



# Characterization of heterotopic cell clusters in the hippocampus of the rat after prenatal treatment of methylazoxymethanol acetate (MAM)

今井, 英明

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2012-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5455

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005455>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Characterization of heterotopic cell clusters in the hippocampus of the rat after prenatal treatment of methylazoxymethanol acetate (MAM)

胎生期 MAM 投与ラット脳の海馬に認められる細胞構築異常の詳細

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻  
神経発生学  
(指導教員：寺島俊雄 教授)

今井英明

【諸言】

脳の発達過程で内的もしくは外的要因が母体に加わることによって、胎児の脳は様々な影響を受ける。実験的に妊娠動物へ催奇形因子を投与することによって、特定の発達時期での環境要因が胎児脳にもたらす影響への理解を深めることが期待される。Methylazoxymethanol (MAM) は、幼若神経細胞に毒性を及ぼすことが知られており、妊娠動物に MAM を腹腔内投与すると胎盤を通過して核酸塩基をメチル化し、投与時期に依存して胎児脳における分裂および移動中のニューロンに選択的に作用する。胎生 15 日齢 (Embryonic day 15: E15) で MAM に暴露されたラットは、顕著な小頭症に加えて、大脳新皮質の層構築異常、および、海馬 CA1 錐体細胞層特異的に異所性細胞集塊が認められることが報告されている。

海馬 CA1 領域に認められる異所性細胞集塊について、これらに含まれるニューロンが電気生理学および分子生物学的に大脳新皮質第 II/III 層ニューロンと類似していることが先行研究によって報告されており、異所性細胞集塊を構成するニューロンが大脳新皮質に由来し、移動異常によって海馬に配置されたことを示唆している。しかし、これらの異所性細胞集塊がどのような過程で海馬 CA1 領域に侵入するのか、また細胞集塊に含まれる全てのニューロンが大脳新皮質第 II/III 層由来なのかは明らかになっていない。そこで本研究では、E15 での MAM 投与が及ぼす脳の形態学的異常を観察し、出生直後における異所性細胞集塊の形成過程の詳細、大脳新皮質の層構築異常および細胞集塊に含まれるニューロンのキャラクタリゼーションを検索した。

【材料と方法】

(1) 材料および MAM 投与

雌雄のラット (Jcl:Wistar) を型通り交配させ、産産確認日を胎生 0 日齢 (E0) と規定し、E15 の妊娠ラット (n=9) に、生理食塩水に溶解した 30 mg/kg の MAM (MAM 投与ラット) もしくは同量の生理食塩水 (対照ラット) を腹腔内投与した。投与後に得られた仔ラットを以下の実験に用いた。

(2) 組織学的検索

生後 0 日齢 (Postnatal day 0: P0) から P2 まで、6 時間おきに同腹仔を 0.1M phosphate buffer saline (PBS) と 4% paraformaldehyde を用いて灌流固定し、抜脳後、同一固定液にて後固定を行った。型通りセロイジン包埋したのち連続切片を作成し、Nissl 染色を施した。また、成体期ラット (P50) に関しても、同様の方法で灌流固定を行った後、凍結ミクロームにて 40  $\mu$ m 厚の凍結切片、もしくは型通り包埋した後にスライディングミクロームにて 8  $\mu$ m 厚のパラフィン切片を作成し、Klüver-Barrera 染色および Bodian 染色を施した。

### (3) FluoroGold (FG) 注入および免疫組織化学

麻酔下の成体期ラット (P50) の頭背側部、もしくは、外側中隔核に 4% FG (Fluorochrome) を 0.2  $\mu$ l 注入し、逆行性に標識されるニューロンを検索した。FG を注入後、型通り灌流固定し、抜髄後、凍結ミクロトームにて 40  $\mu$ m 厚の連続切片を作成した。作成した切片を 1% BSA 溶液にてブロッキング後、抗 FG 抗体 (Chemicon) および抗 calbindin 抗体 (Diagnostic Biosystems) を添加し一晩反応させた。二次抗体は、それぞれビオチン化抗ラビット抗体 (Vector)、ビオチン化抗マウス抗体 (Vector) を用いた。

#### 【結果および考察】

成体期 MAM 投与ラットおよび対照ラットの脳を肉眼的に比較すると、MAM 投与ラットの脳は顕著に萎縮しており、脳重に関して両群間に有意な差が認められた ( $t=3.728$ ,  $p<0.01$ )。組織学的には、海馬 CA1 領域錐体細胞層に異所性細胞集塊が観察され、海馬周辺にも同様に細胞集塊が認められた。また、大脳新皮質に関しては、特に第 II/III 層において細胞の欠落が認められることが明らかになった。Bodian 染色の結果、MAM 投与ラットの海馬 CA1 錐体細胞が上昇層から放射状層にわたって配置しており、その神経線維の方向は不均一に絡まり合うような形状を示した。

次に、海馬 CA1 領域における異所性細胞集塊の形成過程を詳細に調べるために、同腹仔の脳について、出生直後から P2 まで 6 時間おきに還流固定を行い、Nissl 染色を施した。その結果、P0 において脳梁直下に異所性細胞集塊が観察され、その後 P1 までほぼ同様の所見を示した。P1.25 から、脳梁の発達に伴って細胞集塊は次第に腹側に移行し、P1.25 および P1.5 では大脳新皮質と海馬との橋渡しをするような形状を示した。P1.75 以降になると、細胞集塊は海馬に侵入しはじめ、P2 では CA1 錐体細胞層に完全に侵入した。これらの結果から、出生直後にすでに異所性細胞集塊が脳梁の直下に存在しており、生後に海馬 CA1 領域へ侵入してくることが明らかとなった。脳梁が出生直前から出生後にかけて発達することから、これらの異所性細胞集塊は MAM 投与によって垂直方向へ正常な移動ができないまま蓄積し、脳梁の発達によって海馬 CA1 領域に二次的に異所性の細胞集積が行なわれたと考えられる。

さらに、MAM 投与による大脳新皮質層構築への影響を調べるため、大脳新皮質第 V 層に分布する皮質脊髄路 (Corticospinal tract: 以下 CST と略す) ニューロンを、逆行性トレーサーである FG を上部頸髄に注入することによって標識し、その分布を調べた。MAM 投与ラットの標識された CST ニューロンの多くは第 V 層に分布していたが、その一部は大脳新皮質表層に異所的に位置しており、それらの CST ニューロンの頂上樹状突起は異常な極性を示すことが分かった。このことから、胎生期 MAM 投与によって発達中の大脳新皮質における移動異常が引き起こされ、大脳新皮質 CST ニューロンの異所配置を引き起こして

いる可能性が示唆される。一方で、海馬周辺に認められた細胞集塊中に CST ニューロンは認められなかった。つまり、CST ニューロンを含む脳発生の比較的早い段階で産生される大脳新皮質深層ニューロンは、海馬へ侵入する異所性細胞集塊には含まれないことが明らかになった。これは MAM 投与によって引き起こされる異常が、ニューロンの産生時期に依って変化することを反映していると考えられる。

先行研究では、海馬 CA1 異所性細胞集塊を形成するのは大脳新皮質第 II/III 層由来のニューロンであることが示唆されているが、そのキャラクタライゼーションの詳細は分かっていない。そこで、海馬錐体細胞の有力な投射先である外側中隔核に逆行性トレーサーである FG を注入後、大脳新皮質 II/III 層のマーカーとして抗 calbindin 抗体を用いた免疫染色を行ない、MAM 投与ラットの海馬 CA1 領域を観察した。その結果、海馬 CA1 領域に認められる異所性細胞集塊が calbindin 陽性細胞およびニューロパイルで構成されていることが明らかになった。さらに興味深いことに、蛍光二重標識観察によって FG 陽性海馬 CA1 錐体細胞が異所性細胞集塊の周囲に散在していた。つまり、MAM 投与によって異所性に集積された大脳新皮質由来の細胞集塊の侵入によって、本来位置していた海馬 CA1 錐体細胞は腹側方向に押し出されるが、それらのニューロンは正常な投射機能を維持し続けることが明らかになった。E15MAM 投与によって海馬 CA1 領域特異的に異所性細胞集塊が認められることから、海馬依存性である記憶学習課題の獲得障害に焦点を当てた先行研究が数多く行われてきた。しかし、それらの先行研究の間で結果が一致しておらず、明確な結論に至っていない。本研究の形態学的観察から明らかになった異所性細胞集塊の侵入後も海馬錐体細胞が残存するという事実は、これらの結果の不一致を説明しうる可能性がある。つまり、これまで確認されなかった正常な CA1 錐体細胞の残存が正常な神経回路の一部として位置異常を示した後も機能し続けていることから、海馬依存的な記憶学習課題での行動学的表現型が検出しにくいと考えられる。

自然発症性 *reeler* 遺伝子欠損マウスである *reeler* も MAM 投与ラットと同様に顕著な層構造異常を示すことが知られているが、MAM 投与が引き起こす DNA メチル化が *reelin* 遺伝子を抑制し、海馬特異的に Reelin タンパクの発現を変化させている可能性が最近の研究で指摘された。本研究結果も、MAM 投与が引き起こす Reelin シグナルの機能欠損が適切な細胞増殖、分化、および時空間的に制御されたニューロン移動に影響を与えている可能性を示唆しているだろう。近年、ニューロイメージングの発達によって大脳新皮質や海馬の層構造異常とヒト精神疾患との関連が明らかになりはじめており、MAM 投与動物および Reelin シグナル欠損動物を用いた解析はそれらの疾患発症メカニズムの一端を明らかにすると思われる。そして両者の関連性に対するさらなる理解を深めることによって、哺乳類特異的に認められる層構造の機能的意義の実験的証明に繋がる可能性があるだろう。

| 論文審査の結果の要旨                       |  |    |       |
|----------------------------------|--|----|-------|
| 受付番号                             | 甲 第 2252 号   | 氏名 | 今井 英明 |
| 論文題目<br>Title of<br>Dissertation | <b>Characterization of heterotopic cell clusters in the hippocampus of the rat after prenatal treatment of methylazoxymethanol acetate (MAM)</b><br>(胎生期 MAM 投与ラット脳の海馬に認められる細胞構築異常の詳細) |    |       |
| 審査委員<br>Examiner                 | 主査 匂坂 敏朗<br>Chief Examiner<br>副査 西尾 久英<br>Vice-Examiner<br>副査 平島 正則<br>Vice-Examiner   |    |       |
| 審査終了日                            | 平成 24 年 02 月 15 日  |    |       |

(要旨は 1, 000 字 - 2, 000 字程度)

【はじめに】

Methylazoxymethanol (MAM) は、幼若神経細胞に神経毒性を及ぼすことが知られており、妊娠動物に MAM を腹腔内投与すると投与時期に依存して胎児脳における分裂中のニューロンに選択的に作用する。胎生 15 日齢 (Embryonic day 15: 以下 E15 とする) で MAM に暴露されたラットは、顕著な小頭症に加えて、大脳新皮質の層構築異常、および、海馬 CA1 錐体細胞の層特異的に異所性細胞集塊が認められることが報告されている。しかし、これらの異所性細胞集塊がどのような移動様式で海馬 CA1 領域に侵入するのかは明らかになっていない。本研究では、E15 での MAM 投与が及ぼす脳の形態学的異常を視察し、出生直後における異所性細胞集塊の形成過程の詳細、大脳新皮質の層構築異常および細胞集塊に含まれるニューロンのキャラクターゼーションを検索した。

【方法と結果】

成体期 MAM 投与ラットの脳は顕著に萎縮し、脳重に関してコントロール群と有意な差が認められた。組織学的には、海馬 CA1 領域錐体細胞層に異所性細胞集塊が観察され、海馬周辺にも同様に細胞集塊が認められた。加えて大脳新皮質の第 II/III 層における細胞の欠落が明らかになった。MAM 投与ラットの海馬 CA1 錐体細胞は上昇層から放射状層にわたって配置し、その神経線維の方向は不均一に絡まり合うような形状を示した。さらに、海馬 CA1 領域における異所性細胞集塊の形成過程を調べるために、出生直後から生後 2 日 (postnatal day 2; 以下 P2 とする) まで 6 時間おきに還流固定を行い、Nissl 染色を施した。P0 において脳梁直下に異所性細胞集塊が観察され、その後 P1 までほぼ同様の所見を示した。P1.25 から、脳梁の発達に伴って細胞集塊は次第に腹側に移行し、P1.25 および P1.5 では大脳新皮質と海馬との橋渡しをするような形状を示した。P1.75 以降になると、細胞集塊は海馬に侵入しはじめ、P2 では CA1 錐体細胞層に完全に侵入した。脳梁が出生直前から出生後にかけて発達することから、これらの異所性細胞集塊は MAM 投与によって垂直方向へ正常な移動ができないまま蓄積し、脳梁の発達によって海馬 CA1 領域に二次的に異所性の細胞集積が行なわれたと考えられる。

MAM 投与による大脳新皮質層構築への影響を調べるため、大脳新皮質第 V 層に分布する皮質脊髄路 (Corticospinal tract: CST) ニューロンを、逆行性トレーサーである FluoroGold (FG) を頸髄に注入することによって標識し、その分布を調べた。MAM 投与ラットの FG 標識 CST ニューロンの多くは第 V 層に分布していたが、その一部は大脳新皮質表層に異所的に位置していた。つまり、胎生期 MAM 投与によって発達中の大脳新皮質における移動異常が引き起こされている可能性が示唆される。一方で、海馬周辺の異所性細胞集塊中に CST ニューロンは認められなかった。CST ニューロンを含む脳発生 の早い段階で産生される大脳新皮質深層ニューロンは、海馬へ侵入する異所性細胞集塊には含まれないことから、MAM 投与によって引き起こされる異常がニューロンの産生時期に依存して変化することを反映していると考えられる。

さらに海馬錐体細胞の投射先である外側中隔核に FG を注入後、大脳新皮質 II/III 層のマーカーとして抗 calbindin 抗体を用いた免疫染色を行なった結果、海馬 CA1 異所性細胞集塊が calbindin 陽性細胞およびニューロパイルで構成されていることが明らかになった。さらに興味深いことに、蛍光二重標識観察によって FG 陽性海馬 CA1 錐体細胞が異所性細胞集塊の周囲に散在していた。つまり、MAM 投与によって異所性に集積された大脳新皮質由来の細胞集塊の侵入によって、本来位置していた海馬 CA1 錐体細胞は腹側方向に押し出されるが、それらのニューロンは正常な投射機能を維持し続けることが明らかになった。

#### 【結論】

E15MAM 投与ラットを用いて海馬依存性である記憶学習課題の獲得障害に焦点を当てた先行研究が数多く行われてきたが、それらの先行研究の間で結果が一致していない。本研究の形態学的観察から、これまで確認されなかった正常な CA1 錐体細胞の残存が正常な神経回路の一部として位置異常を示した後も機能し続け、海馬依存的な記憶学習課題での行動学的表現型が検出しにくいと考えられる。また、自然発症性 *reelin* 遺伝子欠損マウスである *reeler* も MAM 投与ラットと同様に顕著な層構造異常を示すことが知られている。MAM 投与が引き起こす DNA メチル化が *reelin* 遺伝子を制御し、*Reelin* タンパクの発現を変化させている可能性が最近の研究で指摘された。本研究の結果からも、MAM 投与が引き起こす *Reelin* シグナルの機能欠損が適切な細胞増殖、分化、および時空間的に制御されたニューロン移動に影響を与えている可能性を示唆する。

本研究は、ラット胎生期に Methylazoxymethanol (MAM) を投与することにより、その中枢神経系の発生と発達における神経毒性を形態学的に解析したものである。その結果、胎生期 MAM 投与により、大脳新皮質の層構築が異常となること、また海馬の異所性細胞塊は大脳新皮質ニューロンの異常な細胞移動によるものであることを証明した点において、価値ある業績であると認める。よって、本研究者は博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。