

[課程-2]

審査の結果の要旨

氏名 脇元 麻有

本研究は、高次脳機能の基盤と考えられる大脳新皮質内の局所神経回路の形成メカニズムについてより深い理解を得るために、げっ歯類のバレル野において皮質 2/3 層錐体細胞の軸索構築（4 層バレルネット）の形成メカニズムを解析したものである。過去の古典的カドヘリンの発現分布や同種親和性を持つという報告から、本研究ではバレルネットの形成に古典的カドヘリンが必要である、という仮説を立て、下記の結果を得ている。

1. 子宮内電気穿孔法を用いることで 2/3 層神経細胞選択的に可視化および遺伝子操作が行なえるという利点を活かし、2/3 層神経細胞選択的に優性不能型カドヘリンを発現させて、カドヘリンの機能を抑制した際のバレルネット形成について検討した。子宮内電気穿孔法を用いて胎生期から優性不能型カドヘリンを発現させると、神経細胞移動に異常が起こることから、本研究では 4-hydroxytamoxifen (4-OHT) 投与によって時期依存的に遺伝子組み換えを起こすことができる、ERT2Cre/loxP システムを用いた。4-OHT 投与開始時期および回数を検討して、バレルネット形成前、かつ神経細胞移動の異常が起こらない投与方法を確立した。この方法を用いて 2/3 層神経細胞に優性不能型カドヘリンを発現すると、バレルなどの神経回路構築の形成には変化がないのに対して、バレルネット選択的に形成が抑制されることが明らかになった。また、本来バレルネット軸索が形成されるはずの 4 層セプタという領域で 2/3 層神経細胞の軸索量が減ることが、共焦点顕微鏡を用いて強拡大した観察結果から明らかになった。
2. バレルネット形成が抑制された際、優性不能型カドヘリンが個々の 2/3 層神経細胞やその軸索においてどのような影響を及ぼしているか検討した。具体的には、優性不能型カドヘリンを発現した際の (1) 2/3 層神経細胞の細胞数、(2) 2/3 層神経細胞由来軸索の伸長や分岐形成、(3) 2/3 層神経細胞の細胞運命、の 3 点の変化について、子宮内電気穿孔法とあわせて初代分散培養や組織切

片の抗体染色を用いて比較検討した。その結果、上記 3 つのどの点においても対照個体と優性不能型カドヘリン発現個体で有意な差は認められなかった。このことから、その他の点、例えば軸索の空間的な分布を決めるのにカドヘリンが関わっている可能性が示唆された。

3. バレルネット形成が抑制された際の、バレル野局所回路への影響を評価した。具体的には、2/3 層神経細胞に蛍光タンパク結合型シナプトフィジンをプレシナプスマーカーとして共発現させ、優性不能型カドヘリンを発現させた際にバレルネット上のプレシナプス構造の数に変化があるか検討した。その結果、バレルネット上のプレシナプスマーカーの数は減少しているように観察された。このことから、バレルネット形成の抑制がバレル野の回路機能に影響を与えている可能性が示唆された。一方で、強拡大して観察し軸索単位長さあたりのプレシナプスマーカーの密度を測ると、対照個体と優性不能型カドヘリン発現個体で有意な差はなかった。このことから、バレルネット上のプレシナプスマーカーの減少は、個々の軸索上のプレシナプス構造密度の減少によるのではなく、バレルネット軸索の減少によることが示唆された。
4. カドヘリンがバレルネットの形成過程のみならず維持過程にも関わるのか検討した。具体的には、優性不能型カドヘリンを発現させるタイミングをバレルネット形成が終了した後から発現させることで検討した。その結果、カドヘリンはバレルネットの維持過程には必要ではなく、形成過程に必要であることが明らかになった。

以上、本論文は子宮内電気穿孔法の利点を活かして大脳新皮質 2/3 層神経細胞選択的にカドヘリンの機能を抑制した結果、それまで報告されていなかった、大脳新皮質内の局所神経回路における古典的カドヘリンの役割を明らかにした。本研究は大脳新皮質内の神経回路の形成過程の理解に寄与すると考えられ、学位の授与に値するものであると考えられる。