

る様々な部位の脳における、各種神経細胞の形態を染色する。そして、ニューロルシダシステムを用いて、個々の神経細胞の神経突起構造を全て入力し、様々なパラメータで統計処理を行い、神経細胞形態の異常を検出する。また、各種神経細胞種マーカーを用いてそれぞれの神経細胞の位置を可視化し、その細胞体の配置について解析する。

(電気生理学的解析)

IER および野生型ラット個体において、扁桃体での誘発刺激閾値について測定する。また、扁桃体の頻回刺激によるキンドリング形成の完成のしやすさについても測定する。さらに、海馬スライスにおいて、paired pulse facilitation について調べる。

(倫理面への配慮)

利用するラット個体は、麻酔をかけてから速やかに処理をし、動物に苦痛が生じないように配慮している。

C. 研究成果

(解剖学的解析)

ゴルジ染色法によって、脳の各部位の個々の神経細胞の形態について解析し、以下の結果を得た。

(1) IER では、大脳皮質の特に第5層の錐体神経細胞では、樹状突起の形態が未熟で、突起の長さも分岐も野生型よりもかなり減少していた。

(2) 扁桃体の spiny neuron (興奮性神経細胞と考えられる) も non-spiny neuron (抑制性神経細胞と考えられる) も、IER では樹状突起の形態が未熟で、突起の長さも分岐も野生型よりもかなり減少していた。

(3) 海馬においては、CA1、CA3 の神経細胞の樹状突起の形態に軽微な異常が認められた。(細胞体から出た樹状突起が第一分岐にさしかかるまでの距離が短くなっていた。)

(4) 大脳皮質、海馬において、神経細胞の樹状突起の異常な束化を観察した。

(電気生理学的解析)

電気生理学的解析により、以下の結果を得た。

(1) 扁桃体における誘発刺激閾値が IER で優位に低下していることを見いだした。これは、扁桃体での興奮性が、異常に上昇していることを示唆していた。

(2) 扁桃体刺激によるキンドリングが、IER では遙かに少ない日数で完成することが明らかになった。これも、扁桃体から海馬および大脳皮質へ至る神経回路が興奮しやすくなっていることを示唆していた。

(3) 扁桃体において、特に複数回の刺激を行った際に IPSC の顕著な低下が認められたことから、IER の扁桃体における抑制系の機能の低下が認められた。

(4) IER の海馬スライスにおいて CA3 から CA1 への入力における paired pulse facilitation の顕著な低下が認められた。

D. 考察

本研究から、IER において、大脳、海馬、扁桃体などの脳領域の神経細胞の形態異常が認められた。特に、樹状突起の形成が未発達であること、さらには異常な束化が認められることから、本来の神経回路が果たす情報処理がうまくいかない可能性が高い。特に扁桃体では、抑制性神経細胞の形態異常が認められると同時に、抑制性神経細胞系の機能低下も検出された。実際に、扁桃体全体の誘発刺激閾値の低下からも明らかである。IER では、扁桃体を初発とするてんかん発作が生じることが最も多いので、この形態学的・生理学的異

常が IER のてんかん様症状の直接的な原因となっているのではないかと考えられる。

また、海馬においては paired pulse facilitation の異常が認められた。もしかするとこれは、海馬のシナプス機能にも異常があるかもしれないことを示唆しているが、今の段階ではそれを確定できるデータは持ち合わせていない。しかし、この海馬での機能異常や、大脳皮質における神経細胞形態の異常が、IER における記憶・学習障害や社会性行動障害などに関与しているのではないかと、考えられた。

実際に、主任研究者の星野幹雄の研究により、IER の原因遺伝子である Epi-IER が海馬神経細胞の突起進展や分岐促進に働いていることが示唆されているが、それは今回の私のデータとも整合性がある。それらを総合すると、IER では Epi-IER 蛋白質の機能が失われた結果、大脳、海馬、扁桃体などでの神経細胞の形態形成がうまくいかず、その結果としてその神経回路の機能が損なわれ、発達障害やてんかん様の症状が引き起こされているのではないかと、と考えられる。

E. 結論

IER の大脳皮質、海馬、扁桃体などにおいて、神経細胞の特に樹状突起の形成不全を検出した。また、扁桃体の抑制性神経細胞システムの機能が低下しているということ、扁桃体が興奮しやすい状態にあること、海馬での paired pulse facilitation が低下していることなどを、電気生理学的に明らかにした。

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野））
分担研究報告書

精神遅滞バイオリソースの整備と Epi-IER 遺伝子の異常によるヒト疾患の同定

研究分担者 後藤雄一

国立精神・神経医療研究センター 神経研究所
疾病第二部 部長

研究要旨

国立精神神経医療研究センターでは、厚生労働省精神・神経疾患研究委託費（後藤雄一班）の活動として、精神遅滞家系の血液 DNA およびリンパ芽球の試料と臨床症状の情報を合わせた『精神遅滞リサーチリソース』を蓄積してきており、それは平成 23 年度末の段階で累計 421 家系に達している。本研究では、イハラてんかんラット（IER: Ihara epileptic rat）の原因遺伝子として同定された Epi-IER 遺伝子の異常によって引き起こされるヒト精神遅滞あるいはてんかん症例を見つけることを目的とする。

まずは各症例のリンパ芽球を培養し、そこから RNA を抽出し、cDNA を合成することによって、精神遅滞リサーチリソースに RNA および cDNA のバイオリソースを加えることとした。このバイオリソースを用いることで、各症例において様々な遺伝子の発現量を調べることができる。平成 23 年度からこのバイオリソース調製を初め、年度末の段階で 215 検体の RNA と cDNA の作製を完了した。また、この cDNA サンプルを用いて、各症例における Epi-IER 遺伝子の発現量を定量 PCR を用いて測定することを開始した。平成 24 年度以降は、引き続き残りの症例の RNA・cDNA バイオリソース調製を行うと共に、Epi-IER の発現量解析、そして Epi-IER ゲノムのシーケンス解析を行うことによって、Epi-IER 異常によるヒト精神遅滞およびてんかん症例の同定に努める。

A. 研究目的

国立精神神経医療研究センターでは、厚生労働省精神・神経疾患研究委託費（後藤雄一班）の活動として、精神遅滞家系の血液 DNA およびリンパ芽球の試料と臨床症状の情報を合わせた『精神遅滞リサーチリソース』を蓄積してきており、それは平成 23 年度末の段階で累計 421 家系に達している。本研究では、イハラてんかんラット（IER: Ihara epileptic rat）の原因遺伝子として同定された Epi-IER 遺伝子の異常によって引き起こされるヒト精神遅滞あるいはてんかん症例を見つけることを目的とする。

B. 研究方法

(1) ヒトリンパ芽球デポジトリーからの RNA 精製

ヒトリンパ芽球（ 1×10^6 細胞）から、カラム式の High Pure Isolation RNA Kit (Roche) を用いて DNaseI 処理を行い、RNA を約 $15 \mu\text{g}$ 精製する。

(2) 精製した RNA からの cDNA 作成

精製した RNA の一部を、ReverTra Ace qPCR RT Kit (TOYOBO) を用いて逆転写反応させ、cDNA を作成する。cDNA の濃度は約 $50\text{ng}/\mu\text{L}$ にし、1 サンプルにつき $100 \mu\text{L}$ 作成する。

(3) RNA&cDNA バイオリソースの管理

作成した RNA と cDNA は、1 サンプルにつき、

- ・ RNA 50 μ L/1 本
- ・ 中期保存用 cDNA 50 μ L/1 本
- ・ 外部機関持ち出し用 cDNA 10 μ L/3 本

の計 5 本を、一家系で一箱にまとめて-80℃で保存する。

それとは別に、外部機関持ち出し用に RNA 10 μ L/2 本を-80℃で保存する。先に作った 100 μ L の cDNA のうち、残った cDNA 20 μ L は、研究部での実験用として別のチューブにストックし、-20℃で保存しておく。(図 1)

(4) Real-time PCR による Epi-IER の定量

蛍光標識プローブに TaqMan プローブを、RealTimePCR には Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System を使用して、実験用に作成した cDNA を用い RealTimePCR を行う。内在コントロールとして Actin を用い、標的遺伝子 Epi-IER の発現量と Actin の発現量を比較して、サンプルごとの遺伝子 Epi-IER の発現量を解析する。

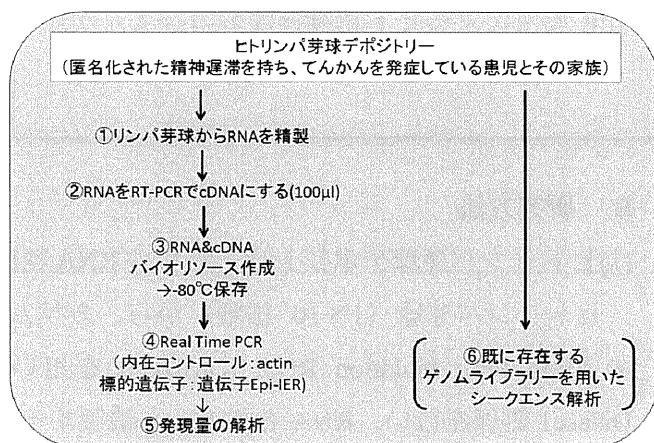


図 1: バイオリソース作成手順

C. 研究成果

(1) RNA および cDNA バイオリソースの構築

病院各診療科及び臨床検査部、TMC 臨床開発部バイオリソース管理室と連携し、「精神遅滞リサー

チリソース」の各症例のリンパ芽球より各種遺伝子発現検索をするための RNA および cDNA バイオリソースシステムを構築した。

平成 23 年末までに、合計で 215 症例 (215 検体) の RNA および cDNA の調製が完了した。引き続き次年度以降も残りの症例について調製を続ける。

(2) Epi-IER 遺伝子の発現量の解析

上記(1)で構築された cDNA バイオリソースを用いて、定量 RT-PCR 法によって、各症例のリンパ芽球における Epi-IER 遺伝子の発現量を定量した。平成 23 年度末時点において、189 症例についての定量を終えた。次年度以降も引き続き残りの症例における発現量の定量を続ける。

D. 考察

本研究により、これまでの「精神遅滞リサーチリソース」に対して、さらにリンパ芽球の RNA および cDNA をバイオリソースとして加えることができた。このバイオリソースを用いれば、それぞれの症例のリンパ芽球におけるあらゆる遺伝子の発現量を調べることができる。確かに、リンパ芽球での発現が、必ずしも脳神経系での発現と相関があるとは限らない。しかし、例えば IER のようにゲノム上のスプライシング異常を引き起こす突然変異が入ったような場合には、組織を問わず発現量に影響が出るはずであるから、このバイオリソースはやはり、有効かつ貴重であると考えている。RNA・cDNA バイオリソースは今なお作製中であり、順調に進めば平成 24 年度中には全ての症例について調製することができるであろう。

また、cDNA バイオリソースを用いた Epi-IER 遺伝子発現の定量についても、順調に進んでおり、平成 24 年度中にはほとんどの症例について定量

することができると思われる。Epi-IER 遺伝子の発現量が極端に高い、あるいは、低い症例については、さらに Epi-IER 遺伝子のゲノムを詳細に調べ、あるいは可能であれば、患者において網膜異常を疑わせる所見（視力低下や ERG 異常など）があるかどうかについても検討する。（IER では、網膜形成異常が認められるため。）さらに、将来的には次世代シーケンサーを用いて、全ての症例の Epi-IER 遺伝子ゲノムの配列を読むことも考えている。

E. 結論

本研究により、これまでの精神遅滞リサーチリソースに、さらに RNA・cDNA バイオリソースを加えることができた。また、その cDNA リソースを用いることで、Epi-IER の発現量の解析を開始することができた。次年度、次々年度も引き続き解析を行い、Epi-IER 遺伝子の異常によるヒト精神遅滞あるいはてんかん症例の同定に努めて行きたい。

G. 研究発表

1. 著書・論文発表

原著

- 1) Itoh M, Tahimic CGT, Ide S, Otsuki A, Sasaoka T, Noguchi S, Oshimura M, Goto Y, Kurimasa A. Methyl CpG-binding protein isoform MeCP2_e2 is dispensable for phenotypes but essential for embryo viability and placenta development. *J Biol Chem* 2012; 287 (17): 13859–13867.
- 2) Takeshita E, Saito Y, Nakagawa E, Komaki H, Sugai K, Sasaki M, Nezu A, Kitamura J, Itoh M, Sawano Y, Goto Y. Late-onset mental deterioration and fluctuating dystonia in a female patient with a

truncating MECP2 mutation. *J Neurol Sci* 2011; 308:168–172.

- 3) Miyake K, Hirasawa T, Soutome M, Itoh M, Goto Y, Endoh K, Takahashi K, Kudo S, Nakagawa T, Yokoi S, Taira T, Inazawa J, Kubota T. The protocadherins, PCDHB1 and PCDH7, are regulated by MeCP2 in neuronal cells and brain tissues: implication for pathogenesis of Rett syndrome. *BMC Neuroscience* 2011, 12:81 (<http://www.biomedcentral.com/1471-2202/12/81>).
- 4) Saito T, Hanai S, Takashima S, Nakagawa E, Okazaki S, Inoue T, Miyata R, Hoshino K, Akashi T, Sasaki M, Goto Y, Hayashi M, Itoh M. Neocortical layer-formation of the human developing brains and lissencephalies: consideration of layer-specific markers expression. *Cereb Cortex* 2011; 21:588-596.

著書（分担）

- 1) 後藤雄一: MELAS 症候群. 症候群ハンドブック, 中山書店, 東京, pp73-74, 2011
- 2) 後藤雄一: ミトコンドリア病. 小児科診療ガイドライン-最新の診療指針-第 2 版, 総合医学社, 東京, pp250-251, 2011
- 3) 後藤雄一: ミトコンドリア病. 標準神経病学第 2 版, 医学書院, 東京, pp46-52, 2012

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野））
分担研究報告書

ヒト「精神遅滞＋てんかん」の神経病理像の解析

研究分担者 伊藤 雅之

国立精神・神経医療研究センター 神経研究所

疾病第二部 室長

研究要旨

イハラてんかんラット（IER: Ihara epileptic rat）は生後から発達障害様症状（社会性行動異常、記憶・学習障害）を、5 ヶ月からてんかん症状を呈し約一年で死に至る原因不明の自然発症ラット突然変異体であり、ヒトの「精神遅滞を伴うてんかん」の良いモデルとなりうる。また、主任研究者星野の研究により、IER の原因遺伝子 Epi-IER が同定された。現在、分担研究者の後藤により「精神遅滞リサーチリソース」から、Epi-IER 遺伝子の異常によって引き起こされるヒト精神遅滞あるいはてんかん症例の探索が進められている。

本研究では、後藤により同定された Epi-IER 異常によるヒト症例について、手術標本や剖検標本を解析し、その疾患の病態に迫ることを最終目的とする。本年度は、まず、その準備段階として、実際のヒトの脳標本を用いて、大脳皮質の層構造についての評価方法を確立することを目的とした。具体的には、各層の特異抗体 (layer-specific markers) を用いて染色することで評価した。

A. 研究目的

イハラてんかんラット（IER: Ihara epileptic rat）は生後から発達障害様症状（社会性行動異常、記憶・学習障害）を、5 ヶ月からてんかん症状を呈し約一年で死に至る原因不明の自然発症ラット突然変異体であり、ヒトの「精神遅滞を伴うてんかん」の良いモデルとなりうる。また、主任研究者星野の研究により、IER の原因遺伝子 Epi-IER が同定された。現在、分担研究者の後藤により「精神遅滞リサーチリソース」から、Epi-IER 遺伝子の異常によって引き起こされるヒト精神遅滞あるいはてんかん症例の探索が進められている。

本研究では、同定された Epi-IER 異常によるヒト症例について、手術標本や剖検標本を解析し、

その疾患の病態に迫ることを最終目的とする。本年度は、まず、その準備段階として、実際のヒトの脳標本を用いて、大脳皮質の層構造についての評価方法を確立することを目的とした。具体的には、各層の特異抗体 (layer-specific markers) を用いて染色することで評価した。

B. 研究方法

正常脳組織（ヒト 19 週から 37 週と生後 1 か月齢）および滑脳症患者脳組織（10 ヶ月例）において、各種抗体を用いて免疫染色を行った。利用した抗体は、Layer-specific marker としてげっ歯類の研究が進んでいる SATB homeobox 2 (SATB2)、COUP-TF interacting protein 2 (CTIP2)、Forkhead box

protein P1 (FOXP1)、Cut homeobox like 1(CUTL1)、T-box brain 1 (TBR1)である。インフォームドコンセントは全ての症例について得ている。

C. 研究成果

①正常脳組織（ヒト胎齢 19 週から 37 週と生後 1 か月齢、1 歳）：19 から 25 週齢では、SATB2 陽性細胞が cortical plate(CP)浅部に、CTIP2、FOXP1 陽性細胞は CP 深部に、CUTL1 陽性細胞は CP 全層に分布していた。また、TBR1 陽性細胞は CP 浅部と subplate に分布していた。29 週以降では、SATB2 陽性細胞は II 層、CUTL1 陽性細胞は II から V 層、CTIP2 は V 層、FOXP1 陽性細胞は V 層、TBR1 陽性細胞は II、VI 層に特異的に発現していた。これらの発現パターンは、いままでの動物実験の結果に類似していた。生後 1 か月以降では、SATB2、CUTL1 陽性細胞のみ認められたが、層特異性はなくなった。

②10 か月の滑脳症の脳組織の滑脳症：FOXP1、TBR1 陽性細胞が浅層に観察された。つまり、これは大脳皮質の層構造の乱れを意味しており、さらには神経細胞移動の異常を示唆していると言える。

D. 考察

ヒト大脳皮質の形成過程でも、動物実験の報告と同様に層特異的分子が発現していた。今回検討した胎生中期から出生時期まで個々の分子の局在には変化がなかったが、乳児期早期にこれらの分子の発現はなくなるか層特異性が失われる。しかし、滑脳症では、Layer-specific markers の分布異常がみられ、神経細胞の移動障害を反映しているものと考えられた。また、生後では発現しないはずの marker の発現があり、神経細胞の成熟障害が存在するものと考えられた。

E. 結論

平成 23 年度の研究において、実際のヒトの脳組織を用いた免疫染色、およびそれによる大脳皮質の層構造の評価法は確立できた。今後、Epi-IER 遺伝子の異常によるヒト症例を同定した際には、インフォームドコンセントを得るなど倫理的問題点を解決した上で、その脳標本の解析を行って行きたい。

G. 研究発表

1. 著書・論文発表 原著

- 1) Itoh M, Tahimic CGT, Ide S, Otsuki A, Sasaoka T, Noguchi S, Oshimura M, Goto Y, Kurimasa A: Methyl CpG-binding protein isoform MeCP2_e2 is dispensable for phenotypes but essential for embryo viability and placenta development. *J Biol Chem* 2012; 287 (17): 13859–13867.
- 2) Suzuki Y, Ichinomiya S, Kurosawa M, Matsuda J, Ogawa S, Iida M, Kubo T, Tabe M, Itoh M, Higaki K, Nanba E, Ohno K: Therapeutic Chaperone Effect of N-Octyl 4-Epi-b-Valienamine on Murine GM1-Gangliosidosis. *Mol Genet Metab* 2012; 106: 92-98.
- 3) Kaido T, Otsuki T, Saito Y, Sugai K, Takahashi A, Kaneko Y, Sakakibara T, Saito Y, Takahashi H, Honda R, Nakagawa E, Sasaki M, Kakita A, Itoh M: Novel pathological abnormalities of deep brain structures including dysplastic neurons in anterior striatum associated with focal cortical dysplasia in epilepsy. *J Neurosurg Pediatr* 2012 (in press).
- 4) Kuki I, Kawawaki H, Okazaki S, Kimura S, Nakano T, Fukushima H, Inoue T, Tomiwa K, Itoh M: Progressive Leukoencephalopathy with Intracranial

- Calcification, Congenital Deafness and Developmental Deterioration. *Am J Med Genet A* 2011;155:2832-2837.
- 5) Takeshita E, Saito Y, Nakagawa E, Komaki H, Sugai K, Sasaki M, Nezu A, Kitamura J, Itoh M, Sawano Y, Goto Y: Late-onset mental deterioration and fluctuating dystonia in a female patient with a truncating MECP2 mutation. *J Neurol Sci* 2011; 308:168-172.
- 6) Miyake K, Hirasawa T, Soutome M, Itoh M, Goto Y, Endoh K, Takahashi K, Kudo S, Nakagawa T, Yokoi S, Taira T, Inazawa J, Kubota T: The protocadherins, PCDHB1 and PCDH7, are regulated by MeCP2 in neuronal cells and brain tissues: implication for pathogenesis of Rett syndrome. *BMC Neuroscience* 2011, 12:81 (<http://www.biomedcentral.com/1471-2202/12/81>).
- 7) Wang W, Takashima S, Segawa Y, Itoh M, Shi X, Hwang SK, Nabeshima K, Takeshita M, Hirose S: The Developmental Changes of Na_v1.1 and Na_v1.2 Expression in the Human Hippocampus and Temporal Lobe. *Brain Res* 2011;1389:61-70.
- 8) Honda T, Fujino K, Okuzaki D, Ohtaki N, Matsumoto Y, Horie M, Daito T, Itoh M, Tomonaga K: Upregulation of insulin-like growth factor binding protein 3 in astrocytes of transgenic 4 mice expressing Borna disease virus phosphoprotein. *J Virol* 2011; 85:4567-4571.
- 9) Saito T, Hanai S, Takashima S, Nakagawa E, Okazaki S, Inoue T, Miyata R, Hoshino K, Akashi T, Sasaki M, Goto Y, Hayashi M, Itoh M: Neocortical layer-formation of the human developing brains and lissencephalies: consideration of layer-specific markers expression. *Cereb Cortex* 2011; 21:588-596.
- 総説
高嶋幸男, 伊藤雅之, 小保内俊雅: 発達障害の脳組織バンクの重要性と課題. *医学のあゆみ* 2011;239(6):627-630.
- 著書 (分担)
伊藤雅之: 急性脳症の病理. *小児科臨床ピクシス* 28 急性脳炎・脳症, 中山書店, 東京, 16-21pp., 2011.
2. 学会発表
1) 伊藤雅之: レット症候群の研究最前線. 第53回日本小児神経学会 シンポジウム 3, 横浜, 5.26, 2011.
2) Itoh M, Okazaki S, Kawawaki H, Inoue T, Goto Y: Abnormal distribution of GABAergic interneurons leads to the epileptogenesis: Interneuron pathology associated with ARX mutation. Prague Symposium of Child Neurology and Developmental Epileptology. Prague, Czech Republic, 3-5, November, 2011.
3) 伊藤雅之: レット症候群 治療の試み. レット症候群シンポジウム 2011「レット症候群の基礎・臨床研究から治療へ」, 大阪, 12.4, 2011.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
<u>星野幹雄</u>	小脳皮質のないマウス 「セレベレス」	三品昌美	モデル動物利用 マニュアル 疾患モデルの作製と 利用－脳・神経疾患	エル・アイ・ シー	東京	2011	269-276

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>星野幹雄</u>	小脳発達の分子機構と 小脳無形成モデルマウス “セレベレス”	医学のあゆみ	239 巻 6 号	670-674	2011
<u>Hoshino M</u>	Neuronal subtype specification in the cerebellum and dorsal hindbrain.	<i>Dev Growth Differ</i>	54 巻	317-326	2012
Takeshita E, Saito Y, Nakagawa E, Komaki H, Sugai K, Sasaki M, Nezu A, Kitamura J, <u>Itoh M</u> , Sawano Y, <u>Goto Y</u>	Late-onset mental deterioration and fluctuating dystonia in a female patient with a truncating MECP2 mutation	<i>J Neurol Sci</i>	308 巻	168-172	2011
Saito T, Hanai S, Takashima S, Nakagawa E, Okazaki S, Inoue T, Miyata R, Hoshino K, Akashi T, Sasaki M, <u>Goto Y</u> , Hayashi M, <u>Itoh M</u>	Neocortical layer-formation of the human developing brains and lissencephalies: consideration of layer-specific markers expression	<i>Cereb Cortex</i>	21 巻	588-596	2011
<u>Itoh M</u> , Tahimic CGT, Ide S, Otsuki A, Sasaoka T, Noguchi S, Oshimura M, <u>Goto Y</u> , Kurimasa A	Methyl CpG-binding protein isoform MeCP2_e2 is dispensable for phenotypes but essential for embryo viability and placenta development	<i>J Biol Chem</i>	287 巻 17 号	13859-13867	2012

IV. 研究成果の刊行物・別刷

第2節 小脳皮質のないマウス「セレベレス」

我々はあるトランスジェニック (Tg) マウス作製の過程において、偶然にも行動異常を示す突然変異マウス「セレベレス」を得た。セレベレスは、小脳皮質を完全に失いながらも成体まで成長する世界で唯一の突然変異マウスである。この変異マウスの解析、原因遺伝子の同定などによって、いくつかの生物学上の未解明な問題が明らかとなった。さらに、セレベレス変異体は「小脳皮質のない」モデルマウスとして今後活用されていくことが期待されている。本稿では、この変異マウスの得られた経緯と、その解析によって明らかにされたこと、

そして今後の利用の可能性などについて述べたい。

1. セレベレス突然変異マウスの表現型

セレベレスはある Tg マウスの作製の過程で偶然得られた突然変異マウスである¹⁾。最初に見つめられた表現型は、ホモ接合体において、震える、後ずさる、うまく歩けない、などの運動失調様症状である。このマウスの成体における脳組織を調べると、驚くべきことに小脳皮質を完全に欠失していることがわかり(図 1A-D)、この変異体は小脳

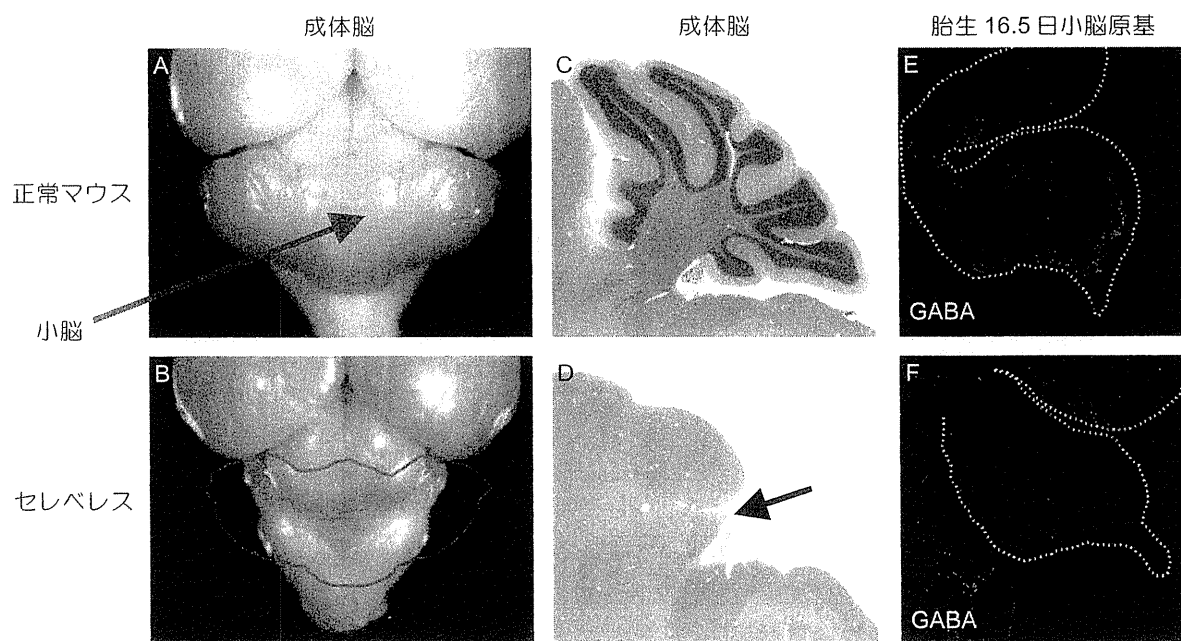


図1 セレベレスの表現型

A-D: 正常マウス (A, C) およびセレベレス (B, D) の成体脳。A, B が小脳領域の全景で、C, D が正中断のヘマトキシリン・エオジン染色像。セレベレスでは小脳皮質を完全に欠失していることがわかる。E, F: 胎生 16.5 日の小脳原基における GABA 作動性神経細胞。セレベレス (F) では、小脳原基の中に GABA 作動性神経細胞はほとんど観察されないが、それ以外の領域ではたくさん認められる。文献 1 から一部改変して転載。

(cerebellum)を失っているという意味からセレベレス(*cerebelless*)と名付けられた。さらに驚いたことには、セレベレスはちゃんと成体まで成長し、正常マウスと同等の寿命(約2年)まで生きるのである。これまでも小脳構造を欠失するマウスはいくつか報告されてきたが、それらは全て何らかの原因によって発生過程で致死となってしまうため、小脳皮質を完全に欠失するにもかかわらず成体まで成長するマウスは、筆者の知る限りセレベレスだけである。

セレベレスの成体脳は小脳皮質の全ておよび小脳白質の大部分を失っている。すなわち、小脳皮質に存在する抑制性のプルキンエ細胞、ゴルジ細胞、バスケット細胞、星状細胞や、興奮性の顆粒細胞などは、セレベレスでは全く観察できない。また、わずかに残された小脳核の痕跡領域においては、グルタミン酸作動性の興奮性小脳核神経細胞は残されているが、GABA作動性の抑制性神経細胞は全て失われている。さらに、成体において、大脳皮質、嗅球、海馬などを含む小脳以外の脳組織ではほとんど異常が認められないが、例外とし

て下オリブ核と橋核が完全に欠失している。

2. セレベレスにおける病理(図2)

セレベレス突然変異体で発生過程の最初に認められる異常は、小脳原基においてプルキンエ細胞を含む抑制性のGABA作動性神経細胞が、小脳神経上皮からほとんど生み出されないということである(図1E, F)。一方で、興奮性の顆粒細胞の前駆細胞(外顆粒層の細胞)は一旦は生み出される。しかしながら、外顆粒層の細胞は出生前後からアポトーシスにより失われていき生後7日目には消失する。そして結果として小脳皮質の全ての神経細胞成分が完全に失われることとなる。過去の報告では、外顆粒層の顆粒細胞前駆細胞の生存、増殖、分化のためにはプルキンエ細胞から放出されるソニックヘッジホッグタンパク質が必要とされるということが示唆されている²⁾。そのため、セレベレスでは発生のはじめからプルキンエ細胞が存在しないので、結果として顆粒細胞前駆細胞が

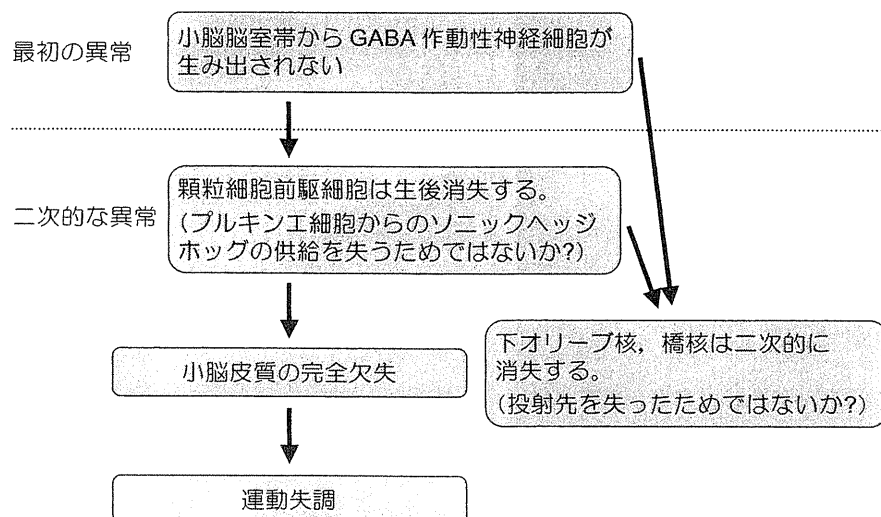


図2 セレベレスにおける病理

セレベレスの発生段階を辿りながらの表現型が記載してある。括弧内に書かれている事象はあくまでも筆者の推論であって、実験的な裏付けがある訳ではない。

ソニックヘッジホッグシグナルを受け取ることができずにアポトーシスを起こしてしまうのではないかと想像される。

外顆粒層と同様に、セレベレスの下オリブ核および橋核も発生途中で失われる。それぞれ生後2日目、5日目までは正常に発生しているように見えるのだが、その後の2、3日間のうちにアポトーシスによって完全に失われるのである。下オリブ核を構成する登上線維神経細胞および橋核に含まれる苔状線維神経細胞はそれぞれ小脳皮質のプルキンエ細胞および顆粒細胞へと投射することが知られている。セレベレスにおいて下オリブ核および橋核の神経細胞が消失する時期は、神経投射の時期よりも後である。一般的に、多くの種類の神経細胞ではその生存が神経投射に依存していることが知られているので、セレベレスの下オリブ核と橋核の神経細胞は、投射先を失ったために二次的に失われているという可能性が考えられる。

また、セレベレスでは興奮性の小脳核神経細胞は生み出されてはいるものの、成体においてその数が正常の40%にまで減少している。これについては、最初から生み出される数が少ないのか、あるいは正常に生み出された後に数が減少したことによるのか、まだ明らかにはなっていない。興奮性の小脳核神経細胞へはプルキンエ細胞からの入力があることが知られているが、セレベレスではその入力失われているために、この細胞が二次的に脱落してしまったのかもしれない。

3. セレベレスの原因遺伝子 *Ptf1a*

上述のように、セレベレスはTgマウス作製の過程で得られたのであるが、同じトランスジーンで同時期に作製した系統の中に同様な表現型を示すものは他にはなく、またその表現型は何代交配させても常にトランスジーンと連鎖していた。さ

らに、セレベレスのヘテロ接合体には、全く異常は認められなかった。これらの状況証拠から考えて、セレベレスの表現型はTgマウス作製の過程でトランスジーンがマウスゲノム上に挿入される際に、その周辺のゲノムDNAが傷つけられ、ある特定の遺伝子が破壊されたせいでもたらされたのであろうと推定された。

Tgマウス作製の過程で、トランスジーンの前ゲノム挿入部位の近傍の遺伝子が損傷されて、突然変異体を生じることが少なからずある。実際に、老化・カルシウム代謝異常モデルマウスとしてよく知られている「Klothoクロトー」変異体も、もともとは筆者がかつて所属した研究室でTgマウス作製の過程で偶然に得られたものである³⁾。クロトーの場合には、トランスジーンの前ゲノム挿入部位の近傍でクロトー遺伝子の発現調節のためのゲノム領域が欠失しており、その結果としてこの遺伝子の発現が著しく低下していることが判明している。セレベレスの場合には、第二染色体の前ゲノム上の1ヵ所にトランスジーンが約400コピーも挿入されており、またトランスジーン近傍の約31万3千塩基ものゲノム領域が失われていることがわかった。

我々はそのゲノム欠失領域の一端から外側へ6万塩基離れたところに、セレベレスの原因遺伝子として*Ptf1a* (*Pancreatic transcription factor 1a*: 膵臓転写因子1a)を同定した。この遺伝子は、もともと膵臓の発生に必要とされることが知られており、そのノックアウト(KO)マウスでは、膵臓がほとんど形成されず、出生後すぐに死んでしまうことが知られている。しかしセレベレス変異体では膵臓は正常に形成されるし、野生型と同じくらい(約2年)長生きする。実は、セレベレスでは、*Ptf1a* 遺伝子の発現が小脳原基ではほとんど失われているが、膵臓では保たれていることが判明した。このことから、セレベレス変異体では*Ptf1a* 遺伝子の小脳原基での発現に関与するエンハンサー配列が失われている(恐らく31万3千塩基の

欠失領域に含まれている)が、膵臓での発現に関与するエンハンサーは保存されているのではないかと、推定される。そのおかげで膵臓は正常発生し、その個体は成体まで成長できるのであろう。しかし小脳原基でのこの遺伝子の発現は失われるため、小脳の発生は異常となる。結果として、小脳皮質を完全に欠失しながらも成体まで成長する、世界で唯一の突然変異マウスが得られたということになる。

4. 小脳神経細胞の発生機構

小脳原基には、神経細胞を生み出す神経上皮領域が2種類ある。最も背側の菱脳唇とそれよりやや腹側にある脳室帯である。*in situ* ハイブリダイゼーションにより *Ptf1a* は、小脳原基の脳室帯の神経上皮細胞で発現するが、そこから誕生する分裂を終えた神経細胞や菱脳唇の神経上皮細胞では発現しないことがわかった。それでは、様々な種類の小脳神経細胞のうち、どの神経細胞が *Ptf1a* を発現する神経前駆細胞から生み出されるのであろうか？

この課題を解くために、我々は *Ptf1a* 遺伝子に Cre リコンビナーゼをコードした cDNA をノックインすることによって作られたマウス系統 (*Ptf1a^{cre}*) を用いて、遺伝的細胞系譜追跡実験を行った。このマウスをあるレポーター系統 (*Rosa26R-loxP-lacZ* : 以後 R26R と略す) と交配することによって、*Ptf1a* を発現する神経前駆細胞から生み出された細胞が、将来どのような種類の神経細胞になるのかを *lacZ* 遺伝子の発現によって調べることができる。この細胞系譜追跡実験を *Ptf1a^{cre}* ノックインマウスのヘテロ接合体バックグラウンド (*Ptf1a^{cre/+}; R26R* : これは正常に発生する) で行うことによって、全ての種類の小脳の抑制性 GABA 作動性神経細胞 (プルキンエ細胞, ゴルジ細胞, バスケット細胞, 星状細胞, そして GABA

作動性小脳核神経細胞) が *Ptf1a* を発現する小脳脳室帯の神経上皮由来であり、逆に興奮性のグルタミン作動性小脳核神経細胞や顆粒細胞はそのリニエージにはないことが明らかになった (図3)。そして、セレベレス (あるいは *Ptf1a* KO マウス) において小脳脳室帯神経上皮における *Ptf1a* の発現が失われると、全ての GABA 作動性ニューロンが生み出されなくなることから、「*Ptf1a* が小脳脳室帯の神経上皮で発現し、GABA 作動性ニューロンの誕生に必須な働きをしていること」が明らかになった¹⁾。

我々の上記の報告の後に、別のグループから、菱脳唇神経上皮から生み出される神経細胞についての報告がなされた^{4), 5)}。彼らは、菱脳唇で bHLH 型転写因子 *Atoh1* (*Math1* と呼ばれる) が発現することを利用して遺伝学的細胞系譜追跡実験を行い、従来報告されていた顆粒細胞だけではなく、(恐らくは興奮性の)小脳核神経細胞が菱脳唇の神経上皮由来であることを示した。彼らは、その小脳核神経細胞の発生が、*Atoh1* ミュータントマウスでは異常になることも示している。

すると、小脳全体において、「グルタミン酸作動性の興奮性神経細胞は全て菱脳唇由来であり、GABA 作動性の抑制性神経細胞は全て脳室帯由来である」というように単純化して考えることができる。実際に、小脳皮質の神経細胞としては比較的マイナーであり研究がなされてこなかったグルタミン酸作動性の Unipolar Brush Cells (UBCs) も、菱脳唇由来であることが、その後報告された⁶⁾。以上から、小脳の各種神経細胞の発生について実にシンプルなモデルが描ける。すなわち、「小脳の連続した神経上皮は、背側の領域が *Atoh1* を発現することによって菱脳唇としての性質を与えられ、そこからグルタミン酸作動性神経細胞が生み出される一方、より腹側に位置する神経上皮が *Ptf1a* を発現することによって脳室帯としての性質を持ち、そこから GABA 作動性神経細胞が生み出される」という「bHLH 型転写因子による神

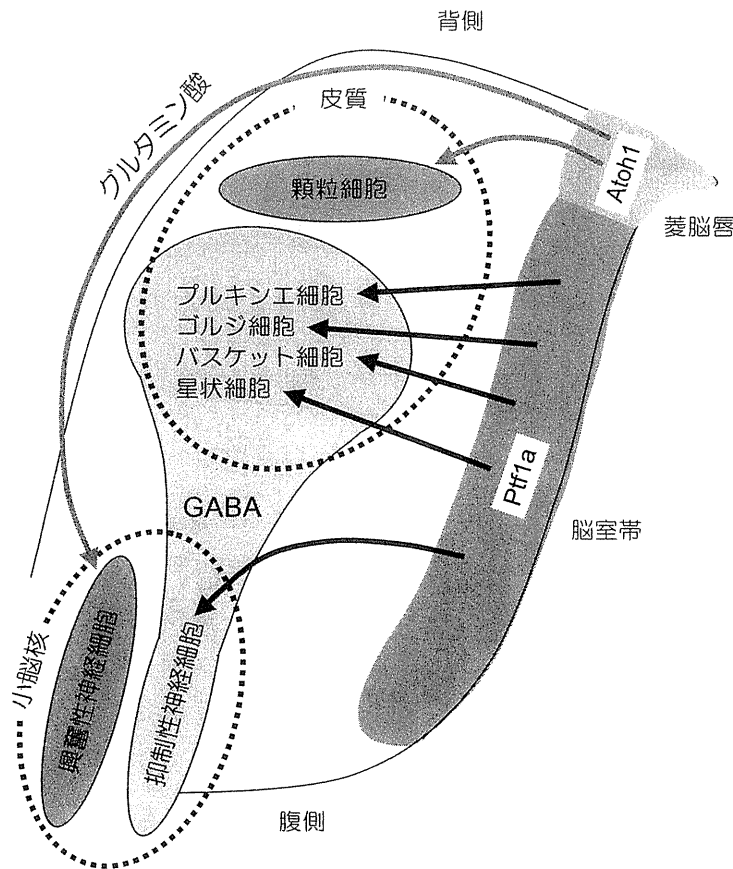


図3 小脳原基神経上皮からの神経細胞の発生

小脳原基の連続した神経上皮は、背側の領域(菱脳唇)で Atoh1 を、やや腹側の脳室帯で Ptf1a を発現する。それぞれの領域からグルタミン酸作動性および GABA 作動性神経細胞が生み出される。セレベレス変異体においては、脳室帯での Ptf1a の発現が失われるために、全ての種類の GABA 作動性抑制性神経細胞が生み出されない。

経上皮の領域化」モデルである(図3)⁷⁾。

5. 後脳背側の神経上皮から生まれる神経細胞について

実は、Ptf1a も Atoh1 もともに、後脳から尾側の発生途上の神経管において発現し、それぞれの神経上皮ドメインを構成している。(正確に言うと、脊髄においては神経上皮ではなくて、生まれてすぐの幼若な神経細胞で一過性に発現する。)最近の細胞系譜追跡実験から、それぞれの神経上皮ドメインから固有の神経細胞が生み出されるということ、そしてその発生過程にそれぞれの転写

因子が必須な役割を果たしているということが明らかになってきた。たとえば脊髄においては、Ptf1a および Atoh1 はそれぞれ背側の抑制性および興奮性神経細胞の発生に関与していることが報告されている⁸⁾。我々は、後脳における Ptf1a および Atoh1 の働きを明らかにしてきたので、以下に紹介する。

マウス胎生期後脳は、吻側から尾側へむかってロンボメア(r)1~8の領域に分けられるが、最も前方領域であるr1の背側からは小脳の神経細胞、r2-5の背側からは蝸牛神経核の神経細胞、またr6-8の背側からは橋核や下オリーブ核などの小脳へと投射する前小脳システムの神経細胞が生み出される。Ptf1a および Atoh1 は、後脳領域を前

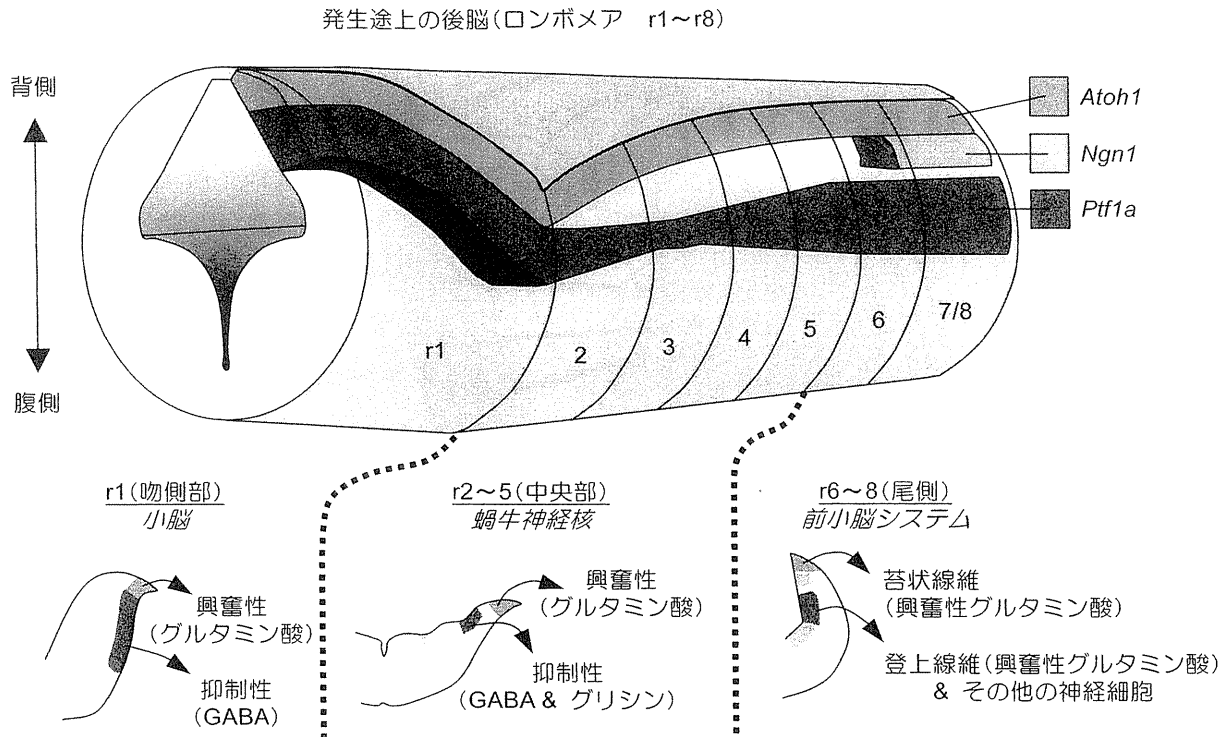


図4 後脳背側から生まれる神経細胞と転写因子

上図：ロンボメア構造(r1~r8)をとる発生途上の後脳神経管の模式図。背側には、図で示した転写因子を発現する神経上皮ドメインが存在する。
 下図：背側後脳の吻側部(r1)、中央部(r2~5)、尾側部(r6~8)の断面の模式図。それぞれの神経上皮ドメインから異なる種類の神経細胞が生まれる。

後に貫くように発現し、背腹軸における神経上皮ドメインを規定している(図4)。r1から生まれる神経細胞、すなわち小脳の神経細胞については上述した。r2-5においては、Ptf1aドメインおよびAtoh1ドメインからそれぞれ蝸牛神経核の抑制性神経細胞と興奮性神経細胞が生まれるが、それぞれの神経細胞の発生にそれぞれの転写因子が必要とされる⁹⁾。また、r6-7においては、Ptf1aドメインおよびAtoh1ドメインからそれぞれ登上線維神経細胞および苔状線維神経細胞が生まれる、やはりそれぞれの転写因子がその発生に関与している¹⁰⁾。

Ptf1aは下オリブ核の登上線維神経細胞の発生に関与しているために、Ptf1aのヌル変異体(Ptf1a^{cre/cre})においては、登上線維神経細胞の発生はうまくいかずに下オリブ核は形成されない。

しかしながら、セレベレスにおいては下オリブ核は生後2日後までは正常に発達する。定量PCRで調べたところ、発生途上の小脳におけるPtf1aの発現量はセレベレスで約30分の1に減少していたが、延髄領域では5分の1にしか減少していなかった。おそらく5分の1の発現量だけ残されたPtf1aのおかげで、セレベレスでは登上線維神経細胞が正常に発生したのであろう。

以上をまとめると、後脳背側から生まれる神経細胞について図4のようなモデルが描ける。すなわち、後脳の神経上皮には、Ptf1aやAtoh1というbHLH型転写因子によって背腹軸の位置情報を規定された神経上皮ドメインがあり、さらには前後軸に沿った位置情報(r1~r8)との組み合わせによって(そちらはホメオドメインタンパク質などによって規定されると考えられる)、様々な種

類の神経細胞が生み出されるという考え方である。

6. セレベレス変異体の活用の可能性

セレベレスは小脳皮質を完全に失いながらも成体まで生き残る唯一の突然変異マウスである。小脳皮質は小脳における情報処理の中核であり、容積的にも小脳の大部分を占めている。すなわち、小脳皮質を完全に失ったということは、小脳の機能を全く果たせなくなっていると考えられる。確かに、呼吸などの生命維持の諸機能は脳幹に存在すると考えられてはいるものの、セレベレスの存在それ自体は、「小脳がマウスの生存には必ずしも必要とされない」ということを具体的かつ実証的に示している。筆者自身としては、この動物に出会った時に「小脳がなくても生きていられるんだ！」と純粋に驚いたという鮮明な記憶がある。

さらに、最近のfMRIなどの解析から、小脳機能は従来考えられていた運動の統合・制御だけではなくて、運動の想像や三次元視覚認識などの脳の高次認知にも関わっていることが示唆されている。今後、「小脳機能を持たない」セレベレス変異体の行動解析や電気生理学的解析を行うことによって、「小脳が本来果たしている未知の機能」が明らかにされるかもしれない。また、*Ptfla* 遺伝子の異常によって重症糖尿病と運動失調をきたすヒトの疾患が報告されており¹¹⁾、セレベレスがそのような疾患のモデル動物となることも期待されている。

また、セレベレスにおいては、小脳へと投射する下オリーブ核の登上線維神経細胞および橋核の苔状線維神経細胞が二次的に脱落することが観察される。このことは、セレベレスが神経投射依存的な神経細胞の生存機構を研究するよいモデルになる可能性を示唆している。

7. おわりに

前述したように、筆者の所属した研究室では「クロトー」「セレベレス」と、Tgマウス作製の過程で2系統も興味深い突然変異マウスを得ることができた。我々がさほど多くのTgマウス系統を作製している訳ではないことを考え合わせると、意外と高頻度で突然変異が生じるものなのかもしれない。そういう意味においては、もしもTgマウスを作製した場合には、とりあえずそのホモ接合体を作製して、その表現型を簡単に調べてみるということも、考えられていいのではないだろうか。

謝 辞

セレベレス変異体、および、*Ptfla^{cre}* ノックインマウスは、それぞれ、京都大学医学研究科の森潔博士、川口義弥博士によって作製されました。以上の方々と、この研究に取り組んでくれた中村祥子博士(現理化学研究所発生・再生化学総合研究センター)、寺尾真美さん、山田真弓博士、藤山知之君(京都大学医学研究科)、様々なアドバイスを頂きました神戸大学医学研究科の寺島俊雄教授、京都大学医学研究科の鍋島陽一教授に感謝致します。

参考文献

- 1) Hoshino M., Nakamura S., Mori K., Kawauchi T., Terao M., Nishimura Y. V., Fukuda A., Fuse T., Matsuo N., Sone M., Watanabe M., Bito H., Terashima T., Wright C. V. E., Kawaguchi Y., Nakao K. and Nabeshima Y.: *Ptfla*, a bHLH transcriptional gene, defines GABAergic neuronal fates in cerebellum. *Neuron*, 47: 201-213, 2005.
- 2) Lewis P. M., Gritli-Linde A., Smeyne R., Kottmann A. and McMahon A. P.: Sonic hedgehog signaling is required for expansion of granule neuron precursors and patterning of the mouse cerebellum. *Dev. Biol.*,

- 270 : 393-410, 2004.
- 3) Kuro-o M., Matsumura Y., Aizawa H., Kawaguchi H., Suga T., Utsugi T., Ohyama Y., Kurabayashi M., Kaname T., Kume E., Iwasaki H., Iida A., Shiraki-Iida T., Nishikawa S., Nagai R. and Nabeshima Y. I. : Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*, 390 : 45-51, 1997.
 - 4) Wang V. Y., Rose M. F. and Zoghbi H. Y. : *Math1* expression redefines the rhombic lip derivatives and reveals novel lineages within the brainstem and cerebellum. *Neuron*, 48 : 31-43, 2005.
 - 5) Machold R. and Fishell G. : *Math1* is expressed in temporally discrete pools of cerebellar rhombic-lip neural progenitors. *Neuron*, 48 : 17-24, 2005.
 - 6) Englund C., Kowalczyk T., Daza R. A., Dagan A., Lau C., Rose M. F. and Hevner R. F. : Unipolar brush cells of the cerebellum are produced in the rhombic lip and migrate through developing white matter. *J. Neurosci.*, 26 : 9184-9195, 2006.
 - 7) Hoshino M. : Molecular machinery governing GABAergic neuron specification in the cerebellum. *Cerebellum*, 5 : 193-198, 2006.
 - 8) Glasgow S. M., Henke R. M., Macdonald R. J., Wright C. V. and Johnson J. E. : *Ptf1a* determines GABAergic over glutamatergic neuronal cell fate in the spinal cord dorsal horn. *Development*, 132 : 5461-5469, 2005.
 - 9) Fujiyama T., Yamada M., Terao M., Terashima T., Hioki H., Inoue Y. U., Inoue T., Masuyama N., Obata K., Yanagawa Y., Kawaguchi Y., Nabeshima Y. and Hoshino M. : Inhibitory and excitatory subtypes of cochlear nucleus neurons are defined by distinct bHLH transcription factors, *Ptf1a* and *Atoh1*. *Development*, 136 : 2049-2058, 2009.
 - 10) Yamada M., Terao M., Terashima T., Fujiyama T., Kawaguchi Y., Nabeshima Y. and Hoshino M. : Origin of climbing fiber neurons and their developmental dependence on *Ptf1a*. *J. Neurosci.*, 27 : 10924-10934, 2007.
 - 11) Sellick G. S., Barker K. T., Stolte-Dijkstra I., Fleischmann C., Coleman R. J., Garrett C., Gloyn A. L., Edghill E. L., Hattersley A. T., Wellauer P. K., Goodwin G. and Houlston R. S. : Mutations in *PTF1A* cause pancreatic and cerebellar agenesis. *Nat. Genet.*, 36 : 1301-1305, 2004.

(星野幹雄)

小脳発達の分子機構と 小脳無形成モデルマウス “セレベレス”

Molecular machinery of cerebellar development and model mouse for cerebellar agenesis, “*cerebelless*”



星野 幹雄

Mikio HOSHINO

国立精神・神経医療研究センター神経研究所

◎著者らはあるトランスジェニックマウス作製の過程において、偶然にも行動異常を示す突然変異マウス“セレベレス”を得た。セレベレスは、小脳皮質を完全に失いながらも成体まで成長する世界で唯一の突然変異マウスである。この変異マウスの解析、原因遺伝子の同定などによって、いくつかの生物学上の未解明な問題が明らかとなった。さらに、この原因遺伝子の異常によって引き起こされるヒト小脳無形成・低形成症も報告されてきており、セレベレスは小脳発達障害、小脳無形成・低形成症のモデルマウスとしても今後活用されていくことが期待されている。本稿ではこの変異マウスの得られた経緯、その解析によって明らかにされた神経発生学上の知見、そしてヒト疾患との関連性などについて述べたい。



セレベレス、小脳、小脳無形成・低形成、発達障害、転写因子、発生

セレベレス突然変異マウスの表現型

セレベレスは、あるトランスジェニックマウスの作成の過程で偶然得られた突然変異マウスである¹⁾。最初にみつけられた表現型はホモ接合体において、震える、後ずさる、うまく歩けない、などの運動失調様症状である。このマウスの成体における脳組織を調べると、小脳皮質を完全に欠失していることがわり(図 1-A~D)、この変異体は小脳(*cerebellum*)を失っているという意味からセレベレス(*cerebelless*)と名づけられた。セレベレスの成体脳は小脳皮質のすべておよび小脳白質の大部分を失っている。すなわち、小脳皮質に存在する抑制性の Purkinje 細胞、Golgi 細胞、バスケット細胞、星状細胞や、興奮性の顆粒細胞などはセレベレスではまったく観察できない。また、わずかに残された小脳核の痕跡領域においてはグルタミン酸作動性の興奮性小脳核神経細胞は残されているが、GABA 作動性の抑制性神経細胞はすべて失われている。さらに、成体において大脳皮質、嗅球、海馬などを含む小脳以外の脳組織では

ほとんど異常が認められないが、例外として下オリブ核と橋核が完全に欠失している。

驚いたことには、セレベレスはちゃんと成体まで成長し、正常マウスと同等の寿命(約 2 年)まで生きる。これまでも小脳構造を欠失するマウスはいくつか報告されてきたが、それらはすべて何らかの原因によって発生過程で致死となってしまうため、小脳皮質を完全に欠失するにもかかわらず成体まで成長するマウスは、著者の知るかぎりセレベレスだけである。

セレベレスにおける病理(図 2)

セレベレス突然変異体で発生過程の最初に認められる異常は、小脳原基において Purkinje 細胞を含む抑制性の GABA 作動性神経細胞が小脳神経上皮からほとんど生みだされないということである(図 1-E, F)。一方で、興奮性の顆粒細胞の前駆細胞(外顆粒層の細胞)はいったんは生みだされる。しかし、外顆粒層の細胞は出生前後からアポトーシスにより失われていき、生後 7 日目には消

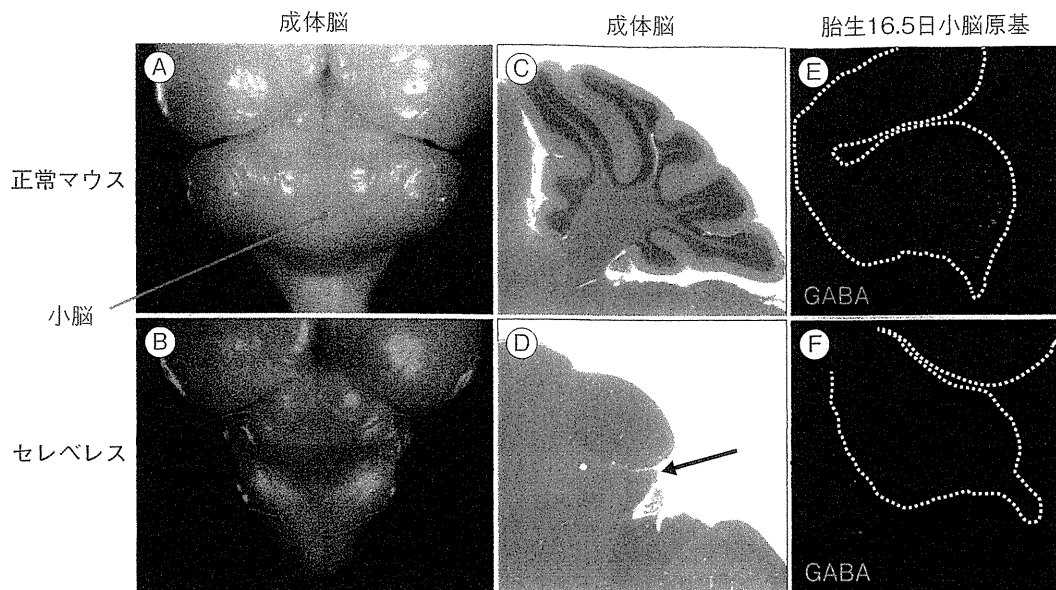


図 1 セレベレスの表現型¹⁾

A~D: 正常マウス (A, C) およびセレベレス (B, D) の成体脳. A, B が小脳領域の全景で, C, D が正中断のヘマトキシリン・エオジン染色像. セレベレスでは小脳皮質を完全に欠失していることがわかる.

E, F: 胎生 16.5 日の小脳原基における GABA 作動性神経細胞. セレベレス (F) では小脳原基のなかに GABA 作動性神経細胞はほとんど観察されないが, それ以外の領域ではたくさん認められる.

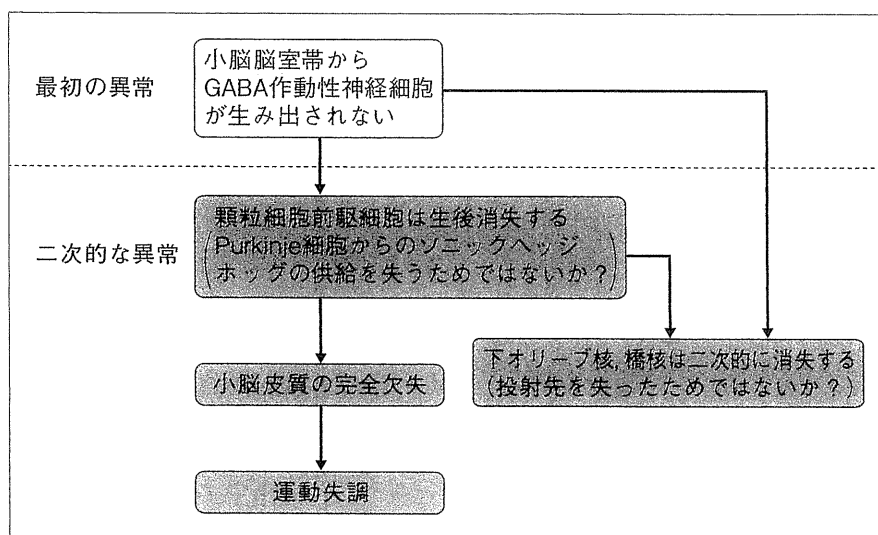


図 2 セレベレスにおける病理

セレベレスの発生段階をたどりながらの表現型が記載してある. () 内に書かれている事象はあくまでも著者の推論であって, 実験的な裏づけがあるわけではない.

失する. そして結果として, 小脳皮質のすべての神経細胞成分が完全に失われることとなる. 過去の報告では, 外顆粒層の顆粒細胞前駆細胞の生存, 増殖, 分化のためには Purkinje 細胞から放出されるソニックヘッジホッグ蛋白質が必要とされるということが示唆されている²⁾. そのため, セ

レベレスでは発生のはじめから Purkinje 細胞が存在しないので, 結果として顆粒細胞前駆細胞がソニックヘッジホッグシグナルを受け取ることができずにアポトーシスを起こしてしまうのではないかと想像される.

外顆粒層と同様に, セレベレスの下オリーブ核