

学 位 論 文 題 名

リーラーマウスを用いた皮質投射

ニューロンの計量形態学的解析

学位論文内容の要旨

緒言 正常の太脳皮質内にある投射ニューロンは頂上樹状突起と基底樹状突起を有する錐体型を示し、投射先に応じた特定の層に局在することを特徴とする。その細胞体の大きさと頂上樹状突起の分枝様式には投射先と局在する層が反映していることが明らかになっている。例えば、同じ皮質第5層に局在するニューロン間でも投射先の違いにより細胞体の大きさおよび頂上樹状突起の形態に差がみられ、同一の領域に投射するニューロン間でも局在する層が異なれば同様の差がみられる。

リーラーマウスでは発生初期におけるニューロンの移動障害により太脳皮質の層構造に乱れが生じている。例えば正常マウスの太脳皮質第5層に局在する皮質脊髄路ニューロンは、リーラーマウスでは軟膜から数えて2番目にある大錐体細胞層に数多く存在するものの太脳皮質の全層にわたって分布している。そこで、リーラーマウスの太脳皮質内投射ニューロンの形態に投射先および皮質内位置が如何なる影響を及ぼしているかを明らかにするため、皮質交連線維ニューロン (Callosal commissural neurons: CC-ニューロン)、皮質脊髄路ニューロン (Corticospinal neurons: CS-ニューロン)、皮質視床路ニューロン (Corticothalamic neurons: CT-ニューロン) をとりあげ計量形態学的に解析した。

方法と材料 6週齢のリーラーマウスと野生型の同腹仔マウスを用いて、3種類の投射ニューロンを逆行性に標識するため、左側感覚運動領、左側脊髄錐体交差部、右側視床VA+VL核のいずれかにトリス緩衝液に溶かした5%バイオサイチンを注入した。24時間生存させた後に4%パラフォルムアルデヒドにて経心的に還流固定し、50 μ m厚の切片を作成し、ABC法により発色させた。カメラルシーダ法により切片上の標識されたニューロンを描画し、それらの図からデジタイザーとパーソナルコンピューターをもちいて細胞体の断面積、頂上樹状突起の太さ、頂上樹状突起の向きを測定した。

結果、

1) 細胞体の断面積

正常マウスでは大きい順に、CS-ニューロン、第5層または第6層に分布するCC-ニューロン、第2+3層に分布するCC-ニューロン、CT-ニューロンの順で各々の間に有意な差 ($p < 0.01$; t検定による、以下も同様) がみられた。それに対しリーラーマウスでは、CS-ニューロンが他のニューロンより有意に大きくCC-ニューロンとCT-ニューロンの間には有意な差がみられなかった。リーラーマウスのCS-ニューロンは各層でほぼ正常マウスと同じ大きであった。リーラーマウスのCC-ニューロンは正常マウスの大きさの範囲内にあり全層でほぼ均一であった。リーラーマウスのCT-ニューロンは全層で有意に正常マウスより大きく、しかも白質側から軟膜側に近づくに従ってさらに大きくなる傾向がみられた。

2) 頂上樹状突起の太さ

正常マウスでは太い順に、CS-ニューロン、CT-ニューロン、CC-ニューロンであり、各々の間に有意な差がみられた。一方リーラーマウスでは、CS-ニューロンは他のニューロンより有意に太く、CT-ニューロンと CC-ニューロンの間には有意な差がみられなかった。また、リーラーマウスの CS-ニューロンと CC-ニューロンは正常のニューロンとほぼ同一の太さを示すのに対し、CT-ニューロンでは浅層に局在するニューロンを除いて正常よりも有意に細くなっていた。

3) 頂上樹状突起の方向性

正常マウスでは、3種の投射ニューロンの頂上樹状突起とも軟膜方向に伸長していた。リーラーマウスの CC-ニューロン、CS-ニューロンの中で大脳皮質の中間部および白質側に局在するニューロンの頂上樹状突起は軟膜方向に伸長していたのに対し、軟膜側に局在するニューロンは一定の傾向を示さなかった。CT-ニューロンの中で中間部に局在するニューロンは軟膜方向あるいは白質方向に伸長する傾向を示したが、軟膜側あるいは白質側に局在するニューロンは一定の傾向を示さなかった。

考察 正常でみられるように、リーラーマウスの全層で CS-ニューロンは他の投射ニューロンに比べ有意に細胞体が大きく頂上樹状突起が太かった。CS-ニューロンは他の2種の投射ニューロンに対し投射標的までの距離が長いことが特徴的である。このことから、CS-ニューロンの細胞体の大きさと頂上樹状突起の太さは軸索の長さおよび軸索側枝量の影響を受けている可能性が考えられる。正常の CC-ニューロンは局在する層の違いが細胞体の大きさに反映されていたが、リーラーマウスでは皮質内の局在に関らず細胞体の大きさは均一であった。この理由として対側由来の皮質交連線維が CC-ニューロンへの主要な求心性線維であり、リーラーマウスの大脳皮質内ではその線維が均質に分布しているため細胞体の大きさが均質化したと考えられる。また、リーラーマウスの CT-ニューロンは軟膜により近く局在すると細胞体が大型化する傾向が見られた。CT-ニューロンの主要な入力線維は視床皮質線維である。視床皮質線維は大脳皮質ニューロンが細胞移動している段階から皮質内に進入することが知られており、リーラーマウスでは正常と異なって軟膜に達した後に白質方向に伸長する。そのため、軟膜直下にあるニューロンは深部にあるニューロンより多くの入力を受けた結果、細胞体が大型化したと考えられる。

頂上樹状突起は発生初期に多くの軸索が集まる Plexiform zone (PZ) に向かうことが知られている。一方、リーラーマウスでは PZ に相当する Internal plexiform zone (IPZ) が皮質の軟膜に近い中間層にみられ、胎生 17 日目のニューロンの頂上樹状突起は IPZ に向けて伸長すると報告されている。成体のリーラーマウスの CC-ニューロンと CS-ニューロンの頂上樹状突起はこの時期に伸長した方向を保っていると考えられる。これに対し、リーラーマウスの CT-ニューロンでは頂上樹状突起の伸長方向が一定しない理由として、CT-ニューロンは視床皮質線維と強く結合するため、視床皮質線維が軟膜より白質方向に皮質内を迷走している大脳皮質内では、頂上樹状突起の再構成期に変異が加わり伸長方向が変化した可能性がある。

結語 細胞体の大きさおよび頂上樹状突起の太さの点で、CS-ニューロンは投射先による特性を保持していたのに対し、CC-ニューロンや CT-ニューロンは特定の入力線維の分布、走行の変異からの影響を受けていた。また、頂上樹状突起の伸長方向の点で、CS-ニューロンおよび CC-ニューロンは入力線維の分布、走行の影響をほとんど受けていなかったのに対し、CT-ニューロンはその影響を強く受けていた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 井 上 芳 郎

副 査 教 授 阿 部 和 厚

副 査 教 授 長 嶋 和 郎

学 位 論 文 題 名

リーラーマウスを用いた皮質投射

ニューロンの計量形態学的解析

正常マウスの大脳皮質にある投射ニューロンは頂上樹状突起を軟膜方向に向け基底樹状突起を水平方向に伸ばす錐体型を共通して呈するのに対し、先天性神経奇形のため大脳皮質の層構造に異常のみられるリーラーマウスの投射ニューロンでは投射先が同一でも個々のニューロンごとに変異がみられる。本研究ではそれらの形態を引き起こす機構を解明するためにおこなった。バイオサイチンにより逆行性に標識された皮質交連線維ニューロン、皮質脊髓路ニューロン、皮質視床路ニューロンの細胞体の大きさ、頂上樹状突起の太さ及び傾きをパラメーターとした計量形態学的解析を行い、同時に順行性標識された右側大脳皮質感覚運動領における皮質交連線維、視床皮質線維を観察し、以下の結果を得た。皮質交連線維ニューロンの場合、正常マウス大脳皮質第5層と6層に分布するニューロンの細胞体が第2+3層に分布するニューロンより有意に大きかったのに対しリーラーマウスでは全層でほぼ均一な細胞体の大きさを示した、また軟膜に近い層に分布するニューロンの頂上樹状突起は特定の伸長方向を示さず中央部と白質に近い層に分布するニューロンは軟膜方向を向く傾向、すなわち胎生期でみられる頂上樹状突起の伸長方向の様式を示した。皮質脊髓路ニューロンの場合、リーラーマウスでも正常と同様に皮質交連線維ニューロンおよび皮質視床路ニューロンに対し有意に大型な細胞体と太い頂上樹状突起を示した、また頂上樹状突起の伸長方向は胎生期でみられる様式を示した。皮質視床路ニューロンの場合、正常マウス大脳皮質では第5層と第6層に分布するが両者の細胞体の大きさに差が見られなかったのに対しリーラーマウスの細胞体は全層で正常マウスより大きくしかも軟膜に近い層でより大型化する傾向が見られた、また軟膜近くに分布するニューロンを除き頂上樹状突起の太さは正常に比べ細かった、頂上樹状突起の方向性については中間よりやや軟膜側に分布するものを除くと特定の伸長方向を示さなかった。一方、リーラーマウス大脳皮質への入力系である皮質交連線維は正常では第2+3層および第5層に軸索終端が密に分布しているのに対しリーラーマウスでは全層にわたって分布していた。また視床皮質線維は正常において白質より皮質内に進入し軸索終

端が第4層で密に分布するのに対し、リーラーマウスでは束になって外側より皮質内を斜走し軟膜直下に至ってから各軸索が解離し白質方向に向かって走行し全層にわたって軸索終端は分布していた。これらのことは、皮質交連線維ニューロンと皮質視床路ニューロンでは層方向に線維連絡する軸索終端の分布の影響が強く細胞体の大きさおよび頂上樹状突起の太さの形成に働き、一方、皮質脊髄路ニューロンでは入力軸索の分布の影響をほとんど受けず投射先の因子が強く働くことを示唆していた。また皮質視床路ニューロンの頂上樹状突起については発生後期に入力線維の影響を受け胎生期とは異なる方向に伸長した可能性が考えられた。口頭発表に際し、リーラーマウスの欠失している遺伝子がニューロンの特性に変化を与えるのではないかという質問に対し、その遺伝子から産生される物質は大脳皮質発生初期に最も早くに出現するカハール・レティウス細胞の突起の表層に発現し投射ニューロンには発現しないと説明し、リーラーマウスの視床皮質線維の走行異常の成因についての質問については、細胞移動期以前に皮質内に進入し視床皮質線維が細胞移動障害のため軟膜まで押し上げられると説明し、細胞体の大きさと頂上樹状突起の太さの機能的な意義についての質問には、電気生理学的実験結果より支配する領域の広さまた入力する情報量と相関する可能性が高いと説明した。それらは、おおむね妥当な回答であると考えられた。

審査員一同は、リーラーマウスの大脳皮質投射ニューロンを逆行性に標識し計量形態学的手法で解析することにより、投射先の違いにより形態形成に寄与する因子に差が見られることを明らかとした成果を高く評価し、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。