

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24650177

研究課題名(和文)なぜ海馬裂の脳境界バリア構造は正常マウスで消失しリーラーマウスで遺残するのか？

研究課題名(英文)The barrier structure of glial limitans in the hippocampal fissure is broken in the normal mouse, but maintained in the reeler.

研究代表者

寺島 俊雄(Terashima, Toshio)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20101892

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):正常マウス、リーリン欠損マウス(リーラー)、Dab1欠損マウス(ヨタリ)成体の嗅内野にBDAを注入し、海馬貫通線維を標識したところ、リーラー・ヨタリのBDA標識線維は海馬裂を貫通しない。正常マウスおよびリーラー・ヨタリの海馬貫通線維の生後発育をDilにより調べたところ、リーラー/ヨタリではP4を超えて海馬裂を貫通する線維はない。さらにリーラー・ヨタリではGFAP陽性アストログリアは海馬裂に沿って蓄積する。このような像は正常マウスでは認められない。以上より、リーリンシグナル伝達系分子の欠損により海馬裂の両側を挟む皮質最表層のグリア増殖により海馬貫通線維の経路変更が起こることが証明された。

研究成果の概要(英文):In the present study, we injected BDA into the entorhinal cortex of the normal, reeler and yotari mice to examine the course of the entorhinohippocampal fibers, i.e., perforant pathway. BDA-labeled entorhinohippocampal fibers penetrated through the hippocampal fissure in the normal mouse, but they could not penetrate through the hippocampal fissure in the reeler and yotari mice. Next, we placed Dil crystals into the entorhinal cortex of the normal, reeler, and yotari mice during early postnatal weeks. Dil-labeled entorhinohippocampal fibers penetrated through the hippocampal fissure on P1 in the reeler and yotari mice, but no fibers which penetrated through the fissure were identified until P4, and all of Dil-labeled fibers ran in parallel to the fissure instead of perforating it. GFAP-immunopositive astroglia were accumulated along the hippocampal fissure both in the reeler and yotari mice, which may result in obstruction of elongation of entorhinohippocampal projection.

研究分野: anatomy

キーワード: 海馬裂 リーラー ヨタリ リーリン 貫通線維

1. 研究開始当初の背景

脳の表面を覆う表層グリア性境界膜は、脳とクモ膜下腔を境界し、脳を外界から遮蔽する重要な構造物である。今までこのバリア構造はその破綻が生み出す病的側面に大きな関心が払われてきた。例えば福山型筋ジストロフィーでは脳境界が破綻してニューロンがクモ膜下腔に遊出し、大脳の層構築異常を呈する(図1)。一方、今回、問題とする海馬裂では、一度形成された表層グリア性境界膜が分解する特異な領域であり、脳バリア構造の維持とは異なる実験パラダイムを私たちに提供する。しかもリーリン欠損マウスやリーリン欠損ラットの海馬裂ではバリア構造が分解・消失しないため、正常脳におけるバリア破綻の分子メカニズムを検証する上で、極めて示唆に富む研究材料となる。すなわちリーリンシグナル伝達系の欠損による脳バリア構造の残存のメカニズムの解析を通じて、表層グリア性境界膜の生理的分解の機能的意義を明らかにするだろう。またリーリン下流で機能する Dab1 欠損マウス(ヨタリ)の海馬裂や海馬貫通線維に関する研究は乏しい(図2)。

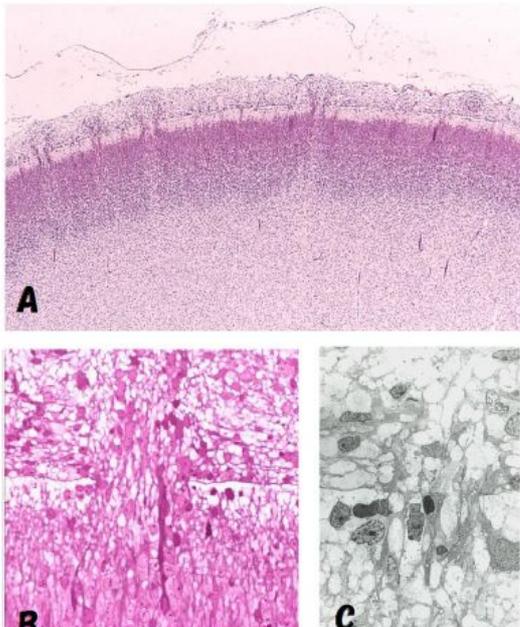


図1 大脳皮質表面におけるグリア性境界膜の消失--福山型筋ジストロフィーを例にして A 大脳皮質表面より湧出するニューロン B, C グリア性境界膜を越えて遊走するニューロン(B 光顕、C 電顕)

2. 研究の目的

脳の表面を覆う表層グリア性境界膜は、髄液脳関門として脳を外部環境から遮断する。このバリア構造が破綻すると、福山型筋ジスト

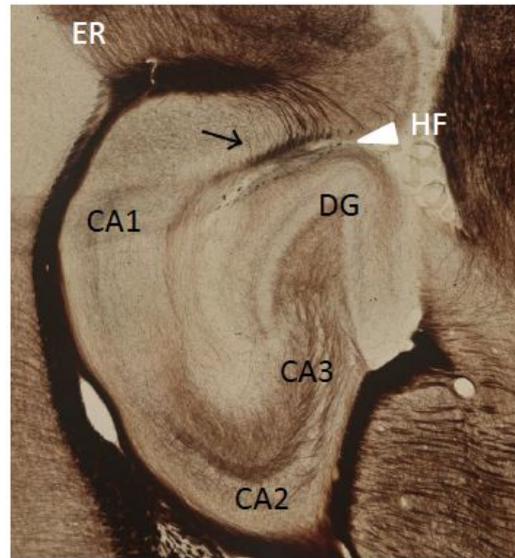


図2 海馬裂を通過する嗅内野海馬投射線維(貫通線維)(矢印)Biershowsky

ロフィーの場合のように、脳表面からニューロンやグリアがクモ膜下腔に遊出する結果となる。したがって脳表面のバリア構造は脳の形成にとって必須な構造物である。ところが一度できたバリア構造が発生過程で分解・消失する部位が1つだけ正常脳にある。海馬が発生過程で折り畳まれることによりできる海馬裂である。興味深いことに、リーリン・シグナル分子を欠損するマウス・リーラーの海馬裂バリア構造は消失しない。その結果、海馬貫通線維は海馬裂を貫通せず、これを迂回して、その標的である歯状回に達する。本研究の目的は脳バリア構造の維持と崩壊に係わる分子メカニズムをとくにリーリンシグナル伝達系(Reelin, Dab1)の観点から明らかにすることである。

3. 研究の方法

胎生期～生後発育期における正常およびリーリン欠損マウス・リーラーと Dab1 欠損マウス・ヨタリを用いて、(1)海馬貫通線維が海馬裂を貫通あるいは迂回する過程を、順行性軸索輸送法により明らかにする、(2)形態学手法を用いて発生過程において海馬裂が障壁としての組織構築を失う過程を調べる、(3)海馬体と嗅内野の共培養により、海馬貫通線維の経路を観察する、(4)リーリン遺伝子を電気穿孔法により海馬に導入し、海馬裂の正常化を試みる。以上を総合してリーリンシグナル分子が、海馬裂の軟膜・グリアバリアーの生理的分解を誘導し、海馬貫通線維の進入を可能とするメカニズムを明らかにする。

4. 研究成果

(1) ピオチンデキストラミンによる海馬貫通線維の標識

生後 6 週令の正常マウス、リーラーマウス、ヨタリマウスを麻酔下で脳定位置に頭蓋を固定した。右の頭頂骨に小孔をうがち、ビオチン デキストラン アミン (BDA) を嗅内野内側部と外側部に微量注入した。5 日後にパラホルムアルデヒドアルデヒドの混合液にて還流固定した。脳を取り出し、凍結切片を作成し、アビジン-ビオチン HRP に浸漬し、DAB 反応にて発色した。正常マウスの嗅内野外側皮質注入例では BDA 標識線維は CA1 と CA2 の網状分子層に終わるが、一部は海馬裂を横断し、歯状回に侵入し、分子層の表層に終止した。一方、リーラーマウス、ヨタリマウスの嗅内野外側皮質注入例では、BDA 標識線維は CA1 と CA2 に終わるものの、その終止する層は不明瞭であった。標識線維は、海馬裂を貫通することなく、海馬裂に沿ってその最深層を迂回し、歯状回分子層の最表層に終止した。以上より、リーラーマウスと同様にヨタリマウスにおいても海馬貫通線維は海馬裂を迂回し、最終的な標的である歯状回分子層の最表層に終末することが明らかになった (図 3)。

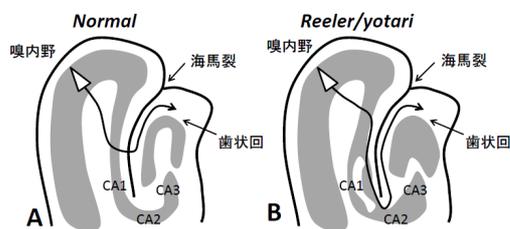


図 3 貫通線維 (A 正常、B リーラー/ヨタリ)

(2) Dil の *postmortem labeling* 法による海馬貫通線維の標識

正常マウスおよびリーラー、ヨタリのホモ個体の生後 0 日 (P0) から P6 の仔をパラホルムアルデヒド溶液にて固定し、抜脳後、嗅内野皮質にカルボシアニン蛍光色素の Dil の微小結晶をおいた。3 週間、冷暗所にパラホルム固定脳を保存し、マイクロスライサーにて海馬体を水平断して、蛍光顕微鏡にて Dil で標識された貫通線維を観察した。

P0 では正常マウス、リーラー、ヨタリともに Dil 標識海馬貫通線維は海馬裂に達しない。P1 では、ごく少数の標識線維が正常マウス、リーラー、ヨタリの海馬裂を通過する。標識貫通線維は、CA1/CA2 領域の網状分子層に分布するが、リーラー/ヨタリでは、海馬の細胞構築異常を反映して、Dil 標識貫通線維終末はより広い範囲に終止する傾向がある。P2 を過ぎると、正常マウスでは引き続き多くの標識線維が海馬裂を越えて歯状回分子層に進入するが、リーラー/ヨタリではその数を減じ、P4 以後では海馬裂を貫通する嗅内野歯状回投射線維 (つまり海馬貫通線維) は海馬裂を貫通しない。リーラー/ヨタリの海馬貫通線維に相当する線維束は海馬裂の最深層を迂回して、その最終的な投射部位である歯状回分子層に至る (図 4)。

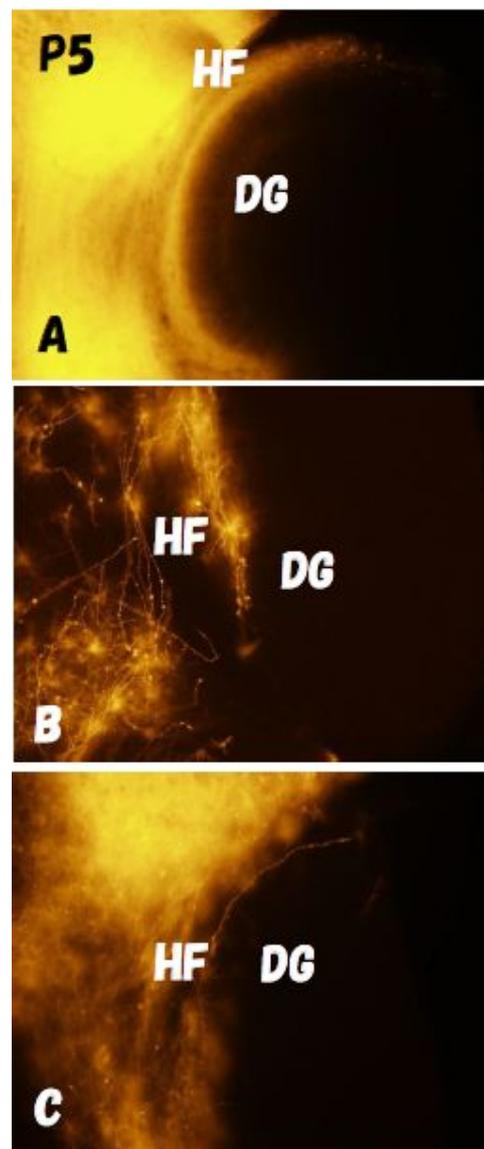


図 4 生後 5 日 (P5) の海馬貫通線維 (A 正常マウス、B リーラー、C ヨタリ) 略号: DG 歯状回、HF 海馬

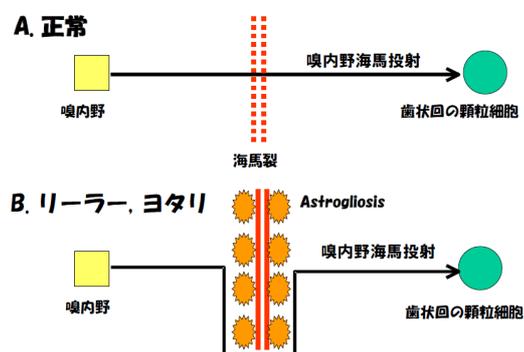


図 5 海馬裂を貫通する嗅内野海馬投射線維 (A 正常マウス、B リーラー・ヨタリ)

(3) 海馬裂の構造

ラミニン免疫組織化学: 正常マウス、リー

ラー/ヨタリともに血管壁がラミニン陽性であり、その免疫陽性像は生後発達期、成体期いずれにおいても変わらない。

GFAP 免疫組織化学：成体の正常マウスでは GFAP 陽性のグリア線維は歯状回の水平断面において垂直方向に配列するが、このような配向はラー/ヨタリでは全く観察することができない。またラー/ヨタリでは GFAP 陽性アストログリアは海馬裂に沿って蓄積する。このような像は正常マウスでは認められない。

結語：ラー・ヨタリマウスでは海馬裂に沿ってアストログリアの増殖が起こり、これが嗅内野海馬投射線維（貫通線維）の進入を阻害する（図 5）。ただしラーやヨタリでも生後最初期（P1~P2）に海馬裂に進入する貫通線維を認める。しかし、これらの貫通線維は、その後の過程で消褪し、嗅内野海馬投射線維は、海馬裂の最深層を迂回して、その標的とする歯状回分子層および海馬 CA1, CA2 の網状分子層に終止する。

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 5 件）

山本 達朗、奥山-山本 綾子、寺島 俊雄、軸索輸送による伝導路追跡 *Clinical Neuroscience*、査読有、2015（印刷中）
Sonoshita M, Itatani Y, Kakizaki F, Sakimura K, Terashima T, Katsuyama Y, Sakai Y, Taketo MM. Promotion of Colorectal Cancer Invasion and Metastasis Through Activation of Notch-Dab1-Abl-RhoGEF Protein Trio. *Cancer Discov.* Vol. 5, No. 2, 2015, 198-211.
doi: 10.1158/2159-8290.CD-14-0595

Yunus J, Setzu T, Kikkawa S, Sakisaka T, Terashima T. Cytoarchitecture of the olfactory bulb in the laggard mutant mouse. *Neuroscience*, 275, 2014, 259-271.
doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.06.011

Fujikura K, Setzu T, Tanigaki K, Abe T, Kiyonari H, Terashima T, Sakisaka T, Kif14 mutation causes severe brain malformation and hypomyelination. *PLoS One*. 8(1), 2013, Epub e53490.
doi: 10.1371/journal.pone.0053490

勝山裕、寺島俊雄、Reelin 受容体機能の多様性と脊椎動物脳の進化、生体の科学 64 巻、5 号、2013、518-519.

Imai H, Yamamoto T, Katsuyama Y, Kikkawa S, Terashima T. Subcortically and callosally projecting neurons are distinct neuronal pools in the motor cortex of the reeler mouse. *Kobe J Med*

Sci. 2012; 8: 58(3), 2012, E86-E95.
<http://www.med.kobe-u.ac.jp/journal/contents/58/E86.pdf>

〔学会発表〕（計 12 件）

ユヌス・ジュナエディ、薛富義、吉川知志、匂坂敏朗、寺島俊雄. 神経奇形マウスラガードの小脳細胞構築）第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会・第 92 回日本生理学会大会合同大会 2015 年 3 月 21 日～23 日、神戸（兵庫県）

勝山裕、中村龍司、杉山拓、大隅典子、阿部高明、相澤慎一、日比正彦、寺島俊雄. Sbn1 は神経幹細胞の維持と分化に必須である、第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会・第 92 回日本生理学会大会合同大会 2015 年 3 月 21 日～23 日、神戸（兵庫県）.

Kikkawa S, Sumimoto T, Sumi T, Sakihama Y, Terashima T. Functional analysis of the Reelin-Dab1 signal pathway in the developing zebrafish nervous system. “Neuroscience 2014” Society for Neuroscience 44th annual meeting, November 15-19, 2014 ワシントン（米国）

薛富義、藤倉航平、崎浜吉昭、匂坂敏朗、寺島俊雄. 髄鞘低形成と小脳性運動失調を呈する laggard マウスの皮質構築異常. 第 118 回日本解剖学会総会全国学術集会 2013 年 3 月 30 日、高松（香川県）

並河知宏、寺島俊雄、吉川知志. 発生期大脳皮質における Dab1 の分子内機能制御機構の解析 2014 年 9 月 11 日～13 日、横浜（神奈川県）

吉川知志、角本貴進、崎浜吉昭、寺島俊雄. ゼブラフィッシュ小脳皮質発生における Reelin シグナルの機能解析. 第 118 回日本解剖学会総会全国学術集会 2013 年 3 月 29 日、高松（香川県）

並河知宏、寺島俊雄、吉川知志. 発生期大脳皮質における Dab1 の分子内機能制御機構の解析. 第 118 回日本解剖学会総会全国学術集会 2013 年 3 月 30 日（高松）

Junaedy Y, 藤倉航平, 薛富義, 匂坂敏朗, 寺島俊雄. Cytoarchitecture of the olfactory bulb in the Laggard mutant mouse. 第 118 回日本解剖学会総会全国学術集会 2013 年 3 月 28 日、高松（香川県）

山本達朗、山本綾子、永井 諒、田邊弘基、西村直道、寺島俊雄. リーリンまたは Dab1 の欠損は小腸上皮細胞の分化に影響を与える. 第 118 回日本解剖学会総会全国学術集会 2013 年 3 月 28 日、高松（香川県）

並河知宏、寺島俊雄、吉川知志. Dab1N 末端フラグメントの発現は発生期大脳皮質において異所的な細胞集積を誘導する第 35 回日本神経科学大会 2012 年 9 月 20

日、名古屋（愛知県）
角本貴進, 崎浜吉昭, 寺島俊雄, 吉川知志,
ゼブラフィッシュ神経系の発生における
Reelin-Dab1 シグナルの機能解析第 35 回
日本神経科学大会 2012 年 9 月 21 日、
名古屋（愛知県）

勝山 裕, 今井英明, 杉山 拓, 大隅典子,
寺島俊雄, Sbno1 is required for neural
stem cell morphogenesis and survival of
differentiating neurons during cortical
development. 包括型脳科学研究推進支
援ネットワーク 夏のワークショップ
2012 年 7 月 26 日、仙台（宮城県）

勝山 裕, 今井英明, 杉山 拓, 大隅典子,
寺島俊雄, Sbno1 is required for survival
of differentiating neurons and
morphogenesis of the neural stem cells.
第 45 回日本発生生物学会 2012 年 5 月
31 日、神戸（兵庫県）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.med.kobe-u.ac.jp/anato1/Anat1_home.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺島 俊雄 (TERASHIMA, Toshio)

神戸大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：20101892

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

吉川 知志 (KIKKAWA, Satoshi)

神戸大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：90244681

薛 富義 (SETSU, Tomiyoshi)

神戸大学・医学部・技術専門員

研究者番号：30403281