

平成21年5月15日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19580359
 研究課題名 (和文) ドーパミンニューロンの発達・維持における Lmx1a および
 アトラクチンの役割
 研究課題名 (英文) Roles of Lmx1a and attractin for development and maintenance of
 dopaminergic neurons.

研究代表者

小谷 猛夫 (KOTANI TAKAO)
 大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授
 研究者番号：00081589

研究成果の概要：成体 qc ラットの脳をブレイン・マトリックスを用いて 2mm ごとに全脳を切り出し、パラフィン包埋標本を作製した。抗 Tyrosin hydroxylase 抗体およびシンプルステインキットを用いた免疫組織化学法を行い、ドーパミン作動性ニューロンを同定した。qc ラットにおいて黒質領域のドーパミン陽性ニューロンの減少が観察された。また、qc ラットでは線状体へ投射されるドーパミン陽性線維の密度も著しく減少していた。以上の結果から、qc ラットにおけるドーパミンニューロンの形態・機能異常が示唆された。さらに mv ラットにおける PLP, MBP および CNP の mRNA および蛋白の発現量を調べたところ、ミエリン遺伝子および蛋白の発現量が低下していた。この発現低下は mv ラットにおけるオリゴデンドロサイトの機能異常を示唆し、発症メカニズムとして重要と考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学，応用獣医学

キーワード：パーキンソン病，Lmx1a，アトラクチン，モデル動物

1. 研究開始当初の背景

我々は行動異常を示す qc ラットの病態と原因遺伝子を解析し、qc ラットの原因遺伝子が Lmx1a であり、様々な中枢神経の発達異常や生殖器の発達異常が認められることを報告した。近年、ドーパミンニューロンの発達に Lmx1a 遺伝子が重要な役割を演じていることが示唆され、さらに、アトラクチン遺伝子がドーパミン作動性ニューロンの維持に重要であり、その機能が損なわれるとドーパミン

作動性ニューロンの変性が進行することが報告された。

2. 研究の目的

qc ラットおよび mv ラットのドーパミン作動性ニューロンの発達・動態に注目し、これら自然発生ミュータントラットのパーキンソン病モデルとしての位置付けを確定すること。また、ドーパミン作動性ニューロンの発達・維持に関わる各種遺伝子の相互作用を qc

ラットおよび mv ラットを用いて in vivo にて解析することを目的とした。

3. 研究の方法

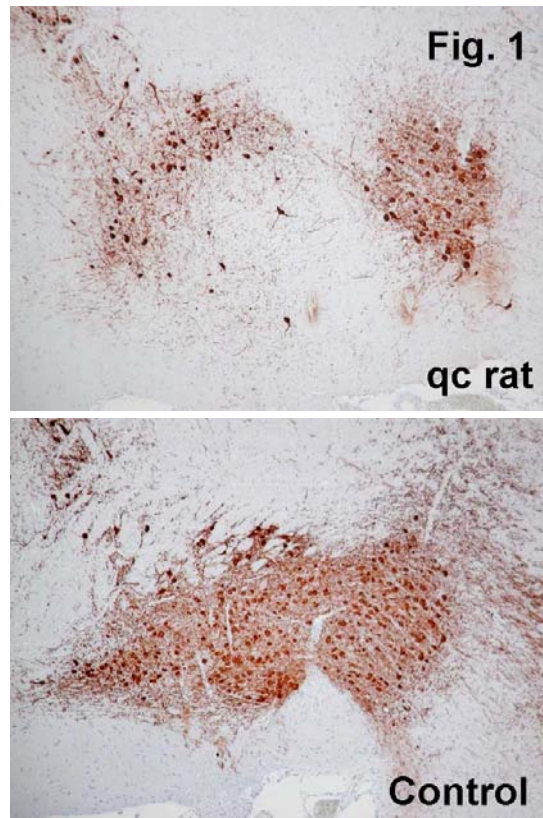
(1) 成体 qc ラットの脳をブレイン・マトリックスを用いて2mmごとに全脳を切り出し、パラフィン包埋標本を作製した。抗 Thyrosin hydroxylase 抗体およびシンブルステインキットを用いた免疫組織化学法を行い、ドーパミン作動性ニューロンを同定した。

(2) qc ラットの原因遺伝子である *Lmx1a* の胎生期における発現を解析する目的で、対照ラットに対して合成オリゴヌクレオチドプローブを用いた in situ hybridisation 法を行った。大脳は4%パラホルムアルデヒドを用いて4°Cで1晩固定し、パラフィン包埋した。切片は脱パラフィン後、Proteinase K で処理した。その後、FITC 標識した cDNA オリゴヌクレオチドプローブを湿潤箱内で 36°C、20 時間反応させた。アルカリフォスファターゼ標識抗 FITC 抗体を室温で1時間反応させた。発色は BICP/NBT を用いた。

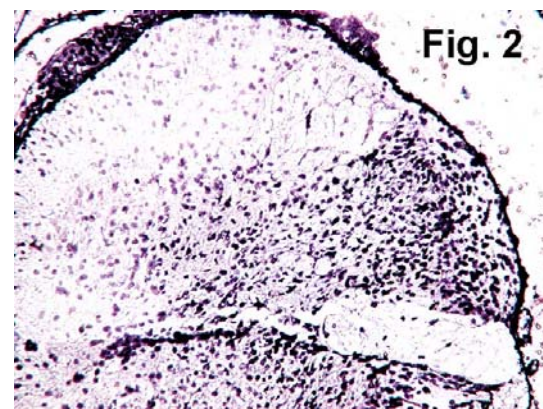
(3) mv (myelin vacuolation)ラットは中枢神経系のミエリン低形成とミエリンの解離を特徴とするミュータントで、その病態は膜蛋白アトラクチンの欠損による。mvラットのみエリン病変は2週齢から認められるが、病変が進展する2週齢から8週齢においてオリゴデンドロサイトの細胞数および形態に著変はみられない。アトラクチンの中中枢神経系の役割を明らかにし、ミエリン関連蛋白とドーパミンニューロンの発達を明らかにする基礎データを得ることを目的として、mvラットにおけるミエリン関連遺伝子および蛋白の発現動態を調べた。

4. 研究成果

(1) qc ラットにおいて黒質領域のドーパミン陽性ニューロンの減少が観察された。また、qc ラットでは線状体へ投射されるドーパミン陽性線維の密度も著しく減少していた。以上の結果から、qc ラットにおけるドーパミンニューロンの形態・機能異常が示唆された (Fig. 1)。



(2) 胎齢 17 日齢の大脳では、頭頂部の cortical plate や海馬領域のマトリックス層で、視床原基となる第 3 脳室の背側でシグナル発現が観察された。中脳では主に下丘で、小脳では外胚細胞層および第 4 脳室周囲の神経上皮で *Lmx1a* 発現が認められた。胎齢 19 日には、大脳の神経上皮や海馬の椎体細胞、小脳の外胚細胞層、第 3 脳室背側、橋核、三叉神経節、脊髄背側 (Fig. 2)、骨芽細胞でも *Lmx1a* のシグナルが認められた。



胎齢 21 日のシグナル発現分布は、胎齢 19 日齢と類似しており、大脳半球内側や海馬の神経上皮と椎体細胞、小脳では外胚細胞や小脳核、舌下神経核、橋核で *Lmx1a* シグナル発現が観察された。

(3) 2, 4, 6, 10 週齢の *mv* ホモ型および対照ラットの脊髄（腰部）を用いて、proteolipid protein (PLP) および myelin basic protein (MBP) の免疫染色を実施した。4, 10 週齢のホモ型および野生型ラットの脊髄白質から RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR 法により、PLP, MBP および CNP の mRNA 発現量を調べた。全ての週齢において、PLP および MBP の免疫染色性が低下していた。PLP mRNA および蛋白の発現量は、4 週齢から有意に低下していた。MBP mRNA 発現量は 4, 6 週齢で低下傾向を示し、MBP 蛋白発現量は 10 週齢で有意に低下した。CNP mRNA 発現量は、4, 6 週で低下傾向にあり、CNP 蛋白発現量は 4 週齢で有意に低下した (Fig. 3)。

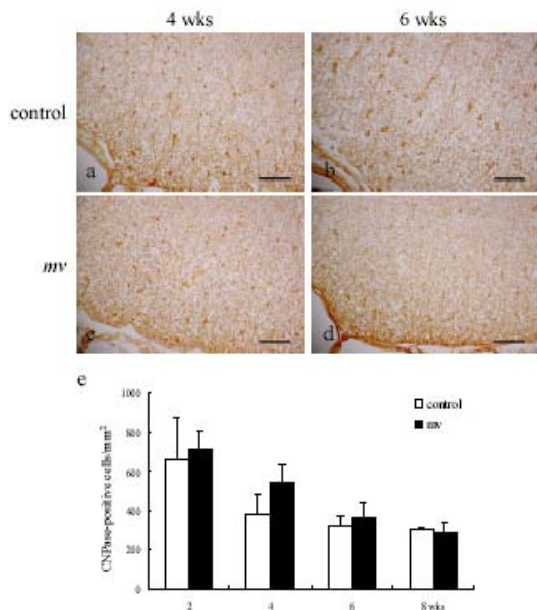
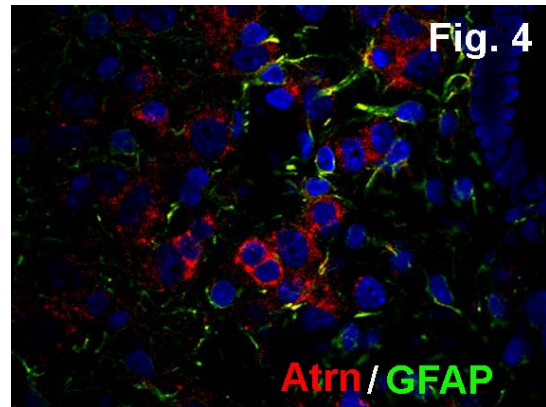


Fig. 3. CNPase immunohistochemistry in control (a, b) and *mv* (c, d) rats. The graph shows the number of CNPase-positive oligodendrocytes in the dorsal funiculus (e). There was no significance between control (open bars) and *mv* (black bars) rats ($n=3$ in each group) at all ages by Scheffe's test. Bar: 100 μ m.

また、正常ラットの脊髄白質のアトラクチン発現細胞は主にオリゴデンドロサイトであったが (Fig. 4),



mv ラットではアトラクチン陽性細胞は認められなかった。

これらミエリン遺伝子および蛋白の発現量の低下は、*mv* ラットにおけるオリゴデンドロサイトの機能異常を示唆し、発症メカニズムとして重要と考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

1. Kuwamura M, Nakagawa M, Nabe M, Yamate J, Inoue M, Satoh H, Yamato O
Neuronal ceroid-lipofuscinosis in a Japanese domestic shorthair cat.
J Vet Med Sci (in press) 査読有
2. Kuwamura M, Murai F, Nishioka S, Aoki M, Ohashi F, Yamate J, Kotani T, Summers BA.
Late onset cerebellar cortical degeneration in a Koala
Aust Vet J (in press) 査読有
3. Izawa T, Takenaka S, Ihara H, Kotani T, Yamate J, Franklin RJ, Kuwamura M. Cellular responses in the spinal cord during development of hypomyelination in the mv rat
Brain Res 1195: 120-129, 2008
査読有

[学会発表] (計2件)

1. Izawa T, Takenaka S, Kotani T, Yamate J, Kuwamura M
Altered myelinogenesis and glial responses in the attractin-deficient mv rat.
26th Annual meeting of European Society of Veterinary Pathology
2008年9月19日, Dubrovnik, Croatia
2. 井澤武史, 桑村 充, 山手丈至, 小谷猛夫,
アトラクチン欠損ミュータントmvラットにおけるミエリン関連遺伝子・蛋白の発現解析
第145回 日本獣医学会
2008年3月29日
麻布大学(相模原市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.vet.osakafu-u.ac.jpjp/path/path.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小谷 猛夫 (KOTANI TAKAO)

大阪府立大学・生命環境研究科・教授

研究者番号: 00081589

(2) 研究分担者

桑村 充 (KUWAMURA MITSURU)

大阪府立大学・生命環境研究科・講師

研究者番号: 20244668

山手 丈至 (YAMATE JYOJI)

大阪府立大学・生命環境研究科・教授

研究者番号: 50150115