

氏名(本籍)	よし かわ まさ あき 吉川雅朗(埼玉県)		
学位の種類	博士(神経科学)		
学位記番号	博甲第4386号		
学位授与年月日	平成19年3月23日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	Runx1 selectively regulates cell fate specification and axonal projections of dorsal root ganglion neurons (Runx1は脊髄神経節ニューロンの細胞分化と軸索投射を選択的に制御する)		
主査	筑波大学教授	博士(医学)	榎正幸
副査	筑波大学助教授	医学博士	山本三幸
副査	筑波大学助教授	医学博士・薬学博士	野上晴雄
副査	筑波大学講師	博士(理学)	依馬正次

論文の内容の要旨

(目的)

転写因子 Runx は、哺乳類では Runx1~3 の3種類が存在し、脊髄後根神経節(DRG)では、Runx1が TrkA 陽性皮膚感覚性ニューロンに、Runx3は TrkC 陽性固有感覚性ニューロンに発現する。*Runx3*^{-/-}マウスでは、TrkC 陽性 DRG ニューロンは維持されるが、中枢および末梢の標的への固有感覚性 DRG ニューロンの軸索投射が著しく減少する。一方、*Runx1*^{-/-}マウスは、肝臓における二次造血の停止により胎生11.5日(E11.5)までに死亡するため、神経発生における Runx1 の機能は不明であった。本研究では、*GATA-1* プロモーター制御下で Runx1 を肝造血細胞に特異的に発現させることによって早期胎生致死を回避したマウス(*Runx1*^{-/-::Tg})を用いて、Runx1 の DRG 発生における機能を明らかにすることを目的とした。

(対象と方法)

Runx1 欠損による DRG ニューロンの変化を免疫組織化学法で調べるために、10 μ m または 12 μ m 厚の凍結切片を作製し、RUNX1、神経栄養因子受容体(TrkA, TrkB, TrkC, c-ret)、神経ペプチド(CGRP, substanceP, somatostatin)、カルシウム結合タンパク(calbindinD-28K, parvalbumin)、TRPチャンネル(TRPV1, TRPV2)、peripherin, Islet-1, Ki67, MAP2, Lmx1b に対する抗体を用いて、DAB 染色または蛍光三重染色を行い、同腹仔の *Runx1*^{-/-::Tg} とコントロール(*Runx1*^{+/+::Tg})を比較した。また、BrdU を用いて細胞分裂を、active-caspase3 抗体を用いてアポトーシスを調べた。

(結果)

1. 細胞数への影響

Runx1^{-/-::Tg} は、肝臓造血細胞の Runx1 発現により、E18.5 まで生存した。E17.5 で、*Runx1*^{-/-::Tg} の DRG の体積は 1.29 倍に、DRG ニューロン数は 1.18 倍に増加した。DRG 前駆細胞の細胞分裂のピークである E11.5 または E12.5 に BrdU を妊娠マウスに腹腔内投与し、E13.5 で解析したところ、E11.5 の投与では、

Runx1^{-/-}::Tg で BrdU 陽性ニューロンの割合が増加したが、E12.5 の投与では有意差はなかった。*Runx1^{-/-}::Tg* では、DRG ニューロンの細胞死のピークである E13.5 で、caspase3 陽性細胞の割合が減少していた。

次に、DRG ニューロン数の増加が、特定のサブタイプで起こるのかを調べるために、E17.5 で各種抗体を用いた免疫染色を行った。*Runx1^{-/-}::Tg* では、TrkA 陽性ニューロンが 1.43 倍、CGRP 陽性ニューロンが 2.74 倍、somatostatin 陽性ニューロンが 1.53 倍、TrkC 陽性ニューロンが 1.25 倍に増加したが、c-ret 陽性ニューロンは 0.41 倍に減少した。また、調べた全てのサブタイプで、CGRP を共発現するニューロンの割合が増加していた。

2. 軸索投射への影響

DRG ニューロンの軸索投射を調べたところ、*Runx1^{-/-}::Tg* では、E16.5 で脊髄後角表層に投射する CGRP 陽性線維が増加し、その傾向は E17.5 でより顕著になった。CGRP 陽性線維は、*Runx1^{+/+}::Tg* では脊髄後角表層に限局しているが、*Runx1^{-/-}::Tg* では TrkA 陽性線維の多くも CGRP を共発現した。*Runx1^{+/+}::Tg* では、TrkA 陽性線維と CGRP 陽性線維が、細い線維束として真皮と表皮基底部分に見られたが、*Runx1^{-/-}::Tg* では TrkA 陽性線維が真皮で増加し、その多くが CGRP を共発現していた。

(考察)

Runx1^{-/-}::Tg で DRG ニューロン数が増加した原因としては、細胞増殖の亢進とアポトーシスの減少が考えられた。Runx1 は DRG ニューロンの前駆細胞には発現しないことから、この変化は細胞自律的ではなく、Runx1 を発現する他の細胞を介して間接的に引き起こされたと考えられる。本研究で見られた *Runx1^{-/-}::Tg* での TrkA 陽性ニューロンと CGRP 陽性ニューロンの増加は、c-ret 陽性ニューロンの減少を伴っていた。この結果は、Runx1 が c-ret の発現を誘導し、CGRP の発現を抑制するという最近の報告を支持し、TrkA 陽性から TrkA 陰性 / c-ret 陽性への変換が阻害されている可能性を示唆する。細胞分化に加えて、脊髄後角表層および皮膚に投射する CGRP 陽性線維が増加し、その軸索投射にも異常が観察されたことから、Runx1 は DRG ニューロンにおける細胞分化と軸索投射に関与することが明らかになった。

審査の結果の要旨

本研究は、肝造血細胞に Runx1 を特異的に発現させることによって早期胎生致死を回避したマウスを用いて Runx1 の DRG 発生における役割を調べたものである。*Runx1^{-/-}::Tg* マウス胎児における DRG 構成ニューロンの種類と数の変化、ならびに DRG ニューロン軸索の投射を免疫組織化学的方法を用いて丹念に調べており、データの質は高い。得られた結果と先行研究の結果を合わせて、Runx1 が DRG ニューロンにおける細胞分化と軸索投射に関与することを明らかにしており、この分野に新しい知見を加えているものとして評価できる。今度は、それらの異常が出現した機序についての解析が望まれる。

よって、著者は博士（神経科学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。