

氏 名	井 上 健 一
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2535 号
学位授与の日付	平 成 14 年 11 月 25 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 分 子 医 学 系 専 攻
学位論文題目	Runx3 controls the axonal projection of proprioceptive dorsal root ganglion neurons. (RUNX3 は固有覚神経の軸索投射を制御する)
論文調査委員	(主 査) 教 授 井 出 千 束 教 授 笹 井 芳 樹 教 授 影 山 龍 一 郎

論 文 内 容 の 要 旨

Li ら (2002) の研究によると, Runx3 欠損マウス (Runx3^{-/-}) は生後まもなく死亡するため, それ以降の発生過程の解析が不可能であった。申請者はこの Runx3^{-/-} を近交系の C57BL/6 から非近郊系の ICR に交配すると, 稀に生き延びるものが出てくることを見出した。生存したマウスは重篤な歩行障害を示した。脊髓の横断切片を Nissl 染色で観察すると, Runx3^{-/-} の後索面積が有意に減少していた。Runx3 の発現パターンから, 大型の筋求心性 DRG ニューロンに異常がある可能性が示唆されたため, 筋求心性 DRG ニューロンのマーカーである抗 parvalbumin (PV) 抗体を用いて免疫染色を行なったところ, Runx3^{-/-} では筋求心性 DRG ニューロンとその軸索における PV の抗原性が消失していた。一方, 痛覚・温度覚マーカーの calcitonin gene related peptide (CGRP) および TrkA では, 有意な差がなかった。DRG 一次求心性線維の脊髓投射について, 脂溶性蛍光色素の DiI を用いて解析を行なったところ, 筋求心性線維が特異的に消失していた。即ち, 伸張反射回路が形成されていなかった。一方, 皮膚求心性線維には差が見られなかった。

筋求心性線維の消失は, 発生期における過度の細胞死, もしくは軸索投射の異常を示唆する。申請者は In situ trkC mRNA を指標として, 筋求心性 DRG ニューロンの生存を調べた。Runx3^{-/-} では, 少なくとも生後 0 日までは, 野生型と変わらない数の細胞体が生存していた。従って Runx3^{-/-} では, 筋求心性 DRG ニューロンの軸索を標的に投射する過程が異常を起こしている可能性が浮上してきた。

そこで申請者は, 胎生 14.5 日及び 18.5 日齢の DRG を取り出して, 神経突起の伸長能力を調べた。DRG を神経栄養因子 NT-3 存在下で培養したとき, TrkC を発現する大型の神経細胞のみが生存する。このとき, Runx3^{-/-} の神経突起の長さが有意に短いことが観察された。一方, NGF 存在下で培養したときには, TrkA を発現する小型の細胞のみが生存し, Runx3^{-/-} の神経突起伸長は野生型と比べて変化がなかった。これらの結果から, Runx3^{-/-} の固有覚神経細胞は生存しているが, 軸索の伸長能力が低いことが示唆された。

DRG 神経は, その特徴的な求心性線維の投射パターンから, 軸索誘導における確立された系として, 調べられてきた。しかしながら, mRNA の転写調節レベルで, 軸索投射を制御しているという報告はまだ数が少ない。Runx のショウジョウバエホモログである Runt が, 眼神経光受容体の軸索投射の標的選択を制御するとの報告もあり, このような機構は進化的に保存されてきたと考えられる。本研究は, ヒトの歩行障害においても, 伸張反射回路の形成不全が同様の分子機構によって起こっている可能性を示唆している。

神経芽細胞腫は胎児期の神経冠細胞由来の癌であり, DRG と由来を同じくする。悪性度の高い神経芽細胞腫に特徴的に観察されるのが, 1p36 の欠失と N-myc の増幅である。RUNX3 は 1p36 に位置するが, オランダの研究グループは, 悪性度の高い神経芽細胞肺の殆どが, RUNX3 の発現消失を起こしていることを報告している。発癌機構において, 異常細胞の細胞死阻止と遊走性の獲得は重要な過程であるが, Runx3^{-/-} DRG 神経の解析過程で, 両者を示唆する観察が成されている。従って, 本研究の成果は将来的に, 神経芽細胞肺の発生機序解明に貢献する可能性が考えられる。

論文審査の結果の要旨

胎児発生における標的特異的な軸索投射は、正しい神経回路網の形成に必須である。後根神経節（DRG）は、異なる感覚ニューロンから構成されそおり、標的特異的な軸索投射のモデルとして、よく研究されてきた。痛覚および温度覚を司る TrkA ニューロンは、Runt 関連遺伝子 Runx1 を発現し、固有覚を前る TrkC ニューロンは、Runx3 を発現している。申請者は Runx3 欠損マウスが、重篤な運動障害を起こすことを観察した。このマウスは、DRG 固有覚ニューロンの機能マーカーであるパルパルブミンを産生しておらず、固有覚の求心性線維が中枢にも末梢にも投射していなかった。しかしながら、胎児期の DRG は TrkC 陽性であり、神経の運命決定は正常であることが示唆された。新生マウス DRG の trkC mRNA を調べたところ、発現細胞数および発現量共に変化が無かったため、発生の過程で TrkC ニューロンが細胞死を起こす可能性は否定された。胎児期の DRG を取り出して TrkC リガンドの NT-3 存在下で培養したところ、神経突起の伸びが有意に短かった。これらのデータは、DRG の特異的なニューロン群の軸索投射において、Runx3 が必須であることを示している。

以上の研究は、転写制御による神経回路網の形成機構の解明に貢献し、神経科学の発展に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14年11月6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。