



Cytoarchitecture of the olfactory bulb in the laggard mutant mouse

JUNAEDY YUNUS

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2016-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6519号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006519>

※ 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。

**Cytoarchitecture of the olfactory bulb in the
laggard mutant mouse**

ラガード奇形マウス嗅球の細胞構築

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)

JUNAEDY YUNUS

【緒言】

Kif14 タンパク質はキネシンスーパーファミリー分子に属し、細胞分裂に関与する。その機能を阻害すると細胞分裂が障害されアポトーシスが誘導されることが知られている。一方、ラガード奇形マウス（以下ラガードとする）は、髓鞘の低形成と小脳性運動失調を特徴とする自然発症奇形マウスで、先行する研究によりその原因遺伝子が *Kif14* であることが判明した。この奇形マウスの脳の特徴は、肉眼的には嗅球と小脳のサイズが小さく、組織学的には大脳皮質や海馬の層構造が乱れ、小脳の小葉形成やブルキンエ細胞の位置異常が認められる。またミエリン塩基性タンパク質の抗体を用いた免疫組織化学と電子顕微鏡観察により、中枢性髓鞘の低形成が見られる。このラガードは、生後 2 週の終わりにはおそらく小脳性運動失調のために死に、成体に至ることは無い。本研究は、胎生後期と生後発育期におけるラガードマウスの嗅球の細胞構築の形態を組織学的に検討したものである。

【材料と方法】

1. 動物 ラガードヘテロマウス (*lag/+*) の雌雄を交配し、ホモ個体 (*lag/lag*) と対照マウス (*lag/+* or *+/+*) を得た。腔栓を確認した日を胎生 0 日 (E0) 齢、出産を確認した日を生後 0 日 (P0) 齢とした。全ての動物は神戸大学医学部附属動物実験施設にて適正な環境の下に飼育された。また本研究に関わる動物実験計画は、神戸大学動物実験委員会の審査を受けて承認された。また動物実験は神戸大学動物実験規則に従い適正に行われた。
2. HE 染色と免疫組織化学 実験動物の左心室よりパラホルムアルデヒド溶液で灌流固定してサクリファイスし、抜脳した。後固定後、脱水、透徹してパラフィン包埋した。切片を作成し、HE 染色および Reelin 抗体、チロシン水酸化酵素 (TH) 抗体、グリア細線維性酸性タンパク質 (GFAP) 抗体、ミエリン塩基性タンパク質 (MBP) 抗体を用いて ABC 法により免疫染色した。
3. 二重細胞核を持つニューロン (結果の項で後述するが) 僧帽細胞と傍系球体細胞は二重核をもつことがある。そこで Reelin 陽性の僧帽細胞と TH 陽性の傍系球体細胞の中で細胞核の数を数え、ラガードと対照マウス間で二重細胞核を持つ細胞の割合が同じか否か統計的に比較した。
4. TUNEL 法 Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) 法に基づき、細胞死を起こすニューロンを標識した。
5. BrdU 標識法 妊娠マウス (E15.5) に BrdU を腹腔内投与し、2 時間後にパラホルムアルデヒド溶液の灌流固定によりサクリファイスした。脳をパラ

イン包埋し、薄切切片を BrdU 抗体を用いて免疫染色した。

嗅神経の順行性標識 P10 動物の嗅粘膜に WGA-HRP を注入し、翌日、ルタールアルデヒドとパラホルムアルデヒド混合液の灌流固定により動物をクリファイスした。嗅球を取り出し、凍結切片を作成し、TMB 法により順行標識された嗅神経終末を観察した。

結果と考察】

P10 ラガードと対照マウスの嗅球の細胞構築 P10 のラガード嗅球は、常に比較して小さく、また透明である。正常マウスでは側脳室脳室下層から球中心部に至る吻側移動経路 rostral migratory stream (RMS) が明瞭であるが、ラガードでは RMS が確認できない。ラガード嗅球の細胞構築を HE 染色調べたところ、概ね正常であるが傍糸球体細胞と顆粒細胞の数は減少している。またラガードの嗅糸球体は一列に整然と配列しない。また本来一列に配列する僧帽細胞が多層を形成する。この細胞構築異常をマーカー抗体を用いてさに検討した。ラガードの TH 抗体陽性傍糸球体細胞は、対照マウスに比較し糸球体細胞層と外網状層のより広い領域に散布する。さらに TH 免疫陽性の糸球体細胞の中に多核（二重細胞核）の大型のニューロンが混在する。ラガードの Reelin 免疫陽性の僧帽細胞の配列は乱れ、多重細胞核をもつ大型ニューロンが確認できる。

半定量的研究により、ラガードの TH 免疫陽性傍糸球体細胞は減少するが、Reelin 免疫陽性の僧帽細胞の数は対照マウスのそれと変化が無いことが明らかになった。またラガードでは TH 免疫陽性の傍糸球体細胞の中で二重細胞核の合が増加する（対照 0.5% に対しラガード 12.7%）。同様にラガードでは二重細胞核をもつ Reelin 免疫陽性僧帽細胞の割合が増加する（対照 0%、ラガード 3%）。このような結果は、ラガードでは細胞分裂異常があることを示唆する。MBP 免疫染色の結果、対照マウスの嗅球の中心部には MBP 陽性の髓鞘が散するが、ラガード嗅球には陽性産物はない。ラガード嗅球には有髓線維が無いため、肉眼的に透明性が高いと考えられる。GFAP 免疫陽性のアストロцитについてもラガードと対照マウス間に差を認めない。

WGA-HRP の嗅粘膜注入により、ラガード嗅球の嗅神経終末が証明できるこより、ラガードの嗅覚入力系は正常に保たれている。しかし WGA-HRP 陽性嗅糸球体のニューロピルの配列は乱れていた。

出生前および出生後のラガード嗅球の細胞構築変化 出生前の嗅球のサイズはラガードと正常で変化が無い。E15.5 日令のラガードの RMS と嗅球中

心部の脳室（嗅脳室）は正常と変わらないが、E17.5 日令の対照マウスの嗅脳室は閉鎖しているが、ラガードでは P3 日令に至るまで開放している。出生後、対照マウスの嗅球は次第にそのサイズを増すが、ラガードの嗅球のサイズは一定で、P10 日令では明らかにそのサイズが対照マウスの嗅球に比較して小さい。対照マウスの RMS は P3 日令で明瞭に認められるが、同日令のラガード RMS は対照マウスに比べて細い。また対照マウスの RMS は P3 から P10 日令まで変化がないが、ラガードの RMS は次第に細くなり、P10 日令で完璧に消失する。

出生前のラガードの嗅球の細胞構築は、HE 染色で観察するかぎり多層を示す僧帽細胞層を除いて、対照マウス嗅球の細胞構築と大きな差を認められなかった。一方 TH 免疫組織化学によると、E15.5 日齢から生後 1 週令まではラガード嗅球の TH 陽性傍糸球体細胞の分布は対照マウスのそれと大きな差はなかったが、P7 から P10 日令では、より広い範囲に分布し、しかもその細胞体のサイズが大きく、多核の細胞が認められた。また Reelin 免疫陽性の僧帽細胞の分布も多層であり、単層の対照マウス僧帽細胞と著しく異なっている。また P7 から P10 日令のラガードの Reelin 陽性の僧帽細胞に多核の細胞が認められた。

3. TUNEL 法と BrdU アッセイ ラガード嗅球のサイズが小さい理由は、細胞死が増加している可能性と細胞増殖が阻害されている可能性があり、それぞれの可能性を TUNEL 法と BrdU アッセイで検討した。TUNEL 法により E17.5 日令のラガード側脳室上衣下層にアポトーシスを示す細胞が増加していた。このような TUNEL 陽性のアポトーシスを示す細胞は嗅球の中心部でも確認できた。しかし P5 以降は、ラガードと対照マウス間に差は認められなかった。一方、BrdU アッセイでは両者に大きな差を認めなかった。

【結語】

1. ラガード嗅球の細胞構築は異常である。ことに傍糸球体細胞と僧帽細胞の分布が対照マウスに比較して広く散在する。
2. ラガードの傍糸球体細胞と顆粒細胞は数が減少している。このこととがラガード嗅球のサイズが小さい理由である。これらの細胞が減少する理由は不明であるが、ラガードの RMS が生後の早期に退縮傾向となることがその一因であろう。
3. ラガード嗅球では、一部の傍糸球体細胞や僧帽細胞の細胞体のサイズが大きく、多核であることがある。
4. このようなラガード嗅球の細胞構築異常は、citron-K ヌルマウスのそれに類似しており、Kif14 と citron-K 分子間に何らかの相互作用があることを示唆する。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2545 号	氏名	JUNAEDY YUNUS
論文題目 Title of Dissertation	<p>Cytoarchitecture of the olfactory bulb in the laggard mutant mouse ラガード奇形マウス嗅球の細胞構築</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 Chief Examiner</p> <p>古屋敷 智之</p> <p>副査 Vice-examiner</p> <p>舟 良一郎</p> <p>副査 Vice-examiner</p> <p>舟 美津一</p>		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

【はじめに】

ラガード奇形マウス（以下ラガードとする）は、髓鞘の低形成と小脳性運動失調を特徴とする自然発症奇形マウスで、その原因遺伝子はキネシンスーパーファミリーに属する *Kif14* である。この奇形マウスの脳の特徴は、嗅球と小脳のサイズが小さく、組織学的には大脑皮質や海馬の層構造が乱れ、小脳の小葉形成やブルキン工細胞の位置異常が認められる。また中枢性髓鞘の低形成が見られる。このラガードは、生後 2 週の終わりまでに死亡する。本研究は胎生期と生後発育期のラガード嗅球の細胞構築の形態を組織学的に検討したものである。

【材料と方法】

ラガードヘテロマウスの雌雄を交配し、ホモ個体と対照マウスを得た。パラホルムアルデヒド溶液固定した脳をパラフィン包埋し、連続切片を作成した。HE 染色および Reelin 抗体、チロシン水酸化酵素 (TH) 抗体、グリア細線維性酸性タンパク質 (GFAP) 抗体、ミエリン塩基性タンパク質 (MBP) 抗体を用いた免疫組織化学法を行った。また TUNEL 法により細胞死を起こすニューロンを標識した。さらに妊娠マウス（胎生(E)15.5）に BrdU を腹腔内投与し、2 時間後にパラホルムアルデヒドにて固定し、薄切切片を BrdU 抗体を用いて免疫染色した。生後 10 日 (P10) 令の動物の嗅粘膜に WGA-HRP を注入し、翌日、動物をサクリファイスした。嗅球を取り出し、凍結切片を作成し、TMB 法により順行性標識嗅神経終末を観察した。

【結果と考察】

1. P10 ラガード嗅球の細胞構築異常

正常 P10 マウスでは側脳室脳室下層から嗅球中心部に至る吻側移動経路 rostral migratory stream (RMS) が明瞭であるが、同日齢のラガードでは RMS が確認できない。ラガード嗅球の細胞構築を HE 染色で調べると、概ね正常であるが、傍糸球体細胞と顆粒細胞の数は減少していた。またラガードの嗅糸球体は一列に配列しない。また僧帽細胞は多層を形成する。この細胞構築異常を免疫組織化学法により検討したところ、ラガード TH 抗体陽性傍糸球体細胞は、対照マウスに比較して糸球体細胞層と外網状層のより広い領域に散布する。さらに TH 免疫陽性の傍糸球体細胞の中に多核（二重細胞核）の大型のニューロンが混在する。ラガードの Reelin 免疫陽性僧帽細胞の配列は乱れ、多重細胞核をもつ大型ニューロンが確認できる。半定量的研究により、ラガードの TH 免疫陽性傍糸球体細胞は減少する。またラガードでは TH 免疫陽性の傍糸球体細胞および Reelin 免疫陽性の僧帽細胞中、二重核細胞の割合が増加する。このような結果はラガードでは細胞分裂異常があることを示唆する。

一方、WGA-HRP の嗅粘膜注入により、ラガード嗅球の嗅神経終末が証明できることより、ラガードの嗅覚入力系は正常に保たれている。

2. 出生前および出生後のラガード嗅球の細胞構築変化

胎生期ラガードの RMS は正常と変わらないが、出生後、対照マウスの嗅球は次第にそのサイズを増すが、ラガードの嗅球のサイズは一定で、P10 日令では明らかにそのサイズが正常マウスと比較して小さい。対照マウスの RMS は P3 日令で明瞭に認められるが、同日令のラガード RMS は対照マウスに比べて細い。また対照マウスの RMS は P3 から P10 日令まで変化がないが、ラガードの RMS は次第に細くなり、P10 日令で完全に消失する。

出生前のラガード嗅球の細胞構築は、TH 免疫組織化学によると、E15.5 日齢から生後 1 週令までは大きな差はないが、P7 から P10 日令では、より広い範囲に分布し、しかもその細胞体のサイズが大きく、多核の細胞が認められた。また Reelin 免疫陽性の僧帽細胞の分布も多層であり、単層の対照マウス僧帽細胞と著しく異なっている。また P7 から P10 日令のラガードの Reelin 陽性の僧帽細胞に多核の細胞が認められた。

ラガード嗅球のサイズが小さい理由は、細胞死が増加している可能性と細胞増殖が阻害されている可能性があり、それぞれの可能性を TUNEL 法と BrdU アッセイで検討した。TUNEL 法により E17.5 日令のラガード側脳室上衣下層にアポトーシスを示す細胞が増加していた。このような TUNEL 陽性のアポトーシスを示す細胞は嗅球の中心部でも確認できた。しかし P5 以降は、ラガードと対照マウス間に差は認められなかった。一方、BrdU アッセイでは両者に大きな差を認めなかった。

【結語】

ラガード嗅球の細胞構築は異常である。ことに傍糸球体細胞と僧帽細胞の分布が対照マウスに比較して広く散在する。またラガードの傍糸球体細胞と顆粒細胞は数が減少している。その結果、ラガード嗅球のサイズは小さい。上記の細胞種が減少する理由は不明であるが、ラガードの側脳室上衣下層にアポトーシスが増える結果、RMS が生後の早期に退縮傾向示すことがその一因であろう。ラガード嗅球では、一部の傍糸球体細胞や僧帽細胞の細胞体のサイズが大きく、多核であることより、細胞分裂のメカニズムに異常があると考えられる。このようなラガード嗅球の細胞構築異常は、citron-K 欠損マウスのそれに類似しており、Kif14 と citron-K 分子間に何らかの相互作用があることを示唆する。

以上、本研究は Kif14 タンパク質を欠損する自然発症マウス・ラガードの嗅球の細胞構築を胎生後期から生後発達期にかけて、HE 染色、免疫組織化学法、BrdU による birth date ラベリング、TUNEL 法、WGA-HRP による順行性標識法により研究したものである。その結果、ラガードの嗅球の細胞構築異常を明らかにした。また傍糸球体細胞と顆粒細胞が減少する。脳室上衣下層におけるアポトーシスが増加して RMS は早期に消褪し、多核のニューロンが増加する。この所見は Kif14 タンパク質が脳室上衣下層や嗅球における細胞増殖に関与することを示したものであり、価値ある業績と認める。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。