



Cytoarchitecture and fiber pattern of the superior colliculus are disrupted in the s haking Rat Kawasaki

榊原, 俊介

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2005-06-08

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2827

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002827>

※ 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。



【 1 5 7 】

氏 名・（本 籍）	榊原 俊介	（ 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1949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 】

Cytoarchitecture and fiber pattern of the superior
colliculus are disrupted in the Shaking Rat Kawasaki
(Reelin 欠損を示す突然変異ラット Shaking Rat Kawasakiの
中脳視蓋領域における細胞構築および線維構築異常)

審 査 委 員

主 査	教 授	田原 真也
	教 授	南 康博
	教 授	饗場 篤

<緒 言>

Reelin 欠損動物である *reeler* マウスは大脳皮質や小脳皮質、海馬など層構造を特徴とする領域の細胞構築異常を示すことが知られている。網膜より強い視覚性入力を受ける上丘（視蓋）は7層の美麗な層構造をもつが、*reeler* マウスの上丘は、網膜視蓋投射の異常に伴う線維構築異常があるものの、その層構造は正常であるとされてきた。マウス上丘では *reelin* mRNA の発現がみられることより、Reelin は上丘における網膜視蓋路の経路探索や終末形成に何らかの関与をしていることが考えられる。

Shaking Rat Kawasaki (SRK ラット) は失調歩行、振戦などの運動失調を特徴とし、組織学的には大脳・小脳皮質、海馬などに細胞構築異常を認める。SRK ラットのフェノタイプは *reeler* マウスのそれに酷似しているが、最近、*reelin* 遺伝子中 62 塩基が欠損することによる Reelin のヌル発現変異個体であることが明らかとなった。

本研究では SRK ラット上丘の細胞構築および線維構築について一般染色、免疫組織化学、神経回路標識法を用いて解析を行い、(1) Reelin は上丘の層形成を制御する、(2) 網膜視蓋投射線維の走行異常は上丘の層構築異常に伴う二次的なものである、ことを明らかにした。

<方 法>

動 物

Wistar 系の Reelin 突然変異ラットである SRK ヘテロ動物は(財)実験動物中央研究所(神奈川県川崎市)より提供された。動物の取り扱いには「神戸大学医学部実験動物に関する指針」を遵守した。

ニッスル染色

生後 21 日齢の正常ラットおよび SRK ラットを灌流固定後、抜脳し 50 μ m の厚さのセロイジン切片を作成した。切片はクレシルバイオレットによりニッスル染色を行った。

抗 MBP 免疫組織化学による髄鞘染色

生後 21 日齢の正常ラット、SRK ラットを灌流固定後、抜脳し、4 μ m 厚のパラフィン切片を作成した。抗 MBP ポリクローナル抗体を用いて ABC 法により免疫組織化学を行い、MBP 陽性の有髄線維を DAB により可視化した。

視蓋脊髓ニューロンの逆行性染色

生後 18 日齢の正常ラット、SRK ラットをケタミンにより麻酔し、WGA-HRP を上部頸髄に注入した。術後 3 日の生存期間をおいた後、灌流固定後、抜脳し凍結ミクロトームを用いて 40 μ m 厚の切片を作成した。TMB を基質として peroxidase 組織化学を行い、視蓋脊髓ニューロンを逆行性標識した。

網膜視蓋路ニューロンの順行性標識

生後 19 日齢の正常ラット・SRK ラットを麻酔後、対側の網膜に 10% Cholera Toxin B subunit (CTB) を注入した。2 日の生存期間ののち、灌流固定後、抜脳し、40 μ m 厚の凍結切片を作成した。抗 CTB 抗体を用いて ABC 法により網膜視蓋路投射線維を順行性に標識した。

抗 Reelin 免疫組織化学

妊娠ラットを麻酔し、胎生期 15 日令の胎児を取り出し、顕微鏡下で灌流固定を行った。室温にて 2 時間、後固定を行った後、抜脳し、8 μ m 厚のクリオスタット切片を作成した。抗 Reelin ポリクローナル抗体を用いて免疫組織化学を行った。

<結 果>

1. 上丘の細胞構築および線維構築

Nissl 染色にて正常ラットと SRK ラットの上丘の細胞構築を比較したところ、上丘表層の細胞構築異常が認められた。正常ラットの上丘は、表層より帯層(Zo)、浅灰白層(SuG)、視神経層(Op)、中間灰白層(InG)、中間白層(InWh)、深灰白層(DpG)、深白層(DpWh)の7層構造からなる。正常ラットのZo層では細胞密度が低いが、SRK ラットでは軟膜直下に細胞が密に分布していた。その結果、SRK ラットでは上丘表層の3層(Zo, SuG, Op)の境界が不明瞭で、融合していた。その為、この融合した表層から3層の細胞層を Superficial fused layer (SuF: 表層融合層)と名づけた。一方、SRK ラット上丘深層の4層の細胞構築は正常に保たれていた。

抗 MBP 免疫組織化学法にて上丘の線維構築を観察したところ、正常ラットでは表層より2層(Zo, SuG)に於いては MBP 陽性有髄線維が疎であるのに対し、SRK ラットでは SuF 層に密に有髄線維が分布していた。また正常ラットでは Op 層に MBP 陽性有髄神経線維束が分布しており、同層より神経線維が表層に向かって上行していたが、SRK ラットでは MBP 陽性有髄神経線維束が SuF 層全体に広がって均一に分布していた。上丘深層の線維構築は正常ラットと SRK ラット間に差を認めなかった。

2. 視蓋脊髓ニューロンの逆行性標識

正常、SRK ラットともに、主に InG 層、DpG 層に大型で多極性の視蓋脊髓ニューロンが逆行性に標識された。その分布パターンや形態に両系統間で差を認めなかった。

3. 網膜視蓋路ニューロンの順行性標識

正常、SRK ラットともに順行性標識された網膜視蓋路線維は視交叉を通過し、一部は反対側の外側膝状体に終始するが、大半の標識線維は反対側の外側膝状体表面を通過し

て上丘に到達した。正常ラット、*SRK* ラットともに標識網膜視蓋投射線維は上丘の表層に限局していた。標識された線維の集積が疎な部分では単一線維レベルでの解像度が得られたため、この部を利用して詳細に標識線維の走行と終末形成を観察した。その結果、正常ラットでは網膜視蓋投射線維は Op 層内をその吻尾方向に走行し、その後 Op 層から表層に向かって直角に上昇し、SuG 層や Zo 層で終末形成を行うことが明らかとなった。一方、*SRK* ラットでは標識網膜視蓋投射線維は SuF 層内を散在性に吻尾方向に走行し、特に上行することなく SuF 層中で終末を形成していた。

4. 胎生期ラット上丘における Reelin の発現

胎生 15 日の正常ラット胚の上丘における Reelin 発現を抗 Reelin 免疫組織化学法により検索したところ、Reelin 陽性細胞は上丘の表層に位置し、その発現は吻側より尾側に向かって次第に減少していた。また下丘では Reelin の発現が見られなかった。Reelin 陽性細胞は球形ないしは卵形を呈しており、その大きさは $15\sim 20\mu\text{m}$ であった。

< 考 察 >

上丘の層構築は、視覚入力を受ける表層 (Zo, SuG, Op) と、上丘の出力層である深層 (InG, InWh, DpG, DpWh) に二大別される。本研究では、正常ラットと *SRK* ラットの層構築を詳細に比較し、*SRK* ラットの上丘表層の細胞構築は異常であることを証明した。正常ラットの Zo 層、SuG 層、Op 層に該当する表層部分が *SRK* ラットでは融合・凝集しており、これら 3 層の境界は明瞭ではないため、Superficial fused layer (SuF) と名づけた。Frost らは *reeler* マウスの上丘には細胞構築異常が無いと報告しているが、この相違はラット・マウス間の種差と見なすことも可能である。しかし、*reeler* マウス上丘の細胞構築を予備的に解析したところ、*SRK* ラットと同様の所見が得られた (投稿準備中) ことより、おそらく Reelin 欠損動物の上丘表層の細胞構築は異常であると思われる。ヒトには Reelin を欠損する家系が 2 家系ほど知られているが、上丘の層構造は不明である。

抗 MBP 免疫組織化学により *SRK* ラット上丘の髄鞘構築を調べたところ、上丘表層の線維構築が異常であることが判明した。さらに上丘に終末する網膜視蓋路線維を順行性に標識したところ、*SRK* ラットではその経路と終末形成に異常があることが明らかとなった。*SRK* ラット上丘表層の髄鞘構築異常の少なくとも一部は、網膜視蓋路投射線維の経路異常と異常終末形成により説明できる。

大脳皮質の層形成において、Reelin はプレプレートサブプレートと辺縁層に分離し、しかも皮質板内における inside-out パターンの形成に関与する。Reelin 欠損動物の大脳皮質では、プレプレートがサブプレートと辺縁層に分離せず、プレプレートの直下に皮質板ニューロンが outside-in に配列する (アンダープレート)。一方、上丘の層形成は大脳皮質のそれに比較してはるかに複雑な発生過程を持つことが知られている。すなわち、上丘の深層は大脳皮質と同様に inside-out パターンをとるが、表層は inside-out と outside-in

パターンによるサンドイッチ構造をとる。*SRK* ラットの上丘の表層のみに細胞構築異常が認められることより、上丘表層のサンドイッチ構造の形成に Reelin が関与することが示唆される。ラットの上丘は胎生 12-16 日の間に形成されるが、胎生 15 日における抗 Reelin 免疫染色を行ったところ、Reelin 陽性細胞は上丘の表層に限局し、上丘深層には陽性細胞は認められなかった。これらの所見を併せると Reelin は発生段階において上丘の表層の細胞構築形成に関与していると思われる。また Reelin 欠損動物の上丘深層の細胞構築が正常であることより、上丘深層の出力層の形成は Reelin の影響を受けないと推測される。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第1951号	氏名	榊原 俊介
論文題目	Cytoarchitecture and fiber pattern of the superior colliculus are disrupted in the Shaking Rat Kawasaki Reelin 欠損を示す突然変異ラット <i>Shaking Rat Kawasaki</i> の 中脳視蓋領域における細胞構築および線維構築異常		
審査委員	主査 田原真也 (田原真也) 副査 南 康博 (南康博) 副査 饗場 篤 (饗場篤)		
審査終了日	平成 17年 5月 18日		

(要旨は1,000字〜2,000字程度)

上丘（視蓋）は表層より帯層（Zo）、浅灰白層（SuG）、視神経層（Op）、中間灰白層（InG）、中間白層（InWh）、深灰白層（DpG）、深白層（DpWh）の7層構造からなる。*Shaking Rat Kawasaki*（SRKラット）は失調歩行、振戦などの運動失調を特徴とし、組織学的には大脳・小脳皮質、海馬などに細胞構築異常を認める。SRKラットのフェノタイプは *reelin* 欠損マウス（*reeler*）のそれに酷似しているが、実際、*reelin* 遺伝子中 62 塩基が欠損する *Reelin* のヌル発現変異個体である。本研究では SRKラット上丘の細胞構築および線維構築を明らかにするために、一般染色、免疫組織化学、神経回路標識法を用いて詳細に解析を行なった。

正常および SRKラットの上丘の細胞構築をニッスル染色により比較したところ、上丘表層の細胞構築異常が認められた。正常ラットの Zo 層では細胞密度が低い、SRKラットでは軟膜直下に細胞が密に分布していた。その結果、SRKラットでは上丘表層の 3 層（Zo、SuG、Op）の境界が不明瞭で、融合していた。その為この融合した表層から 3 層の細胞層を *Superficial fused layer*（SuF：表層融合層）と名づけた。一方、SRKラット上丘深層の 4 層の細胞構築は正常に保たれていた。つぎに正常および SRKラットの上丘の線維構築を抗 MBP 免疫組織化学法にてを顕察したところ、正常ラットでは表層より 2 層（Zo、SuG）では MBP 陽性有髄線維が疎であるのに対し、SRKラットでは SuF 層に密に有髄線維が分布していた。また正常ラットでは Op 層に MBP 陽性有髄神経線維束が分布しており、同層より神経線維が表層に向かって上行していたが、SRKラットでは MBP 陽性有髄神経線維束が SuF 層全体に広がって均一に分布していた。

正常ラット、SRKラットの上部頸髄に WGA-HRP を注入して、視蓋脊髓路ニューロンを逆行性標識したところ、上丘の深層に標識ニューロンが存在した。標識視蓋脊髓路ニューロンの分布パターンや形態は両系統間で同一であった。

正常および SRKラットの網膜にコレラ毒素を注入し、網膜視蓋路投射線維を順行性に標識したところ、正常ラット、SRKラットともに標識網膜視蓋投射線維は上丘の表層に限局していたが、正常ラットでは網膜視蓋投射線維は Op 層内を吻尾方向に走行し、その後 Op 層から表層に向かって直角に上昇し、SuG 層や Zo 層で終末形成を行うのに対して、SRKラットでは標識網膜視蓋投射線維は SuF 層内を散在性に吻尾方向に走行し、特に上行することなく SuF 層中で終末を形成していた。

胎生期 15 日今の正常ラット胎児上丘における *Reelin* の発現を調べるために、抗 *Reelin* ポリクローナル抗体を用いて免疫組織化学を行ったところ、*Reelin* 陽性細胞は上丘の表層に位置し、その発現は吻側より尾側に向かって次第に減少していた。

上丘の層構築は、視覚入力を受ける表層（Zo、SuG、Op）と、上丘の出力層である深層（InG、InWh、DpG、DpWh）に二大別される。本研究では、正常ラットと SRKラットの層構築を詳細に比較し、SRKラットの上丘表層の細胞

構築は異常であることを証明した。正常ラットの *Zo* 層、*SuG* 層、*Op* 層に該当する表層部分が *SRK* ラットでは融合・凝集しており、これら 3 層の境界は明瞭ではないため、Superficial fused layer (*SuF*) と名づけた。

抗 MBP 免疫組織化学により *SRK* ラット上丘の髄鞘構築を調べたところ、上丘表層の線維構築が異常であることが判明した。さらに上丘に終末する網膜視蓋路線維を順行性に標識したところ、*SRK* ラットではその経路と終末形成に異常があることが明らかとなった。*SRK* ラット上丘表層の髄鞘構築異常の少なくとも一部は、網膜視蓋路投射線維の経路異常と異常終末形成により説明できる。

上丘の深層は、その深層ほど早く形成されるが (inside-out パターン)、上丘の表層は inside-out と outside-in パターンによるサンドイッチ構造をとる。*SRK* ラットの上丘の表層のみに細胞構築異常が認められることより、上丘表層のサンドイッチ構造の形成に Reelin が関与することが示唆される。ラットの上丘は胎生 12-16 日の間に形成されるが、胎生 15 日における抗 Reelin 免疫染色を行ったところ、Reelin 陽性細胞は上丘の表層に限局し、上丘深層には陽性細胞は認められなかった。これらの所見を併せると Reelin は発生段階において上丘の表層の細胞構築形成に関与していると思われる。また Reelin 欠損動物の上丘の深層の細胞構築が正常であることより、上丘深層の出力層の形成は Reelin の影響を受けないと推測される。

以上、本研究は、リーリン欠損ラットである *SRK* ラットの上丘の表層の細胞層が融合していることを初めて示した。さらに網膜視蓋路線維をコレラ毒素にて順行性標識することにより、*SRK* ラットの網膜視蓋路線維の経路異常を明らかにした。本研究の知見は、リーリンが上丘表層の層形成に関与することを示すものであり、リーリンの機能に関する価値有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。