

氏 名 山中 創

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 884 号

学位授与の日付 平成 17 年 3 月 24 日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 Development of GABAergic local circuit neurons in
cerebellar cortex and effects of changes in local
environment on these neurons.

論文審査員 主査 教授 鍋倉 淳一
教授 川口 泰雄
教授 重本 隆一
講師 吉田 祥子（豊橋技術科学大学）
ユニットリーダー 小幡 邦彦（理化学研究所）

論文内容の要旨

脳機能は、神経回路網の働きにより実現されているが、発達期における神経回路の形成の仕組みは複雑で不明な点が多く残されている。特に、局所回路ニューロンの発生・移動などの研究は、その重要性にもかかわらず、不明な部分が残されている。そこで、本研究では抑制性の γ -アミノ酪酸 (γ -aminobutyric acid; GABA) 作動性介在ニューロンの生後発達、成熟過程に焦点をあて、構造の比較的単純な小脳皮質を選び、形態学的な解析を行った。

小脳皮質は明瞭な三層構造 (分子層; ML, プルキンエ細胞層; PL, 内顆粒層; IGL) で構成されており、5種類のニューロンが配置されているが、顆粒細胞以外はすべて GABA 作動性ニューロンである。その中でも、GABA 作動性介在ニューロンは、IGL のゴルジ細胞と ML のステレート/バスケット (S/B) 細胞である。ゴルジ細胞は、プルキンエ細胞と同じく、胎生期に第 IV 脳室の天井部分にある脳室帯 (VZ) から発生する。S/B 細胞は、顆粒細胞と同様に菱脳唇から外顆粒層 (EGL) にいたる領域で誕生・分裂すると考えられてきたが、レトロウイルスを使ったマーカー遺伝子導入実験によって、出生後に VZ から白質にいたる領域で誕生・分裂し、ML まで移動することが報告された (Zang and Goldman, 1996)。しかし、依然として、S/B 細胞が、小脳皮質発達期において、ML にどのように配置され定着するのかが不明であり、特に、移動の最終目的地である ML での S/B 細胞の細胞数や密度が、発達に伴いどのように変化するかの報告は未だない。本研究は新たな手法を用いて、この問いに解答を与えようとするものである。

また、局所回路ニューロンの発達に対し、神経構築における層構造の乱れのような局所環境の変化が、どのような影響を及ぼすかは、殆ど知られていない。強力な細胞分裂阻害剤であり、発達期の投与により小頭症を引き起こすメチルアゾキシメタノール (MAM) は、小脳ニューロンの層構造に異常を引き起こし、出生日 (P0) に投与することにより、ML に異所性顆粒層 (ectopic GL) が形成される (Yamanaka and Obata, 2004)。本研究では、出生直後 (P0) に MAM を投与することにより、この ectopic GL の出現という層構造の異常を作り出し、局所環境の変化が S/B 細胞の移動、回路形成に及ぼす影響を解析した。

本研究では、GABA 作動性ニューロンが GFP 蛍光を持つ GAD67-GFP ノックインマウスを利用した。発達期の小脳重量の経時的変化を較べたところ、このマウスと野生型との間に有意な差は認められなかった。また、野生型の小脳皮質との比較をニッスル染色で行い、細部構築の明確な異常や欠損は示されないことも確認した。さらに、GAD67-GFP ノックインマウスにおいて、GABA 作動性ニューロンに GFP 発現がある事を GABA 染色で確認した。

PL の横幅 $100\mu\text{m}$ あたりの PL/ML に含まれる S/B 細胞 (PL/ML にある GABA 作動性介在ニューロン) の数を生後 5、7、10、15、20/21 日 (P5, 7, 10, 15, 20/21) で調べたところ、P5 から P15 までの間、細胞数は増加し続けた ($p < 0.05$)。この間、PL/ML の厚みも同様に増加したため、面積あたりの S/B 細胞密度は、P5 から P15 までの間、ほぼ一定であった ($p > 0.05$)。

この S/B 細胞数の増加が、IGL からの移動による単純増加なのか、それとも自然細胞死 (アポトーシス) による負の制御が行われている中での動的平衡による増加なのかを確認するために、アポトーシスの解析を試みた。その結果、4つのアポトーシスマーカー (1本鎖 DNA、活性化型 caspase-3、TUNEL および Hoechst33258) で染め出される S/B 細胞が PL/ML に存在すること確認された。さらに、1本鎖 DNA を指標にしたアポトーシス細胞密度の解析結果から、S/B 細胞の約 0.1% にアポトーシスが起きていることが示された。これらの結果から、生後 2 週までの S/B 細胞では、動的平衡

による細胞数の増加がおきており、その負の制御にアポトーシスが関与していることが示唆された。これに加えて、発達期の白質において GABA 作動性介在ニューロンが多数観察され、密度の経時的な変化やアポトーシスも示すことができた。

次に、ectopic GL形成が、GABA作動性局所回路ニューロンの発達と回路形成に与える影響について、GAD67-GFPノックインマウスを用いた免疫組織化学法で検討した。ectopic GL形成時でのS/B細胞数、MLとPLの厚さおよびS/B細胞密度をectopic GL形成のおこらなかったMAM投与マウスをコントロールとして、GFP陽性Calbindin陰性のS/B細胞の分布を比較した。その結果、MLのS/B細胞数の減少 ($p < 0.05$)、MLの厚さの低下 ($p < 0.05$) およびMLのS/B細胞密度の上昇 ($p < 0.05$) が観察された。また、PLの細胞数、層の厚さ、細胞密度には有意な差は認められなかったことから、大部分のS/B細胞が移動を終えた後にectopic GLができたことを提案している。次に、軸索を示す抗neurofilament抗体を用いた免疫組織化学的観察において、ectopic GLの有無にかかわらず、軸索走行の明確な違いは観察されなかった。さらに、抗hyperpolarization-activated and cyclic-nucleotide-gated nonselective cation channel 1 (HCN1) 抗体で、バスケット細胞軸索末端 (バスケット) がプルキンエ細胞軸索起始部と形成するpinceau構造の面積を調べたところ、ectopic GL形成のある皮質部位において、減少傾向はみられたものの、有意な減少ではなかった ($p = 0.06$)。これらの結果から、ectopic GLの存在が、S/B細胞の軸索分布やpinceauに影響を与えないことが示唆された。

GAD67-GFPノックインマウスを用いた本研究により、発達期の小脳皮質GABA作動性局所回路ニューロン (S/B細胞) の細胞数や細胞密度の経時的変化およびアポトーシスの存在が初めて明確に示された。また、小脳皮質における異所性細胞配置がS/B細胞の数や密度に影響を与える可能性が示唆された。以上の知見は小脳機能発達の理解に構造的基礎を与えると同時に、小脳以外の領域における局所回路ニューロン発達の理解にも、比較のモデルを提供することにより、貢献するものと考えられる。

論文審査結果の要旨

小脳皮質の γ -アミノ酪酸 (γ -aminobutyric acid; GABA) 作動性介在ニューロンであるステレート/バスケット (S/B) 細胞の分子層/プルキンエ細胞層 (ML/PL) への移動に伴う、同部位における細胞数や密度の変化を、GABA作動性ニューロンがGFP蛍光を示すGAD67-GFPノックインマウスを主に利用して解明したものである。小脳皮質の矢状断面切片の横幅100 μ mあたりのML/PL全層に含まれるS/B細胞数は生後5日から15日まで増加し続けたが、この間、ML/PLの厚みも増加したため、単位面積あたりのS/B細胞密度は、この間ほぼ一定であった。アポトーシスマーカー陽性S/B細胞がこの時期のML/PLにおいて観察されるため、このML/PLにおける細胞総数/密度の発達は、細胞移動による増加とアポトーシスによる減少の動的平衡のうえにたつものと考えられる。これらGABA作動性ニューロンの発達にともなう配列/回路形成に対する局所環境に影響を検討するために、細胞分裂阻害剤の投与によってMLに異所性顆粒層 (ectopic GL) を形成させる技術を開発し、このectopic GL層の存在によるS/B細胞の移動および回路形成に及ぼす影響を解析している。、ほとんどのS/B細胞がectopic GLの形成に影響されず本来の移動先であるMLへ移動していることが示唆された。しかし、S/B細胞のプルキンエ細胞への投射構造であるpinceauxは、ectopic GL形成が存在すると縮小していた。これらの結果は、発達期の小脳局所回路ニューロンの細胞数、密度、アポトーシス、移動および回路形成に知見を与えるもので、小脳発達の理解に貢献するものと考えられる。これらのことから申請者の論文は学位論文として十分に相応しい内容であると結論した。