



# Reelin expressing neuron in the anterior commissure and corpus callosum of the rat

美崎, 佳寿代

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2006-02-08

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2853

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002853>

※ 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 6 5 】

氏 名・（本 籍） 美崎 佳寿代 （ 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1964号

学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当

学位授与の 日 付 平成18年2月8日

【 学位論文題目 】

Reelin expressing neuron in the anterior commissure and corpus  
callosum of the rat  
（前交連と脳梁内に分布するリーリン発現細胞）

審 査 委 員

主 査 教 授 南 康博  
教 授 岡村 均  
教 授 饗場 篤

## 【緒言】

リーラーマウスは、中枢神経系の細胞構築に異常をもつマウスで、大脳皮質、小脳皮質、海馬のように明瞭な層を形成する領域に加えて顔面神経核など層構造を示さない領域においても細胞構築異常を示し、振戦、歩行失調など小脳性運動失調を呈する。リーラーマウスの変異の原因遺伝子である *reelin* がコードする Reelin protein (以下リーリン) は、脳の発生過程で大脳皮質の第1層に存在するカハール・レチウス細胞で発現分泌され、ニューロンの移動と定位を制御している。また脳の構造が完成した成体脳においても、大脳皮質内の GABA 作動性ニューロンや嗅球の僧帽細胞、海馬等にリーリンの発現は強く維持されていることより、リーリンは胎児期における脳の形態形成に関与するだけではなく、成体期の脳内でも重要な役割を果たしていることが推測されている。

本研究では、ラットリーリンを特異的に認識する抗体を作製し、免疫組織学的に生後各時期のラット脳におけるリーリンの発現を調べることににより、成熟脳内におけるリーリンの機能を知る手がかりを得ることを目的にした。その結果、大脳皮質の GABA ニューロン、嗅球の僧帽細胞など、これまで報告されている領域での発現に加え、梨状葉皮質や外側嗅条の投射線維の周辺など、嗅覚や情動に関係の深い領域に分泌産物と考えられる発現を確認した。さらに、今回、脳梁交連線維や前交連線維内にリーリン発現細胞が多数存在することを見出した。交連線維内でのリーリン発現細胞は生後 14~21 日 (P14~P21) にかけて顕著に観察され、脳梁内にあるものと前交連内にあるものではその形態に違いが見られた。また、交連線維内のリーリン発現細胞も、GABA 陽性の神経細胞であることがわかった。

## 【方法】

### ＜動物＞

実験に使用した *Shaking Rat Kawasaki* (SRK) ホモ接合体および野生型ラットは、(財) 実験動物中央研究所 (川崎市) から供与された Wistar 系突然変異ラット SRK のヘテロ接合体同士を交配することにより得た。動物の取り扱い扱いは「神戸大学医学部実験動物に関する指針」を遵守した。

### ＜抗体の作製＞

ラットリーリンのアミノ酸 108~244 番目をコードする cDNA 領域を pQE ベクターにサブクローニングし、大腸菌を用いて発現精製したものを抗原として用いた。この抗原をウサギに頻回免疫することにより抗体を得た。

### ＜抗体の検定＞

イムノブロット法で調べた。野生型 Wistar ラット脳の抽出液を試料として

用いた。コントロールとして、リーリン欠損ラットである SRK の脳抽出液を用いた。脳抽出液は以下の手順で調整した。ネブタール (30 mg/kg) を腹腔内に投与して実験動物を深麻酔し、左心室から生理的食塩水を還流することにより脱血をした。その後すばやく脳を取り出し、抽出緩衝液中でブレンダーでホモジナイズを用いて脳を破碎した。抽出緩衝液にタンパク質分解酵素阻害剤を添加し、抽出の作業はすべて氷上で行った。得られた脳破碎液は遠心操作により分離し、その上清を試料として使用した。

### ＜免疫組織化学＞

胎生 18 日 (E18)、生後 0 日 (P0)、P7、P14、P21 の Wistar ラットを使用した。ネガティブコントロールとして同齢の SRK ラットの脳およびリーラーマウス脳を使用した。動物は、麻酔後、還流固定したのち抜脳した。P14、P21 齢の脳は、凍結マイクロトームにより 40  $\mu$ m の凍結切片を作製した。P0、P7 齢の脳からは 10  $\mu$ m のクリオスタット切片を作製した。抗体染色には 1 次抗体としてラットリーリンポリクローナル抗体、または NeuN、anti-oligodendrocytes、GFAP、GAD67 等の抗体を使用し、2 次抗体に HRP 標識抗体、蛍光標識抗体を使用した。蛍光標識抗体で染色したサンプルは、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察を行った。

## 【結果】

### 1. 抗体の特異性

今回作製した抗リーリン抗体 ( $\alpha$ reln) の特異性を調べるため、ラット脳の抽出液を用いたイムノブロットング法、および脳の切片を用いた免疫組織化学法により抗体の検定を行った。 $\alpha$ reln を用いたイムノブロットング法により、野生型ラット脳の内因性リーリンの分子量に一致したバンドパターンが得られた。またリーリンを欠損する SRK ラットおよびリーラーマウス脳の抽出液を用いた場合、シグナルが得られなかった。その結果、 $\alpha$ reln は、生体内のリーリンを特異的に認識することを確認した。この  $\alpha$ reln 抗体を用いて胎生 18 日 (E18) ラットの脳の大脳皮質の免疫組織化学を行ったところ、第1層のカハール・レチウスニューロンが強い免疫陽性を示した。さらに P7 ラット嗅球の僧帽細胞と傍系球体細胞が強い  $\alpha$ reln 免疫活性を示した。一方、リーリン欠損ラットではこのような発現パターンは認められなかった。以上より、今回作成した  $\alpha$ reln 抗体は内因性リーリンを特異的に認識することが明らかとなった。

### 2. 免疫染色と脳梁交連線維内での分布様式

抗リーリン抗体 ( $\alpha$ reln) を用いて成体ラット脳内におけるリーリンの発現分布を調べたところ、既に報告があるように大脳皮質の第1~6層、梨状

葉皮質、海馬などにリーリン陽性細胞が分布していた。これ以外の領域では、脳梁、前交連内にリーリン発現細胞が多数分布していることがわかった。脳の前額断、矢状断、水平断切片を用いて交連線維内におけるリーリン陽性細胞の分布を詳細に調べたところ、前交連内では前部、後部共に広く散在していた。脳梁交連線維内におけるリーリン発現細胞は紡錘型を示し、細胞の両端から出る突起を有していた。その細胞質突起や細胞体は、脳梁交連線維に沿って伸長し、あたかも移動中のニューロンを思わせるものであった。一方前交連内に存在する細胞は、卵形、あるいは円形の細胞体をしており、長い突起を四方に伸ばしていた。突起の分岐部に一致して、多数の膨瘤部があり、一見するとニューロンよりむしろオリゴデンドロサイトを思わせる形態を示していた。

### 3. 二重蛍光免疫組織化学

脳梁交連線維内に存在するリーリン発現細胞が様々な形態を示したことから、これらの細胞の性質を明らかにする目的で、ニューロン、オリゴデンドロサイト、アストロサイトのマーカーとしてそれぞれ NeuN、anti-oligodendrocytes、GFAP 抗体と抗リーリン抗体との二重標識法により、その性質を調べた。その結果、リーリン発現細胞は NeuN 陽性、anti-oligodendrocytes 陰性、GFAP 陰性であることよりニューロンであることが判明した。さらに GABA の生成酵素である GAD の抗体 (GAD67 抗体) を用いて、二重蛍光免疫組織化学を行った結果、 $\alpha$ reln 陽性細胞は GABA 陽性細胞であることがわかった。以上より、交連線維系中のリーリン発現細胞は GABA 作動性ニューロンであると結論された。

#### 【考察】

成体脳におけるリーリンの機能に関する手がかりを得るために、免疫組織化学手法を用いて脳内の発現分布に関して詳細に調べた。その結果、脳梁交連線維や前交連線維内にリーリンを発現する細胞が存在することを見出した。脳梁交連線維内での発現細胞の数は少なく、その形態は紡錘形で、移動中の細胞を示唆した。一方、前交連内の発現細胞の細胞体は、円形あるいは卵形をしており、多数の細胞質突起を四方に広げていた。この細胞質突起の分岐部に一致して多数の膨瘤部が認められた。またリーリン陽性細胞は前交連内の前部、後部共に分布し、前交連内に特に局在する傾向は認められなかった。このような形態上の多様性があるために、ニューロン、オリゴデンドロサイト、アストロサイトの細胞マーカー NeuN、anti-oligodendrocytes、GFAP 抗体を用いてリーリン陽性細胞の細胞種を同定した。その結果、交連線維内に存在するリーリン発現細胞は、NeuN を発現し、anti-oligodendrocytes、GFAP を発現しないことより、ニューロンであることが判明した。さらに前交連内

におけるリーリン陽性細胞は GABA 陽性を示すことより、リーリン発現ニューロンは交連線維内で何らかの神経情報の伝達に関与していることが推測される。

Larriva-Sahd et al. (2002) は、前交連内に奇妙な形態を呈した細胞があることを発見し、これを interfascicular neuron と命名した。この奇妙なニューロンは、樹状突起上に顕著な膨隆を豊富にもち、交連線維と密接な結合を有している。この細胞がニューロンであることは後に電気生理学的にも証明された。今回、学位申請者が発見した前交連線維内におけるリーリン陽性ニューロンはその形態から interfascicular neuron に極めて類似している。

今回、脳梁交連線維内でリーリン発現細胞が存在することを見出したが、リーリンを欠くリーラマウスでは脳梁交連線維系において明瞭な構造の異常は認められない (Aoki et al., 2002)。このことは、トレーサー実験で検出できないような軽微な異常がある可能性は否定できないものの、脳の発生がある程度進んだ時期から交連線維内にリーリン発現細胞が顕著に現れることを考えると、この細胞が発現するリーリンは細胞の移動や神経回路形成には関与しないことが予測される。

最近、統合失調症患者脳ではリーリンと GAD67 の発現が減少することが報告された (Dong et al., 2005)。また従来統合失調症患者の脳梁交連線維系は形態的に異常を示す報告が数多くある (Diwadkar et al., 2004; Brambilla et al., 2005)。今回、報告した交連線維系内におけるリーリン発現ニューロンが、統合失調症とどのような関連があるか興味を持たれる。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第 1967 号	氏名	美崎佳寿代
論文題目 Title of Dissertation	<p>Reelin expressing neuron in the anterior commissure and corpus callosum of the rat</p> <p>(前交連と脳梁内に分布するリーリン発現細胞)</p>		
審査委員 Examiner	<p>主 査 南 康博 Chief Examiner Yasuhiro Minami</p> <p>副 査 岡 田 均 Vice-examiner Hitoshi Okamura</p> <p>副 査 櫻 場 篤 Vice-examiner Atsu Aiba</p>		
審査終了日	平成 18 年 1 月 18 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

リーラーマウスや Shaking Rat Kawasaki (SRK) は、中枢神経系の細胞構築に異常をもつ常染色体劣性遺伝性のミュータントで、大脳皮質、小脳皮質、海馬のように明瞭な層を形成する領域に加えて顔面神経核など層構造を示さない領域においても細胞構築異常を示し、振戦、歩行失調など小脳性運動失調を呈する。リーラーマウスや SRK ラットの変異の原因遺伝子である *reelin* がコードする Reelin protein (以下リーリン) は、脳の発生過程で大脳皮質の第1層にのカハール・レチウス細胞で発現分泌され、ニューロンの移動と定位を制御している。また脳の構造が完成した成体期脳においても、大脳皮質内の GABA 作動性ニューロンや嗅球の僧帽細胞、海馬等にリーリンの発現は強く維持されていることより、リーリンは胎児期における脳の形態形成に関与するだけではなく、成体期の脳内でも重要な役割を果たしていることが推測されている。本研究では、ラット・リーリンを特異的に認識する抗体を作製し、免疫組織学的に生後各時期のラット脳におけるリーリンの発現を調べることににより、成熟脳内におけるリーリンの機能を知る手がかりを得ることを目的にした。

ラットリーリンのアミノ酸 108～244 番目をコードする cDNA 領域を pQE ベクターにサブクローニングし、大腸菌を用いて発現精製したものを抗原として用いた。この抗原をウサギに頻回免疫することにより抗体を得た。

胎生 18 日 (E18)、生後 0 日 (P0)、P7、P14、P21 の Wistar ラットを使用した。ネガティブコントロールとして同様の SRK ラットの脳およびリーラーマウス脳を使用した。動物は、麻酔後、還流固定したのち抜脳した。P14、P21 歳の脳は、凍結ミクロトームにより 40  $\mu$ m の凍結切片を作製した。P0、P7 歳の脳からは 10  $\mu$ m のクリオスタット切片を作製した。抗体染色には 1 次抗体としてラットリーリンポリクローナル抗体、または NeuN、O4、GFAP、GAD67 等の抗体を使用し、2 次抗体に HRP 標識抗体、蛍光標識抗体を使用した。蛍光標識抗体で染色したサンプルは、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察を行った。

今回作成した抗リーリン抗体 ( $\alpha$ reln) を用いて成体ラット脳内におけるリーリンの発現分布を調べたところ、既に報告があるように大脳皮質の第1～6層、梨状葉皮質、海馬などにリーリン陽性細胞が分布していた。これ以外の領域では、脳梁、前交連内にリーリン発現細胞が多数分布していることがわかった。脳の前額断、矢状断、水平断切片を用いて交連線維内におけるリーリン陽性細胞の分布を詳細に調べたところ、前交連内では前部、後部共に広く散在していた。脳梁交連線維内におけるリーリン発現細胞は紡錘型を示し、細胞の両端から出る突起を有していた。その細胞質突起や細胞体は、脳梁交連線維に沿って伸長し、あたかも移動中のニューロンを思わせるものであった。一方前交連内に存在する細胞は、卵形、あるいは円形の細胞体をしており、長い突起を四方に伸ばしていた。突起の分岐部に一致して、多数の膨瘤部があり、一見するとニューロンよりむしろオリゴデンドロサイトを思わせる形態を示していた。

脳梁交連線維内に存在するリーリン発現細胞が様々な形態を示したことから、これらの細胞の性質を明らかにする目的で、ニューロン、オリゴデンドロ

サイト、アストロサイトのマーカーとしてそれぞれ NeuN、Antioligodendocyte、GFAP 抗体と抗リーリン抗体との二重標識法により、その性質を調べた。その結果、リーリン発現細胞は NeuN 陽性、Antioligodendrocyte 陰性、GFAP 陰性であることよりニューロンであることが判明した。さらに GABA の生成酵素である GAD の抗体 (GAD67 抗体) を用いて、二重蛍光免疫組織化学を行った結果、 $\alpha$ reln 陽性細胞は GABA 陽性細胞であることがわかった。

以上、本研究は、成体脳におけるリーリンの機能に関する手がかりを得るために、免疫組織化学手法を用いて脳内の発現分布に関して詳細に調べ、脳梁および前交連中にリーリン発現細胞があることを発見し、さらにリーリン発現細胞が GABA 作動性ニューロンであることを明らかにした。本研究の結果は成体期における交連線維系の機能維持にリーリンが関与する可能性を形態学的に初めて示唆するものであり、リーリングナル伝達系の機能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。