

氏名(本籍)	伊 奈 鮎 香 (愛知県)		
学位の種類	博士(神経科学)		
学位記番号	博甲第4745号		
学位授与年月日	平成20年3月25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	<b>Cajal-Retzius cells and subplate neurons differentially express vesicular glutamate transporters 1 and 2 during development of mouse cortex</b> (カハール・レチウス細胞とサブプレートニューロンはマウス大脳皮質発生期において小胞性グルタミン酸輸送体1と2を分別発現する)		
主査	筑波大学教授	理学博士	志賀 隆
副査	筑波大学教授	博士(医学)	一谷 幸男
副査	筑波大学講師	博士(医学)	尾崎 繁
副査	筑波大学講師	博士(医学)	堀 孝文

### 論文の内容の要旨

#### (目的)

大脳皮質の形成は、プレプレート (PP) と脳室帯 (VZ) の2層構造から始まり、その後辺縁帯 (MZ)、皮質板 (CP)、サブプレート (SP)、中間帯 (IZ)、脳室下帯 (SVZ)、VZの6層が形成される。この過程での細胞増殖、ニューロン分化と移動などに関わる因子の一つとしてグルタミン酸が挙げられるが、その作用時期や部位は未だ明確ではない。グルタミン酸は代謝産物やγ-アミノ酪酸の前駆物質としても細胞内に存在するため、このアミノ酸自体の観察からは大脳皮質における作用部位は特定できない。近年、軸索終末のシナプス小胞膜上に局在しグルタミン酸を小胞内に輸送する3種類の小胞性グルタミン酸輸送体 (VGLUT1, VGLUT2 及び VGLUT3) が同定され、グルタミン酸作動性ニューロンのマーカーとして汎用されている。成熟したほ乳類脳では、VGLUT1は大脳皮質や海馬などの終脳領域で高発現し、VGLUT2は視床や視床下部などの間脳領域で高発現する。本研究では大脳皮質の神経発生におけるグルタミン酸の役割を明らかにする目的で、VGLUT1とVGLUT2に着目してマウス大脳皮質形成におけるそれらの遺伝子およびタンパク質の発現を組織化学的に解析した。

#### (対象と方法)

本研究ではICRマウスを用いた。まず、大脳皮質におけるグルタミン酸作動性細胞の出現部位と時期を明らかにするために、異なる胎齢のICRマウス胎仔大脳皮質におけるVGLUT1及びVGLUT2発現の局在についてデオキシゲニン標識cRNAプローブを用いたin situハイブリダイゼーションと免疫染色により解析した。次に上記の結果が機能的mRNA発現を捉えたものかどうかを推定するために、胎仔と成体の大脳皮質を用いてRT-PCR法でVGLUT1とVGLUT2の塩基対長を調べ、成体と同様に胎仔皮質による全長mRNA発現を確かめた。さらに、大脳皮質や海馬原基でVGLUT1やVGLUT2を発現する細胞の表現型を特定するために蛍光in situハイブリダイゼーションと蛍光免疫染色を併用した2重蛍光標識法を行った。細胞マーカーには、リーリン (Cajal-Retzius (CR) 細胞マーカー) と微小管結合タンパク2 (MAP2, 成熟ニューロン及びSP細胞マーカー) を用いた。

(結果)

ICR マウス胎仔脳の凍結切片を用いた *in situ* ハイブリダイゼーションと免疫染色による観察では、VGLUT1 mRNA 発現は胎生 10 日 (E10) に初めて終脳神経上皮の PP 表層の細胞で確認され、E11 に VGLUT1 免疫陽性 PP 細胞が観察された。E13 の mRNA 発現は、PP と MZ の細胞で強く、CP 全域で弱発現の細胞が確認された。E15 以降、MZ の発現細胞は消失したが、SP に強発現細胞が出現した。海馬原基では、E15 に初めて mRNA 発現が観察され、E17 には錐体細胞層と内側辺縁帯 (IMZ) の細胞が強発現を示した。一方、VGLUT2 mRNA 発現細胞は E10 から終脳神経上皮の PP に観察され、免疫染色により PP 表層にて水平方向に突起を伸ばす陽性細胞が確認された。E11 では、PP で発現細胞数が増加し、内側部神経上皮に位置する cortical hem では表層に限らず深層においても mRNA 発現及び免疫陽性細胞が観察された。E13 では、IZ と SVZ の発現が明瞭になり、PP と MZ の mRNA 発現細胞は存続し、海馬原基の外側辺縁帯 (OMZ) でも確認された。E15 以降、MZ、IZ-SVZ の深層、そして海馬原基の OMZ に強発現が観察された。RT-PCR 解析により、胎仔脳において成体脳と同様に機能的 VGLUT 合成を示唆する遺伝子全長の発現が確認された。

次に、VGLUT1 と VGLUT2 を発現する細胞の表現型をあきらかにするために蛍光 *in situ* hybridization と蛍光免疫染色を併用した二重蛍光標識法を行った。VGLUT1 mRNA 発現は、E11 の PP において一部の MAP2 陽性細胞に観察され、E13 では MZ の MAP2 陽性細胞に強発現が認められた。これらの PP や MZ における VGLUT1 mRNA 発現細胞はリーリン陰性であった。E15 以降、MZ から mRNA 発現細胞は消失し、MAP2 陽性の SP 細胞が強発現を示した。MAP2 陽性 SP 細胞は VGLUT1 陽性反応も示した。一方、VGLUT2 mRNA 発現は E11 の PP 表層でリーリン陽性細胞に発現し、MAP2 陽性及び陰性細胞にも認められた。Cortical hem において、軟膜下に位置する最表層の VGLUT2 mRNA 発現細胞のみリーリン陽性反応を示した。E13 以降、mRNA 発現は MAP2 陽性 MZ 細胞と IZ-SVZ 深層の MAP2 陰性細胞で認められた。PP や MZ に存在するリーリン陽性細胞には VGLUT2 mRNA 発現と免疫陽性反応の両方が確認された。海馬原基において、VGLUT2 mRNA を発現するリーリン陽性細胞が E13 の OMZ で観察され、その後その細胞数は増加した。

(考察)

本研究により、VGLUT1 と VGLUT2 の両者が、それぞれマウス大脳皮質発生の開始期である E10 から互いに時間的・空間的に異なるパターンで発現し始めることが明らかとなった。特に、PP と MZ、及び cortical hem 最表層部に局在するリーリン陽性 CR 細胞における VGLUT2 発現と CR 細胞の起源領域として知られる cortical hem 深層のリーリン陰性細胞での VGLUT2 mRNA 発現は、皮質層形成に重要な CR 細胞の分化や移動に関して重要と思われる。これらの結果は CR 細胞がグルタミン酸作動性ニューロンであり、また CR 前駆細胞はリーリン発現以前にグルタミン酸作動性としての運命が決まることを示唆している。

## 審査の結果の要旨

培養実験等によって神経発生におけるグルタミン酸の機能解析が進む一方で、適切なマーカー分子の欠如によって、発達期の脳におけるグルタミン酸作動性ニューロンの発生に関する解析が遅れていた。本研究では、VGLUT1 と VGLUT2 がグルタミン酸作動性ニューロンに特異的に発現することに注目し、*in situ* ハイブリダイゼーション法と免疫組織化学法によって胎生期マウスの大脳皮質と海馬におけるグルタミン酸作動性細胞の発現時期と発現細胞について詳細な解析を行なった。その結果、大脳皮質と海馬の形成初期から VGLUT1 と VGLUT2 が時期および細胞特異的に発現することを明らかにした。したがって本研究は発生過程の脳におけるグルタミン酸の役割を解析する上で、重要な形態学的基盤となるデータを提供している点で高く評価できる。

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。