

氏名(本籍)	おか だ たく や (岡山県) 岡 田 拓 也 (岡山県)		
学位の種類	博 士 (神経科学)		
学位記番号	博 甲 第 4387 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	Studies on migration and nucleogenesis of precerebellar neurons and functional roles of neurotrophins (小脳前核神経細胞の移動と核形成およびニューロトロフィンによる制御に関する研究)		
主査	筑波大学教授	理学博士	志 賀 隆
副査	筑波大学助教授	医学博士	山 本 三 幸
副査	筑波大学講師	博士(医学)	尾 崎 繁
副査	筑波大学助教授	博士(医学)	一 條 裕 之

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目的)

神経系の発生過程において、細胞移動や核形成を制御する分子機構はほとんど解明されていない。小脳前核神経細胞(PCN)は、橋核(PGN)、橋被蓋網様核(RTN)、外楔状核(ECN)、外側網様核(LRN)、下オリブ核(ION)から成り、下菱脳唇(LRL)で誕生後に長い距離を移動する事から細胞移動のモデル系としてよく研究されている。これまでにPGN/RTN細胞はanterior extramural migratory stream(AES)を移動後に同側の橋で核を形成すること、ECN/LRN細胞はposterior extramural migratory stream(PES)を移動して正中を交差後に反対側の延髄で核形成すること、さらにIONはintramural migratory streamを移動して同側で核形成する事が明らかになっている。しかし、これまでの研究ではLRL由来細胞が両側性に標識されたため、PCNの正中交差について正確に判別できなかった。そこで本研究では、電気穿孔法を用いてマウス胎仔LRLにEGFP遺伝子を一側性に導入し、EGFPで標識されたPCNの移動と核形成を解析した。さらに、この細胞移動と核形成を制御する分子としてニューロトロフィンに着目し、*in vivo*における発現と機能を解析した。

(対象と方法)

1. PCNの移動様式の解析

胎生12.5日目(E12.5)のマウス胎仔脳室に、電気穿孔法を用いて子宮内でpCX-EGFPプラスミドDNAを注入し、LRLを一側性に標識した。その後、EGFP陽性細胞の移動と核形成を解析した。また、EGFP陽性細胞がPCNであることを確認するために以下の解析を行った。(1) PCNの特異的マーカー遺伝子*Mbh2*の発現とEGFPの発現を調べた。(2) 生後1日目の小脳にDiIを挿入し、小脳に投射する神経繊維を逆行性に標識した。(3) E12.5にEGFP遺伝子を導入したマウスを、生後4週目に固定して標識細胞の局在を調べた。

2. PCN の移動におけるニューロトロフィンの発現と機能解析

PCN が移動、核形成する際のニューロトロフィン (*NGF*, *BDNF*, *NT-3*, *NT-4/5*) とその受容体 (*TrkA*, *TrkB*, *TrkC*, *p75NTR*) の発現を *in situ* ハイブリダイゼーションを用いて調べた。次に、電気穿孔法を用いて、E12.5 で pCX-*NGF*, -*BDNF*, -*NT-3* プラスミド DNA を pCX-EGFP プラスミド DNA と共に LRL に導入することによってニューロトロフィンを過剰発現させ、細胞の移動と核形成への影響を調べた。

(結果)

1. PCN の移動様式の解析

E12.5 で *EGFP* 遺伝子を導入すると、PGN/RTN 細胞は E14.5 で橋に到達後、放射状方向に移動方向を変え、E15.5 以降に核を形成し、また一部の細胞は正中交差した。一方、ECN/LRN 細胞は、E14.5 で正中交差後に反対側まで移動し、その後放射状方向に移動方向を変えて E17.5 にかけて核を形成した。これらに加えて、反対側の三叉神経脊髄路核中間核 (Sp5I) にも *EGFP* 陽性細胞が観察された。以上の *EGFP* 陽性細胞は、マーカー遺伝子 *Mbh2* の発現、DiI 標識、生後 4 週目での *EGFP* 陽性神経細胞の局在観察によって PCN であることが確認された。

2. PCN の移動におけるニューロトロフィンの機能解析

PCN が移動、核形成する際、橋では E15.5 から E17.5 にかけて、PGN/RTN 領域で *NGF*, *BDNF*, *NT-3* が、また PCN で *TrkA*, *TrkB*, *TrkC* が発現していた。延髄では *BDNF* と *NT-3* が E13.5 以降に予定 ECN, Sp5I, LRN, ION 領域で発現し、*NGF* は E15.5 に予定 ECN, LRN 領域に到達した PCN で発現していた。一方、全ての受容体が E13.5 で正中交差中／交差直後の PCN に発現していた。次に、電気穿孔法を用いたニューロトロフィンの過剰発現による細胞移動の変化を解析した。*NGF* の過剰発現では、ほとんどの *EGFP* 陽性細胞は PGN/RTN 領域で正常に核形成したが、一部は上オリーブ核から顔面神経核付近で本来の移動経路よりも腹側正中方向に偏位しながら接線方向に移動し、橋内部へ放射状方向に移動した。*BDNF* の過剰発現では、ほとんどの *EGFP* 陽性細胞は橋底部まで正常に接線方向移動した後、放射状方向に移動せず、通常核形成位置の外側で核を形成した。*NT-3* の過剰発現では、通常よりも外側で核形成する *EGFP* 陽性細胞が観察された。一方、ECN/Sp5I/LRN 細胞の移動と核形成については、*NGF* を過剰発現させると一部の細胞が、同側の LRN/ION 領域や反対側の Sp5I/LRN 領域で延髄表層にとどまっていた。*BDNF* の過剰発現では、ほとんどの *EGFP* 陽性細胞が両側の ION 領域と反対側の LRN 領域で異所的に放射状方向に延髄内部へ向けて移動し、核を形成した。*NT-3* の過剰発現では、*NGF* あるいは *BDNF* を過剰発現させた胎仔で観察された異常が混在していた。

(考察)

これまで PGN/RTN 細胞は同側の橋で核を形成し、ECN/LRN 細胞は正中交差後に反対側の延髄で核形成すると考えられてきた。しかし本研究によって、PGN/RTN 細胞の一部が正中を交差して反対側まで移動する事が明らかとなった。さらに小脳に投射する Sp5I 細胞が LRL に由来し、ECN/LRN 細胞と同様に PES を移動し、反対側の延髄で核を形成する事が示唆された。

PCN の発生過程において *NGF*, *BDNF*, *NT-3* が予定核形成部位で発現し、*TrkA*, *TrkB*, *TrkC* が PCN で発現していたが、*in vivo* において移動開始以前から PCN をニューロトロフィンに暴露し続けると、PCN の核形成に異常が認められた。これらの結果より、*NGF*, *BDNF*, *NT-3* が、Trk 受容体を介して、予定核形成部位に到達した PCN に作用している可能性が示唆された。また、これらのニューロトロフィンはそれぞれ異なる機能を担っており、*NT-3* を過剰発現させると *NGF*, *BDNF* を過剰発現させた場合の異常が混在して観察された事から、*NT-3* のシグナルは *TrkC* だけでなく、*TrkA* と *TrkB* を介して PCN に伝えられる

可能性が示唆された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、子宮内電気穿孔法を用いて PCN の移動と核形成を詳細に観察し、次いでその過程におけるニューロトロフィンの役割をニューロトロフィンの過剰発現実験によって解析した。その結果、PCN の移動と核形成において、NGF、BDNF、NT-3 が Trk 受容体を介してそれぞれ異なる役割を果たすことを示唆する結果を得た。従って、神経発生過程の細胞移動と核形成におけるニューロトロフィンの役割について重要な知見を提供しており、学位論文として評価できる。

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。