



Ectopic corticospinal tract and corticothalamic tract neurons in the cerebral cortex of *yotari* and *reeler* mice

山本, 達朗

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2005-06-08

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2826

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002826>

※ 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。



【 156 】

氏 名・(本 籍) 山本 達朗 (兵庫県)

博士の専攻分野の名称 博士(医学)

学 位 記 番 号 博ろ第1948号

学位授与の要件 学位規則第5条第2項該当

学位授与の日付 平成17年6月8日

【 学位論文題目 】

Ectopic Corticospinal Tract and Corticothalamic Tract
Newrons in the Cerebral Cortex of Yotari and Reeler Mice
(ヨタリとリーラーマウス大脳皮質における異所性皮質脊髄路
ニューロンと皮質視床路ニューロン)

審 査 委 員

主 査 教 授 岡 村 均
教 授 南 康 博
教 授 饗 場 篤

群の中で標識ニューロンの細胞体の中心 S を通過する法線を L とする。法線 L が軟膜と白質を横断する点を A, B とする。皮質内における標識ニューロンの相対的皮質内位置 (Z) を $Z(\%) = BS/AB \times 100$ とする。ここで $Z = 0\%$ は白質を意味し、 $Z = 100\%$ は軟膜を意味する ($0 \leq Z \leq 100$)。

<結 果>

1. リーラー遺伝子型の決定

reel/in 遺伝子と *Hammer-toe* 遺伝子の二重ヘテロ個体 (*Reel/in*^{+/+}, *Hm*^{+/+}) の交配により得た同腹仔のうち、内反足を示すホモ (*Hm*^{++/+}) あるいはヘテロ個体 (*Hm*^{+/+}) の小脳は正常であったが、内反足を示さない正常足の個体 (*Hm*^{++/0}) は、リーラー型小脳を示した。したがって内反足を指標にリーラーの遺伝子型が決定可能であることが証明された。*Hammer-toe* を利用したリーラーの遺伝子型決定の妥当性を検討するために、*reel/in* の genomic PCR を行ったところ、外奇形とリーラー変異の相關性が確認された。

2. 第V層-CST ニューロン

正常マウスの標識 CST ニューロンの大部分が、大脳皮質の運動感覺野下肢領域 (HL) に分布し、一部の標識ニューロンが、運動感覺野上肢領域 (FL) や前頭葉第1領域 (Fr1) に散在していた。全ての標識 CST ニューロンが、大脳皮質第V層に分布していた。ヨタリやリーラーの標識 CST ニューロンは、接線（水平）方向の分布領域は正常マウスと変わりが無いかが、放射状（垂直）方向の分布に関しては広い範囲で異所性に分布した。さらに詳細に標識 CST ニューロンの分布をヨタリとリーラーで比較すると、ヨタリでは標識 CST ニューロンが大脳皮質の表層 1/3 に分布し、リーラーでは大脳皮質の全層に分散して分布していた。リーラー、ヨタリともに脳軟膜直下にある多形細胞層の表層には、標識 CST ニューロンは乏しかった。標識 CST ニューロンの形態は錐体型で、リーラーとヨタリで類似していた。

3. 第VI層-CTT ニューロン

大脳皮質第VI層-CTT ニューロンを標識するために、WGA-HRP を視床の腹外側核に注入した。正常マウスでは標識 CTT ニューロンは運動感覺野下肢領域 (HL) に認められた。標識 CTT ニューロンの大半は大脳皮質第VI層に分布したが、ごく少数の標識ニューロンが第V層に認められた。リーラーやヨタリでは、標識 CTT ニューロンが大脳皮質の全層に認められるが、大部分は脳軟膜直下の多形細胞層に分布していた。

4. 第V層-CST、第VI層-CTT ニューロンの皮質内分布の定量的解析

正常マウスの標識 CST ニューロンの 98% が、相対的皮質内位置 (Z) が 20~50% の範囲に存在した。ヨタリでは、54% の標識 CST ニューロンが相対的皮質内位置 80~100%

<緒 言>

大脳新皮質の各層を構成するニューロンは層特異的な細胞形態と投射様式を示す。このような層形成を制御する分子として最初に同定されたのは、リーラーマウス（以下リーラーとする）の原因遺伝子 *reel/in* がコードする *Reelin* タンパクであった。リーラーでは、大脳新皮質の層構造が逆転するが、従来考えられていたような単純な逆転構造ではなく、より複雑な層構造異常であることを示唆するデータが蓄積してきた。例えば、正常大脳皮質の第V層を占める皮質脊髄路（以降 CST）ニューロンは、リーラー大脳皮質では単一な層を形成せず、放射状方向に広く散布する。しかし、大脳新皮質の第VI層の主要な細胞である皮質視床路（以降 CTT）ニューロンがリーラー大脳皮質内でどのような分布を示しているかについては詳細な解析がない。一方、ヨタリマウス（以下ヨタリとする）は、*Dab1* 遺伝子の突然変異による自然発症性のマウスであり、脳の多くの部位でリーラーに類似した層構築異常を示すが、従来の報告によれば、ヨタリとリーラーの表現型は、同一であるとされている。しかし詳細に両系統間の大脳皮質の組織構築を比較した研究はない。そこで本研究では、リーラーとヨタリの CST ニューロンと CTT ニューロンの分布パターンが同一であるか否かを明らかにするために、逆行性神経回路標識法により解析した。

<材料と方法>

動物

Dab1 ヘテロ動物の交配によりヨタリホモ個体を得た。先天性内反足を示す *Hammer-toe* マウスの遺伝子座がリーラー原因遺伝子座と染色体上で近位にあることをを利用して、リーラーへテロ個体と *Hammer-toe* ヘテロ個体を交配して二重ヘテロマウスを作成した。この二重ヘテロマウスを交配することにより、外奇形によりリーラーホモ個体を同腹仔より簡単に判別することができた。*reel/in* のプライマーを用いた PCR 法により動物の遺伝子背景を最終的に同定した。動物の取り扱いは「神戸大学医学部実験動物に関する指針」を遵守した。

第V層-CST・第VI層-CTT ニューロンの逆行性標識

生後 19 日齢のリーラー、ヨタリおよび正常マウスを麻酔後 HRP を両側の腰膨大に注入し、第V層-CST ニューロンを逆行性に標識した。また、同様に麻酔後 WGA-HRP を右側の腹側視床に微量注入し、第VI層-CTT ニューロンを標識した。48 時間後マウスを灌流固定し、抜脳後、連続凍結切片を作成した。切片は HRP 組織化学により標識ニューロンを可視化し、ニュートラルレッドにより対比染色した。

第V層-CST、第VI層-CTT ニューロン分布の定量的解析

標識 CST、CTT ニューロンの皮質内分布を定量的に解析した。すなわち、脳軟膜の法線

に分布したが、リーラーでは同様の相対的皮質内位置に 33% の標識 CST ニューロンが分布した。一方、ヨタリでは相対的皮質内位置 0~20% に標識 CST ニューロンないが、リーラーでは同様の皮質内位置に 26% の標識ニューロンが存在した。リーラーとヨタリの第 V 層-CST ニューロンの分布は、Student *t* 検定により有意の差を認めた。

一方、標識 CTT ニューロンは、正常マウスでは相対的皮質内位置 0~20% の範囲に 97% の標識 CTT ニューロンが分布していた。ヨタリとリーラーでは、標識 CTT ニューロンの平均分布位置がそれぞれ約 82% であり、Student *t* 検定によりその差を認めなかった。

＜考 察＞

本研究は、リーラー第 VI 層-CTT ニューロンが軟膜直下の多形細胞層に分布することを証明した。正常マウスの CTT ニューロンが皮質の最深層の VI 層に限局して分布することより、第 VI 層-CTT ニューロンの分布からみればリーラー大脳皮質は完全な逆転構造といえる。リーラーの皮質板ニューロンは、プレプレート内に入り込むことが出来ず、結果的にプレプレートの下にアウトサイド・インパターンに蓄積する。その後の生後発達期にプレプレートニューロンが細胞死を起こすために、最終的にリーラー成体脳においては、大脳皮質第 VI 層ニューロンが軟膜直下の多形細胞層の上半に分布することになると考えられる。

リーラー第 VI 層-CTT ニューロンが正常マウスのそれとは逆転した分布をしていたのと対照的に、リーラー第 V 層-CST ニューロンは皮質内に分散して分布していた。しかしながら、注目すべきことはリーラー大脳皮質の最表層である多形細胞層の上半分は標識第 V 層-CST ニューロンを含まず、しかもその部分を第 VI 層-CTT ニューロンが占めていることである。これは、リーラーの皮質第 V 層ニューロンが、既に移動を終えた皮質第 VI 層ニューロンを乗り越えることができないことを示している。Hoffarth らは、胎生 12 日目のリーラーの培養皮質ニューロンは、正常マウスの胎生 12 日目ニューロンに比べて細胞接着性が高いことを示した。胎生 12 日目に生まれる皮質ニューロンは、皮質第 VI 層ニューロンになる運命にあるので、リーラーの第 VI 層ニューロン間の強い接着性は、遅生まれの第 V 層ニューロンの通過を妨げ、その結果、第 V 層ニューロンが第 VI 層ニューロンの下方に蓄積する。興味深いことに、Hoffarth らは、リーラーの胎生 12 日目の早生まれニューロン early-born neuron が、胎生 16 日目の遅生まれニューロン late-born neuron よりも細胞接着性が高いことを示した。胎生 16 日目に誕生したニューロンは、第 V 層ニューロンになる運命にあり、それらの細胞間の弱い細胞接着性により、第 II / III 層ニューロンになる運命にある遅生まれニューロンが第 V 層ニューロンを乗り越えることができるのかもしれない。もしヨタリ V 層-ニューロンの細胞間接着性が強いとするならば、遅生まれニューロンは、V 層ニューロン間を自由に通過することができずに、それらの下層に蓄積する。その結果、ヨタリ V 層ニューロンの分布は、大脳皮質の表層 1/3 に制限されるのだろう。

ヨタリとリーラーの表現型は、同一であると考えられてきたが、青木等は脳梁交連織維系ニューロンの分布パターンが両マウスで異なることを示した。顔面神経核についても両系統間にフェノタイプの違いが認められる。本研究で示した、V 層-CST ニューロンの両マウスにおける分布の違いは、ヨタリとリーラー間の区別可能な表現型の第三の例である。Reelin とその下流で制御を受ける Dab1 は直線的な関係とみなされてきたが、Dab1 は Fyn やインテグリンと結合することより、Reelin/Dab1 シグナル伝達系は従来考えられているより複雑な系である可能性がある。

＜要 約＞

Reelin タンパクの異常による変異体であるリーラー、Dab1 タンパクの異常による変異体であるヨタリは、大脳皮質の層構築に異常を示す。それぞれのマウスの大脳皮質第 V 層、第 VI 層ニューロンの分布パターンに差異があるのかどうかを調べる目的で、第 V 層を占める CST ニューロンと、第 VI 層を占める CTT ニューロンを逆行性標識した。標識 CST ニューロンは、正常マウスでは第 V 層に分布するが、ヨタリとリーラーでは、大脳皮質の放射状（垂直）方向に広く散在していた。しかも、ヨタリに比べてリーラーの方がより深層に標識 CST ニューロンは分布していた。CTT ニューロンは、正常マウスの大脳皮質ではそのほとんどが大脳皮質第 VI 層に分布するが、リーラーとヨタリの大脳皮質では、軟膜直下の最表層に分布し、両系統間に差異を認めなかった。リーラーとヨタリの CST ニューロン、CTT ニューロンの皮質内分布を定量的に解析したところ、大脳皮質第 VI 層を占める CTT ニューロンの分布には両系統間で違いがないが、大脳皮質第 V 層を占める CST ニューロンの分布が異なることが明らかとなった。従来、リーラーとヨタリ間には大脳皮質は構造的な違いが無いとされてきたが、本研究により、初めて大脳皮質の構造が両系統で異なることが証明された。おそらく、Reelin と Dab1 は大脳皮質第 V 層ニューロンの移動や細胞接着に異なる役割を果たしているのであろう。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第 1950 号	氏名	山本達朗
論文題目			Ectopic Corticospinal Tract and Corticothalamic Tract Neurons in the Cerebral Cortex of Yotari and Reeler Mice (ヨタリとリーラーマウス大脳皮質における異所性皮質脊髄路ニューロンと皮質視床路ニューロン)
審査委員	主査 <u>司村 均</u> 副査 <u>南 康博</u> 副査 <u>郷場 篤</u>		
審査終了日	平成 17 年 5 月 30 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

大脑新皮質は、6層構造からなるが、各層を構成しているニューロンは層特異的な形態と投射様式を示す。このような層構造の形成に関与する分子の間で最初に同定されたのは、リーラーマウス（以下リーラーとする）の原因遺伝子 *reelin* がコードするリーリンタンパクであった。一方、ヨタリマウス（以下ヨタリとする）は、*Dab1* 遺伝子の突然変異による自然発症性のマウスであり、その表現型は、リーラーと同一であるとされてきた。しかし、詳細に両系統の脳の組織構築を比較した研究はないため、皮質第5層の皮質脊髄路ニューロンと皮質第6層の皮質視床路ニューロンの分布を逆行性標識法を用い解析した。

生後 19 日齢のリーラー、ヨタリ、対照マウス計 39 匹を用いた。麻酔後 HRP を両側の腰膨大に注入し、皮質脊髄路ニューロンを逆行性に標識した。また、同様に WGA-HRP を右側の腹側視床に注入し、皮質視床路ニューロンを標識した。2日後マウスを灌流固定し抜脳後、凍結ミクロトームを用い連続横断切片を作成した。切片は HRP 組織化学を施し、対比染色した。

正常マウスの標識皮質脊髄路ニューロンの大半は、大脳皮質の運動感覺野の第V層に分布していた。ヨタリやリーラーの標識皮質脊髄路ニューロンの接線方向（水平方向）の分布領域は正常マウスと変わりが無いが、放射状方向の分布に関しては、標識皮質脊髄路ニューロンが広い範囲に異所性に分布した。詳細に標識皮質脊髄路ニューロンの分布を両系統間で比較したところ、ヨタリでは、標識皮質脊髄路ニューロンが大脳皮質の表層 1/3 に分布するが、リーラーでは大脳皮質の全層に分散して分布していた。

WGA-HRP を視床の腹外側核に注入したところ、正常マウスでは、標識皮質視床路ニューロンは運動感覺野下肢領域の第VI層に分布したが、ごく少数の標識ニューロンが第V層に認められた。リーラーやヨタリでは、標識皮質視床路ニューロンの大部分は脳軟膜直下の多形細胞層に分布し、両系統の間に分布の差を認めなかった。

本来、皮質の最深層である第VI層に分布する皮質視床路ニューロンが、リーラーやヨタリでは軟膜直下の多形細胞層に分布することより、リーラーやヨタリの大脳皮質は少なくとも皮質視床路ニューロンの分布からみれば完全な逆転構造といえる。リーラーやヨタリの皮質板ニューロンは、プレプレート内に入り込むことが出来ず、結果的にプレプレートの下にアウトサイド・インパターンに蓄積する。その後の生後発達期にプレプレートニューロンが細胞死を起こすために、最終的にリーラー成体の脳においては、大脳皮質第VI層ニューロンが軟膜直下の多形細胞層に分布することになると考えられる。

このようにリーラー大脳皮質第VI層-皮質視床路ニューロンが正常マウスとは逆転した分布をしていたのと対照的に、大脳皮質第V層-皮質脊髄路ニューロンは皮質内に分散して分布していた。注目すべきことはリーラーの大脳皮質最上位層には皮質脊髄路ニューロンがほとんどなく、しかもその部分を皮質視床路ニューロンが占めていることが分かった。これは、リーラーマ

ウスの皮質第V層ニューロンが、既に移動を終えた皮質第VI層ニューロンを乗り越えることができないことを示している。

標識皮質脊髄路ニューロンは、正常マウスでは大脳皮質第V層に分布するが、ヨタリとリーラーの大脳皮質においては、放射状に広く散在しており、その分布はヨタリに比べてリーラーの方がより深層に分布していた。皮質視床路ニューロンは、正常マウスの大脳皮質ではそのほとんどが大脳皮質第VI層に分布するが、リーラーマウスとヨタリマウスの大脳皮質では、軟膜直下の最表層に分布していた。定量的解析により、リーラーとヨタリでは、大脳皮質第VI層を占める皮質視床路ニューロンの分布には違いがないが、大脳皮質第V層を占める皮質脊髄路ニューロンの分布が異なることが明らかとなつた。以上より、リーリンと Dab1 は大脳皮質第V層ニューロンの移動や細胞接着に関して異なる役割を果たしている可能性がある。

以上、本研究は、リーラーおよびヨタリの大脳皮質第5層およそ6層の投射ニューロンの分布を逆行性標識法により調べることにより、リーラーとヨタリの大脳皮質層構造異常のフェノタイプに違いがあることを初めて証明した。従来、リーラーとヨタリのフェノタイプが同一であることより、リーリンと Dab1 はリーリンシグナル伝達系において直線関係にあるとされてきたが、本研究の結果は Dab1 がリーリン以外の機能タンパクの制御を受ける可能性を形態学的に初めて示唆するものであり、リーリンシグナル伝達系の制御機構に関する価値ある集積であると認める。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。