

氏 名	宗 田 武
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	医博第 2643 号
学位授与の日付	平成 15 年 7 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	医学研究科外科系専攻
学位論文題目	Segregation and coactivation of developing neocortical layer 1 neurons (生後発達期大脳皮質第 1 層における神経ネットワークの解析)
論文調査委員	(主査) 教授 金子武嗣 教授 井出千束 教授 小川 修

論 文 内 容 の 要 旨

大脳皮質の発生期には脳室帯で生成した神経細胞が脳表に向かって放射状移動を行い、辺縁帯 (将来の第 1 層) 直下まで到達してそこにとどまり、その後第 1 層で密な神経回路を構成する。この時期の第 1 層には 2 種類の神経細胞、すなわち Cajal-Retzius (CR) 細胞と非 CR 細胞が存在する。CR 細胞は細胞外マトリックス蛋白であるリーリンを分泌することによって細胞移動に重要な影響を及ぼしていることが近年明らかとなったが、細胞移動終了後の神経回路形成における役割は全くわかっていない。

成体ラットの CR 細胞が代謝型グルタミン酸受容体 2 型 (mGluR2) を発現しているとの報告があることより我々は mGluR2 のプロモーター下に緑色蛍光蛋白 (GFP) を発現するトランスジェニックマウスを作成し、生後発達期の大脳皮質で解析を行った。出生当日 (P0) から P10 にかけて GFP を発現する細胞は大脳皮質第 1 層に限局して存在し、卵形から紡錘形の細胞体を持つ双極細胞であり、1 本の細い軸索とその反対側から発生する 1 本の太い樹状突起を持つという、CR 細胞に特徴的な形態を有していた。更に免疫染色を行ったところ、P0 においては GFP 発現細胞はリーリン発現細胞と完全に一致した。発生期においてリーリンは CR 細胞のマーカーと考えられており、以上の所見より GFP 陽性細胞は CR 細胞であることが示された。GABA の免疫染色では GFP 陽性細胞は全く染まらず、CR 細胞が GABA 作動性ではないことを反映しているものと考えられた。P0 で GFP とリーリンが完全に一致したのに対して P5, P10 ではリーリン陽性かつ GFP 陰性の細胞が出現し、日を追って増加した。これらリーリン陽性かつ GFP 陰性細胞の大部分は GABA 陽性の介在ニューロンであった。成体では介在ニューロンがリーリンを分泌するという報告は以前にもあり、発生期以降のリーリンの役割を考える上で興味深い所見である。

大脳皮質の発生における第 1 層細胞の役割は CR 細胞のリーリンの分泌以外にはよくわかっておらず、特に細胞移動終了後の神経回路形成期において第 1 層の神経細胞がどのような電気的活動を行っているのか、ほとんど研究されていない。我々のトランスジェニックマウスでは GFP の蛍光を利用することで CR 細胞と非 CR 細胞が生きた状態で明確に区別できることを利用し、パッチクランプ法を用いて両者の電気的活動を記録した。自発シナプス後電流 (sPSC) および誘発シナプス後電流 (ePSC) を記録したところ、CR 細胞では GABA_A 受容体を介した GABA 作動性の入力しか受けないのに対して非 CR 細胞では GABA 作動性入力に加えて NMDA 型ならびに AMPA 型受容体を介したグルタミン酸作動性入力も受けることが示された。また、これら GABA 作動性入力やグルタミン作動性入力の由来は第 1 層のみならず大脳皮質の深い層あるいは皮質下領域からも生じること、CR 細胞と非 CR 細胞は同期した大きな入力を受けること、さらには、非 CR 細胞同士がシナプスを形成してお互いに連絡を取り合っていることを示した。

以上より、神経回路が形成される新生児期に大脳皮質第 1 層に存在する CR 細胞と非 CR 細胞は入出力が全く異なっており、お互いの割合をダイナミックに変化させることで大脳皮質の発達にそれぞれ固有で不可欠な役割を果たしているものと考えられた。

論文審査の結果の要旨

本研究は、発生期における神経ネットワークの構築過程を調べるため、カハール・レチウス（CR）細胞に選択的に緑色蛍光蛋白（GFP）を発現するトランスジェニックマウスを用い、新生児期の大脳皮質第1層を構成するCR細胞および非CR細胞を免疫組織学ならびに電気生理学的手法を用いて解析したものである。

まず代謝型グルタミン酸受容体2型のプロモーター下に発現させたGFPがCR細胞に選択的に発現していることを示した上で、CR細胞が成長とともに減少するのに対してGABA陽性（GFP陰性）の非CR細胞は増加し、かつ生後5日令以降はリーリンを発現していることを明らかにした。

ついで自発シナプス後電流および誘発シナプス後電流を記録し、CR細胞はGABA作動性入力しか受けないのに対して非CR細胞はGABA作動性入力に加えてNMDA型ならびにAMPA型受容体を介したグルタミン酸作動性入力も受けることを示した。また、これらGABA作動性入力やグルタミン作動性入力の由来は第1層のみならず大脳皮質の深い層あるいは皮下領域からも生じること、CR細胞と非CR細胞は同期した大きな入力を受けること、さらには、非CR細胞同士がシナプスを形成してお互いに連絡を取り合っていることを示した。

以上の研究は、神経ネットワークの構築過程を解明することに貢献し、中枢神経系の発生を理解する上で寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成15年6月26日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。