

〈原著論文〉

成体マウス脳における嗅覚系新生ニューロンの 遊走に関する三次元構造解析

徳岡 晋太郎, 清蔭 恵美, 樋田 一徳

川崎医科大学解剖学, 〒701-0192 岡山県倉敷市松島577

抄録 哺乳類の嗅覚系ニューロンの一部は生後も新生することが知られている。側脳室前角の脳室下帯で新生した細胞は吻側遊走経路を嗅球に向かって遊走し、嗅球各層のニューロンに分化する。ニューロン新生は再生医学の観点から研究が進んでいるが、神経回路への組み込みなどの分化に関しては未だ不明な点が多い。これは、新生細胞を継時的に追跡した時空間的同定に基づく統合的構造解析の欠如に起因する。そこで本研究は、生後新生するとされる嗅球傍糸球体細胞、顆粒細胞の起源を生体細胞標識法により特定し、標識細胞が遊走し、嗅球に達する過程を正確に同定した後に免疫組織学、電子顕微鏡連続切片三次元再構築、デジタル計測で解析し、新生細胞の遊走と分化の詳細を明らかにすることを目的とした。成体マウス脳室下帯へ Cell Tracker Orange (CTO) を脳定位的に注入し、1~7日後に灌流固定し矢状断切片を作製、CTO 標識された新生細胞が遊走経路に沿って嗅球に到達しているのを確認した。その後、抗 CTO 抗体を用いた多重免疫染色により経路内の新生細胞の立体構造を同定し、遊走と分化を検討し、また微細構造を透過型電子顕微鏡で解析した。遊走経路の CTO 標識細胞は PSA-NCAM 陽性で、遊走する新生ニューロンであることを同定した。NeuroLucida によるデジタル形態解析により経路の部位により突起の形態と伸展極性に多様性があることを明らかにした。また嗅球ニューロンのマーカーである tyrosine hydroxylase (TH) の遺伝子発現が遊走早期に見られる新たな知見を TH-GFP マウスで得た。本研究の生体標識法は遊走と分化の過程を同一標本で確認できる利点があり、遊走しながら形態が変化している。一方、化学的性質を決める遺伝子は、形態変化より前に発現していることがわかり、遺伝子発現と形態の多様性変化について今後の解析課題と言える。

doi:10.11482/KMJ-J41(1)57 (平成27年6月5日受理)

キーワード：ニューロン新生, 遊走, チロシン水酸化酵素, 電子顕微鏡, 三次元構造解析, 嗅覚系

緒言

1910年代にスペインの Ramón y Cajal が、「成人では中枢神経回路は固定され再生しない」と提唱した¹⁾。この提唱により成体脳は自己修復および再生されないとされてきた²⁾。しか

し、1968年に Altman がトリチウムチミジンをを用いた方法で、生後もラットの脳において海馬歯状回 (dentate gyrus of hippocampus: DG) で顆粒細胞が産生され続けていることを発見して以来³⁾、脳領域において様々な新生ニューロンに

別刷請求先
樋田 一徳
〒701-0192 岡山県倉敷市松島577
川崎医科大学解剖学

電話：086 (462) 1111
ファックス：086 (462) 1199
Eメール：toida@med.kawasaki-m.ac.jp

関する解析が行われるようになった。その結果、成体哺乳類の脳において、DGと側脳室前角の脳室下帯 (subventricular zone: SVZ) ではニューロン新生が絶えず生じていることが広く知られるようになった⁴⁾。

Loisらは、SVZで産生された神経前駆細胞は嗅球へ移動し、嗅球の顆粒細胞層 (granule cell layer: GCL) および嗅球糸球体層 (glomerular layer: GL) に組み込まれ、嗅球介在ニューロンへ分化することを示唆した⁵⁾。SVZにおいて、産生された神経幹細胞は神経前駆細胞となり神経芽細胞へ分化し、吻側遊走経路 (rostral migratory stream: RMS) と呼ばれるマウス脳で総長約5 mmの遊走経路⁶⁾を毎時70~80 μm の速さ⁷⁾で遊走し、嗅球のGCLやGLに達する。RMSはアストロサイトの突起が縦に繋がった鎖状構造で、その中を神経芽細胞 (新生ニューロン) は長軸方向への移動を可能とする⁶⁾。嗅球へ到達した新生ニューロンは約95%が顆粒細胞へ⁷⁾、他にごく少数が傍糸球体細胞へ分化することが報告されており^{8, 9)}、少なくとも傍糸球体細胞や顆粒細胞はSVZから産生され遊走してくることが知られている⁵⁾。傍糸球体細胞は γ -アミノ酪酸 (gamma-aminobutyric acid: GABA)、カルシウム結合蛋白であるCalbindinおよびCalretininを含有する3種類の化学的サブpopulationからなることが筆者らをはじめとするこれまでの研究で明らかになっている¹⁰⁾。すなわち、ラットの嗅球では傍糸球体細胞のうち、GABA陽性細胞は約20%、CalbindinおよびCalretinin陽性細胞はそれぞれ20%、10%存在し、さらに、GABA陽性細胞の半数以上はチロシン水酸化酵素 (Tyrosine Hydroxylase: TH) 陽性細胞であり、TH陽性細胞の80%がGABA陽性である¹¹⁾。一方マウスでは、TH陽性細胞のほとんどがGABA陽性であるなどTHとGABAの化学的共存性は高い¹²⁾。THはドーパミン合成の律速酵素であり、嗅上皮の破壊や鼻腔閉鎖で匂い刺激が遮断されるとTH発現が低下することが知られ、匂い入力の有無による影響を受け易い^{13, 14)}。このよう

なTH陽性細胞がどこから遊走し、どこで発現するのか明確な見解はない。このような特徴を持つTH陽性細胞は、嗅球神経回路において匂い識別に重要な役割を演じているが^{15, 16)}、生後に新生して遊走する細胞がいかにして嗅球神経回路に組み込まれるかはわかっていない。ニューロン新生については従来、分子レベルから組織レベル、また電子顕微鏡による微細構造レベルの研究がなされているが、解析対象となった細胞を継時的に追跡して日齢を同定するといった、より精緻な組織学的解析はない。これには、生後新生するTH陽性細胞をはじめとする嗅球傍糸球体細胞、顆粒細胞などの時空間的な起源を特定し、それらが遊走し、嗅球に達する過程を正確に同定した細胞そのものを解析する必要がある。

最近、生体への脳定位の注入によって特定な領域の細胞を生きたまま標識し、細胞を数週間生存させ、活動挙動が解析可能となる生体細胞標識物質が神経生物学に応用され始めた¹⁷⁾。更に遺伝子レベルで蛍光標識するTH-GFP (Green Fluorescent Protein) トランスジェニックマウスにより個体レベルで化学的性質を同定することが可能になるなど¹⁸⁾、細胞の生体標識が急速に進歩した。また、光学顕微鏡の三次元解析の発展により細胞の正確なデジタル形態計測と統計学的処理も急速に進歩している¹⁹⁾。このような現代的手法に、従来の我々が行ってきた免疫組織化学法、電子顕微鏡連続切片三次元再構築法を組み合わせることにより、本研究は、これまで詳細な解析が困難であった、発生起源を時空間的に同定した新生ニューロンの遊走過程における三次元的構造解析を行うものである。ニューロン新生により神経回路に組み込まれるニューロンの起源を同定した組織学解析により、嗅球神経回路の詳細な構造解析を行うのが本研究の主な目的である。

材料と方法

1. 動物

生後8~12週齢のC57BL/6Jマウス (日本

SLC) を14匹 (雄10匹, 雌4匹) および B6. Cg-Tg (TH-GFP) 21-31マウス (BRC No. 02095, 理研バイオリソースセンターより提供¹⁸⁾, 川崎医科大学 DNA 組換え承認番号: 川換12-01, 2013), 4匹 (雄4匹) を用いた. すべての動物実験の前に, マウスはペントバルビタールナトリウム (6.48 mg /100 g 体重) を腹腔注射し, 深麻酔を行った.

2. 新生ニューロンの標識

定位脳固定装置を用いて生体細胞マーカーである Cell Tracker Orange (CTO, Molecular Probes, USA) 2mM, 0.3 μ l をニューロン新生の場である SVZ (Bregma から前方 0.5 mm, 側方 1.0 mm, 深度 2.0 mm) へ注入した¹⁷⁾.

頭皮をナイロン糸 (6-0) で縫合し, 麻酔から覚醒させ通常に飼育させて1~7日後, 4% パラフォルムアルデヒド及び電子顕微鏡観察用には0.05% グルタルアルデヒドを含む0.1M リン酸塩緩衝液 (PB) で心臓より灌流固定を行った. 全ての実験は, 川崎医科大学動物実験委員会の承認 (承認番号13-020, 13-022, 2013) を受け, 川崎医科大学動物実験指針に基づいて行われた.

3. 免疫組織化学法

(1) 免疫単染色

灌流固定後に脳を摘出し, ビブラトーム (VT1200S, Leica, Germany) を用いて50 μ m 厚の傍矢状断連続切片を作製した. スライスは, 0.3% Triton X, 0.05% アジ化ナトリウム含有1% ウシ血清アルブミンリン酸ナトリウム緩衝液 (BSA-PBS) に入れ, 20 $^{\circ}$ C, 1時間ブロッキング反応を行った. その後, CTO の抗体であるウサギ抗 Tetramethyl rhodamine (TMR, 1: 100希釈, Molecular Probes, USA) 抗体で20 $^{\circ}$ C, 1~3日間反応させた. 洗浄後スライスは, ビオチン標識ロバ抗ウサギ IgG (1: 200希釈, Jackson) BSA-PBS 中で, 20 $^{\circ}$ C, 2時間, さらに Alexa Fluor 594 fluoronano streptavidin (1: 200希釈, Nanoprobe, USA) 中で20 $^{\circ}$ C, 3時間,

その後 avidin-biotin complex PBS (ABC, 1: 200希釈, Vector) 中で20 $^{\circ}$ C, 2時間で反応させた. スライスを洗浄後, Metal Enhanced 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride substrate kit (metal-DAB, Thermo Scientific, USA) 溶液中で室温, 1~3分間発色反応を行った. 免疫染色後のスライスは, 0.05% オスミウム酸リン酸緩衝液で後固定を4 $^{\circ}$ C, 15分行い, 脱水後エポキシ樹脂 (TAAB) 包埋を行った. 包埋されたスライスは, 光学顕微鏡で確認後 (Olympus BX61 Olympus, Japan, Uplan Apo 40x/0.85, Uplan Apo 100x/1.35 油浸), RMS の各領域 (下降部: RMS1, 水平部: RMS2, 嗅球深部: core OB) の新生ニューロンを Lucivid (MicroBrightField, USA) を用いて三次元的にデジタルトレースし, 形態解析を行った. 以上は, 我々の従来の方法に従った^{10, 15)}.

(2) 多重蛍光染色

レーザーで標識されたニューロンの分化段階を確認するため, 各種マーカーを用いて多重蛍光免疫染色を行った. スライスは1% BSA-PBS でブロッキング反応後, 以下の一次抗体を組み合わせ20 $^{\circ}$ C, 1~3日間反応させた: (1) ウサギ抗 TMR 抗体 (1: 100希釈), (2) 遊走する新生ニューロン (神経芽細胞) のマーカーであるマウス抗 polysialylated neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM, 1: 5000希釈, T. Seki²⁰⁾ 抗体, (3) 神経前駆細胞のマーカーであるマウス抗 mammalian achaete scute homolog 1 (MASH-1, 1: 200希釈, BD Biosciences, USA) 抗体, (4) ニワトリ抗 GFP (1: 5000希釈, Molecular Probes, USA) 抗体. 一次抗体反応後, 標識シグナルを増強するためビオチン標識ロバ抗ウサギ IgG 抗体 (1: 200希釈) を20 $^{\circ}$ C, 2時間で反応させたのち, 以下の蛍光二次抗体を組み合わせ20 $^{\circ}$ C, 2時間反応させた: (1) fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識ロバ抗マウス IgG (1: 200希釈, Jackson), (2) FITC 標識ロバ抗ニワトリ IgY 抗体 (1: 200希釈, Jackson), (3) Alexa Fluor 594 fluoronano Streptavidin (1: 200). Vectashield (Vector H-1000) で封入後, 共焦

点レーザー顕微鏡 (LSM700, Zeiss, Germany, Plan Apochromat 63x/1.40 油浸, A1R-MP, Nikon, Japan, apochromat x25/NA 1.4 水浸) で観察撮影を行った。以上の多重蛍光染色は、従来の我々の方法に従った¹⁰⁾。

4. 電子顕微鏡による観察

1% BSA-PBS でブロッキング反応後、ウサギ抗 TMR 抗体 (1: 100希釈) およびマウス抗 PSA-NCAM 抗体 (1: 5000希釈) を20°C, 1-3日反応させたのち、ビオチン標識ロバ抗ウサギ IgG (1: 200希釈) 20°C, 2時間で反応させる。さらに、Alexa Fluor 594 fluoronano Streptavidin (1: 200希釈) および FITC 標識ロバ抗マウス IgG (1: 200希釈) 混合液で20°C, 3時間反応させた。共焦点レーザー顕微鏡 (LSM700, A1R-MP) で新生ニューロンを観察撮影後、PBS で洗浄し、20°C 条件下で avidin-biotin complex (ABC, 1: 200希釈, Vector, USA) を2時間反応させ、metal-DAB で発色反応後、3% グルタルアルデヒド溶液30分、および1% 四酸化オスミウム溶液による後固定を氷上温で1時間、2% 酢酸ウラン水溶液で電子染色を氷上で30分間行った。その後、室温でエタノール溶液を用いた脱水、酸化プロピレンに置換し、60°C でエポンアララルダイト混合樹脂にて熱重合包埋した。

光学顕微鏡で metal-DAB で置換された新生ニューロンを確認し、その標本をエポン樹脂に再包埋した。RMS を含む観察対象領域を残してトリミングし、ウルトラミクロトーム (Reichert-Nissei Ultra-Cuts, Leica, Germany) を用いて80 nm 厚の超薄連続切片を作製した。その後、透過型デジタル電子顕微鏡 (JEM-1400, JEOL, Japan) を用いて光学顕微鏡で観察した新生ニューロンを同定し、連続切片のモニター撮影 (3×5images) を倍率3,000倍で行った。撮影された画像から NeuroLucida (version 11, MicroBrightField, USA) を用いて対象となる新生ニューロンをデジタルトレースし、三次元再構築を行った。以上の免疫電子顕微鏡法は、従来の我々の方法に従った¹⁵⁾。

5. 新生ニューロンの経時的分布

TH-GFP マウスの SVZ に CTO 注入3日後の50 μm 厚傍矢状断連続切片18枚を用いて新生ニューロンの経時的な分布の定量解析を行った。共焦点レーザー顕微鏡 (LSM700) で各切片の SVZ から嗅球全ての領域、すなわち、個々の細胞と突起が同定可能な倍率 (LSM700: Plan Apochromat x20/0.8, A1R-MP: apochromat x25/NA 1.4 水浸) で一画像を撮影し、この画像を縦5画像×横8画像の広範囲モニターモードにより撮影した。このモニターモード撮影された切片を1.6 μm ごとに焦点を変え、各焦点位置にて同じモニターモード撮影を行い、深さ6~7 μm までの光学的モニター画像を得た (総撮影160画像/切片)。このようにして撮影された5,500 μm × 900 μm × 3,000 μm の脳内空間には新生→遊走→嗅球と言った RMS 全経路が含まれる。得られた三次元スタック画像を基に SVZ で産生された新生ニューロンと TH-GFP 陽性細胞の分布を NeuroLucida を用いて各切片上にプロットし、トレーサー注入部位からの距離を Sholl analysis (NeuroLucida explorer ver.11) で三次元的に計測した。

結果

1. 新生細胞の標識

標識された細胞がどのように分布しているのか、生体細胞マーカーである CTO を用い新生細胞を脳定位的に標識した。CTO で標識された細胞は、遊走経路内に認められ、嗅球へ到達していた。標識細胞は注入部位から嗅球までの RMS の全経路にわたり広範に分布しており発生起源の同定された新生細胞の様々な分化段階を同一切片で観察することができた (図1)。

2. 標識細胞の形態

CTO で標識した新生細胞を詳細に形態を解析するために、CTO に対する特異的抗体である抗 TMR 抗体、および新生ニューロンのマーカーである抗 PSA-NCAM 抗体を用い多重免疫染色を行った (図2-a)。光学顕微鏡を用いた

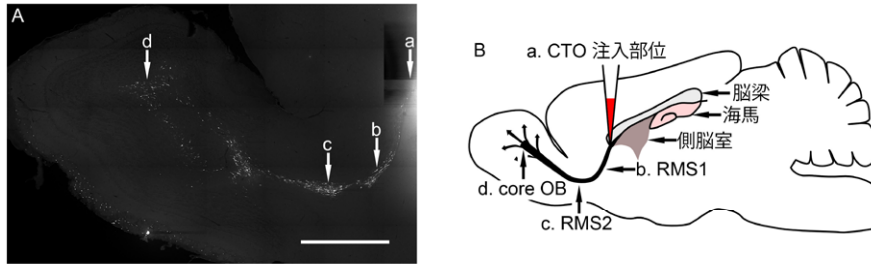


図1 Cell Tracker Orange (CTO)を用いた新生細胞の標識

A: CTO注入3日後の傍矢状断像。注入部(a)から嗅球深部(d)まで全ての遊走経路(a~d)で新生細胞がCTOで標識されていた。B: 傍矢状断全体の模式図。a: CTO注入部位, b: RMS1, c: RMS2, d: core OB, RMS: rostral migratory stream, OB: olfactory bulb, Scale bar=1 mm(白線)

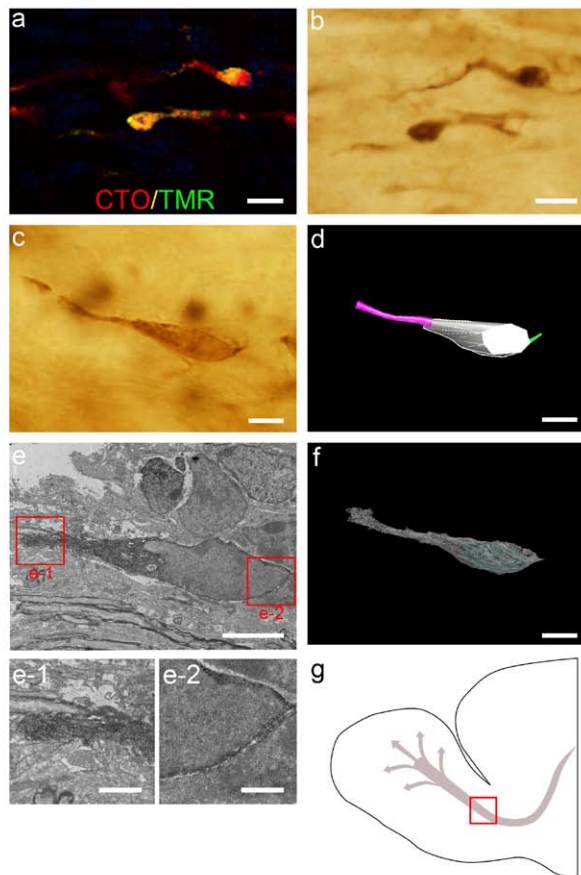


図2 光学顕微鏡像と電子顕微鏡像との対応

CTO注入3日後の切片を示す。a: CTOで標識された新生細胞は全てTMR陽性であった。b: aのmetal-DABに置換された新生細胞。c: 別のCTO/PSA-NCAMで蛍光標識された新生ニューロンをmetal-DABに置換した像。d: cの新生ニューロンのデジタルトレース像。e: cの新生ニューロンの透過型電子顕微鏡像。細胞質の形態は楕円形であり、細胞突起は伸展していた。e-1: eの拡大図。細胞突起の先端までmetal-DABで置換され、突起の先端は細胞体に比べ辺縁が不整であった。e-2: eの拡大図。ニューロンの細胞体は細胞質に乏しく、核は楕円形であった。f: 超薄連続切片法を用いた電子顕微鏡画像から取得したeの新生ニューロンの三次元構築像。g: 傍矢状断模式図。cの新生ニューロンが観察された部位を赤枠で示す。CTO: Cell Tracker Orange, TMR: Tetramethyl rhodamine, DAB: diaminobenzidine, PSA-NCAM: polysialylated neural cell adhesion molecule, a, b: Scale bar=10 μm (白線), c-e, f: Scale bar=5 μm (白線), e-1, e-2: Scale bar=1 μm (白線)

形態学的な特徴と、電子顕微鏡を用いた微細構造を解析するため metal-DAB に置換し (図 2-b, c), 光学顕微鏡下では, Lucivid によるデジタルトレースを行い三次元再構築を行った (図 2-d). 次に, デジタルトレースした同一標本で超薄連続切片法を用い透過型電子顕微鏡で観察した (図 2-e). 新生ニューロンの細胞体は楕円形で細胞質に乏しく, 核も楕円形で, 突起の先端まで metal-DAB の反応が見られた (図 2-e-1, 2). さらに, 電子顕微鏡写真をデジタルトレースし三次元再構築法を行ったところ (図 2-f), 突起の先端の細部まで光学顕微鏡によるデジタルトレース所見と一致した. なお, 突起の先端は細胞体に比べ辺縁が不整であることがわかった (図 2-e-1, 2).

RMS 各領域に遊走する新生ニューロンについてデジタルトレース後に三次元再構築をしたところ, 細胞の形態変化に多様性があることがわかった. RMS の各部位で特徴のある新生ニューロンの形態変化を認め, 単極性 (図 3-a), 双極性 (図 3-b), 多極性ニューロン (図 3-c) の3種類に分類した. RMS1では細胞体の長径×短径は $9.10 \pm 0.51 \times 4.00 \pm 0.13 \mu\text{m}$ (平均値±SE: n=24), 突起の長さは $19.71 \pm 2.50 \mu\text{m}$ (平均値±SE: n=24) であるのに対し, core OB では細胞体の長径×短径は $11.38 \pm 0.35 \times 5.73 \pm 0.19 \mu\text{m}$ (平均値±SE: n=29), 突起の長さは $30.87 \pm 3.64 \mu\text{m}$ (平均値±SE:

n=29) であった. そのほか細胞体表面積および体積, 突起の表面積および体積, 突起の分岐

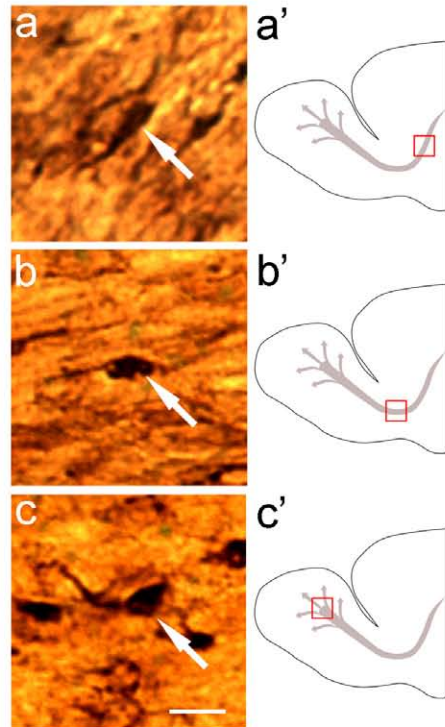


図3 新生ニューロンの形態変化

代表的な新生ニューロンの形態変化. a: 単極性ニューロン (矢印), a': a の新生ニューロンが観察された部位 (赤枠; RMS1), b: 双極性ニューロン (矢印), b': b の新生ニューロンが観察された部位 (赤枠; RMS2), c: 多極性ニューロン (矢印), c': c の新生ニューロンが観察された部位 (赤枠; core OB), RMS: rostral migratory stream, OB: olfactory bulb, Scale bar=10 μm (白線)

表1 新生ニューロンの形態解析

	RMS1 (n=24)	RMS2 (n=26)	core OB (n=29)
細胞体長径 (μm)	9.10 ± 0.51	10.72 ± 0.35	11.38 ± 0.35
細胞体短径 (μm)	4.00 ± 0.13	4.26 ± 0.16	5.73 ± 0.19
細胞体表面積 (μm^2)	91.74 ± 4.78	99.23 ± 4.17	136.28 ± 4.70
細胞体体積 (μm^3)	72.38 ± 4.73	79.73 ± 5.01	134.11 ± 6.62
突起の長さ (μm)	19.71 ± 2.50	29.11 ± 3.26	30.87 ± 3.64
突起の表面積 (μm^2)	44.79 ± 6.74	75.11 ± 8.93	88.20 ± 10.58
突起の体積 (μm^3)	9.46 ± 1.54	18.17 ± 2.39	25.58 ± 3.34
突起の分岐数	0.29	0.42	0.59

表2 新生ニューロンの形態変化

	RMS1 (n=24)	RMS2 (n=26)	core OB (n=29)
単極性ニューロン	91.67%	92.31%	65.52%
双極性ニューロン	8.33%	7.69%	24.14%
多極性ニューロン	0%	0%	10.34%

数 (bifurcation) についても標識部位 (ニューロン新生部位) から離れるに従って漸増傾向を示した (表 1). 新生ニューロンの形態変化については, RMS1から core OB へ遊走するにつれて単極性ニューロンの割合が91.67% から65.52% と減少し (n=24), 多極性ニューロンの割合が0% から10.34% と増える傾向 (n=29) を示した (表 2). このように SVZ から発生して間もない新生ニューロンと core OB まで遊走したものとを比較することで形態の多様性が明らかとなった.

また, 新生ニューロンは遊走時に細胞体を中心として突起を伸長させる. RMS1ではRMSの方向に細胞突起を伸展していたが, core OBでは様々な方向へ細胞突起を伸展していた (図 4-b, c, d). そこで, 細胞体を中心として突起がどのように分岐しているのかデジタルトレース (図 4-b', c', d') に基づいて極性解析を行った (図 4-b'', c'', d'', 表 3). RMS1では75% (n=24) の新生ニューロンがRMSの方向とほぼ平行に嗅球側へ細胞突起を伸展したが, core OBでは44.83% (n=29) と減少した. 一方 core OBでは

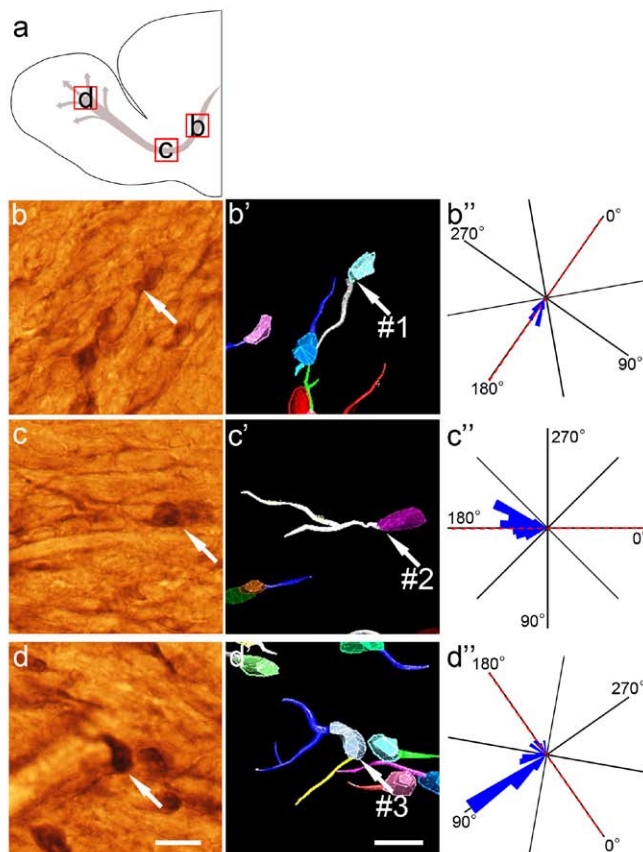
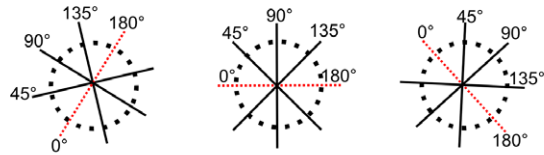


図4 新生ニューロンの極性解析

CTO 注入 3 日後の切片を示す. a: 傍矢状断模式図. RMS1 (b), RMS2 (c), core OB (d) の位置を示す. b: RMS1 で観察された新生ニューロン (矢印) の metal-DAB 像. b': b で観察された新生ニューロンのデジタルトレース像 (#1). b'': b で観察された新生ニューロンの極性解析. RMS の方向に沿って細胞突起を伸展させていた. c: RMS2 で観察された新生ニューロン (矢印) の metal-DAB 像. c': c で観察された新生ニューロンのデジタルトレース像 (#2). c'': c で観察された新生ニューロンの極性解析. RMS の方向に沿って細胞突起を伸展させていた. d: core OB で観察された新生ニューロン (矢印) の metal-DAB 像. d': d で観察された新生ニューロンのデジタルトレース像 (#3). d'': d で観察された新生ニューロンの極性解析. RMS の方向に対して細胞突起を異なる方向へ伸展させた. CTO: Cell Tracker Orange, RMS: rostral migratory stream, OB: olfactory bulb, DAB: diaminobenzidine, Scale bar=10 μm (白線)

表3 RMSの接線方向に対する細胞突起の極性変化

RMSの接線方向に対する細胞突起の向き	RMS1 (n=24)	RMS2 (n=26)	core OB (n=29)
0-45°	75%	88.46%	44.83%
45-90°	0%	0%	27.59%
90-135°	0%	0%	10.34%
135-180°	25%	11.54%	17.24%



赤点線はRMSの接線方向を示す。

RMSの方向と異なる方向(45°から135°)に細胞突起を伸展する新生ニューロンを37.93%(n=29)認めた。すなわち、新生ニューロンはcore OBへ遊走しながら細胞突起の伸展極性を変え、形態を多様に変化させていることが明らかとなった。

3. 標識細胞の分化

新生した細胞は、神経前駆細胞、神経芽細胞を経て遊走し、嗅球に組み込まれて化学的性質を発現してニューロンとなるという分化の過程をたどる。

(1) 神経前駆細胞

MASH-1はニューロンへの分化を運命づける転写因子の1つで、神経前駆細胞のマーカである。このMASH-1に対する特異的抗体を用いた多重免疫染色を行ったところ、MASH-1は新生部位である側脳室前角のSVZに多く発現するものの、RMSの全領域にも散在的に分布することがわかった(図5)。更にそれを多重染色することで、少なくともこれまでの解析では、CTOで標識された新生細胞はMASH-1を発現することはなかった。この結果から、本研究で標識された遊走細胞は前駆細胞ではないことがわかった(図5)。

(2) 遊走細胞の同定

CTOで標識された細胞の遊走を検証するため、抗PSA-NCAM抗体を用いた多重蛍光免疫染色を行った。PSA-NCAMは細胞外マトリッ

クスに発現しているタンパクで神経芽細胞を標識できる。CTOとPSA-NCAMに対する二重蛍光免疫標識では、99.4%のCTO陽性細胞の周囲にPSA-NCAMが発現していた(図6)。すなわち、RMSに認められるCTO陽性細胞は遊走している新生ニューロンであることがわかった。

(3) THの発現

RMSに局在するTH-GFP陽性細胞は、主要なニューロンマーカーであるTHの遺伝子を発現している。TH-GFP陽性細胞は、嗅球表層のGLに限局しているTH陽性細胞と対照的に嗅球深部にも認められる。これが深部に認められたTH-GFP陽性細胞が遊走しているものかを検証するために、CTOとTH-GFPの発現の関係を検証した。その結果、TH発現細胞は僅かであるがRMS全領域に認められ、形態変化は乏しいものの、発生直後からTH-GFPを発現しながら嗅球側へ遊走する像がRMSの各領域に認められた(図7)。

(4) 標識細胞の分布と多様性

CTOで標識された細胞は、遊走性を示す細胞周囲のPSA-NCAM、さらに分化が進みTHを発現するものがあり、これらの細胞がRMS中にどのように特異的に分布しているのか1例を挙げる。左側全脳のCTOで標識された新生細胞数を調べたところCTO/PSA-NCAM陽性細胞は4,528個(図8-a; 青)、CTO/TH-GFP陽性

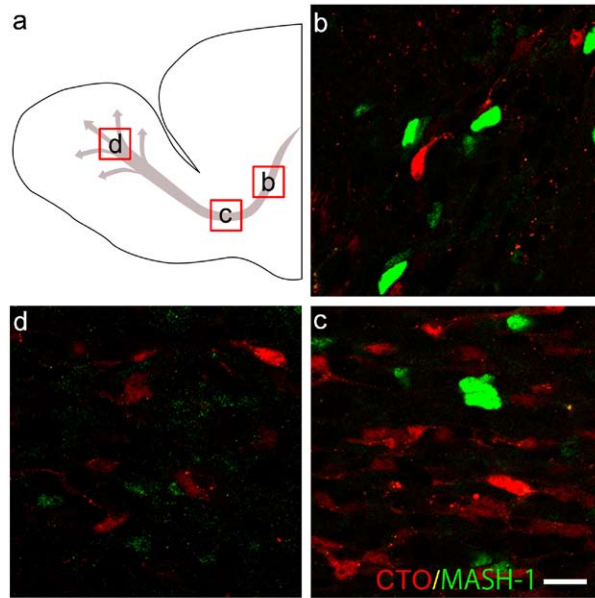


図5 CTO/MASH-1の2重蛍光染色による神経前駆細胞の標識
CTO注入3日後の切片を示す。a: 傍矢状断模式図。RMS1 (b), RMS2(c), core OB(d)の位置を示す。b-d: CTO(赤)とMASH-1(緑)は別の細胞に発現し、CTO/MASH-1陽性ニューロンは認められなかった。嗅球入口部までMASH-1陽性ニューロンは認められ、嗅球に入ると徐々に蛍光強度は減衰した。CTO: Cell Tracker Orange, MASH: mammalian achaete schute homolog, RMS: rostral migratory stream, OB: olfactory bulb, Scale bar=10 μm (白線)

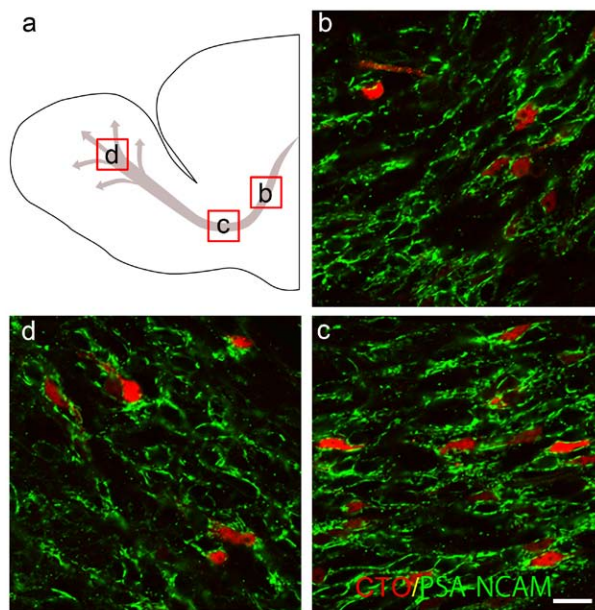


図6 CTO/PSA-NCAMの2重蛍光染色による神経芽細胞の標識
CTO注入3日後の切片を示す。a: 傍矢状断模式図。RMS1 (b), RMS2(c), core OB(d)の位置を示す。b-d: CTO/PSA-NCAM陽性細胞をRMS1 (b), RMS2(c), core OB(d)に認めた。ほぼ全てのCTO陽性細胞(赤)の周囲にPSA-NCAM(緑)が発現していた。CTO: Cell Tracker Orange, PSA-NCAM: polysialylated neural cell adhesion molecule, RMS: rostral migratory stream, OB: olfactory bulb, Scale bar=10 μm (白線)

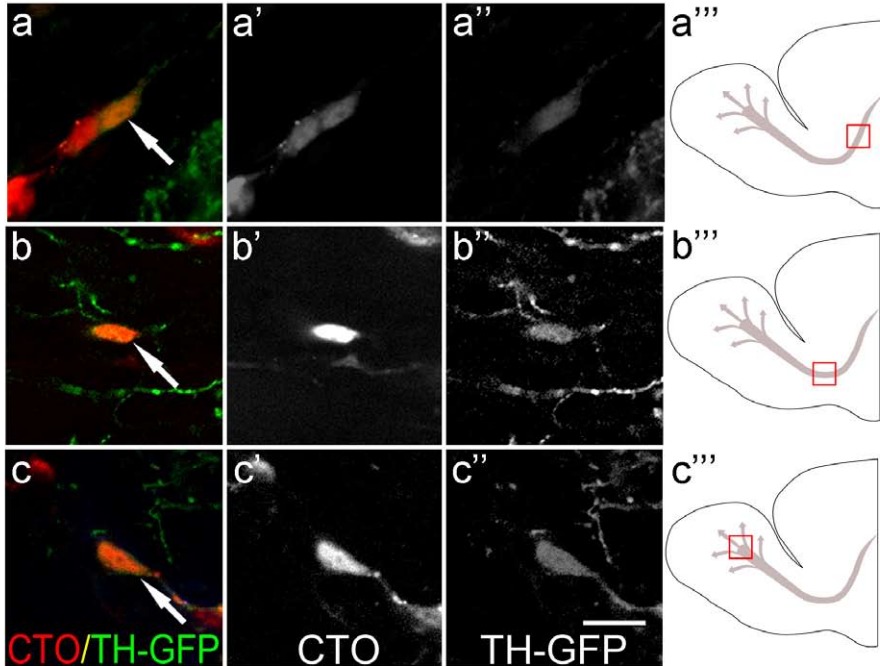


図7 Tyrosine Hydroxylase-Green Fluorescent Protein トランスジェニックマウス (TH-GFP マウス) の CTO/TH-GFP の 2重蛍光染色による TH ニューロンの標識

TH-GFP マウスの脳の CTO 注入 3 日後の切片を示す (CTO は赤, TH-GFP は緑, 共陽性は黄). 形態の a: RMS1 に観察された CTO/TH-GFP 陽性細胞 (矢印). a': a の細胞の CTO 単独像. a'': a の細胞 (矢印) の TH-GFP 単独像. a''': 傍矢状断模式図, 赤枠は a の細胞が観察された部位. b: RMS2 に観察された CTO/TH-GFP 陽性細胞 (矢印). b': b の細胞 (矢印) の CTO 単独像. b'': b の細胞 (矢印) の TH-GFP 単独像. b''': 傍矢状断模式図, 赤枠は b の細胞が観察された部位. c: RMS3 に観察された CTO/TH-GFP 陽性細胞 (矢印). c': c の細胞 (矢印) の CTO 単独像. c'': c の細胞 (矢印) の TH-GFP 単独像. c''': 傍矢状断模式図, 赤枠は c の細胞が観察された部位. a-c: RMS の各領域で認められた CTO/TH-GFP 陽性細胞の形態変化は乏しい. CTO: Cell Tracker Orange, RMS: rostral migratory stream, Scale bar=1 mm (白線)

細胞は78個 (図 8-a; 黄緑), CTO 単独陽性細胞は30個 (図 8-a; 赤) であった. CTO 標識された細胞のうち約1.7% が TH-GFP 陽性細胞であり, CTO/PSA-NCAM と CTO/TH-GFP 陽性細胞は嗅球側に到達する前に漸増傾向を示した (図 8-b, c). CTO/TH-GFP 陽性細胞は嗅球深部で最も発現していたが, RMS1 でも認められ発生直後から発現する可能性が示唆された (図 8-c).

考察

本研究は, 日齢および発生源を正確に同定した遊走する新生ニューロンにおける形態変化および分化の過程を, 免疫組織学法, 電子顕微鏡連続切片法を組み合わせデジタルトレースで

形態解析を加えた三次元的構造を解析することにより, 新生ニューロンの遊走および分化の過程を明らかにすることを目的に行ったものである. その結果, 遊走過程における新生ニューロンに細胞突起の形態と伸展極性に多様性が認められ, 生後早期に TH 遺伝子を発現していることが初めてあきらかになった.

1. 新生細胞の標識法

Puche A. C らは2001年に Cell Tracker が優れた蛍光プローブであることを提唱した¹⁷⁾. この蛍光プローブは細胞の運動, 局在, 遊走などのモニタリングが可能な優れたプローブであり, ライブイメージなど様々な細胞生物学的な解析に応用できる. この蛍光プローブは細胞膜を自

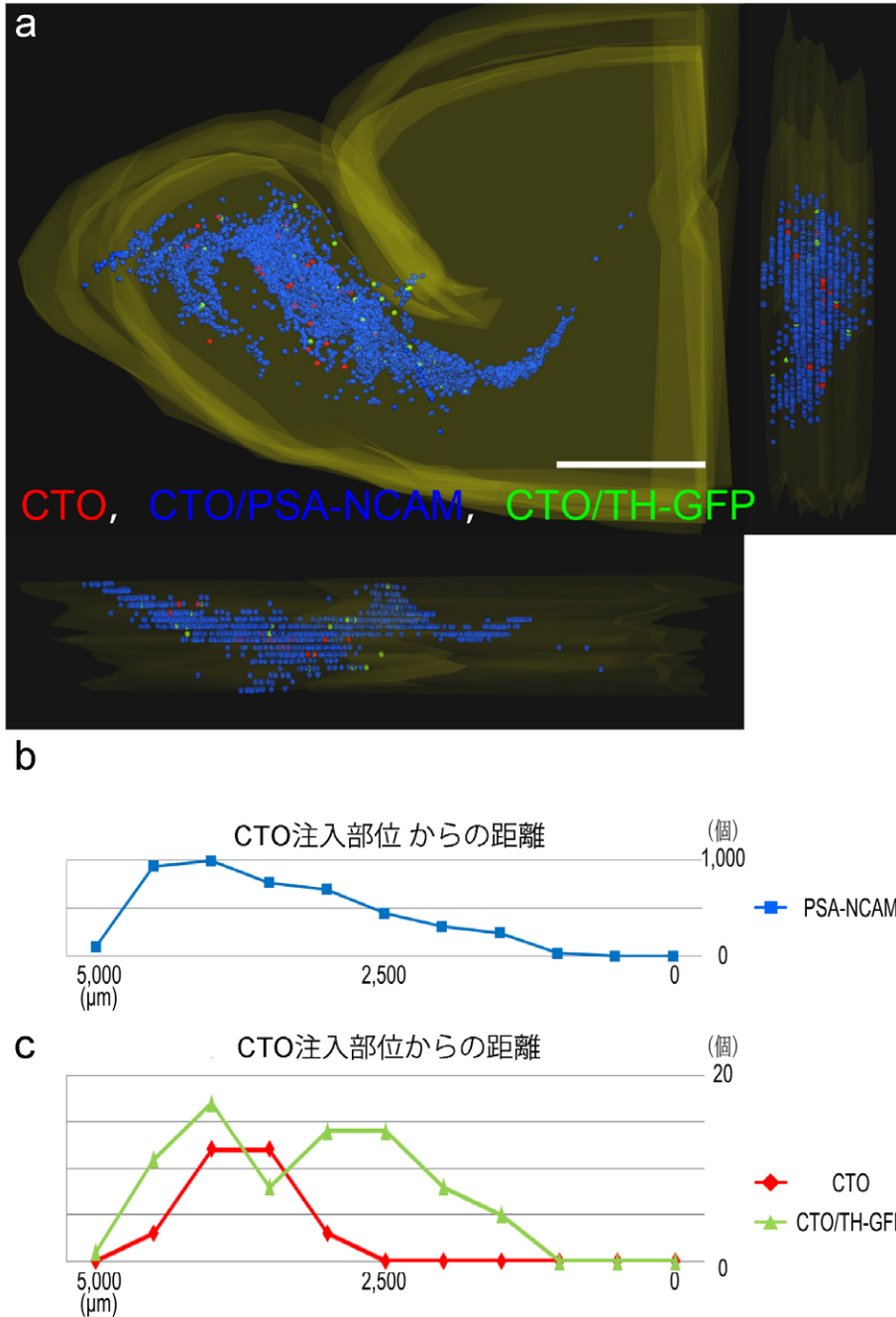


図8 Tyrosine Hydroxylase-Green Fluorescent Protein トランスジェニックマウス(TH-GFP マウス)のCTO, CTO/PSA-NCAM, CTO/TH-GFP 陽性細胞の分布
 a: TH-GFP マウスの脳へCTO 注入3日後の左側全脳の三次元再構築像。CTO 単独陽性細胞(赤, 30個), CTO/PSA-NCAM 陽性細胞(青, 4528個), CTO/TH-GFP(黄緑, 78個)の分布を示す。b: CTO 注入部位からCTO/PSA-NCAM 陽性細胞が局在する部位までの距離をグラフで示す。CTO/PSA-NCAM 陽性細胞は嗅球へ到達する前に漸増傾向を示した。c: CTO 注入部位からCTO/TH-GFP 陽性細胞およびCTO 単独陽性細胞が局在する部位までの距離をグラフで示す。CTO/TH-GFP 陽性細胞はRMS1で認められ、嗅球へ到達する前に漸増傾向を示した。CTO: Cell Tracker Orange, PSA-NCAM: polysialylated neural cell adhesion molecule, RMS: rostral migratory stream, Scale bar=1 mm (白線)

由に通過し、一旦細胞内に取り込まれると細胞非透過性の反応生成物へ変換される。クロロ基またはプロモメチル基を含有し、グルタチオンSトランスフェラーゼを媒介としてチオール基と反応する²¹⁾。細胞に取り込まれた蛍光プローブは細胞分裂を生じても娘細胞へ伝達されるが、隣接する細胞には伝達されない。このトレーサーの利点は、局在している多くの新生細胞を標識できることにある¹⁷⁾。この新規のトレーサーの有用性を用いて本研究の解析を行った。

まず、遊走する新生ニューロンの起源を特定するためには、新生ニューロンの発生部位の細胞を選択的に標識しなければならない。新生細胞の標識には、トリウムチミジンやDNA合成の際に取り込まれる物質として臭化デオキシウリジン (BrdU)²²⁾が用いられてきたが、DNAを合成した細胞を非特異的に標識するため、起源を同定することは困難である。線条体²³⁾、中脳黒質²⁴⁾など、SVZ以外の新生ニューロンが標識される可能性があり、また、レトロウイルスベクターを感染させ新生細胞を標識できるが²⁵⁾、感染後の生存日数が限られることから、CTOとは対照的にごく少数の細胞しか標識できず効率が悪い¹⁷⁾。

本研究では、Puche A. Cらの方法を用い、SVZへCTOを注入することで新生細胞を直接標識した¹⁷⁾。これにより、解析する細胞の日齢、発生部位と発生起源が同定できるようになった。Puche A. Cらは遊走細胞に対しライブイメージを用いて組織学的観察を行ったが詳細な解析を行わなかった。そこで本研究はこの方法を応用してCTOの抗体である抗TMRを用いるレーザー顕微鏡による解析、Lucividを用いた光学顕微鏡による解析、超薄連続切片法を用いた電子顕微鏡による解析を行った。

Namらの報告によると、新生細胞は全長約5 mmのRMSを約70~80 $\mu\text{m}/\text{h}$ の速度で移動する⁷⁾ことから嗅球へ到達するには約3日間かかると予想される。我々の実験でもRMSは全長 $4,519 \pm 117 \mu\text{m}$ (平均値 \pm SE)で、SVZから発生した新生細胞は遊走し約3日で嗅球へ到

達していることから、本研究の生体標識法においても新生細胞の遊走は正常に行われていると考える。また、脳定位手術を用いてCTOを注入し、3日後の切片を観察すると、注入部位からcore OBまでRMSの全領域にCTOで標識された新生細胞を認めた。このことはトレーサーが新生細胞へ短期に取り込まれるだけでなく、組織に貯留したトレーサーが順次取り込まれることによると考えられる。これは最大3日までの多様な時間相の細胞形態の観察が可能となることを意味する。すなわち、注入部位付近の標識された直後の細胞や、標識後3日経過した細胞まで1枚の切片で様々な分化段階の細胞を同時に解析できる利点があり、細胞の形態変化の詳細な解析を可能とする。このような網羅的な組織的解析はこれまでにない。

2. RMSにおける形態と分化

遊走する新生細胞は、新生ニューロン(神経芽細胞)のマーカであるPSA-NCAMが免疫陽性であることが知られている²²⁾。そこで、抗PSA-NCAM抗体を用い、CTOで標識された新生細胞が、ニューロンに分化する神経芽細胞か、すなわち新生ニューロンかどうかを検証した。蛍光標本は観察中に退色する欠点があり、広範囲に存在する新生ニューロンの形態を長時間観察するには不向きである。CTO/PSA-NCAM免疫陽性新生ニューロンを、より安定した染色像へ置き換えるため、抗TMR抗体を用い染色した後、metal-DABで置換を行った。こうすることで光学顕微鏡を用いて高感度で新生ニューロンの形態を詳細に観察でき、また電子顕微鏡用に応用できる利点がある。

Loisらは電子顕微鏡を用いRMSを形成するアストロサイトの突起によって形成されるトンネル状構造の中に存在する細長い形態の遊走細胞を確認した²⁶⁾。また、DoetschらはSVZに存在する新生ニューロンの構造を電子顕微鏡で三次元的に解析し、それらの特徴からA cell(神経芽細胞)、B cell(アストロサイト)、C cell(神経前駆細胞)と定義した²⁷⁾。A cellの形態

は楕円形で細胞質に乏しく、核は楕円形で陥入を認めクロマチンはまばらであるという特徴を持つ²⁷⁾。これは Lois らが報告した RMS に存在した遊走細胞と同様の構造であった。このうち我々が標識した新生ニューロンは、A cell に類似する形態であった。Lois や Doetsch らの解析では新生細胞の発生起源を同定せずに、RMS にみられた新生細胞の位置と形態のみで解析している^{26, 27)}。我々は新生細胞の発生起源を同定しながら、光学顕微鏡および電子顕微鏡を用い解析を行っており、より信頼性の高い形態解析ができたと考える。しかし、新生ニューロンの遊走に関する微小管蛋白や細胞骨格の変化は、ほとんどないと報告があり^{26, 27)}、我々の電子顕微鏡を用いた解析においても同様の結果が得られるに留った。

さらに詳しく観察するためには新生ニューロンの形態変化をライブイメージで見る必要があると考える。新生ニューロンの運動性を観察する時には微小管蛋白、アクチンなどの細胞内小器官が加わる可能性が示唆されるが、それにはライブイメージにより新生ニューロンの細胞内外の物質の変化に注目する必要がある。

神経前駆細胞が遊走する新生ニューロンに含まれるかどうか、抗 MASH-1 抗体で染色し CTO との共存を検討したところ、神経前駆細胞は CTO とほとんど共存を認めなかった。PSA-NCAM は細胞接着分子で細胞骨格に関わり構造の可塑性を促進する^{28, 29)}。Seki らの報告によると、PSA-NCAM は胎生期に脳の広範囲に発現し、遊走、突起およびシナプスの形成を調節するが、生後には劇的に減少し DG や SVZ で発現が維持され神経発生およびシナプスのリモデリングに作用する²²⁾。また、細胞の生存調節にも重要な役割を持つと報告されている²²⁾。標識された新生ニューロンは、嗅球深部に近づくにつれて細胞体表面積、体積に変化がみられ、RMS の接線方向に対して極性の変化が認められた。これらの細胞周囲には PSA-NCAM が強く発現することがあり、形態の変化に影響していると考えられる。

3. TH-GFP 細胞の発現

特に RMS1 で TH-GFP を発現することは興味深い。これらの細胞周囲に PSA-NCAM の発現を認め、形態や細胞極性を変化させながら移動していることが示唆されたが、実際の形態の変化は乏しい。また、TH-GFP 陽性細胞の発現場所について検討したところ、RMS 全体に TH-GFP 陽性細胞の発現を認め、CTO で標識された細胞が TH-GFP 陽性を示すのは 1.7% に留まる。これまで TH 細胞は蛋白レベルでは糸球体にはほぼ限局し、遺伝子レベルでは深部にも散在するが、これらの細胞が遊走新生由来のニューロンであるのかわからなかった。そこで本研究において生体トレーサーを注入したところ、RMS1 に TH-GFP 細胞が認められることから遺伝子の発現は新生後まもなく行われていることが初めてわかった。本研究では解析例に限られるが、TH の発現が CTO の約 1.7% に留まることから考えると、かなり早期に分化している細胞はそれほど多くはないと推測される。この点については、今後、解析例を増やし検討したい。また、TH-GFP 陽性細胞は core OB で最も多く認められ、一部の新生ニューロンは嗅球に入ると TH-GFP を発現する可能性が示唆され、今後 TH-GFP 陽性細胞の形態変化をより詳細に解析したい。

4. 今後の課題

Lazarini らは成体マウスの嗅球に 6-hydroxydopamine を使用してドーパミン作動性ニューロンを選択的に除去した後に、Lentivirus で標識され SVZ から産生された多くの新生ニューロンが嗅球に遊走し、ドーパミン作動性ニューロンの補充が行われ修復されることを証明した³⁰⁾。我々は鼻閉後の TH-GFP マウスにおける TH 発現細胞変化を最近報告しており¹⁴⁾、SVZ から産生される TH-GFP 細胞の産生と、遊走がどのように変化していくのか解析していきたい。同時に遊走細胞、細胞の供給が嗅覚機能にどのような影響を及ぼすかは今後の興味深い課題と言える。

臨床医学的にはTHは、中脳黒質においてドーパミンの産生低下が認められるパーキンソン病³¹⁾や、中脳-皮質ドーパミン系の低活動および過活動が関係する統合失調症³²⁾など関係が深い。また、外傷で脳実質が損傷を受けた場合、一部の新生ニューロンが損傷部位へ移動し、神経回路を修復することが認められており³³⁾再生医療分野で注目を集めており臨床的意義は深い。脳梗塞および神経変性疾患治療などの再生医学の観点から新生ニューロンに関する研究は注目され進歩しているが、ニューロン新生から遊走後、どのように傷害細胞と置換され、どのように神経回路へ組み込まれるかなど、新生ニューロンの分化に関しては未だ不明な点が多い³⁰⁾。これは細胞組織を統合的にみた時空間的解析が無いことに起因すると考えられ、本研究において行われた嗅覚系ニューロン新生の解析法、およびそれにより得られた形態学的基盤を用いることで、様々な他の脳領域におけるニューロン新生、および再生に関する研究に応用できると思われる。

結 語

脳定位の手術によりCTOで標識された新生細胞はRMS全体に認められ、これらの細胞は全てPSA-NCAM陽性であり、分化の過程を同一標本で確認できることがわかった。免疫組織的化学法、電子顕微鏡連続切片三次元再構築法を用い、詳細に形態を解析した結果、新生ニューロンは嗅球深部で形態をダイナミックに変化させていた。その形態の変化にはPSA-NCAMが関与すると考えられた。TH-GFP陽性細胞はRMS全体にわたり存在し、形態変化よりも早期にTHの遺伝子発現が認められた。今後はTH-GFP陽性細胞の構造変化やシナプスの形成に注目し、電子顕微鏡による微細構造解析を行い、神経回路への組み込みを探索したいと考えている。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、川崎医科大学解剖学教室

の研究補助員の方々に深く感謝いたします。TH-GFPマウスを譲渡していただいた福島県立医科大学医学部附属生体情報伝達研究所生体機能研究部門 小林和人教授と英文抄録の校正を快諾頂いた Renee E. Cockerham 博士 (Program in neuroscience, University of Maryland, School of Medicine, Baltimore, USA) に心より感謝いたします。本研究は、科学研究費 (24500418)、川崎医科大学プロジェクト研究費 (23基整-1) (23基-63) (24基-68) の援助を受けて行われました。

また研究を進めるにあたり、川崎医科大学解剖学教室の研究補助員、組織・電子顕微鏡センターの方々に感謝いたします。

引用文献

- 1) Ramón y Cajal S: Degeneration and regeneration of the nervous system (Raoul M, eds). New York, USA, Oxford University Press. 1928, p750
- 2) 岡野栄之: 神経再生・疾患モデルの研究の将来展望. 学術の動向 7: 93-96, 2011
- 3) Altman J: Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. *Anat Rec* 145: 573-591, 1963
- 4) Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM: Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci* 22: 629-634, 2002
- 5) Lois C, Alvarez-Buylla A: Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264: 1145-1148, 1994
- 6) Whitman MC, Greer CA: Adult neurogenesis and the olfactory system. *Prog Neurobiol* 89(2): 162-175, 2009
- 7) Nam SC, Kim Y, Dryanovski D, *et al.*: Dynamic features of postnatal subventricular zone cell motility: a two-photon time-lapse study. *J Comp Neurol* 505: 190-208, 2007
- 8) Lledo PM, Saghatelian A: Integrating new neurons into the adult olfactory bulb: joining the network, life-death decisions, and the effects of sensory experience. *Trends Neurosci* 28: 248-254, 2005
- 9) Lemasson M, Saghatelian A, Olivo-Marin JC, Lledo PM, *et al.*: Neonatal and adult neurogenesis provide two distinct populations of newborn neurons to the mouse olfactory bulb. *J Neurosci* 25: 6816-6825, 2005
- 10) Kosaka K, Aika Y, Toida K, Heizmann CW, Hunziker W, Jacobowitz DM, Nagatsu I, Streit P, Visser TJ, Kosaka T: Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb. *Neurosci Res* 23: 73-88, 1995

- 11) Kosaka K, Toida K, Aika Y, Kosaka T: How simple is the organization of the olfactory glomerulus?: the heterogeneity of so-called periglomerular cells. *Neurosci Res* 30: 101-110, 1998
- 12) Kosaka K, Kosaka T: Chemical properties of type 1 and type 2 periglomerular cells in the mouse olfactory bulb are different from those in the rat olfactory bulb. *Brain Res* 1167: 42-55, 2007
- 13) Baker H, Morel K, Stone DM, Marniak JA: Adult naris closure profoundly reduces tyrosine hydroxylase expression in mouse olfactory bulb. *Brain Res* 614: 109-116, 1993
- 14) 谷口美季, 清蔭恵美, 小林和人, 他: 嗅覚系脳神経回路の解明: 鼻閉モデルマウスを用いた嗅入力遮断効果の解析. *川崎医学会誌* 40: 67-75, 2014
- 15) Toida K, Kosaka K, Aika Y, Kosaka T: Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb--IV. Intraglomerular synapses of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons. *Neuroscience* 101: 11-17, 2000
- 16) Toida K: Synaptic organization of the olfactory bulb based on chemical coding of neurons. *Anat Sci Int* 83: 207-217, 2008
- 17) De Marchis S, Fasolo A, Shipley M, Puche A: Unique neuronal tracers show migration and differentiation of SVZ progenitors in organotypic slices. *J Neurobiol* 49: 326-338, 2001
- 18) Sawamoto K, Nakao N, Kobayashi K, *et al.*: Visualization, direct isolation, and transplantation of midbrain dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 6423-6428, 2001
- 19) 清蔭恵美, 野津英司, 松野岳志, 鈴木良典, 樋田一徳: 透過型電子顕微鏡による広範囲モンターージュ撮影と連続切片再構築法を用いた脳神経回路の解析. *細胞* 46: 605-608, 2014
- 20) Seki T: Hippocampal adult neurogenesis occurs in a microenvironment provided by PSA-NCAM-expressing immature neurons. *J Neurosci Res* 69: 772-783, 2002
- 21) Barhoumi R, Bowen JA, Stein LS, Echols J, Burghardt RC: Concurrent analysis of intracellular glutathione content and gap junctional intercellular communication. *Cytometry* 14: 747-756, 1993
- 22) Seki T, Arai Y: Distribution and possible roles of the highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) in the developing and adult central nervous system. *Neurosci Res* 17: 265-290, 1993
- 23) Reynolds BA, Weiss S: Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255: 1707-1710, 1992
- 24) Zhao M, Momma S, Delfani K, Carlen M, Cassidy RM, Johansson CB, Brismar H, Shupliakov O, Frisen J, Janson AM: Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci* 100: 7925-7930, 2003
- 25) van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH: Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415: 1030-1034, 2002
- 26) Lois C, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A: Chain migration of neuronal precursors. *Science* 271: 978-981, 1996
- 27) Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A: Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 17: 5046-5061, 1997
- 28) Gascon E, Vutskits L, Kiss JZ: Polysialic acid-neural cell adhesion molecule in brain plasticity: from synapses to integration of new neurons. *Brain Res Rev* 56(1): 101-118, 2007
- 29) Gascon E, Vutskits L, Jenny B, Durbec P, Kiss JZ: PSA-NCAM in postnatally generated immature neurons of the olfactory bulb: a crucial role in regulating p75 expression and cell survival. *Development* 134: 1181-1190, 2007
- 30) Lazarini F, Gabellec MM, Moigneu C, de Chaumont F, Olivo-Marin JC, Lledo PM: Adult neurogenesis restores dopaminergic neuronal loss in the olfactory bulb. *J Neurosci* 34: 14430-14442, 2014
- 31) Iacovitti L, Wei X, Cai J, Conley RR, Roberts RC: The hTH-GFP reporter rat model for the study of Parkinson's disease. *PLoS One* 2014; 9(12):e113151. doi: 10.1371/journal.pone.0113151.
- 32) Perez-Costas E, Melendez-Ferro M, Rice MW, Conley RR, Roberts RC: Dopamine pathology in schizophrenia: analysis of total and phosphorylated tyrosine hydroxylase in the substantia nigra. *Front Psychiatry* (Epub: 2012. 4. 9), doi: 10.3389/fpsy.2012.00031.
- 33) Yamashita T, Ninomiya M, Hernández Acosta P, *et al.*: Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. *J Neurosci* 26: 6627-6636, 2006

〈Original Article〉

Three-dimensional structural analysis of newly generated cells for migration in the olfactory system of the adult mice brain

Shintaro TOKUOKA, Emi KIYOKAGE, Kazunori TOIDA

*Department of Anatomy, Kawasaki Medical School,
577 Matsushima, Kurashiki, Okayama, 701-0192, Japan*

ABSTRACT In mammals, it is well known that some olfactory neurons are generated in the adult brain. Newly generated cells (NGCs) are continuously born in the subventricular zone (SVZ) at the anterior horn of the lateral ventricle, migrate along the rostral migratory stream (RMS), and differentiate into neurons in olfactory bulb (OB) layers. From the viewpoint of regenerative medicine, adult neurogenesis is attractive and has been investigated by many researchers. It remains to be clarified in detail how these differentiated neurons integrate into the bulbar circuit, however, because few integrative analyses have been done of the structure of NGCs through spatiotemporal identification by tracing during migration from birth to differentiation. Our present study thus aimed to clarify migration and differentiation of NGCs, which differentiate into periglomerular cells and granule cells, by immunohistochemistry, serial-sectioning/reconstruction electron microscopy (serial-EM), and digital morphometry after positive identification of NGCs by vital tracer labeling. First we performed stereotaxic injection of Cell tracker orange (CTO) into the SVZ of adult mice to label NGCs. 1-7days later, fixed brains were cut serially parasagittally. We confirmed CTO-labeled NGCs were distributed and reached the olfactory bulb through the RMS. Thereafter, we identified the three-dimensional structure of NGCs, focusing on migration and differentiation using anti-CTO and analyzed ultrastructure by serial-EM. CTO-labeled cells were immunoreactive for polysialylated neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM), a well-known marker for migrating NGCs. Digital morphology by NeuroLucida indicated new findings, showing structural variability of processes, especially polarity of process extension through the RMS. In addition, we clarified that genetic expression of tyrosine hydroxylase (TH), a marker for bulbar neurons, was found in the early phase after birth using TH-green fluorescent protein (GFP) transgenic mice. The present vital cell-labeling approach we used has the advantage of being able to examine the pleural phase of migration and differentiation in the same section, showing structural changes along with migration. Interestingly, genetic expression was expressed earlier than previously reported. Based on the structural results in the present study, it is worth examining the genetic expression of differentiation that determines the chemical coding of neurons and changes in variability of structure in future projects. *(Accepted on June 5, 2015)*

Key words : **adult neurogenesis, migration, tyrosine hydroxylase, electron microscopy, three-dimensional structure, olfactory system**

Corresponding author

Kazunori Toida

Department of Anatomy, Kawasaki Medical School, 577
Matsushima, Kurashiki, Okayama, 701-0192, Japan

Phone : 81 86 462 1111

Fax : 81 86 462 1199

E-mail : toida@med.kawasaki-m.ac.jp

