

(見本) この Form (A3で1枚、2つ折)、ワープロで作製

論文内容の要旨

論文提出者氏名 中村 高志

論文題目

Novel role of Rac-Mid1 signaling in medial cerebellar development.

論文内容の要旨

神経細胞は、発生段階に一定の様式をとって最終目的地まで遊走することにより、整然とした層構造と複雑な神経回路の形成を可能にする。小脳顆粒細胞の遊走に関しては、以前から詳細に研究されている。マウスにおいては、胎生 13 日に上菱脳唇からその前脚細胞が産生され始め、小脳原基の表層を覆うように後方から前方に向かって接線移動し、小脳原基表層に外顆粒層を形成する。そこで分裂と分化が行われる。分化の最終過程として、胎生 18 日頃から外顆粒層最深部にいる顆粒細胞が深部に向かって樹状突起を形成し、これに沿って放射状移動して内顆粒層を形成する。生後 20 日頃には、外顆粒層は消失し成熟した小脳となる。

Rac (Rac1-3) は、細胞骨格の形成・維持に働く Rho ファミリー低分子量 G タンパク質の一種で、神経細胞においても軸索や樹状突起を含めた神経突起形成を始めとし、細胞遊走、転写調節などへの関与が報告されている。例えば、終脳(大脳半球)由来神経細胞における Rac1 ノックアウト (KO) マウスで軸索誘導と放射状移動の障害が報告されている。しかし小脳顆粒細胞における Rac の病態的な機能については解明されていない。そこで我々は小脳顆粒細胞特異的に Rac1 を KO したマウスを作製し、これに Rac3 を全身で KO したマウス (Rac3-null マウス) を交配させて Rac1,3 ダブルノックアウト (DKO) マウスも作成し、機能解析を行った。

成熟した Rac1KO マウスでは小脳正中中部で内顆粒層が特異的に消失し、行動異常は認めなかった。これに組織形態・行動ともに正常である Rac3-null マウスを交配させ作製した DKO マウスは、正中中部で内顆粒層が完全に消失し、生後歩行開始時から明らかな失調性歩行を呈した。小脳正中中部を矢状断でみると、前葉にあたる第 I ~ VII 小葉でだけ内顆粒層が消失し、他に類を見ないユニークな表現型を呈した。

接線移動する胎生 16.5 日の段階で、上菱脳唇から外顆粒層先端までの距離は DKO マウスにおいて軽度短縮して

(A3判)

いた。生後 4 日齢で、Edu labeling index によって計測した顆粒細胞分裂能は正常であった。生後 5 日齢で分化マーカーである Pax6, P27^{Kip1}, NeuN による免疫染色を行ったが、異常は認めなかった。ところが生後 7 日齢になると明らかに小葉構造が乱れ小脳全体のサイズが縮小し、生後 10 日齢には内顆粒層の消失も顕著となった。そこで生後 8 日齢に活性化型カスパーゼ 3 で免疫染色を行ったところ、DKO 外顆粒層の最深部で多数のアポトーシス細胞を認めた。更に、外顆粒層の移植片器培養による実験によって、MAP2 (微小管結合タンパク: 軸索になく樹状突起に局在) の発現が低下し、樹状突起形成と放射状移動が障害されていることを見出した。

内顆粒層形成不全のメカニズムを検証するため、生後 6 日齢における小脳正中中部を用いて DNA マイクロアレイを行ったところ、全身の正中部分に奇形を生じる Opitz G/BBB 症候群の原因遺伝子 Mid1 の発現が、コントロールと比較して 0.29 倍に低下していることを発見した。更に、Rac 特異的インヒビターである EHop-016 と Rac 特異的活性化因子である Tiam1 を用いた実験によって、Rac が Mid1 の発現を転写レベルで制御すると結論づけた。最後に、初代培養した小脳顆粒細胞に対し Mid1 をノックダウンさせたところ、神経突起伸長の軽度障害が確認された。

本研究により、Rac 分子種は小脳顆粒細胞において、NeuN 発現以降に樹状突起を形成する最終分化段階で重要な機能を果たすことが明らかとなった。Rac が欠失することで接線移動よりも放射状移動が重度に障害され内顆粒層形成不全を生じ、特に正中中部前葉では欠損に至る。また OpitzG/BBB 症候群の原因遺伝子 Mid1 の発現が Rac によって制御されることを世界で初めて報告した。

Opitz 症候群は小脳虫部奇形、脳梁欠損、眼間解離、喉頭気管食道奇形、尿道下裂といった全身の正中中部に奇形を来す症候群であるが、同一家系であっても症状が異なることがあり、その全貌は未だ解明されていない。一方で、Rac の下流標的については、現在までにいくつかの分子が明らかになっているが、実際の臨床病態に関与する報告は殆どない。小脳顆粒細胞における Rac1KO マウスが小脳虫部奇形を呈し、また終脳特異的 Rac1 KO マウスにおいても脳梁の形成不全が報告されており、これらは Opitz 症候群の症状と一致する。Rac 分子種が本症候群の発症に関与する可能性が十分に考えられ、本研究は Opitz 症候群の発症機序解明に貢献しうると期待される。