

学位論文題名

Nuclear hormone receptor ROR α and
Purkinje cell development(核ホルモン受容体 ROR α と小脳プルキンエ細胞の分化に関する形態学的検討)

学位論文内容の要旨

スタゲラー(staggerer)マウスは常染色体劣性遺伝様式をとる小脳奇形ミュータントマウスである。ホモ接合体(*sg/sg*)には生後8-12日齢頃より四肢の協調運動障害により横転を繰り返す小脳失調性歩行、運動時振戦、筋緊張低下等の症状が認められる。小脳プルキンエ細胞は数が減少しており、細胞体が小さく、不規則な配列を示している。また、その樹状突起は矮小化している。三次樹状突起上の棘突起が欠損しており、結果として平行線維とのシナプス結合が選択的に、ほぼすべて欠損している。正常発達過程において重複支配から単一支配に移行する登上線維は、スタゲラーマウスでは成熟期にも重複支配が残存している。キメラマウスを用いた実験系により、変異細胞はプルキンエ細胞であることが指摘されており、多くの生化学的・電気生理学的所見によりその細胞の未熟性が示唆されている。また、いくつかのプルキンエ細胞に豊富に存在する物質の遺伝子発現が減少又は消失していることが報告されている。

近年、スタゲラーマウスの原因遺伝子が核ホルモン受容体ROR α であることが判明した。ROR α はレチノイン酸受容体関連オーファン受容体のサブクラスの一つであり、何らかのリガンドが結合し受容体が活性化した後に、ゲノムの標的ホルモン応答性エレメントに結合し、種々の分子の転写活性を調節することにより広範多岐にわたる生理作用を発現させると考えられている。

本研究は、プルキンエ細胞分化とROR α との関連を追求する目的で、スタゲラーマウスのプルキンエ細胞における1) 形態、2) カルシウム関連蛋白質であり、プルキンエ細胞特異的な物質であるカルビンジンと1型イノシトール 1,4,5-三リン酸受容体 (InsP₃R1) の遺伝子発現、3) *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体チャネルサブユニットの遺伝子発現、並びに4) 野生型マウスの小脳発達段階におけるROR α の遺伝子発現分布を抗カルビンジン抗体を用いた免疫組織化学法と*in situ* ハイブリダイゼーション法により検討した。

生後21日齢の野生型マウスでは、プルキンエ細胞は大型でフラスコ状の細胞体を有し、小脳皮質に一系列に配列し、発達した樹状突起を軟膜表面に向け広げていた。この野生型形態と比べると、スタゲラーマウスのプルキンエ細胞は全体的に未熟な形態を示していた。しかも、形態の異なるプルキンエ細胞が領域特異的に集団をなして、矢状方向の帯状

コンパートメントを形成していた。特に前葉では7個の帯状コンパートメント(zone I-VII)が明瞭に識別され、小脳正中部を含むzone Iではプルキンエ細胞は発達した軟膜表面に向かう樹状突起を持ち、細胞体が大きく、分子層と顆粒細胞層の間に一列に配列していた。このような野生型に近似する分化した細胞形態は、zone IIIとVIIにも見られた。一方、その間に位置するzone II及びIVのプルキンエ細胞は、樹状突起の極性が不規則であり、その分枝形成は乏しかった。また、細胞体が小さく、顆粒細胞層の中に散在していた。zone Vには、軟膜表面の方向に伸びた分枝形成のほとんど見られない長い樹状突起を持つプルキンエ細胞が認められた。それらの細胞体は小さく、顆粒細胞層の中に散在しており、zone I/III/VIIとzone II/IV/VIに見られるものの中間的な形態特性を有していた。

スタゲラープルキンエ細胞におけるカルシウム関連蛋白(カルビンジンとInsP₃R1)の遺伝子発現レベルは総じて減少していた。また、形態的差異によるコンパートメント間で、その発現レベルが大きく異なり、zone I、III、VIIでは強く、zone II、IVでは弱く、zone Vではそれらの中間的な強さを示した。

コンパートメント間での遺伝子発現様式の変化は、NMDA型グルタミン酸受容体サブユニットにも認められた。zone I、III、V、VIIのプルキンエ細胞には ϵ 1、 ϵ 4、 ζ 1サブユニット遺伝子が発現し、zone II、IVでは発現陰性であった。正常成熟プルキンエ細胞には ζ 1サブユニット遺伝子発現が認められるだけであり、これらスタゲラープルキンエ細胞に認められる発現様式は異質なものであった。

さらに、コンパートメント形成とROR α 発現との関連性を追求する目的で、野生型マウス小脳におけるROR α 遺伝子の発現を胎児期から成熟段階に至るまで追求した。その結果、胎児期よりROR α 遺伝子はプルキンエ細胞に特異的かつ顕著に発現しており、小脳領域による発現レベルの差異は認められなかった。

以上の結果は、スタゲラーマウス小脳にはプルキンエ細胞の形態分化および遺伝子発現特性に基づく小脳帯状コンパートメントが存在することを示している。このコンパートメントの出現が核ホルモン受容体ROR α 遺伝子異常の結果生じたことを考慮すると、小脳の正常な分化・発達には1)小脳全域で発達早期より機能するROR α 依存的制御機構と2)小脳内外方向に帯状分布するROR α 非依存的制御機構の両者が必要であることを示唆している。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 井 上 芳 郎

副 査 教 授 小 山 司

副 査 教 授 長 嶋 和 郎

学 位 論 文 題 名

Nuclear hormone receptor ROR α and Purkinje cell development

(核ホルモン受容体 ROR α と小脳プルキンエ細胞の分化に関する形態学的検討)

本研究は、核ホルモン受容体ROR α の遺伝子異常が認められる自然発症系スタゲラーマウスにおけるプルキンエ細胞の形態特性及び遺伝子発現特性（カルビンジン、1型イノシトール三リン酸受容体、NMDA受容体サブユニット）を解析し、さらに野生型マウス発達段階におけるROR α の遺伝子発現分布を検討したものである。結果として、スタゲラーマウス小脳には分化度の異なるプルキンエ細胞が領域特異的に集団をなして矢状方向の帯状コンパートメントを形成していることが明らかとなった。分化度の異なる細胞集団は発達型（細胞体が大きく、配列が一行であり、樹状突起が比較的成熟型を示す。カルビンジン、1型イノシトール三リン酸受容体の遺伝子発現減少度が小さい。 $\epsilon 1$, $\epsilon 4$, $\zeta 1$ NMDA受容体サブユニットの発現が見られる。）と未発達型（細胞体が小さく、異所性配置を示し、樹状突起の分子形成・極性が乱れている。カルビンジン、1型イノシトール三リン酸受容体の遺伝子発現減少度が大きい。NMDA受容体サブユニットの発現が見られない。）に大きく二つに分類され、これらが小脳の内外方向に交互に配列していた。一方、スタゲラーの原因遺伝子であるROR α は胎児期よりプルキンエ細胞に特異的かつ顕著に発現しており、小脳領域による発現レベルの差異は認められなかった。以上の結果は、小脳プルキンエ細胞の発達・分化にはROR α が大きく関与する事を示し、さらに小脳内外方向に帯状に分布し、限局したプルキンエ細胞の集団に作用する遺伝子発現制御分子または各帯状域の異なる神経支配の存在を示唆するものであった。

質疑応答に於いて1) 遺伝子発現を調べるにあたって、カルビンジン、1型イノシトール三リン酸受容体の分子を選択した理由、2) スタゲラーマウス小脳における帯状構造の吻尾側における差異とその考察、3) 異なる神経支配によるコンパートメント形成が結論で導き出され得る根拠、4) 野生型マウス小脳における帯状構造についての知見、5) 甲状腺ホルモンとの関連、6) ROR α の標的遺伝子についての知見、7) 人間の脳遺伝性疾患との関連、について質問があった。それらについて申請者は以下の様に答えた。1) カルビンジン、1型イノシトール三リン酸受容体は小脳において特異的に、かつ顕著に発現するために遺伝子発現様式を検討するうえで有用である。2) 尾側では帯状構造が不明瞭であ

り、小脳の吻尾側で全く異なった構造を示す。他の小脳奇形ミュータントマウス（leaner, nervous等）にも同様の傾向が認められ、小脳構造を決定する上位の遺伝子制御分子が関係しているもの考えられる。3) 現在までに人為的にプルキンエ細胞の入力を阻害した実験や先天的にそれらに異常が見られるミュータントマウスを用いて、樹状突起の形成には入力線維が重要な因子であることが示唆されている。また、培養実験で樹状突起の発達が電気活動依存的であることが報告されている。これらの結果より、スタゲラーマウスにおける樹状突起の形態が異なるプルキンエ細胞を有する各帯状域では異なったシナプス環境が存在すると考えられる。4) 小脳領域により、プルキンエ細胞の発生由来が異なることが指摘されている。しかしながら、形態的な違いはいずれの発生段階に於いても認められない。一方、発達段階において、多くの生化学的マーカー分子（ゼブリン1, モチリン等）による染色像が帯状構造を示し、プルキンエ細胞の異形質性が知られている。また、求心性神経繊維（登上線維、苔状線維）の投射は帯状構造を示す。5) 甲状腺機能低下による小脳の発達遅延はよく知られている。ROR α は単量体として転写活性を示すが、最近の学会における報告などではROR α と甲状腺ホルモン受容体（THR β ）のヘテロ二量体による転写活性について示唆するものも見られる。しかしながら、現在のところ確実な所見は得られていない。6) スタゲラーマウスのプルキンエ細胞において多くの物質（1型イノシトール三リン酸受容体、L7/pcp-2、カルモジュリン等）の遺伝子発現が減少又は消失している。しかし、確実な標的遺伝子は報告されていない。7) 人間の小脳遺伝性疾患との関わりは、全く判っていない。

この論文は、単一遺伝子によるプルキンエ細胞の発達・分化の制御について解析し、また新たな小脳の帯状構造についての知見を示したものとして高く評価され、今後、ユニット構造形成を含む小脳の発達解析に大きく貢献するものと期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。