT	
	140	0	17	18	

表1. ラット線条体におけるSCGN陽性細胞共在分布.

ラット線条体におけるSCGNおよび線条体介在ニューロンマーカーとの共存を示す.

Mouse (coronal)	SCGN only	PV only	NOS only	CR only	ChaT only
	18	167	390	8	170
	SCGN +PV	SCGN +NOS	SCGN +CR	SCGN +ChaT	
	0	0	27	3	
Mouse (pre-sagittal)	SCGN only	PV only	NOS only	CR only	ChaT only
	10	46	219	12	188
	SCGN +PV	SCGN +NOS	SCGN +CR	SCGN +ChaT	
	0	0	19	8	

表2. マウス線条体におけるSCGN陽性細胞共在分布.

マウス線条体におけるSCGNおよび線条体介在ニューロンマーカとの共存を示す.

【考察・結語】

本研究より、我々はラット線条体においてScgn陽性ニューロンが非常に多く発現しており、これまでの線条体での4種の主要な介在ニューロンタイプ、アセチルコリン性ニューロン、PV含有GABAニューロン、NOS含有GABAニューロン、CR含有GABAニューロンとの重複が比較的少ないことから、陽性細胞の一部が新たな第5の介在ニューロン群である可能性を示唆した。

さらにこの発現は、動物種における種差があることが明らかとなった。これまでの多くの免疫組織学的所見を含めて、ラットおよびマウス中枢神経系の解析がニューロン構成の基礎となっているが、動物種の違いを把握した上で解析する必要があることが示唆された。

今後、線条体Scgn陽性細胞の構造および機能における詳細な解析が必要である。

【COI開示】今回の発表に関連し、開示すべきCOI関係にある企業などはありません。