

博士(医学) 高山千利

学位論文題名

Altered distribution of the inhibitory synaptic terminals in reeler cerebellum with special reference to malposition of GABAergic neurons.

(リーラーマウス小脳における抑制性神経回路の改変と
GABA 作動性ニューロンの位置異常との関係)

学位論文内容の要旨

【緒言】

リーラーマウスは常染色体劣性の形式で遺伝形質が伝えられる神経奇形マウスで、運動失調症を呈する。中枢神経系の層構造を示す領域における細胞構築に異常が認められ、神経芽細胞の移動障害が原因と考えられている。リーラーマウス小脳は、小葉形成がきわめて障害され、しかも、表層部には正常マウスと似た皮質構造が存在するものの、大半のニューロンは深部にとどまり、深部細胞集団を形成している。ゴルジ鍍銀法・免疫組織化学的な手法を用いた研究により、プルキンエ細胞の形態は小脳表層部と中心部では大きく異なることがわかっており、形態同様に小脳内でのプルキンエ細胞を中心とする神経回路網にも変化が生じていることが予想される。ところが、深部細胞集団には様々な種類のニューロンが一定の構築を持つこと無く密に分布しているため、これまでの鍍銀法・電子顕微鏡を用いた研究では、抑制性介在ニューロンの分布および線維結合を解析することは困難であった。本研究では、GABAの合成酵素であるグルタミン酸脱炭酸酵素に対する抗血清および、新たに作成した抑制性神経伝達物質であるGABAおよびグリシンに特異的に結合するモノクローナル抗体を用いて免疫組織化学的に抑制性ニューロンを染色した。リーラーマウスの小脳では表層から中心に向かって、プルキンエ細胞を取り巻く環境は段階的に変化している。それぞれの位置で、分布する抑制性ニューロンの種類および抑制性の終末の分布を検索しプルキンエ細胞の形態と分布とを合せて分析することにより、局所の神経回路網の改変を明確にすることを企図した。

【材料と方法】

1) 抗GABAモノクローナル抗体および抗グリシン(Gly)モノクローナル抗体の作成
bovin serum albuminと架橋したGABAおよびGlyをフロイント完全アジバントと十分に混合し、Balb/c系のマウスの腹腔内に免疫した。常法に従って脾細胞を骨髄腫細胞と細胞融合し、GABAまたはGlyに特異的に結合する抗体を産生する細胞株を選択した。

2) 実験動物

米国ジャクソン研究所よりリーラーマウスの系を購入し、研究室で維持・繁殖させた。生後2ヶ月以上経過した成熟リーラー及びその同腹仔を対照群として用いた。

3) 免疫組織化学

(1) グルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD)

エーテル麻酔下、4%paraformaldehyde溶液を灌流したのち、マイクロスライサーを用いて50 μ mの小脳矢状断切片を作成した。切片はYale大学Rakic教授より恵与された抗血清に反応させた後、ABC法で発色した。

(2)GABAおよびGly

抱水クロラール麻酔下、2.5%paraformaldehyde, 1.5%glutaraldehydeの固定液を灌流し、マイクロスライサーを用いて500 μ m厚の矢状断方向の小脳のスライスを作成し、エタノール系列で脱水したのち、型通りエポン包埋した。ガラスナイフを用いて作成した0.5 μ m準超薄切片をメトキシソーダで脱エポンし、希釈したモノクローナル抗体の培養上清を一次抗体として使用し、ABC法で免疫染色を行なった。

【結果】

1)正常マウス小脳におけるGAD・GABA・Glyの免疫組織化学

小脳を構成する5種類のニューロンは以下の様な染色性を示した。プルキンエ細胞の樹状突起・細胞体はGADのみ陽性であるが、軸索終末はGADおよびGABA陽性でGlyは陰性であった。星状細胞・籠細胞の細胞体および神経終末はGAD・GABA陽性であるが、Gly陰性であった。ゴルジ細胞はGAD・GABA・Gly全ての抗体に陽性であった。顆粒細胞は用いた全ての抗体に対して陰性であった。

2)リーラーマウス小脳におけるGAD・GABA・Glyの免疫組織化学

正常マウスで得られた小脳を構成する各々の細胞の染色性をもとにリーラーマウス小脳に存在する抑制性のニューロンの同定を行った。その結果、構成する細胞の種類からリーラーマウス小脳は以下の4つの領域に分けることが可能であった。

(1)小脳の表面を覆う領域：不完全ながら、正常マウス同様に、分子層・プルキンエ細胞層が形成されており、プルキンエ細胞の樹状突起上には星状細胞の終末が、細胞体周囲には籠細胞の終末が認められた。

(2)顆粒層：異所性のプルキンエ細胞、星状細胞、籠細胞が顆粒細胞に混在している。プルキンエ細胞周囲の抑制性終末の分布は正常マウスと同じであった。

(3)顆粒層と白質に挟まれて存在する細胞集団および深部細胞集団の表層：星状細胞および籠細胞が多数認められた。軟膜の方に向かって伸展したプルキンエ細胞の樹状突起上には星状細胞の終末が存在し、細胞体は籠細胞の終末に取り囲まれていた。

(4)深部細胞集団の深層および第四脳室壁に接する領域：主としてプルキンエ細胞およびゴルジ細胞によって構成され、正常マウスの星状細胞と同じ染色性を示す細胞はほとんど認められなかった。プルキンエ細胞の樹状突起の形態はきわめて異常であり、その伸展方向は不規則であった。樹状突起上には星状細胞の終末は認められず、籠状の終末にかわってゴルジ細胞由来と考えられる異型のGly陽性の終末が細胞体に接して認められた。

【考察】

1)深部細胞集団を構成する細胞の種類の領域による違い

白質と接する深部細胞集団では、プルキンエ細胞は樹状突起を軟膜の方向に伸展し比較的正常に近い形態を示しており、周囲には星状細胞または籠細胞と考えられるニューロンが認められる。しかし、不規則な方向に伸展した樹状突起が密に存在している小脳核または脳室に近い領域にはこれらのニューロンは認めない。これまでの研究から、プルキンエ細胞は外胚芽層由来のニューロンに先立って移動を完了し、バーグマン細胞とともに外胚芽層由来のニューロンの移動に重要な働きをしている事が知られており、プルキンエ細胞の移動・形態形成が比較的正常に近い形で成立した領域には星状細胞および籠細胞が進入したと考えられる。しかし、深部に於いては密集する樹状突起および細胞体によって細胞移動が障害されたため、その結果として構成す

る細胞の種類に領域による差が生じたと考えられる。

2) プルキンエ細胞への抑制性入力の改変

星状細胞および籠細胞が混在する軟膜直下から深部細胞集団表層に至る領域ではこれらの細胞からの入力が認められるが、深部細胞集団深層では、近傍に存在しない星状細胞および籠細胞からの入力は認められず、かわってゴルジ細胞との異型のシナプスが形成されている。このことから、各々の領域に認められる抑制性の終末の分布は構成するニューロンの種類ときわめて緊密な関係を持っており、局所の神経回路網は周囲の環境に応じて可塑的に変化していることが明らかとなった。

学位論文審査の要旨

主査 教授 井上 芳郎
副査 教授 西 信三
副査 教授 長嶋 和郎

学位論文題名

Altered distribution of the inhibitory synaptic terminals in reeler cerebellum with special reference to malposition of GABAergic neurons.

(リーラーマウス小脳における抑制性神経回路の改変と
GABA 作動性ニューロンの位置異常との関係)

リーラーマウスは常染色体劣性の形式で遺伝形質が伝えられる神経奇形マウスで、神経芽細胞の移動障害により、中枢神経系の層構築に異常が生じる。小脳は、小葉形成がきわめて障害され、白質の深部に置いて多数の位置異常を起こしたニューロンが集団を形成している。その深部細胞集団では、様々な種類のニューロンが一定の構築を持つこと無く密に分布しているため、これまでの鍍銀法・電子顕微鏡を用いた研究では、介在ニューロンの分布および線維結合を解析することは困難であった。本研究では、グルタミン酸脱炭酸酵素(GAD)に対する抗血清および、新たに作成した γ アミノ酪酸(GABA)およびグリシンに特異的に結合する单クローニング抗体を用いて免疫組織化学的に染色することにより、リーラーマウス小脳の各領域に分布する抑制性ニューロンの種類および抑制性の終末の分布を検索し、ニューロンの位置異常に伴う局所の神経回路網の改変の可能性を明らかにすることを企図した。

経心臓的に固定液を灌流した生後2ヵ月以上経過したリーラーマウスおよびその同腹仔の小脳矢状断切片をGAD・GABA・グリシンに対する抗体を用いて免疫組織化学的に染色した。

正常マウス小脳では、皮質を構成する5種類のニューロンは以下の様な染色性を示した。星状細胞・籠細胞の細胞体および神経終末はGAD・GABA陽性であるが、グリシン陰性であった。プルキンエ細胞の樹状突起・細胞体はGADは陽性であるが、軸索終末はGADお

びGABA陽性でグリシンは陰性であった。ゴルジ細胞はGAD・GABA・グリシン全ての抗体に陽性であった。顆粒細胞は用いた全ての抗体に対して陰性であった。

正常マウスで得られた小脳皮質を構成する各々の細胞の染色性をもとにしてリーラーマウス小脳に存在する抑制性のニューロンの同定を行った。小脳の表面を覆う領域ではブルキンエ細胞の樹状突起上には星状細胞の終末が、細胞体周囲には籠細胞の終末が認められた。顆粒層には顆粒細胞の間にブルキンエ細胞、星状細胞、籠細胞が認められ、異所性のブルキンエ細胞周囲の抑制性終末の分布は正常マウスのブルキンエ細胞と同じであった。深部細胞集団の表層にはブルキンエ細胞に混じって多数の星状細胞・籠細胞および少数のゴルジ細胞が認められた。軟膜の方に向かって伸展したブルキンエ細胞の樹状突起上には星状細胞由来の終末が存在し、細胞体は籠細胞の終末に取り囲まれていた。深部細胞集団の深層および第四脳室壁に接する領域は主としてブルキンエ細胞およびゴルジ細胞によって構成され、星状細胞と同じ染色性を示す細胞はほとんど認められなかつた。ブルキンエ細胞の樹状突起の形態はきわめて異常であり、その伸展方向は不規則であった。樹状突起上には星状細胞の終末は認められず、細胞体周囲は籠状の終末にかわってゴルジ細胞由来と考えられる異型のGly陽性の終末が認められた。

星状細胞および籠細胞は、正常マウスでは分子層にのみ存在するが、リーラーマウスでは顆粒層から深部細胞集団表層に至る場所まで認められ、この領域に存在するブルキンエ細胞周囲にはこれらの細胞からの入力が認められる。一方、深部細胞集団深層はブルキンエ細胞と少数のゴルジ細胞によって構成されており、ブルキンエ細胞周囲には星状細胞および籠細胞の終末は認めず、かわってゴルジ細胞との異型なシナプスが形成されている。このことから、各々の領域に認められる抑制性の終末の分布は構成するニューロンの種類ときわめて緊密な関係を持っており、局所の神経回路網は周囲の環境に応じて可塑的に変化していることが明らかとなつた。

以上、本研究は細胞移動障害のあるリーラーマウスを用いて、免疫組織化学的に抑制性ニューロンを染色することにより、その細胞体および終末の分布を明らかにし、局所の環境の変化に伴う神経回路網の可塑的変化を明らかとした点に研究の独創性があり、神経解剖学の分野に寄与した論文として博士（医学）の学位に相応すると判定した。