



Roles of Cdc42 and Rac in Bergmann glia during cerebellar corticogenesis

Sakamoto, Isao

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2018-07-18

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙第3350号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2003350>

※ 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。

(論文博士関係)

学位論文の内容要旨

Roles of Cdc42 and Rac in Bergmann glia during cerebellar corticogenesis

小脳皮質形成時のバーグマングリアにおける Cdc42 および Rac の機能

(指導教員：神戸大学大学院医学研究科医科学専攻 斎藤 尚亮教授)

坂 本 熱 勇

【序論】

アストロサイトは、脳組織の構築と機能維持に重要な働きを担っており、血液脳関門の形成、神経細胞へのエネルギー代謝物の供給等にも関与する。また、小脳特異的アストロサイトであるバーグマングリアは、小脳の皮質形成においても重要な役割を果たす。小脳皮質は 3 層構造からなり、表層から深層へ向けて分子層、ブルキンエ細胞層、内顆粒層を形成する。バーグマングリアは、神経幹細胞である放射状グリア由来のグリア細胞であり、胎生 15 日から生後 7 日にかけて小脳表層へ向けて移動する。その細胞体はブルキンエ細胞層内でブルキンエ細胞に隣接して一列に並び、数本の放射状突起を樹状に分子層へと伸ばし小脳表層に終わるが、この放射状突起が内顆粒層の形成に深く関与することが報告されている。マウスにおいては、顆粒層を形成する小脳顆粒細胞は、出生前に小脳原基である外顆粒層を形成し、外顆粒層で増殖を繰り返した後の最終分化後に、内顆粒層の形成のために深層へ向け垂直移動（放射移動：radial migration）する。この放射移動は、マウスでは生後間もなくから始まり、生後 7-12 日頃をピークに生後 20 日まで継続し、内顆粒層の完成と共に外顆粒層は消失し、小脳の基本構造が完成する。バーグマングリアは、この小脳顆粒細胞の外顆粒層から内顆粒層への放射移動に関与することが報告されているが、その詳細には不明な点が多く残されている。

Cdc42 と Rac (Rac1, Rac2, Rac3) は、Rho ファミリー低分子 G タンパク質に属し、アクチン骨格系制御や神経細胞の極性形成など、広範囲にわたる神経細胞内プロセスにおいて重要な役割を担う。当研究ではこれまでに、小脳顆粒細胞特異的に Rac1 と Rac3 がダブルノックアウト (Rac1/Rac3-DKO) されるマウスを作製し、そのマウスが小脳形成初期段階において小脳顆粒細胞の最終分化やその直後の放射移動の顕著な障害により、特に正中部の内顆粒層欠損を呈することを確認し、Rac が小脳顆粒細胞の分化と放射移動に不可欠な役割を果たすことを報告した。

本研究では、小脳皮質形成におけるバーグマングリアの働きに着目し、バーグマングリアにおける Cdc42 と Rac の機能を、個体レベルで解明することを試みた。

【結果】

GFAP-Cre プロモーターマウスと Cdc42^{fl/fl}、Rac1^{fl/fl} コンディショナルマウスを交配することにより、アストロサイト特異的に Cdc42、Rac1、およびその両者を欠損するノックアウトマウスとして、Cdc42-ノックアウト (Cdc42-KO) マウス、Rac1-KO マウス、Cdc42/Rac1-ダブルノックアウト (Cdc42/Rac1-DKO) マウスを作製した。

まず、運動機能を指標にその表現型を確認したが、各 KO マウスに異常は認めなかった。

次に、各 KO マウスの小脳を組織形態学的に観察するため、作製した小脳切片を Nissl 染色した。コントロールと Rac1-KO マウスでは、小脳皮質の層構造に差異はなかったが、Cdc42-KO では分子層下層に Nissl 染色陽性細胞の異常蓄積とブルキンエ細胞の軽度配列異常が確認された。さらに、Cdc42/Rac1-DKO では、これらの異常の顕著化が観察された。

続いて、上記の分子層下層に異常蓄積する Nissl 染色陽性細胞の細胞種特定のため及び各種 KO マウスで観察される異常の詳細を調べるために、各種マーカーを用いて免疫染色を行った。成熟顆粒細胞のマーカーである抗 NeuN 抗体による免疫染色では、Cdc42-KO と Cdc42/Rac1-DKO の分子層下層に認められる異常蓄積細胞は NeuN 陽性の顆粒細胞であることが確認された。Rac1、Cdc42 の KO のマーカーとして抗 Cre 抗体で免疫染色を行うと、Rac1-KO、Cdc42-KO バーグマングリアでは、ブルキンエ細胞層での配列に乱れが観察された。また、ブルキンエ細胞のマーカーである抗 PKC- γ 抗体では、Cdc42-KO でブルキンエ細胞の配列に軽度の乱れが確認されたが、Rac1-KO では認められなかった。Cdc42-KO で観察された小脳顆粒細胞とバーグマングリアの異常分布は、Cdc42/Rac1-DKO で著しく悪化した。さらに、バーグマングリアの放射状突起を認識する抗 GFAP 抗体を用いた免疫染色において、コントロール小脳では観察される分子層と内顆粒層の境界が、Cdc42/Rac1-DKO では不鮮明であった。

分子層下層における小脳顆粒細胞の異常蓄積の発現時期を確認するため、生後 3 日から生後 21 日までの小脳切片を Nissl 染色し、組織学的検討を行った。コントロール小脳では、外顆粒層に存在する顆粒細胞が徐々に深層に放射移動し、生後 21 日目には、小脳皮質の 3 層構造が完成するが、Cdc42-KO、Cdc42/Rac1-DKO では、生後 5 日目から分子層に多くの顆粒細胞の停留が確認され始め、生後 21 日目においても同様の停留が持続していた。

以上の結果から、分子層下層の顆粒細胞の異常蓄積は、小脳形成段階での顆粒細胞の放射移動障害により生じた停留によることが判明した。

加えて、小脳顆粒細胞の分子層下層における停滞メカニズムを調べるために、バーグマングリアの放射状突起に着目し、GFAP 抗体と Cre 抗体で蛍光免疫染色した後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて 2D 立体画像を構築し、放射状突起をより詳細に観察した。Rac1-KO、Cdc42-KO および Cdc42/Rac1-DKO では、ブルキンエ細胞層に位置するバーグマングリアの配列異常（乱れ）が確認されると共に、斜走する放射状突起が観察された。また、Cdc42/Rac1-DKO では、放射状突起の斜走がより顕著となり、その肥厚や小脳表面への到達・接着の減弱が観察された。

これらの結果より、Cdc42 と Rac1 が KO されると、1) バーグマングリアのブルキンエ細胞層での配列の乱れ、2) バーグマングリアの放射状突起の櫛状配列の乱れ及び小脳表面への到達・接着低下が生じる結果、小脳顆粒細胞の分子層下層における放射移動が障害されることが示唆された。

【考察】

小脳顆粒細胞の放射移動には、バーグマングリアの放射状突起依存的な移動（gliophilic migration）と顆粒細胞の樹状突起依存的な移動（neurophilic migration）の両者が必要であると報告されている。実際に、gliophilic migration においては、バーグマングリアの放射状突起と分子層下層を下行移動する小脳顆粒細胞の接触が電子顕微鏡で観察されている。また、

neurophilic migration では、外顆粒層に存在する小脳顆粒細胞が小脳深部へ向けて樹状突起を伸ばし、これに先導された放射移動により内顆粒層を形成することが報告されている。当研究グループは、これまでに、小脳顆粒細胞特異的 Rac1/Rac3-DKO マウスを用いて、小脳正中部の内顆粒層形成には Rac 依存的な neurophilic migration が必須であることを明らかにしている。

今回の研究で、バーグマングリア特異的 Cdc42-KO マウスでは、分子層下層での顆粒細胞の放射移動障害が観察され、その異常が Cdc42/Rac1-DKO で著しく増強された。これらの結果より、1) バーグマングリア内の Cdc42 と Rac は、相乗的に gliophilic migration に関与することで小脳顆粒細胞の後期の放射移動に重要な役割を果たすこと、2) Rac は neurophilic migration に不可欠な役割を果たし、小脳顆粒細胞の早期の放射移動に関与することが明らかとなった。

なお、本研究では、Cdc42/Rac1-DKO において、バーグマングリアの斜走や肥厚する放射状突起が確認されており、Cdc42 と Rac1 がバーグマングリアの適切な形態形成に必要であることも示唆された。受容体型チロシンキナーゼである ErbB ファミリーや FGFR ファミリー、ErbB ファミリーに結合するリガンドである neuregulin ファミリー、神経細胞等の分化過程の細胞間情報伝達に関与する Notch ファミリーなどの様々な分子種が、小脳皮質形成過程におけるバーグマングリアの分化・成熟と小脳顆粒細胞の相互作用に重要な役割を担っていることが報告されている。これらの作用における Cdc42 と Rac1 の関与を分子レベルで検証するため、CDC42/RAC1-DKD U87 アストロサイト細胞を用いて DNA マイクロアレイを行ったところ、neuregulin 1 の発現量が大幅に低下し、ErbB4、neuregulin 3、Notch 3 の発現量が著しく増加することを発見した。また、初代培養アストロサイトでの neuregulin 1 と Notch 3 の mRNA の高発現、小脳形成過程にある生後 10 日目のマウスのバーグマングリア内での neuregulin 1 と Notch 3 の発現を免疫染色により確認した。小脳顆粒細胞膜上の neuregulin 1 は、バーグマングリアに発現した ErbB4 受容体と結合することにより、バーグマングリアの分化や顆粒細胞の放射移動を促進することが報告されているが、上記の結果は、neuregulin 1 を発現するバーグマングリアと ErbB を発現する顆粒細胞との結合を介した逆方向の新たなシグナル経路の存在を示唆するものであった。

本研究では、バーグマングリアでの Cdc42/Rac1-DKO による小脳顆粒細胞の放射移動異常の分子メカニズムの詳細解明までには至らなかったが、今後、バーグマングリアが発現する neuregulin 1 や Notch 3 を介した小脳顆粒細胞の放射移動メカニズムの解明が期待される。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第 2166 号	氏名	坂本 純勇
論文題目 Title of Dissertation	Roles of Cdc42 and Rac in Bergmann glia during cerebellar corticogenesis 小脳皮質形成時のバーグマングリアにおける Cdc42 および Rac の機能		
審査委員 Examiner	主査 伊藤 俊樹 Chief Examiner 副査 久保 亮 Vice-examiner 副査 平島 正則 Vice-examiner		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

【序論】

アストロサイトは、脳組織の構築と機能維持に重要な働きを担っており、血液脳閂門の形成、神経細胞へのエネルギー代謝物の供給等にも関与する。また、小脳特異的アストロサイトであるバーグマングリアは、小脳の皮質形成において重要な役割を果たす。小脳皮質は3層構造からなり、表層から深層へ向けて分子層、プルキンエ細胞層、内顆粒層を形成する。バーグマングリアは、神経幹細胞である放射状グリア由来のグリア細胞であり、胎生15日から生後7日にかけて小脳表層へ向けて移動する。その細胞体はプルキンエ細胞層内でプルキンエ細胞に隣接して不規則に並び、数本の放射状突起を櫛状に分子層へと伸ばし小脳表層に終わるが、この放射状突起が内顆粒層の形成に深く関与することが報告されている。マウスにおいては、顆粒層を形成する小脳顆粒細胞は、出生前に小脳原基である外顆粒層を形成し、外顆粒層で増殖を繰り返した後の最終分化後に、内顆粒層の形成のために深層へ向け垂直移動(放射移動: radial migration)する。この放射移動は、マウスでは生後間もなくから始まり、生後7-12日頃をピークに生後20日まで継続し、内顆粒層の完成と共に外顆粒層は消失し、小脳の基本構造が完成する。バーグマングリアは、この小脳顆粒細胞の外顆粒層から内顆粒層への放射移動に関与することが報告されているが、その詳細には不明な点が多く残されている。

Cdc42 と Rac (Rac1, Rac2, Rac3) は、Rho ファミリー低分子 G タンパク質に属し、アクチン骨格系制御や神経細胞の極性形成など、広範囲にわたる神経細胞内プロセスにおいて重要な役割を担う。

本研究では、小脳皮質形成におけるバーグマングリアの働きに着目し、バーグマングリアにおける Cdc42 と Rac の機能を、個体レベルで解明することを試みた。

【結果】

GFAP-Cre プロモーターマウスと Cdc42^{lox}、Rac1^{lox} コンディショナルマウスを交配することにより、アストロサイト特異的に Cdc42、Rac1、およびその両者を欠損するノックアウトマウスとして、Cdc42-ノックアウト (Cdc42-KO) マウス、Rac1-KO マウス、Cdc42/Rac1-ダブルノックアウト (Cdc42/Rac1-DKO) マウスを作製した。

次に、各 KO マウスの小脳を組織形態学的に観察するため、作製した小脳切片を Nissl 染色した。コントロールと Rac1-KO マウスでは、小脳皮質の層構造に差異はなかったが、Cdc42-KO では分子層下層に Nissl 染色陽性細胞の異常蓄積とプルキンエ細胞の軽度配列異常が確認された。さらに、Cdc42/Rac1-DKO では、これらの異常の顕著化が観察された。

続いて、上記の分子層下層に異常蓄積する Nissl 染色陽性細胞の細胞種特定と各種 KO マウスで観察される異常の詳細を調べるため、各種マーカーを用いて免疫染色を行った。成熟顆粒細胞のマーカーである抗 NeuN 抗体による免疫染色では、Cdc42-KO と Cdc42/Rac1-DKO の分子層下層に認められる異常蓄積細胞は NeuN 陽性の顆粒細胞であることが確認された。さらに、バーグマングリアの放射状突起を認識する抗 GFAP 抗体を用いた免疫染色において、コントロール小脳では観察される分子層と内顆粒層の境界が、Cdc42/Rac1-DKO では不鮮明であった。

分子層下層における小脳顆粒細胞の異常蓄積の発現時期を確認するため、生後3日から生後21

日までの小脳切片を Nissl 染色し、組織学的検討を行った。コントロール小脳では、外顆粒層に存在する顆粒細胞が徐々に深層に放射移動し、生後 21 日目には、小脳皮質の 3 層構造が完成するが、Cdc42-KO、Cdc42/Rac1-DKO では、生後 21 日目においても同様の停留が持続していた。

以上の結果から、分子層下層の顆粒細胞の異常蓄積は、小脳形成段階での顆粒細胞の放射移動障害により生じた停留によることが判明した。

加えて、小脳顆粒細胞の分子層下層における停滞メカニズムを調べるために、バーグマングリアの放射状突起に着目し、GFAP 抗体と Cre 抗体で蛍光免疫染色した後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて 2D 立体画像を構築し、放射状突起をより詳細に観察した。Rac1-KO、Cdc42-KO および Cdc42/Rac1-DKO では、プルキンエ細胞層に位置するバーグマングリアの配列異常（乱れ）が確認されると共に、斜走する放射状突起が観察された。また、Cdc42/Rac1-DKO では、放射状突起の斜走がより顕著となり、その肥厚や小脳表面への到達・接着の減弱が観察された。

【考察】

小脳顆粒細胞の放射移動には、バーグマングリアの放射状突起依存的な移動 (gliophilic migration) と顆粒細胞の樹状突起依存的な移動 (neurophilic migration) の両者が必要であると報告されている。

今回の研究で、バーグマングリア特異的 Cdc42-KO マウスでは、分子層下層での顆粒細胞の放射移動障害が観察され、その異常が Cdc42/Rac-DKO で著しく増強された。これらの結果より、バーグマングリア内の Cdc42 と Rac は、相乗的に gliophilic migration に関与することで小脳顆粒細胞の後期の放射移動に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

なお、本研究では、Cdc42 と Rac1 の下流で働く分子の同定を試みた。CDC42/RAC1-DKD U87 アストロサイト細胞を用いて DNA マイクロアレイを行ったところ、neuregulin 1 の発現量が大幅に低下することを発見した。また、初代培養アストロサイトでの neuregulin 1 の mRNA の高発現、小脳形成過程にある生後 10 日目のマウスのバーグマングリア内での neuregulin 1 の発現を免疫染色により確認した。小脳顆粒細胞膜上の neuregulin 1 は、バーグマングリアに発現した ErbB4 受容体と結合することにより、バーグマングリアの分化や顆粒細胞の放射移動を促進することが報告されているが、上記の結果は、neuregulin 1 を発現するバーグマングリアと ErbB を発現する顆粒細胞との結合を介した逆方向の新たなシグナル経路の存在を示唆するものであった。

今後、バーグマングリアが発現する neuregulin 1 を介した小脳顆粒細胞の放射移動メカニズムの解明が期待される。

本研究は、マウス小脳顆粒細胞の放射移動における、バーグマングリア細胞の放射状突起の役割を研究したものであるが、従来ほとんど理解が進んでいなかった当該アストロサイトに発現する低分子量 G タンパク質 Cdc42 および Rac1 の関与について、重要な知見を得たものとして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。