

持ち、先天性水頭症の発症頻度も低いいため、Msi2単独での水頭症への関与は薄いことが分かった。

(5) *msi1*遺伝子単独欠損マウスにみられる閉塞性水頭症の原因の一つは、ポリープ様の構造物の発生による中脳水道の閉塞である。*msi1*および*msi2*遺伝子の二重欠損マウスは、*msi1*遺伝子単独欠損マウスに比べて高頻度でかつより大きなポリープ様構造物が発生する。髄液の灌流障害がより重症化することが予想されるが、水頭症発症前に生後数時間で死亡する。このポリープ様の構造物は、Nestinなどの未分化マーカー陰性であり、PCNAやBrdUの細胞分裂マーカー弱陽性であるが、分化した神経のマーカーであるHuやTuJ1によって強く染色されるため、神経細胞へ高度に分化した無秩序な細胞塊と考えられる。

D. 考察

*msi1*遺伝子欠損マウスの先天性水頭症発症機序は、中脳水道付近の細胞増殖制御異常によるものであると考えられる。これは、mNumbなどの標的mRNAの転写後に翻訳を抑制するというMsi1の機能が失われることに起因すると考えられる。つまり、Notchシグナルを負に制御する因子群の抑制力が増強されると、結果的にNotchシグナルが低下して神経幹細胞の未分化性が維持できなくなり、分化が予定以上に早期に進行してしまうことで、中脳水道付近にポリープ様構造物が形成されるのだと考えている。このポリープ様構造物が、増殖の亢進によるものではなく、未分化性を喪失して分化が亢進した神経細胞の特徴を有していることは、染色の結果からも明らかである。また、*msi1*および*msi2*遺伝子の二重欠損マウスがより重度に中脳水道が閉塞する所見を呈することから、きわめて類似した構造を持つMsi1とMsi2は、類似の標的遺伝子に対して協調的に働いていることが考えられる。

E. 結論

先天性の閉塞性水頭症を発症する*msi1*遺伝子欠損マウスの解析から、*msi1*は重症先天性水頭症の原因遺伝子の一つであることが明らかとなった。また、*msi1*遺伝子欠損による先天性水頭症の発症メカニズムとして、神経幹細胞・前駆細胞の増殖や分化の制御の異常が考えられる。Msi1とMsi2の両蛋白質が、ともに発症機序に強く関与していることが、*msi1*および*msi2*遺伝子の二重欠損

マウスの解析から明らかとなった。

L1細胞内領域遺伝子変異による神経軸索形成異常のメカニズム —クラッチ分子としてのアンキリンBの役割—

理化学研究所 脳科学総合研究センター 発生・分化研究グループ

上口 裕之

研究要旨

神経接着分子L1は、神経軸索路の形成異常を伴うX連鎖性遺伝性水頭症の原因遺伝子産物として注目されている。L1は、主として発生過程の神経細胞に発現し、神経細胞移動・軸索形成・軸索伸長を促進する。L1細胞内領域と直接結合する細胞骨格関連分子アンキリンBの遺伝子欠損マウスも、X連鎖性遺伝性水頭症に酷似した神経軸索路の形成不全を示すことが明らかになっている。さらに、L1細胞内領域アンキリン結合部位に影響をおよぼすのアミノ酸変異（Y1229H、S1224L、del 1181-endなど）の臨床例も、同様の軸索路形成異常を伴うことが知られている。アンキリンB遺伝子欠損マウス由来神経細胞あるいは変異型L1（Y1229H、S1224L、del 1181-end）を発現する神経細胞では、L1依存性軸索形成能が有意に低下しており、L1-アンキリンB結合が軸索形成に重要な役割を担っていることが明らかになっている。我々は最先端の細胞生物学的手法を駆使して軸索形成の分子機構を解析し、1）神経細胞体周囲糸状突起・膜様突起においてアクチン線維は細胞体へ向かって移動すること、2）L1細胞内領域はこのアクチン後方移動と連結すること、3）アンキリンBは、L1-アクチン後方移動連結を媒介するクラッチ分子として機能し、軸索形成に必要な牽引力を細胞外環境へ伝達する役割を担っていることを明らかにした。

以上の研究より、ヒトL1細胞内領域の遺伝子変異が神経軸索路の発生に抑制的な作用をおよぼす分子機構の一部が解明された。

A. 研究目的

神経接着分子L1は、主として発生過程の神経細胞に発現し、神経細胞移動・軸索形成・軸索伸長に重要な役割を担っている¹⁾。ヒトL1遺伝子異常に特徴的な臨床・病理所見として、X連鎖性遺伝性水頭症・精神発達遅滞・錐体路低形成による対麻痺・脳梁低形成・母指内転屈曲・小脳虫部低形成などがあげられる²⁾。L1ノックアウトマウスもこれに類似した表現型を示す³⁾。水頭症および精神発達遅滞の重症度と生存率は、ヒトL1遺伝子変異の部位・タイプと強い相関がある⁴⁾。L1細胞内領域に限局する変異はほとんどが軽症例であり、L1細胞外領域のtruncationは最も重症である。L1細胞外領域の点

変異は両者の中間である。しかし、神経軸索路の形成異常はL1遺伝子変異の部位に関わらずほぼ全症例に認められる。以上より、L1細胞外領域の機能異常すなわちL1依存性細胞接着の阻害は、水頭症の発症・増悪と深い関わりがある反面、神経軸索路の発生過程においては、L1による細胞接着のみならずL1細胞内領域も重要な役割を担っていることが示唆されている。

多くのヒトL1細胞内領域遺伝子変異では、ミスセンス変異あるいはフレームシフト変異によりそのC末端側が欠損する（例えばdel 1181-end⁵⁾）。Vann Bennettらの生化学的実験により、L1細胞内領域C末端側はアンキリン（スペクトリン-アクチン骨格結合蛋白）と直接結合することが証明されている⁶⁾。このL1細胞内領域アンキ

リン結合部位内のアミノ酸点変異 (Y1229H、S1224L) も、神経軸索路の形成異常をきたすことが知られている。さらに、アンキリンBノックアウトマウスはL1ノックアウトマウスと同様、脳室拡大および脳梁・錐体路低形成を伴うことから、L1とアンキリンBとの結合の機能的重要性が示唆されている⁷⁾。我々の平成13年度の研究では、軸索形成過程におけるL1-アンキリンB結合の必要性を実証するとともに、ヒトL1細胞内領域遺伝子変異 (Y1229H、S1224L、del 1181-end) はL1-アンキリンB結合を阻害することにより軸索形成を抑制することを明らかにした。平成14年度は、L1-アンキリンB結合による軸索形成の分子機構を解明した。

B. 研究方法

1. 実験動物および試薬

アンキリンBノックアウトマウスおよび220-kDアンキ

リンB cDNAはVann Bennett教授 (Howard Hughes Medical Institute, Duke University, USA)より供与された。アンキリンBノックアウトマウスの遺伝子型の判定はPolymerase chain reaction法により行った⁷⁾。220-kDアンキリンBのN末端側にenhanced yellow fluorescent protein (enhanced YFP)を付加した融合蛋白 (アンキリンB-YFP)の発現ベクターを作製した。L1-Fc融合蛋白は、L1-Fc cDNAを遺伝子導入したCOS細胞の培養上清からプロテインAアフィニティーカラムで精製した⁸⁾。ポリクローナル抗L1抗体は、Vance Lemmon教授 (Case Western Reserve University, USA)より供与された。Alexa594標識phalloidinはMolecular Probes (Eugene, OR)から、ラミニンはLife Technologies (Gaithersburg, MD)から、シリカビーズ (直径800nm)はMicromod (Rostock, Germany)から購入した。

2. 脊髄後根神経節神経細胞初代培養および遺伝子・蛋

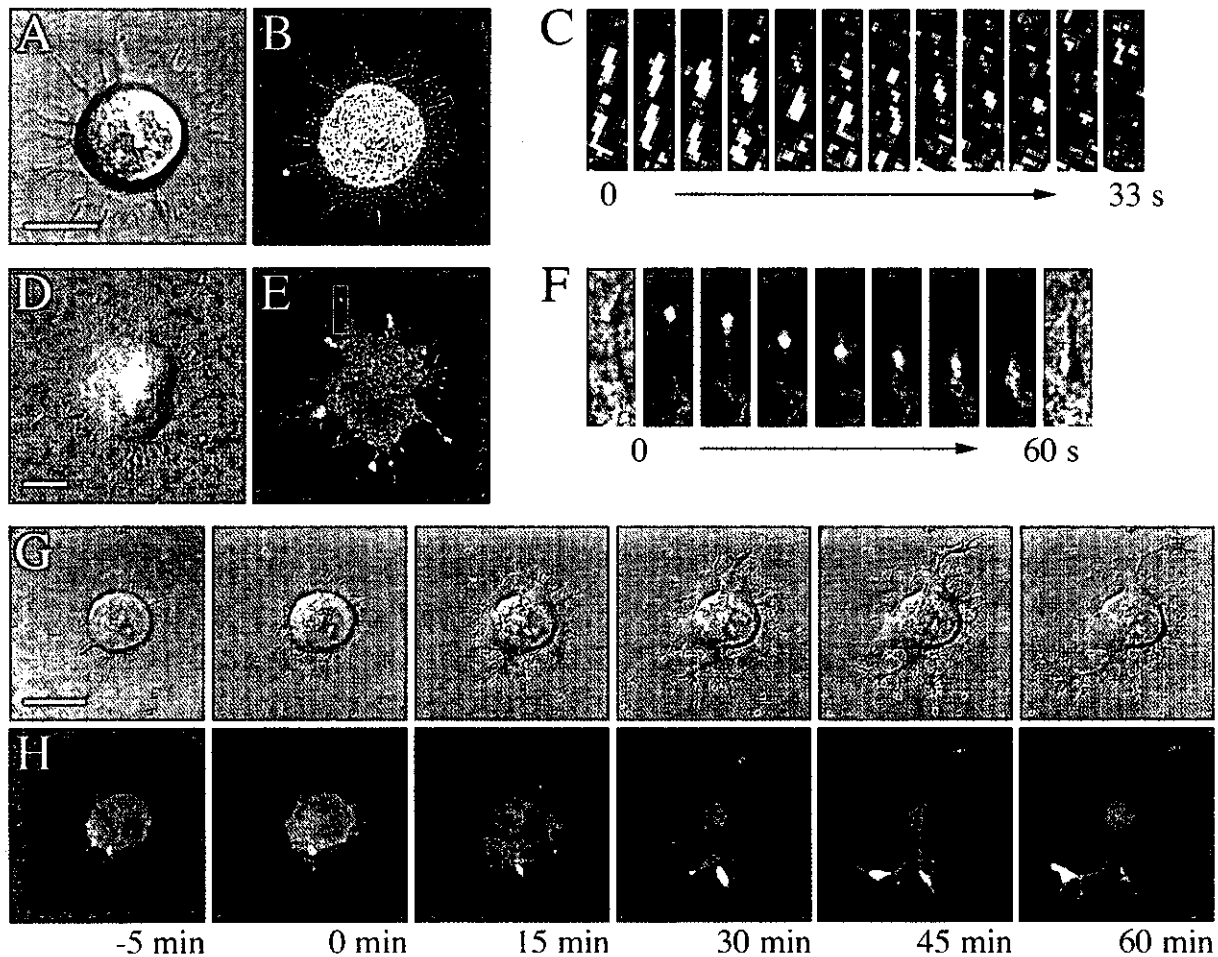


図1 軸索形成過程の神経細胞におけるアクチン線維 (A-C) とアンキリンB-YFP (D-F) の動態。神経細胞の微分干渉像 (A, D)、蛍光像 (B, E)、および赤線で囲んだ領域の拡大像 (C, F) を示す。微分干渉像 (G) およびアンキリンB-YFP蛍光像 (H) は、アンキリンB集積部位から軸索が形成される過程を示すタイムラプス画像である。L1-Fcを0 minの時点で培養系に添加し、軸索形成を誘導した。スケールバー：10 μm

白導入

生後0日齢のマウスの脊髄後根神経節を無菌的に摘出し、DispaseおよびDNaseにて分散後、ガラスペースディッシュ上に培養した。抗Fc抗体をコートしたスライドガラスにL1-Fcを添加することにより、L1基質を作製した⁸⁾。神経細胞への遺伝子導入はLipofectamine2000 (Life Technologies) を用いて行った。神経細胞へのAlexa594標識phalloidinの導入はTritulation Loading法により行った。

3. 光ピンセット法

L1-Fcあるいは抗L1抗体をコートしたマイクロビーズは、過去に報告した方法により作成した⁸⁾。光ピンセット装置は、Laser Tweezers 980/1000 module (1 W diode laser at 985 ± 10 nm; Cell Robotics, Albuquerque, NM)、冷却CCD camera (C5985; 浜松ホトニクス)、ニコン倒立顕微鏡TE300、およびコンピューター制御電動ステージシステムMicroscope Workstation System version 4.0 (Cell Robotics) から構成され、油浸対物レンズ (100X Plan Fluor, N.A. 1.3) を使用してマイクロビーズを操作した⁸⁾。スライドガラス直上のマイクロビーズをXY方向に約2.5pNの力で牽引できるレーザー出力で実験を行った。神経細胞上でのマイクロビーズの運動を、微分干渉タイムラプス画像にて解析した。顕微画像の定量的解析は、Aquacosmos version 1.3 (浜松ホトニクス) を用いて行った。

C. 研究結果

1. 神経軸索形成過程におけるアクチン線維とアンキリンBの動態

一般的に、細胞質内を後方移動するアクチン線維と細胞外基質が機械的に連結することにより、細胞移動あるいは細胞突起伸長に必要な牽引力が伝達すると考えられている^{9,10)}。我々は、アンキリンBがL1細胞内領域とアクチン後方移動を連結することにより軸索形成を促進するものと推察し、軸索形成過程の神経細胞でのアクチン線維およびアンキリンBの動態を解析した。神経細胞内に低濃度 ($5 \mu\text{M}$) のAlexa594標識phalloidinを注入し、アクチン線維を斑上に蛍光標識することにより、アクチン線維の動態を可視化した (Fluorescent Speckle Microscopy)¹¹⁾。図1 A-Cに示すように、神経細胞体周囲の膜様突起・糸状突起に存在するアクチン線維は、 $6.3 \pm 0.2 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n=48$) の速度で細胞体へ向かって移

動した (アクチン後方移動)。アンキリンB非発現神経細胞におけるアクチン後方移動速度は $6.1 \pm 0.2 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n=56$) であり、アンキリンBノックアウトはアクチン後方移動速度に有意な影響をおよぼさなかった。次に、神経細胞体周囲糸状突起におけるアンキリンBの分子動

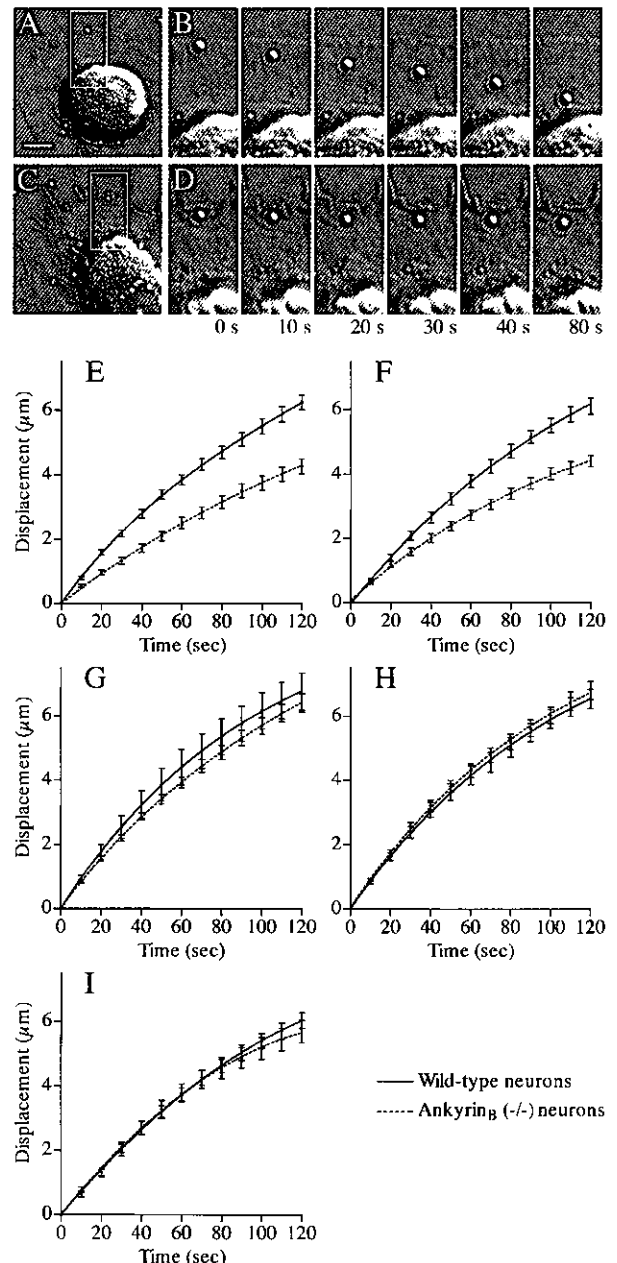


図2 神経細胞体周囲膜様突起上でのL1-Fcコートしたマイクロビーズの運動を示す微分干渉像 (A, Bは野生型神経細胞, C, DはアンキリンBノックアウト神経細胞)。スケールバー: $5 \mu\text{m}$ (E-I) マイクロビーズの移動速度の定量結果。縦軸は細胞先端縁からの距離 (μm)、横軸はマイクロビーズを神経細胞上に接触・解放した後の経過時間 (秒) を示し、実線は野生型、破線はアンキリンBノックアウト神経細胞上でのデータを示す。神経細胞体周囲膜様突起上でのL1-Fcコートビーズ (E)、抗L1抗体コートビーズ (F)、ラミニンコートビーズ (I)、および成長円錐膜様突起上でのL1-Fcコートビーズ (G)、抗L1抗体コートビーズ (H) の移動速度を定量した。

態を解析した。アンキリンB-YFP cDNAを遺伝子導入した神経細胞の蛍光タイムラプス画像解析により、アンキリンBも $5.7 \pm 0.3 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n=24$) の速度で細胞体へ向かって移動するのが観察された (図 1 D-F)。以上の結果から、神経細胞体周囲膜様突起・糸状突起において、アンキリンBはアクチン線維とともに後方移動することが強く示唆された。L1基質上に培養した神経細胞では、多くの場合、アンキリンBの大きな集積が形成された。このようなアンキリンB集積部は後方移動せず、長時間のタイムラプス画像解析により、このアンキリンB集積部から神経軸索が形成・伸長することが明らかになった (図 1 G, H)。

2. L1依存性軸索形成におけるアンキリンBの作用機序

我々の平成13年度の研究から、L1細胞内領域は神経細胞体周囲の膜様突起・糸状突起においてアンキリンBと結合すること、またこのL1-アンキリンB結合部位にアンキリンBが強く集積することが明らかになっている。今回報告したアンキリンBとアクチン線維との結合は、細胞外基質とアクチン後方移動がL1-アンキリンB結合を介して連結されること、すなわちアンキリンBがクラッチ分子として機能することを示唆する。さらに、アンキリンB集積部位 (L1-アンキリンB結合部位) から神経軸索が形成・伸長したことは、アンキリンBを介するL1とアクチン後方移動の連結が軸索成長を促進することを示唆する。

そこで、L1とアクチン後方移動の連結にアンキリンBが必要か否かを検証するため、マイクロビーズを用いたL1分子動態の解析を行った。L1-Fcあるいは抗L1抗体をコートしたマイクロビーズは、いずれも神経細胞形質膜上に発現するL1と結合する。光ピンセットを用いてこのビーズを神経細胞体周囲膜様突起の先端部に接触させ、ビーズの運動軌跡を解析することにより、神経細胞表面でのL1の動態を可視化することができる。図 2 A, B に示すように、マイクロビーズは神経細胞体周囲膜様突起上を細胞体へ向かって移動した。このビーズの移動速度は、アクチン後方移動速度とほぼ同じであった。神経細胞をサイトカラシンで処理してアクチン線維の形成を阻害すると、マイクロビーズの後方移動は観察されなくなった。以上の結果は、L1とアクチン線維の結合によりマイクロビーズが後方移動することを示している。図 2 C-F に示すように、アンキリンBノックアウトマウス由来培養神経細胞では、細胞体周囲膜様突起上でのL1

マイクロビーズの後方移動速度が野生型と比較して有意に低下していた。対照実験として、ラミニンをコートしたマイクロビーズの後方移動はアンキリンBノックアウトの影響を受けなかった (図 2 I)。以上の結果より、アンキリンBはL1とアクチン後方移動の連結に関与することが明らかになった。しかし、アンキリンBノックアウトによりL1とアクチン後方移動の連結が完全には阻害されなかったことから、アンキリンB以外のクラッチ分子も軸索形成に関与する可能性が示唆された。軸索形成後の成長円錐上でのL1-アクチン後方移動連結を解析したところ、野生型とアンキリンBノックアウト神経細胞間で有意差はなく (図 2 G, H)、アンキリンB以外のクラッチ分子が成長円錐移動 (軸索伸長) を制御することが示された。

D. 考察

1980年代には、神経接着分子の細胞外領域を介する細胞接着の強弱が、細胞移動あるいは神経突起伸長の速度・方向を制御する重要な因子であると考えられていた。しかし1990年頃からは、神経接着分子の細胞内領域を介するシグナル伝達の重要性も指摘されるようになった。神経接着分子の細胞内領域と細胞骨格との結合は、その接着分子による細胞接着能および細胞内シグナル伝達の両者を制御しうるプロセスであり、接着分子と細胞骨格には極めて密接な機能的関連性が存在する。L1細胞内領域には2カ所のアクチン骨格結合部位が同定されている。C末端側の領域はアンキリンを介してアクチンスペクトリン骨格と結合し¹²⁾、細胞膜貫通領域近傍部は何らかのリンカー分子を介してアクチンストレス線維と結合する¹³⁾。しかしながら、L1と細胞骨格との結合の制御機構および神経発生過程における機能的意義に関しては不明な点が多い。

L1細胞内領域アンキリン結合部位に影響をおよぼすアミノ酸変異 (Y1229H, S1224L, del 1181-endなど) は軸索路形成不全を伴うX連鎖性遺伝性水頭症を引き起こすこと⁵⁾、また培養系での実験によりL1-アンキリンB結合阻害が軸索形成を抑制することが確認されたため、L1-アンキリンB結合による軸索形成の分子機構の解明を目指した研究を行った。一般的に、移動細胞または伸長過程の細胞突起に存在するアクチン線維は、その先端部から後方へ移動しており、このアクチン後方移動は細胞 (突起) を前方へ推進するための原動機 (エンジン) と

して機能している。細胞表面に発現する接着分子は、その周囲環境（路面に相当）と接着することにより、タイヤとしての役割を果たす。同時にその接着分子の細胞内領域は何らかの分子（クラッチに相当）を介してアクチン線維と結合し、アクチン後方移動により発生した牽引力は細胞外環境へと伝達され、結果として細胞（突起）は前方へ移動する^{9,10}。今回我々が報告した研究結果は、アンキリンBがL1細胞内領域とアクチン後方移動を連結するクラッチ分子として機能し、これにより軸索形成を促進することを明らかにしたものである。一方で、アンキリンB以外のクラッチ分子群もL1依存性軸索形成・伸長に関与することが示された。このような新規クラッチ分子群の同定およびクラッチ接続・離脱の制御機構を解明することは、軸索成長の分子機構の理解およびX連鎖性遺伝性水頭症での軸索路形成異常の発症メカニズムの解明に貢献するものである。

E. 結論

本研究により、アンキリンBはL1細胞内領域とアクチン後方移動を連結するクラッチ分子として機能し、軸索形成を促進することが明らかになった。多くのL1細胞内領域遺伝子変異（Y1229H、S1224L、del 1181-endなど）は、L1-アンキリンB結合を阻害することにより（クラッチの接続不全）、神経軸索の形成に抑制的な作用をおよぼすことが判明した。これらの知見は、X連鎖性遺伝性水頭症での軸索路形成異常の発症メカニズムの理解に貢献するものである。

F. 文献

- 1) Kamiguchi H, Lemmon V: IgCAMs: bidirectional signals underlying neurite growth. *Curr Opin Cell Biol* 2000, 12:598-605.
- 2) Kamiguchi H, Hlavin ML, Yamasaki M, Lemmon V: Adhesion molecules and inherited diseases of the human nervous system. *Annu Rev Neurosci* 1998, 21:97-125.
- 3) Kamiguchi H, Hlavin ML, Lemmon V: Role of L1 in neural development: what the knockouts tell us. *Mol Cell Neurosci* 1998, 12:48-55.
- 4) Yamasaki M, Thompson P, Lemmon V: CRASH syndrome: mutations in L1CAM correlate with severity of the disease. *Neuropediatrics* 1997, 28:175-178.
- 5) Kenwrick S, Watkins A, Angelis ED: Neural cell recognition molecule L1: relating biological complexity to human disease mutations. *Hum Mol Genet* 2000, 9:879-886.
- 6) Davis JQ, Bennett V: Ankyrin binding activity shared by the neurofascin/L1/NrCAM family of nervous system cell adhesion molecules. *J Biol Chem* 1994, 269:27163-27166.
- 7) Scotland P, Zhou D, Benveniste H, Bennett V: Nervous system defects of AnkyrinB (-/-) mice suggest functional overlap between the cell adhesion molecule L1 and 440-kD AnkyrinB in premyelinated axons. *J Cell Biol* 1998, 143:1305-1315.
- 8) Kamiguchi H, Yoshihara F: The role of endocytic L1 trafficking in polarized adhesion and migration of nerve growth cones. *J Neurosci* 2001, 21:9194-9203.
- 9) Lauffenburger DA, Horwitz AF: Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 1996, 84:359-369.
- 10) Mitchison TJ, Cramer LP: Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell* 1996, 84:371-379.
- 11) Schaefer AW, Kabir N, Forscher P: Filopodia and actin arcs guide the assembly and transport of two populations of microtubules with unique dynamic parameters in neuronal growth cones. *J Cell Biol* 2002, 158:139-152.
- 12) Zhang X, Davis JQ, Carpenter S, Bennett V: Structural requirements for association of neurofascin with ankyrin. *J Biol Chem* 1998, 273:30785-30794.
- 13) Dahlin-Huppe K, Berglund EO, Ranscht B, Stallcup WB: Mutational analysis of the L1 neuronal cell adhesion molecule identifies membrane-proximal amino acids of the cytoplasmic domain that are required for cytoskeletal anchorage. *Mol Cell Neurosci* 1997, 9:144-156.

NMHC-Bミオシン変異マウスの水頭症発症機序 —神経系細胞の細胞移動と組織形成における役割—

東邦大学医学部再生医学講座¹ 東京都神経科学総合研究所 微生物研究部門²

原 嘉信¹ 原 由紀子²

研究要旨

Nonmuscle myosin heavy chain II-B (NMHC-B) は、神経組織でもっとも主要なアクチン結合モーター分子であり、神経組織の発生過程でダイナミックに発現様式が変化する事から多様な役割を持つ事が推察されている。NMHC-Bを完全に欠損しているマウスを作成するとマウスは神経上皮細胞の接着異常による脳室壁の破壊を起因にして胎生期に進行性の脳奇形と水頭症を発症し出生直後までに死亡する。しかしマウスは、胎生早期に死ぬために胎生後期から生後のNMHC-Bの機能はまだ明らかでない。そこでNMHC-Bミオシン頭部のATPase活性部位のアミノ酸にR702Cの点突然変異を導入しモーター活性が低下した変異マウスを作成した。このマウスは欠損マウスと比較して遅発性の脳奇形と水頭症を発症し生後15日までに死亡する。このマウスの脳を組織学的に解析すると脳の各部位で発生異常が認められるが、そのなかでも橋核と顔面神経核の欠失が特徴的に認められる。しかもこれらの核の前駆細胞と推定される細胞群が、第4脳室神経上皮の生成部位や細胞移動の途上で異所性に集積している像が認められた。これらの結果は、NMHC-Bミオシンが発生初期において未分化な神経上皮細胞（神経幹細胞）の分裂と移動を制御しているのみならず、分化した神経細胞の移動に重要な役割を果たしている事を示唆している。

A. 研究目的

マウスNMHC-Bミオシン遺伝子に変異を導入しその結果発症する水頭症の発生機序の解明を目的とする。これまではNMHC-B完全欠損マウスを用い胎生初期の水頭症発生機序を解析してきた。今年度は、さらにR702C点突然変異マウスを作成し、胎生後期から生後にかけて進行する脳発生異常と水頭症の発生機序の研究を進めた。

B. 研究方法

NMHC-Bミオシン遺伝子欠損マウスは、既に報告したようにエクソン2のATGコドンの下流にネオマイシン耐性遺伝子を相同置換により挿入し樹立した。またNMHC-

Bミオシン頭部のATPase活性部位にR702Cの点突然変異を持つマウスを相同置換により作成した。

光学顕微鏡用の試料作製には、マウス組織をブアン固定液、4%パラホルムアルデヒド-リン酸緩衝液、5%酢酸-95%エタノール液のいずれかで固定し、連続パラフィン切片を作成し、HE染色して解析した。

透過電子顕微鏡用の試料作製には、マウス胎児の脳組織を2%パラホルムアルデヒド、2%グルタルアルデヒド、0.15Mカコジル酸緩衝液と1%オスミウム酸で固定し、エタノール系列で脱水後、エポキシ包埋した。これを超薄切しウランと鉛で電子染色し、H-7100(日立)で観察した。走査電子顕微鏡用の試料作製には、同様に固定した試料を酢酸イソアミルで処理し、臨界点乾燥後、オス

ミウムでコートしS-4500（日立）で解析した。

C. 研究結果

1. NMHC-B欠損マウスの神経発生異常

1.1 神経上皮細胞の細胞接着構造の消失と細胞周期に同期した核移動の異常

神経上皮細胞の核は、DNA合成期（S期）に軟膜面に、有糸分裂期（M期）に脳室面に移動し、細胞周期に同期してエレベーター運動をする。胎生10.5日未分化な神経上皮細胞を走査および透過電顕で観察すると、脳室面と軟膜面に突起が伸展し隣接する細胞の突起が互いに強く接着しており、細胞核の移動に必要な強固な足場を形成している。とりわけ脳室面に接する末端の細胞接触部位では、adherent junction様の細胞接着構造が局在するが、この接着構造は、軟膜面や上皮層内部の細胞接触部位に無く、神経上皮細胞の細胞極性を決める重要な役割を果たしている事が推察される。

これに対しNMHC-B欠損マウスでは、神経上皮細胞の脳室面接着構造の数が減少消失し、細胞突起が脳室面と離れ変性している像が多く認められる。また有糸分裂期（M期）の細胞像が脳室面のみならず上皮層内の種々の部位で高頻度に認められる。興味深い事に、これらの異所性分裂細胞の突起間には脳室に特異的な接着構造ができ脊髄中心管とよく似た管腔構造の形成が認められる。

1.2 脳室壁の破壊と脳室内への異常細胞突出

NMHC-B欠損マウスの脳室壁は、胎生10.5日で、微小穿孔を伴う膨隆細胞とその破裂像が観察され、しだいに脳室面の局所的な破壊と変性が進行し、神経上皮細胞が脳室に突出してくるようになる。胎生13.5日以後、第三脳室、中脳水道、第四脳室で、細胞が脳室に突出し、神経上皮細胞や神経細胞とグリア細胞を含む巨大な細胞塊を形成する事を明らかにしてきた。胎生14.5日では、破壊と変性が広範囲に進行し、多極性の異常細胞が脳室表面に広範囲に浸潤し、多層性に重なり突起を絡み合っている像が認められた。特に第三脳室と中脳水道の境界部は、変性破壊と細胞死がはげしく、壁面が網目状に変性し、多数のマクロファージが脳室面に集積していた。これらの領域では、線毛や微絨毛がほとんど形成されず、脳脊髄液の循環障害の直接的な原因になると考えられる。

1.3 第4脳室底部菱形窩の破壊と神経細胞移動の異常

NMHC-B欠損マウスの脳室表面を走査電顕で観察する

と、破壊変性の進行度に部位特異的な差異が認められる。なかでも第四脳室の底部すなわち菱形窩正中部位の脳室面の破壊が顕著で、ほぼ全例で観察される。この部位では巨大な細胞塊が異所性に脳室内に突出している。この細胞塊には、未分化な神経上皮細胞や反応性のアストロサイトに加えて特異的な大型神経細胞が認められる。しかしながらこれらの大型神経細胞は運動性神経細胞と推察されるが、その同定は困難であった。

2. R702C点突然変異マウスの神経発生異常

2.1 遅発性水頭症と運動障害

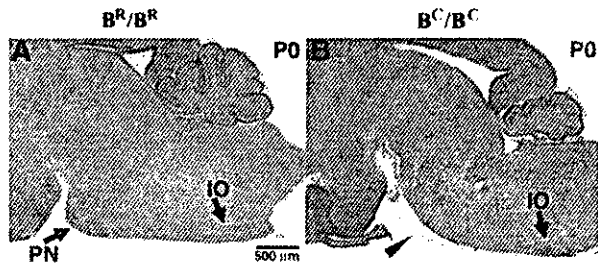
NMHC-Bミオシン頭部のATPase活性部位にR702Cの点突然変異を相同組換えにより導入すると、ミオシン頭部のモーター活性が機能的に障害される。このマウスは完全欠損マウスと異なり胎生期の発生異常が軽度でほとんどのマウスが出生する。しかしながら出生後次第に歩行障害と発育異常を示し欠損マウスと同様に遅発性水頭症を発症し生後15日ではほぼ全例死亡する。このマウスの脳を組織学的に解析すると欠損マウスに比べて軽度であるが同様の発生異常が脳の各部位で認められる。そのなかでも第4脳室を形成する神経上皮細胞から発生する構造、特に橋核と顔面神経核に最も顕著な異常が認められる。

2.2 橋核の欠損と細胞移動異常

橋核は、菱脳唇から発生する小脳前核のひとつで大脳皮質から小脳への中継核として重要な役割をもつ。橋核細胞は、胎生後期14-17日に第4脳室底の外側部を形作る髄脳背側部の小脳前神経上皮から発生する。この細胞は髄脳の外縁を前腹側方向に移動し橋の膝底の正中部に高密度に集積し小型神経細胞からなる大型の神経核を形成する。生後P2-P15のR702Cマウスでは、移動中の橋核細胞と推定される細胞が小脳前神経上皮から橋核への細胞移動経路すなわち前小脳前核経路の各部位に異所性に集積している。これらの細胞は、最終部位の橋膝部に到達せず、橋核はほぼ完全に欠失している。しかしながら同じ菱脳唇の神経上から発生し後方に移動して形成される小脳前核の下オリブ核には、顕著な差違は認められない。(Fig.1)

2.3 顔面神経核の形成不全と細胞移動異常

顔面神経核の細胞は、胎生11-13日に第4脳室底の正中溝近くで菱脳R4の神経上皮細胞から生まれる。この細胞は、はじめ延髄内を後方に水平移動し外転神経核の位置で向きを変え外腹側方向へと移動し、髄脳のR6の



BR/BR : NMHC-B野生型マウス BC/BC : NMHC-B点突然変異マウス

Fig 1 NMHC-B ミオシンR702C変異マウスの橋核の欠損
小脳前核の橋核(PN)と下オリーブ核(IO)は、第4脳室に面する菱脳唇の小脳前核神経上皮から発生する。NMHC-B ミオシンR702C変異マウスでは、橋核が特異的に欠損するが、下オリーブ核は、野生型マウスと差異が認められない。

位置で底部に巨大な神経核を形成する。顔面神経線維は、延髄底部の核から背内側すなわち細胞移動と逆方向に向かい出生部位の菱形窩に伸展し、外転神経核を回って折り返し再び腹外側方向に下行しR4の位置で脳幹を出て行く。生後P2-P15のR702Cマウスの脳連続切片を調べると完全欠損マウスと同様に第4脳室底の菱形窩の正中部位に、特徴的な大型神経細胞が異所性に集積し脳室内に巨大な細胞塊を形成している像がほぼ全例で観察される。この近傍の神経核を調べると顔面神経核に特異的な形成不全が認められる。しかしこの近傍から発生する運動性神経核の三叉神経運動核、外転神経核、舌下神経核には、顕著な差異は認められない。(Fig.2)

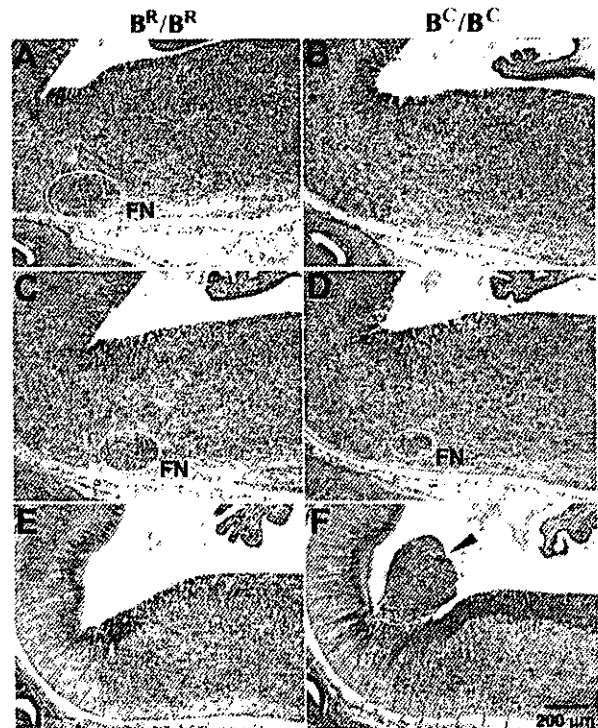
D. 考察

NMHC-B ミオシン欠損マウスの解析結果は、神経発生の初期にNMHC-Bが細胞周期に同期しておこる神経上皮細胞の細胞核移動に重要な役割を持つ事を示している。さらにR702C点突然変異マウスの解析結果は神経細胞の移動時期にNMHC-Bが橋核や顔面神経核の細胞移動に必須である事を示している。

この二つの現象すなわち神経上皮細胞の細胞核移動と神経細胞の細胞移動はこれまで全く異なった現象として考えられていた。しかしその背景にはNMHC-Bが関与する共通のメカニズムがある事が示唆される。細胞移動は、前端突起の伸展、細胞核の移動、後端突起の縮退の過程からなる。神経上皮細胞の核移動では、二つの突起端が脳室面と軟膜面に固定され、細胞核はこれらの面を接着点として細胞周期性に上下に移動する。NMHC-B欠損マウスでは、脳室面と軟膜面での接着異常から神経上皮細

胞の細胞分裂と細胞分化に異常が起きる事を我々は明らかにしてきた。神経細胞の細胞移動では神経上皮細胞と異なり突起の先端は固定していない。先端突起は移動途上にある細胞や細胞外マトリックスと一時的な接着点を形成し、この接着点に向かって細胞核が引き寄せられ移動する。後端突起は軸索として残る場合もあるが必要がなければ縮退する。

これらの二つの細胞移動様式には接着点が固定しているか一時的に形成されるかの違いがあるもののいずれの場合も突起先端の接着点の形成が必要不可欠である。先端突起が接着できなければ細胞核は方向性をもって移動できない。また先端突起の接着点が固定されてしまえば細胞はその先に移動することが不可能になる。したがって細胞が移動するためには先端突起の接着の動的な制御が必要不可欠である。R702C点突然変異マウスの橋核や顔面神経核ではこれらの前駆細胞が生成された部位や移動経路の途上で異所性に集積し最終部位に到達できない。この異常の背景には、神経上皮細胞と同様にやはり接着構造の異常があると推察されその検証を進めてい



BR/BR : NMHC-B野生型マウス BC/BC : NMHC-B点突然変異マウス

Fig 2 NMHC-B ミオシンR702C変異マウスの顔面神経核の形成不全
顔面神経核は(FN)、第4脳室底の正中部位の神経上皮から発生する。NMHC-B ミオシンR702C変異マウスでは、顔面神経核の形成不全が顕著に認められる。顔面神経核の前駆細胞と推定される細胞が細胞塊として脳室に突出している。

る。

E. 結論

NMHC-Bミオシン遺伝子に突然変異を導入するとマウスは水頭症と脳奇形を発症する。NMHC-Bを完全に欠損すると胎生初期に神経上皮細胞は、細胞接着異常を示し、正常な分裂や分化ができなくなり、細胞周期に同期した細胞核移動が制御できない。その結果脳室面が変性し多極性の異型細胞におおわれ、上皮細胞は分化せず脳脊髄液の循環に必要な線毛が発達しない。特に第3脳室と中脳水道の境界部は脳室壁の変性と破壊が激しく中脳水道が狭窄し脳脊髄液が循環できない。NMHC-Bミオシン頭部のATPaseの活性部位にR702Cの点突然変異を導入すると、マウスは生後遅発性的水頭症を発症する。このマウスは完全欠損マウスに比較して軽度の障害をもつが、水頭症の発症機序は同様と考えられる。さらにこのマウスは、特異的な神経核の形成異常を示し橋核と顔面神経核の欠損がほぼ全例で観察される。この欠損に対応して前駆細胞と推定される細胞が生成部位や移動経路の途上で異所性に集積しているのが認められる。このことからNMHC-Bミオシンは、神経上皮細胞の細胞核の移動のみならず分化した神経細胞の細胞移動においても重要な役割を果たしている事が明らかとなった。

謝辞

本研究は、米国NIH, Robert S. Adelstein博士、東京医科歯科大学、機器分析センター、市野瀬志津子博士との協同研究の成果である。

F. 文献

- 1) 原嘉信、原由紀子：NMHC-Bミオシン遺伝子欠損マウスの水頭症発生機序 厚生省特定疾患難治性水頭症調査研究班 平成11年度研究報告書、2000, 26-29.
- 2) 原由紀子、原嘉信：NMHC-Bミオシン遺伝子欠損マウス of 神経上皮細胞の微細構造と水頭症発生機序 厚生省特定疾患難治性水頭症調査研究班 平成12年度研究報告書、2001, 16-21.
- 3) 原由紀子、原嘉信：NMHC-Bミオシン遺伝子欠損マウス of 水頭症発生機序 -神経上皮細胞（神経幹細胞）の分裂・移動・分化の異常と細胞接着構造-厚生省特定疾患難治性水頭症調査研究班 平成13年度研究報告書、2002, 53-57.
- 4) Tullio, A., Bridgman P.C., Tresser, N.J., Chan, C., Conti, M.A., Adelstein, R.S., Hara, Y. Structural Abnormalities develop in the brain following ablation of the gene encoding nonmuscle myosin II-B heavy chain. *J. Comp. Neurol.* 2001, 433 62-74.
- 5) Uren, D., Hwang H., Hara, Y., Takeda, K., Kawamoto, S., Tullio, A., Yu, Z., Ferrans V., Tresser, N., Grinberg, A., Preston Y., Adelstein, R. Gene dosage affects the cardiac and brain phenotype in nonmuscle myosin II-B depleted mice. *J Clinical Investigation* 2000, 105 (5) 663-671.

DNA polymerase λ 遺伝子の上流の新規未知遺伝子の同定 —DNA polymerase λ KOにおける水頭症との関連—

国立長寿医療センター老年病研究部

本山 昇

研究要旨

DNA polymerase λ (Pol λ)、はDNA polymerase β (Pol β) と相同性を有するfamily Xに属する新規DNA polymeraseである。Pol λ ノックアウトマウスは、脳室上衣細胞の繊毛の運動異常が原因で水頭症を発症する。Pol λ 遺伝子近傍の上流に新規遺伝子を発見した。その遺伝子は、私たちの作成したノックアウトマウスでも欠損しており、この新規遺伝子が水頭症の原因である可能性が示唆された。

A. 研究目的

DNA polymerase λ (Pol λ) は、DNAの複製・修復・組換え・減数分裂においてゲノム情報のintegrityを維持するのに重要な機能を果たしている。近年10種以上のDNA polymeraseが新たに同定されてきたが、その生理学的機能や疾病との関係は明らかにされていない。私たちはDNA polymerase Xファミリーに属するPol λ ^{1,2,3} を同定し、その生理機能を明らかにするためにPol λ ノックアウトマウスを作成したところ、Pol λ ノックアウトマウスは、生後発育遅延と頭部肥大が認められ水頭症を発症し死亡することを明らかにしてきた(図1)⁴⁾。しかしながら、Pol λ と水頭症発症の関連が不明であったので、Pol λ 及びその近傍の遺伝子についての解析を進めた。

B. 研究方法

Pol λ ノックアウトマウスは、胚性幹 (ES) 細胞における相同性組換えを用いエクソン1~6を欠損させた。Pol λ ノックアウトマウスの受精卵にCre recombinaseを発現する発現ベクターをマイクロインジェクションし、

neo resistance (PGK-neo) 遺伝子を削除したマウスを作成した(図2)。

C. 研究結果

DNA polymerase λ (Pol λ)、はDNA polymerase λ (Pol λ) と相同性を有するfamily Xに属する新規DNA polymeraseである。Pol λ はDNA修復及び細胞周期のチェックポイントに関与するタンパクにみられるBRCTドメインをN末端に有している。Pol λ ノックアウトマウスは、生後成長の遅延と頭部肥大が認められ水頭症を発症し、死亡する。また、慢性副鼻腔炎を発症していた。さらに、ノックアウトマウスの約20%が臓器逆位を示すことを明らかにしてきた。これら水頭症・慢性副鼻腔炎・臓器逆位という点からPol λ ノックアウトマウスは、Kartagener's syndromeなど、繊毛・鞭毛の運動異常を示すimmotile cilia syndromeのモデルマウスと考えられる。そこで、脳室上衣細胞及び気管支上皮細胞の繊毛の構造を電子顕微鏡で検討した結果、繊毛のinner dynein armが欠損していることが明らかにしてきた。これらの知見と一致し、雄は精子の運動異常により不妊であった。これらのことからPol λ ノックアウトマウスでは、脳室

上皮細胞の繊毛の運動異常が原因で水頭症を発症すると考えられた⁴⁾。

繊毛の形成・運動におけるPolλの機能については、その役割が全く不明である。定法のノックアウトマウス作成においてPGK-neoがゲノムに挿入されるが、このPGK-neoが近傍の遺伝子の発現に影響を及ぼす可能性があることが知られている。私たちの作成したPolλノックアウトマウスの水頭症をはじめとするphenotypeが、PGK-neoによる近傍遺伝子の発現に影響が起きた結果であるかどうかを明らかにするために、PGK-neoを削除したマウス (PolλΔneoマウス) を作成した。Polλノックアウトマウスの受精卵にCre recombinaseの発現ベクターを注入し、loxP間で組換えを起こしPGK-neoを削除した (図2)。PolλΔneoマウスは、Polλノックアウト

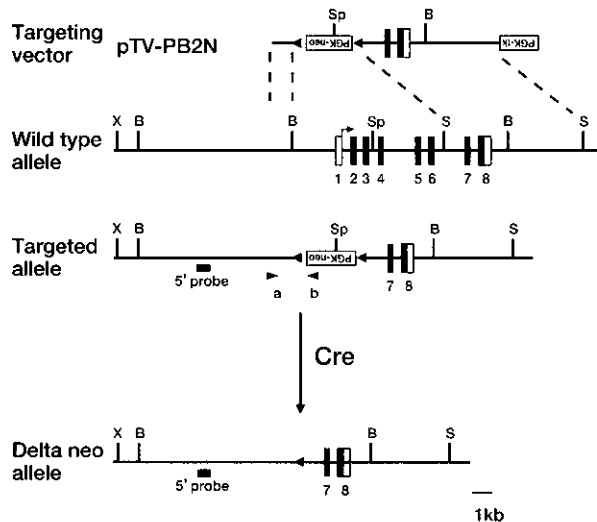
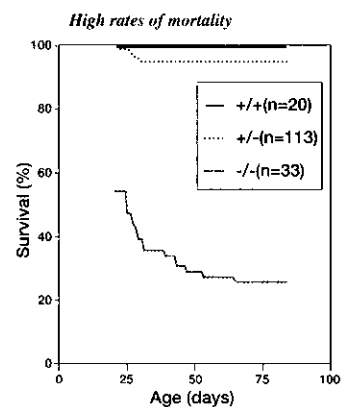
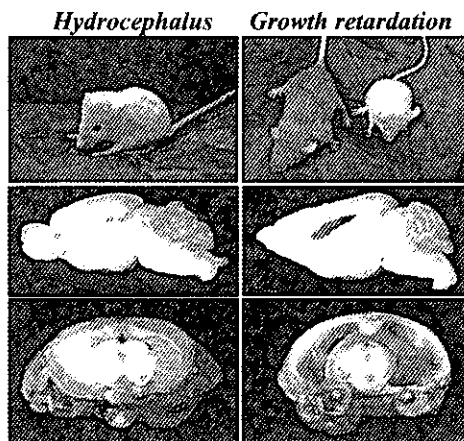


図2. ES細胞を用いたPolλ遺伝子の相同組換え

Polλ遺伝子座・ターゲッティングベクター・組換えPolλ遺伝子座の構造。Polλ遺伝子のエクソン1～6をネオマイシン耐性遺伝子で置換した。Cre recombinaseを発現させることによりloxP間で組換えを起こしPGK-neo遺伝子を削除した。

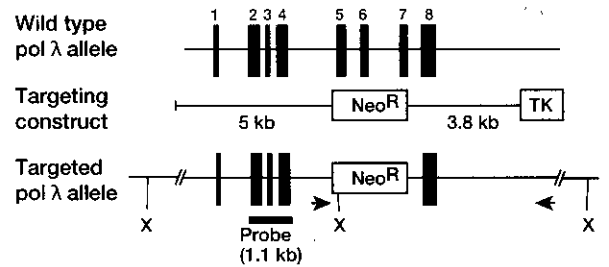
図1. Polλノックアウトマウスにおける発育遅延・水頭症・臓器逆位

ドーム型を特徴とする水頭症を呈する。Polλノックアウトマウスは野性型と比較して発育遅延が起こる。5週齢のPolλノックアウトマウス (左) と野性型マウス (右)。Polλノックアウトマウスは、著しい側脳室の拡張が認められる。生後の生存曲線。Polλノックアウトマウスは、生後3週で約半数になり、生後9週までに約70%が死亡する。



マウスと同様に水頭症を発症し、また内蔵逆位も認められた。これらの結果から、Polλノックアウトマウスで認められた phenotypeはPolλ遺伝子を欠損したことによるものであると考えられた。

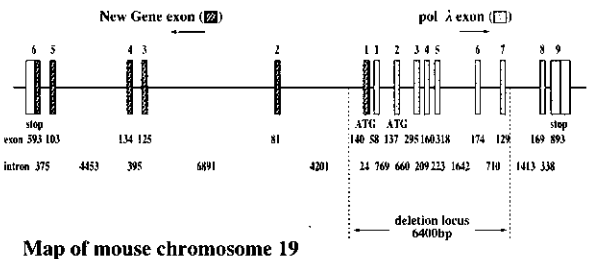
しかしながら、Bertocciらが作成したDNA Polymerase λKOマウスは見かけ上ほとんど異常が認められず、水頭症や雄の不妊は認められないと報告した⁵⁾。私たちが作成したKOマウスは、DNA Polymerase λ遺伝子のプロモータ領域からエクソン6までを欠失している (図2)⁴⁾。一方、Bertocciらが作成したKOマウスはエクソン5～7



Bertocci B et al. *J. Immunol.* 168: 3702-3706, 2002

図3. PolλΔ5-7/Δ5-7ノックアウトマウス

Bertocciらの作成したPolλΔ5-7/Δ5-7ノックアウトマウスの遺伝子ターゲッティングの構造。エクソン5から7を欠損している (文献5より)。



Map of mouse chromosome 19

図4. マウスPolλ遺伝子座上流の新規遺伝子の構造

マウスPolλ遺伝子座上流に新規の遺伝子が存在している。私たちのノックアウトマウスでは、この新規遺伝子のエクソン1も欠損している。

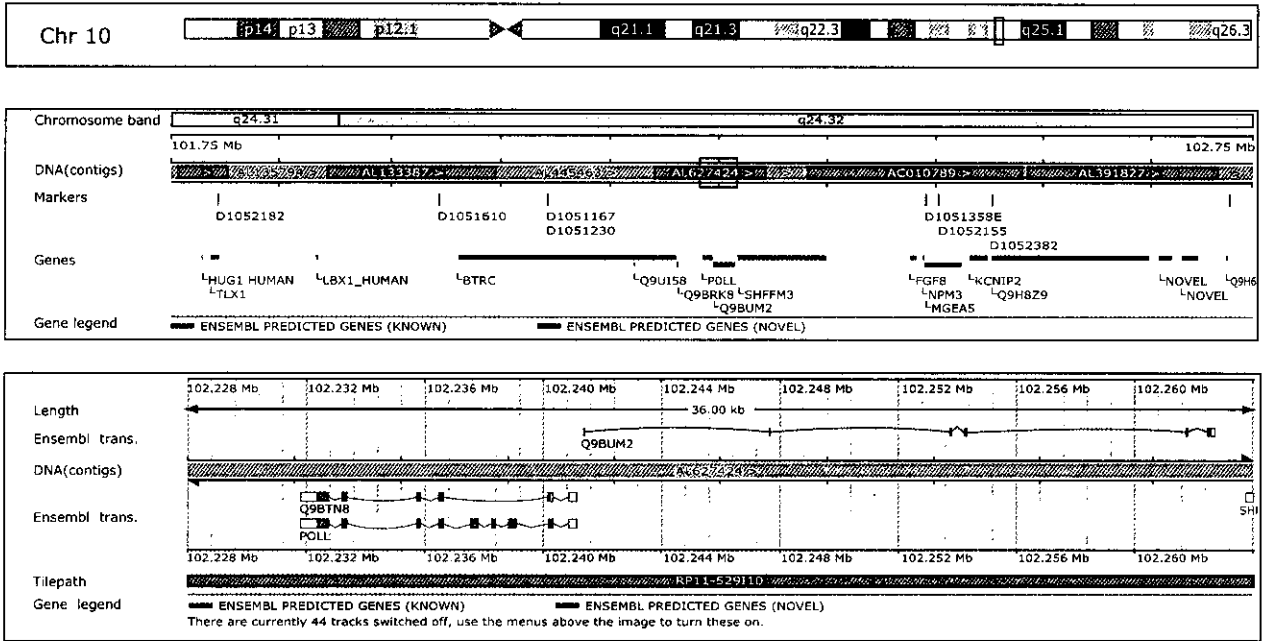


図5. ヒトPolλ遺伝子座上流の新規遺伝子の構造
ヒトPolλ遺伝子座上流に存在する新規遺伝子の構造を示している。

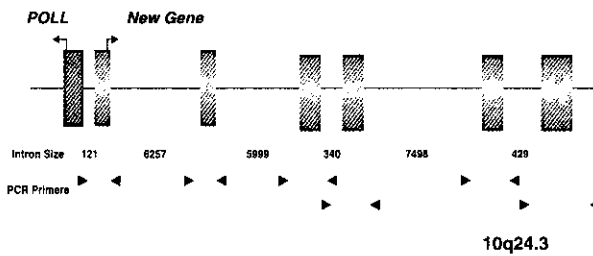


図6. ヒトPolλ遺伝子座上流に存在する新規遺伝子は8個のエクソンから構成されている。それぞれのエクソンを増幅するためのプライマーを示す。

を欠失したのもであった(図3)。これらの表現型の違いから、私たちが欠失した領域に別の遺伝子が存在しているのではないかと考えて、DNAデータベースで解析を進めたところ5'上流1 kb以内から逆向きに6つのエクソンからなる遺伝子が存在することが明らかとなった(図4)。この遺伝子は、ヒトにおいても同様にDNA Polymeraseλ遺伝子の上流に存在していた(図5)。この遺伝子は、下等なeukaryotesからヒトまで保存されており、少なくとも13のorthologuesが同定されている。また、鞭毛を持ったLeishmaniaやTrypanosomaにおいてもよく保存されており、精子の運動性に関与するMajor Sperm Proteinと相同性をもつドメインを有している。これらのことからこの5'上流の遺伝子が繊毛や鞭毛のDynein armの構成成分であり、この遺伝子の欠損がImmotile Cilia Syndromeの症状を呈する原因となってい

る可能性が高いと考えられた。

D. 結論

私たちが作成したPolλノックアウトマウスにおいて認められた脳室上衣細胞の繊毛の運動異常による水頭症の発症は、Polλ遺伝子の欠損によるものではなく、その上流に位置するMajor Sperm Proteinドメインを有する新規遺伝子の欠損によるものと考えられた。今後は、図6に示したようなプライマーを用いて、水頭症遺伝子バンクのDNAサンプルを用いてこの新規遺伝子の異常を検討していきたい。

F. 文献

- 1) Aoufouchi S, Flatter E, Dahan A, Faili A, Bertocci B, Storck S, Delbos F, Cocca L, Gupta N, Weill JC, Reynaud CA. Two novel human and mouse DNA polymerases of the polX family. *Nucleic Acids Res.* 28: 3684-3693, 2000.
- 2) Garcia-Diaz M, Dominguez O, Lopez-Fernandez LA, de Lera LT, Saniger ML, Ruiz JF, Parraga M, Garcia-Ortiz MJ, Kirchhoff T, del Mazo J, Bernad A, Blanco L. DNA polymerase lambda (Pol lambda), a novel eukaryotic DNA polymerase with a potential role in meiosis. *J. Mol. Biol.* 301: 851-867, 2000.
- 3) Nagasawa K, Kitamura K, Yasui A, Nimura Y, Ikeda K, Hirai A, Matsukage A, Nakanishi M. Identification and characterization of human DNA polymerase beta 2, a

DNA polymerase beta-related enzyme. *J. Biol. Chem.* 275: 31233-31238, 2000.

- 4) Kobayashi Y, Watanabe M, Okada Y, Sawa H, Takai H, Nakanishi M, Kawase Y, Suzuki H, Nagashima K, Ikeda K, Motoyama N. Hydrocephalus, Situs Inversus, Chronic Sinusitis, and Male Infertility in DNA Polymerase λ -Deficient Mice: Possible Implication for the Pathogenesis of Immotile Cilia Syndrome. *Mol. Cell. Biol.* 22: 2769-2776, 2002.
- 5) Bertocci B, Smet AD, Flatter E, Dahan A, Bories JC, Landreau C, Weill JC, Reynaud CA. DNA Polymerase μ and λ Are Dispensable for Ig Gene Hypermutation. *J. Immunol.* 168: 3702-3706, 2002.

ヒト発育小脳におけるモノクローナル抗体による 免疫組織化学的検討

聖マリア病院病理部¹ 久留米大学医学部化学² 産業技術総合研究所ティッシュエンジニアリング研究センター³
国立大阪病院 脳神経外科⁴ 慶應義塾大学医学部 生理学教室⁵

中村 康寛¹ 山本 統彦² 小田えり子² 金村 米博³ 山崎 麻美⁴ 岡野 栄之⁵

研究要旨

ヒト正常発育脳および13トリソミー例脳における2種類のモノクローナル抗体(FB-16, FB-27)をもちいた免疫組織化学的検討をおこなった。FB-16抗体はPurkinje細胞の発育マーカーとして有効で、FB-27抗体は外顆粒層、内顆粒層細胞のマーカーである事がわかった。また水頭症を合併する奇形症候群の13トリソミーでよく見られる小脳の異所性ニューロンに関しては、Purkinje細胞型、顆粒層ニューロン型の両者が混在、または単独で見られるタイプがある事が示唆された。Purkinje細胞は第4脳室壁の小脳板由来で、外顆粒層はその小脳板から側方に移動し小脳表面に形成され、さらにそこから内方に遊走し内顆粒層が生じるという小脳発生、発育の表現型としてもこれらの抗体が有用であることが示唆された。

A. 研究目的

平成11-13年度に、大脳発育、特に脳発育の指標としてのRadial fiber (RF)に着目し、種々のマーカーを検討した¹⁻³⁾。その中でもvimentin, GFAP, variant VLDLRそして胎齢14日の胎仔ラット脳を免疫原として得られたモノクローナル抗体 KNY-379 (抗Tubulin beta II抗体)の有用性を論じてきた。その結果、さらに種々の脳発育マーカーが必要である事を痛感したので、ヒト胎児脳のhomogenatesを免疫原として脳組織切片で免疫染色で検討できるモノクローナル抗体を作製することにした。また得られた抗体で、免疫組織化学的検索をヒト発育大脳、小脳、脳幹切片で行い、その分布の特徴を検討した。

B. 研究方法

国立大阪病院より提供された胎齢9週脳のhomogenatesを免疫原としてRibiアジュバントとのエマルジョンを、BALB/cマウスの足底皮下に3回注射した。腫大

した鼠径部リンパ節から得られたリンパ球とマウス形質細胞腫株FO 1細胞とを細胞融合して得られたハイブリドーマ細胞の培養上清を用い、胎齢14週の子鼠胎児脳のパラフィン包埋切片で、組織的スクリーニングを行った。選択された陽性クローンを3回サブクローニングし、マウス腹腔に植え、腹水を得た。このようにして得られたモノクローナル抗体を用いて、2段階avidin-biotin法(ニッスイ社製)により免疫組織化学的染色を行った。なお核染は原則として行っていない。

平成13年度検索した奇形等の重症の合併症のないヒト胎児新生児、及び成人脳のうち20例と乳幼児3例、13トリソミー4例のパラフィン包埋切片を免疫組織化学的検索対象とした。今回の検索では大脳組織のみならず、脳幹部、小脳組織も検索の対象とした。使用した抗体は、8種類であったが、このうち2種類(FB-16, FB-27)は小脳発育を検討するうえでも有用と考えられたので、その結果を今回は詳述する。

(倫理面への配慮)

本研究では、ヒト胎児、新生児脳を研究に用いるため倫理的配慮を要する点がある。そのために病理解剖例に関しては、聖マリア病院倫理委員会の審議をとおして、剖検承諾書に世界医師会のヘルシンキ宣言に基づき医学研究に供される旨、家族に承諾を得たうえで本研究にもちいた。また国立大阪病院症例に関しては国立大阪病院医学倫理委員会に「先天性水頭症の分子生物学的メカニズム解明と治療法開発」研究における倫理審査を申請し、平成11年11月17日に承認された⁴⁾。

C. 研究結果

正常発育小脳でのFB-16, FB-27抗体を用いた免疫組織化学的検索結果

FB-16抗体を用いた免疫組織化学的検索では、胎齢18週、20週小脳では分子層、Purkinje層に陽性。External granular layer (EGL)は陰性。26週～30週ではPurkinje細胞とそのdendriteに陽性になり(図1)、35週、41週例ではPurkinje細胞とそのdendriteの全長が強陽性になる。EGL, 歯状核neuronは陰性。生後2ヶ月、6ヶ月、1歳、成人脳でも同様にPurkinje細胞とそのdendriteが強陽性であるが、白質にも陽性になり、神経路のaxonにも陽性と考えられる。glia系には陰性。

FB-27抗体を用いた免疫組織化学的検索では、胎齢18週、20週小脳では、第4脳室壁のGerminal matrix layer (GML), EGL, Internal granular layer (IGL)に陽性(特にEGLで強陽性)。26週～30週ではEGLと共にIGL, 歯状核他の神経細胞にも陽性(図1)。Purkinje層にもこの時

(図1) 胎齢27週小脳皮質

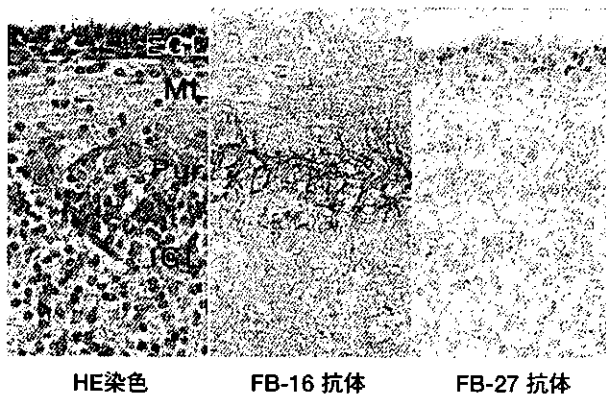


図1：胎齢27週小脳皮質。HE染色では、外顆粒層(EGL)、分子層(ML)に遊走中の内顆粒層型ニューロンをみ、Purkinje層(Pur)には幼弱なPurkinje細胞をみ、内顆粒層(IGL)も見られる。FB-16抗体では、Purkinje細胞の胞体とまだ未発達 dendriteに陽性所見を見る。FB-27抗体ではEGLと、分子層、Purkinje層を遊走中の顆粒型neuron、IGLに陽性所見を見る。

期に陽性細胞が混在する事もあるが、Purkinje細胞とそのdendriteには陰性で、陽性細胞はEGLからIGLへ遊走中の顆粒型neuronと考えられる。35週、41週例ではEGL, IGL細胞に陽性。生後2ヶ月、6ヶ月では僅かに残存するEGLに陽性、IGLに弱陽性。成人脳ではIGLの少数の細胞に陽性。白質の神経路axon及びgliaにも陽性となる。

正常発育大脳、脳幹でのFB-16, FB-27抗体を用いた免疫組織化学的検索結果

大脳では、FB-16による免疫組織化学的検索で、藤田の第Ⅱ期⁵⁾の初期(胎齢7-8週)では全層性に陽性であるがMolecular layer (ML)に強い。Cortical plate (CP)ではやや弱い。Intermediate zone (IMZ)やependymaには強く陽性。Radial fiber (RF)にも弱く陽性。15週くらいからはMLに強陽性で、神経路にも陽性。CPのRFにも陽性。GMLには比較的弱い。藤田の第Ⅲ期にはML, IMZの神経路、ependyma, subependymaには陽性所見が残る。その後は染色性が弱くびまん性になる。FB-27による免疫組織化学的検索では第Ⅱ期には全層の細胞表面に陽性。Matrix layer (Mat), CPで特に強い(Matrix cells, neuroblasts, CPの1, 2層に強く陽性)。GMLではependyme側が強く陽性。MLの最表層にも陽性細胞(Cajal Retzius cellsか?)。Neuronに強陽性。Glialにも陽性。18週脳ではsubmatrix layer (SML)のglialにも陽性。第Ⅲ期では諸核の神経細胞に明らかに陽性になる。その後諸核neuronの強陽性所見が残る。

脳幹部ではFB-16は神経路に陽性。末梢神経、網膜、鼻粘膜にも陽性(嗅細胞に陽性)であるが、その他の組

(図2) 小脳異所性神経細胞

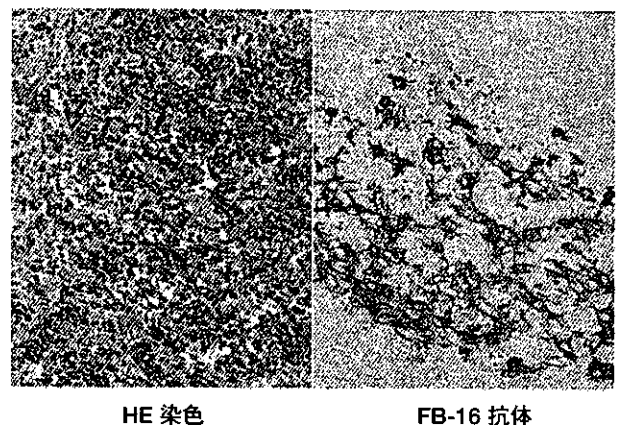


図2：13トリソミー小脳の異所性神経細胞巢で、HE染色では顆粒型と大型のニューロンが混在している。FB-16抗体では大型ニューロンのみが陽性となる。

織では陰性で、神経系に比較的特異的と考えられる。FB-27は脳幹部では諸核の神経細胞に強陽性。網膜、鼻粘膜、脊髄傍神経節に陽性。さらに、腺上皮、線維性結合織、脈絡叢上皮、気管支、肺胞上皮等にも陽性で、神経系に特異的ではない。

13トリソミー症例小脳でのFB-16, FB-27抗体を用いた免疫組織化学的検索結果

13トリソミーでよくみられる小脳のNeuronal heterotopiaでのFB-16, FB-27抗体による免疫組織化学的検索を行った。小型の顆粒細胞型、紡錘形細胞型、大型のニューロンが混在する病巣が多いこの小脳のNeuronal heterotopia巣においても、Purkinje細胞型ではその胞体とdendriteにFB-16抗体で陽性に染まり(図2)、顆粒型neuronにはFB-27が陽性に染まる。

D. 考察

平成11-13年度の研究で、既存の脳発育マーカーと、我々が作製した2つのマーカーにより免疫組織化学的にヒト発育期大脳の検索を行い、いくつかの問題点を明らかにしてきた⁶⁾。今後はStem cell/ matrix cell (S/M cell)からの分化の各段階での細胞、組織マーカーをなるべく多く見だし、骨髄由来細胞におけるCDシリーズのように、S/M cellの分化系統樹の作製といったような作業が必要と考えられる。そのためにはより多くの脳発育分化マーカーを得ることが必須と考えられる。今回のヒト胎児脳のhomogenatesを免疫原として得られた数種類のうちFB-16, FB-27は発育大脳、脳幹部の発育マーカーとしても有用であるが、特に小脳の発育に関して有用かつユニークなマーカーとなりうる事が示唆された。

小脳の発生、発育に関する研究は系統だったものは少ないが、藤田らは次のように述べている。マウス小脳においては、大脳と同じように、胎生期に第4脳室壁のmatrix layerから第II期にPurkinje細胞、小脳核ニューロン、箆ニューロンが作られ、その後第III期にほとんどのgliaが産生される。これに遅れて菱脳唇のmatrix layerから外matrix cellsが脳軟膜下を遊走しEGLを形成し、EGL細胞は独自の第1-3期を経過した後生後消失する。この第2期にEGLからIGL neuronが作られ内側に遊走してIGLを形成する。また第3期にごくわずかのgliaも産生されるとした⁷⁾。他の報告も第II期、第2期でのニューロンの形成に関してはほぼ同じ見解であるがgliaの発生に関しては見解が異なる⁸⁾。

今回のわれわれの検索では、FB-16抗体はヒト発育期脳のPurkinje細胞の良いマーカーであることが解った。いままでPurkinje細胞のマーカーとしてはguanosine 3':5'-phosphate-dependent protein kinase⁹⁾、spot 35 protein¹⁰⁾、inositol 1, 4, 5-triphosphate type 1 receptor (P400 protein)¹¹⁾等が知られている。FB-16抗体による免疫染色では胎齢18週、20週では分子層、Purkinje層に陽性であるが、Purkinje細胞とそのdendriteに明らかに陽性になるのは胎齢26週以後であり、この時期にPurkinje細胞の分化が明らかになると考えられる。以後成人まで、Purkinje細胞の染色性は保たれ、さらに遠心性神経線維に陽性所見が現れると考えられる。FB-16抗体で認識される抗原は神経組織に特異的のようである。

一方でFB-27はEGL, IGL, 特にEGLの良いマーカーである事が解った。EGLのマーカーとしてはD1.1 antigen¹²⁾、4C5 antigen¹³⁾、TAG-1¹⁴⁾等が知られている。FB-27抗体による免疫染色では、GML, EGL, IGLに陽性で、さらに歯状核neuron, 後にはgliaにも陽性になり、多分化のマーカーであるように思われる。また神経系以外の組織にも陽性で、広範な組織に発現している抗原が示唆される。今後はEGL由来とされるMedulloblastoma等の未熟な脳腫瘍での発現の検索も必要であろう。

このような発生由来が異なるPurkinje細胞、顆粒細胞に特異的な抗体を用いて小脳の神経細胞遊走障害の1つである小脳のNeuronal heterotopiaの構成細胞の由来を推定する事が出来る。小脳のNeuronal heterotopiaの構成細胞は3つの型があり、顆粒細胞型(IGL細胞に類似)、紡錘形細胞型(EGL細胞に類似)、大型の神経細胞型であり、これらが単独に、または混合して見られる。正常発育脳でも見られるが、13トリソミー、18トリソミー例の小脳では高頻度にみられ、これら奇形症候群では、しばしば3型の細胞が混在している¹⁵⁾。われわれの今回の検討では、13トリソミー例で、3つの構成細胞が混在した型が殆どで、そのうち大型ニューロンはFB-16抗体で陽性で、Purkinje細胞由来が示唆された。また顆粒型、紡錘形細胞型はFB-27が陽性で、EGL, IGL細胞由来が示唆された。すなわち13トリソミーに見られる小脳のNeuronal heterotopia巣では発生過程の異なる2種類のニューロンが混在している事になり、それぞれの細胞の相互関係を考えるうえで、大変興味深く、今後の課題となるであろう。

D. 結論

2種類のモノクローナル抗体は、発生、発育過程の異なるPurkinje細胞、外、内顆粒層細胞のよいマーカーとなる事が示唆された。今後はこれらの抗体が認識する抗原蛋白質の解析、さらにその役割について検討していく事が重要と考えられる。

F. 文献

- 1) 中村康寛、山本統彦、熊丸えり子：胎生期正常脳発育における Radial fiberの免疫組織化学的検討。厚生科学研究費補助金特定疾患対策研究事業 難治性水頭症調査研究班 平成11年度研究報告書 30-34, 2000.
- 2) 中村康寛、山本統彦、熊丸えり子：ヒト発育期脳におけるTubulin beta IIとVLDL receptorの発現。厚生科学研究費補助金特定疾患対策研究事業 難治性水頭症調査研究班平成12年度研究報告書 22-25, 2001.
- 3) 中村康寛、山本統彦、小田えり子、金村米博、山崎麻美、岡野榮之：ヒト正常発育脳および水頭症脳における脳構築の変化。厚生科学研究費補助金特定疾患対策研究事業 難治性水頭症調査研究班 平成13年度研究報告書 63-66, 2002.
- 4) 山崎麻美：先天性水頭症の分子生物学的メカニズム解明と治療法開発。倫理面への配慮。厚生科学研究費補助金特定疾患対策研究事業 難治性水頭症調査研究班 平成12年度研究報告書 6, 2001.
- 5) Fujita S: Transitory differentiation of matrix cells and its functional role in the morphogenesis of the developing vertebrate CNS. In: Current Topics of Developmental Biology (ed. TS Okada), Academic Press, N.Y., 1986, pp223-242
- 6) Nakamura Y: Architectural changes in the developing human brain based on the matrix cell theory. *Congenital Anomalies* 42: 167-174, 2002.
- 7) Fujita S, Shimada M, Nakamura T: H3-thymidine autoradiographic studies on the cell proliferation and differentiation in the external and the internal granular layers of the mouse cerebellum. *J Comp Neurol* 128: 191-208, 1966.
- 8) Rakic P: Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. *J Comp Neurol* 141: 283-312, 1971.
- 9) Lohmann SM, Walter U, Miller PE, Greengard P, De Camilli P: Immunohistochemical localization of cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 653-657, 1981.
- 10) Takahashi-Iwanaga H, Kondo H, Yamakuni T, Takahashi Y: An immunohistochemical study on the ontogeny of cells immunoreactive for spot 35 protein, a novel Purkinje cell-specific protein, in the rat cerebellum. *Brain Res* 394: 225-231, 1986.
- 11) Maeda N, Niinobe M, Mikoshiba K: A cerebellar Purkinje cell marker P400 protein is an inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP3) receptor protein. Purification and characterization of InsP3 receptor complex. *EMBO J* 9: 61-67, 1990.
- 12) Levine JM, Beasley L, Stallcup WB: The D1.1 antigen: a cell surface marker for germinal cells of the central nervous system. *J Neurosci* 4: 820-831, 1984.
- 13) Thomaidou D, Dori I, Patsavoudi E: Developmental expression and functional characterization of the 4C5 antigen in the postnatal cerebellar cortex. *J Neurochem* 64:1937-1944, 1995.
- 14) Bizzoca A, Virgintino D, Lorusso L, Buttiglione M, Yoshida L, Polizzi A, Tattoli M, Cagiano R, Rossi F, Kozlov S, Furley A, Gennarini G: Transgenic mice expressing F3/contactin from the TAG-1 promoter exhibit developmentally regulated changes in the differentiation of cerebellar neurons. *Development* 130: 29-43, 2003.
- 15) Larroche JC, Encha-Razavi: Cerebellar heterotopia In E. Gilbert-Barness (Ed.), *Potter's Pathology of the Fetus and Infant*. Mosby St, Louis: 1997, pp 1076-1079.

L1CAM遺伝子改変マウスにおける中枢神経系発達異常に関する研究

京都市立医科大学附属脳・血管系老化研究センター病態病理学部門

伊東 恭子 矢追 毅 山中 巧 伏木 信次

研究要旨

神経細胞接着分子L1は、その細胞外領域で、様々な細胞外リガンドと結合することにより、その細胞接着機能を発揮する。6番目のIgドメインはL1同士ホモフィリック結合、integrinとのヘテロフィリック結合に関与するドメインとして重要な機能を担っている。我々は、L1蛋白の細胞外に位置する6番目のイムノグロブリン(Ig)ドメインのみを欠如したマウス(6D)を作成し、詳細な脳の形態学的検索を行った。6Dノックインマウスでは、*in vitro*の培養系では、小脳顆粒細胞がL1同士ホモフィリック結合を欠いているにも拘らず、*in vivo*では、正常な脳発達、伝導路形成が見られ、軸索ガイダンス、神経細胞遊走に異常がないことが示された。このことより、*in vivo*における正常な軸索ガイダンスには、6番目のイムノグロブリン(Ig)ドメインを介したL1同士ホモフィリック結合、integrinとのヘテロフィリック結合は重要でないことが示唆された。

A. 研究目的

神経細胞接着分子L1は、主として発生期中枢及び末梢神経系組織に発現し、神経細胞の遊走、軸索伸長とガイダンスなど神経発生過程において重要な役割を担っている^{1,2,3,4)}。L1遺伝子はヒト、マウスなどではX染色体上に位置し、L1遺伝子変異によるヒト遺伝性神経疾患としてX連鎖性水頭症、MASA症候群、X連鎖性対麻痺などが知られ、その共通する表現型は神経軸索路の形成異常である^{5,6,7,8,9)}。他方L1遺伝子ノックアウトマウスの表現型は、先天性水頭症、脳梁形成不全、皮質脊髄路異常、視床癒合、小脳虫部低形成であり、L1遺伝子異常に伴うヒト水頭症のモデル動物として研究が進められている^{10,11,12)}。しかしながら、水頭症の発生病理は依然として不明で、しかもL1遺伝子改変マウスを対象とする*in vivo*での神経発生に関する研究は皆無である。

L1は細胞外領域で、様々な細胞外リガンドと結合する

ことにより、その細胞接着機能を発揮する。中でも6番目のIgドメインはL1同士ホモフィリック結合、integrinとのヘテロフィリック結合に関与するドメインとして重要な機能を担っている¹³⁾。我々は、L1遺伝子のexon 12、13、14を消去することによりL1蛋白の細胞外に位置する6番目のイムノグロブリン(Ig)ドメインのみを欠如したマウス(6D)を作成した。本研究は、6Dマウスの中枢神経系発生過程を、詳細かつ多角的に解析し、L1遺伝子異常に基づく水頭症発症のメカニズムを明らかにしようとするものである。

B. 研究方法

1. 6Dマウスの作成

cre loxpアプローチを用いて、L1遺伝子のexon 12、13、14を選択的に消去し、その結果、L1-L1ホモフィリック結合部位のひとつであるL1蛋白の6番目のIgドメインのみを欠如したノックインマウス(6D)を作成した。FACS

analysisでは、6Dマウスからの脾臓リンパ球は、L1の6番目のイムノグロブリン(Ig)ドメインを欠如しているが、L1の他の重要なドメインは正常に発現していた。コントロールとしては、loxpサイトを有するが、正常に6番目のIgドメインを発現したマウスを用いた。

6Dマウスは129/SvJあるいはC57BL/6Jを遺伝背景として、5-10世代のもとし交配を行った。

2. 培養細胞による細胞接着アッセイ

129/SvJを遺伝背景とした6Dマウス及びコントロールマウスから分離された小脳顆粒細胞を、ラミニンあるいはL1-Fcをコートした培養皿に播き、細胞接着、軸索伸長を検索した。

3. 肉眼的、組織形態学的検索

成マウス(8週齢)は、4%パラホルムアルデヒドで灌流固定後、脳および脊髄神経を摘出、数時間の後固定後、一部はパラフィン包埋し5 μ m連続切片を作成、他は10 μ m凍結切片を作成した。形態学的解析に関して、通常のヘマトキシリンエオジン染色、ニッスル染色に加え、免疫組織化学的染色、*in situ* hybridizationを施行した。免疫組織化学は、神経細胞の分化、シナプス形成の指標として、Neurofilament、Tau1、MAP2、Synaptotagmin、Calbindin、Parvalbumin、Calretinin、特定のニューロトランスミッターを発現した神経細胞への分化を見る指標として、Tyrosine hydroxylase、Substance P、CGRP、Neuropeptide Y、GluR2/3、アストログリアの指標としてGFAPを用いた。大脳、海馬、視床、基底核、脳幹、小脳、脊髄神経に関して詳細に検索した。

4. DiIおよびDiAによる軸索標識

a. 皮質脊髄路

成マウス(8週齢)は麻酔下に、皮膚切開、頭蓋骨に骨窓を開け、一側の運動領皮質にごく少量のDiIクリスタルを注入、他側の運動領皮質に同量のDiAを注入後、皮膚を縫合した。術後6-8週間して動物を灌流固定後、脳、脊髄神経を摘出し、ピプラトームにて70-100 μ m切片を作成し蛍光顕微鏡で観察した。

b. 皮質視床路、および視床皮質路

成マウス(8週齢)は灌流固定後、脳を摘出、視床背側核あるいは後頭葉視覚領にごく少量のDiIクリスタルを注入、37 $^{\circ}$ Cで、固定液中に放置し、2-4週間後にピプラトームにて100 μ m切片を作成し蛍光顕微鏡で観察した。

c. 網膜視蓋路

成マウス(8週齢)は麻酔下に固定し、一側の網膜側頭部に0.01 μ lのDiI溶液を注入、術後1週間にて動物を灌流固定後、脳を摘出し、ピプラトームにて100 μ mの矢状断切片を作成し蛍光顕微鏡で観察した。

C. 研究結果

1. 培養細胞による細胞接着アッセイ

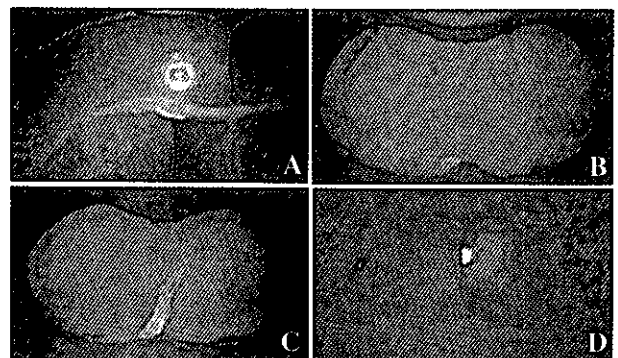
129/SvJを遺伝背景とした6Dマウスの小脳顆粒細胞はラミニンをコートした培養皿上では、コントロールマウスと同様に接着し、軸索伸長を示したが、L1-Fcをコートした培養皿上では、全く細胞接着、軸索伸長を示さなかった。これは、6Dマウスの神経細胞がL1-L1ホモフィリック結合能を欠いていることを意味する。

2. 肉眼的、組織形態学的検索

129/SvJを遺伝背景とした6Dマウスの脳は、肉眼的に正常構造を示し、水頭症、小脳低形成は見られなかった。組織学的には、大脳皮質の層構造、海馬、基底核、視床、脳幹諸核、小脳、脊髄神経に異常は見られなかった。免疫組織化学的にも、大脳皮質神経細胞の樹状突起、軸索の発達、GABA作動性ニューロンの分布、海馬錐体細胞の軸索、樹状突起の形態、脳幹のドパミン作動性ニューロンの分布、小脳プルキンエ細胞の樹状突起発達、脊髄後根神経節細胞の軸索投射は正常であった。大脳白質、脳梁、交連線維、内包、延髄錐体、脊髄上行および下行路は正常に形成されていた。

3. DiIおよびDiAによる軸索標識

129/SvJを遺伝背景とした6Dマウスの脳では、皮質脊髄路(図)、皮質視床路および視床皮質路、網膜視蓋路の走行路、投射には異常がなく、軸索ガイダンス、束形成は正常と考えられた。



図説明：6Dマウスの皮質脊髄路のDiIラベリング

6Dマウスの皮質脊髄路は、DiI注入側の内包、大脳脚を下行し、延髄下部錐体交叉で、対側の延髄背側に投射し、脊髄後索を下る。A：DiI注入サイト B：橋 C：錐体交叉 D：脊髄神経(第6頸髄)