

論文の内容の要旨

論文題目

Studies of the cerebellar morphology and
neuronal circuit in FAK mutant mice

FAK欠損マウスにおける小脳形態、
及び神経回路網形成解析

指導教員 三品昌美 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成12年4月進学

医学博士課程

機能生物学専攻

渡辺文寛

Focal adhesion kinase (FAK)は、様々な細胞種に発現している非受容体型チロシンキナーゼである。FAKの主な細胞外制御因子としてインテグリンがよく知られている。インテグリン以外にも、血小板由来因子受容体、上皮増殖因子受容体、ネトリン受容体、そして Ephからのシグナルを細胞内に伝達し、細胞接着、拡散、細胞移動、細胞生存、細胞周期調節、細胞増殖などに重要な役割を担っている。FAKは脳全体に広く分布している。

本研究では、小脳における FAK の細胞内、及び細胞内局在発現分布を解析し、さらに神経／グリア特異的、及びプルキンエ細胞特異的 FAK 欠損マウスを作製し、小脳発達過程における FAK の役割を検

討した。

従来の FAK 欠損マウスは胎生致死を示すため、FAK 欠損による小脳発達過程への影響を解析するにあたり、Cre/loxP 遺伝子組換えシステムを用いた部位特異的 FAK 欠損マウスの作成を試みた。Cre 組換え酵素活性依存的に FAK を欠損させるために、FAK 遺伝子内のキナーゼ翻訳領域を含む exon15 を Cre 認識部位である loxP 配列で挟んだ、TT2 胚性幹細胞由来の遺伝子組換えマウス Fak^{lox} マウスを得た。

FAK を神経系で欠損させるには、Cre 組換え酵素が神経系で発現するマウスが必要である。そこで神経系特異的中間径フィラメント nestin のプロモーターとエンハンサー制御下で Cre 組換え酵素を発現するトランスジェニックマウス (+/nestin-cre) を使用した。神経/グリア特異的 FAK 欠損マウスを得るために、 $Fak^{lox/lox}$ マウスと nestin-cre マウスを交配した。 $Fak^{lox/lox}$ マウスと $Fak^{lox/lox}; +/nestin-cre$ マウスの交配により得られた $Fak^{lox/lox}$ マウスを対照マウス、 $Fak^{lox/lox}; +/nestin-cre$ マウスを神経/グリア特異的 FAK 欠損マウスとして以下の解析を行った。

まず *in situ* hybridization により、 Fak mRNA の欠損状態を確認した。神経/グリア特異的 FAK 欠損マウスでは、mRNA シグナルは大脳皮質の尾部、及び深部、海馬でシグナルの残存がみられたが、脳全体でシグナルの減少が確認された。免疫染色により、FAK タンパク質の欠損状態を確認した。FAK シグナルは、mRNA と同様な欠損パターンを示した。

脳組織構築への FAK の欠損効果を解析するため、ヘマトキシレン、及びクレシルバイオレット染色を試みた。神経/グリア特異的 FAK 欠損マウスの終脳、間脳、中脳、橋、延髄では、顕著な組織構築異常は認められなかった。しかし、小脳の小葉構造に顕著な異常が観察された。小脳の虫部において、小葉 VI と VII を区切る intercrural fissure の欠如が認められた。一方、小脳皮質の三層構造 (分子層、プルキンエ細胞層、顆粒細胞層) では、顕著な異常は認められなかった。また小葉構築の異常は多様性を示した。小葉 I/II と III を区切る precentral fissure の欠如を示す個体、さらに小葉 IV/V と VI の間で融合を示す個体も確認された。また小脳虫部での各小葉の面積を定量

したところ、対照マウスより縮小しており、それらの面積の減少率には勾配が認められた。以上の結果から、FAK は小葉構造の構築に関与することが明らかになった。

そこで、FAK の発現分布を免疫染色により詳細に解析した。FAK シグナルは、プルキンエ細胞の樹状突起や細胞体、バグマングリアの細胞体や放射状グリア、及び抑制性神経細胞の樹状突起や細胞体で斑点状のシグナルを示した。また平行線維、登上線維、及び抑制性神経細胞の神経終末においても FAK シグナルが観察された。これらの結果から、FAK は小脳の神経細胞、及びグリア細胞内に広く分布していることが明らかとなった。

小脳の細胞構築ならびに神経回路網形成において FAK 欠損の影響を解析した。平行線維終末への影響を検証するため、平行線維終末マーカーVGluT1 の免疫染色を行った。神経/グリア特異的 FAK 欠損マウスにおける VGluT1 シグナルの分布は、対照マウスと同様であった。また、抑制性神経細胞終末マーカーVGAT の免疫染色においても、神経/グリア特異的 FAK 欠損マウスにおける VGAT シグナルのパターンは、対照マウスと同様であった。バグマングリアへの影響を検証するため、バグマングリアマーカーBLBP の免疫染色を試みた。対照マウスでは、プルキンエ細胞層内、及び表層に伸展する突起として強いシグナルが観察された。一方、神経/グリア特異的 FAK 欠損マウスでは、プルキンエ細胞層内でみられたシグナルの一部が分子層の内部に侵入していることが確認された。また登上線維終末への影響を検証するため、登上線維終末マーカーVGluT2 の免疫染色を行った。対照マウスでは、VGluT2 シグナルは分子層の 3/4 まで観察されるのに対し、神経/グリア特異的 FAK 欠損マウスでは、そのシグナルの分布範囲が分子層の底部に低下していることを見出した。これらの結果は、FAK がバグマングリアの細胞体の配置と登上線維の支配領域の形成に関与することを示している。

登上線維に焦点を絞り、プルキンエ細胞樹状突起上での登上線維の支配様式を検討した。まず生後 16, 21, 28 日齢で VGluT2 染色を行い、登上線維の発達過程への影響を検証した。その結果、神経/グリア特異的 FAK 欠損マウスの登上線維の支配領域の発達は、対照マ

ウスと比較して有意に低下していた。さらに生後 24 日齢において、登上線維のトレーサー蛍光標識/VGluT2 蛍光染色/プルキンエ細胞樹状突起染色の三重染色により、プルキンエ細胞への登上線維の支配領域、及び投射様式を検討した。対照マウスでは、トレーサー標識登上線維の終末と VGluT2 シグナルは完全に一致した。またプルキンエ細胞体に終末をつくることなくプルキンエ細胞層を通過し、近位樹状突起と有棘小枝の境界まで終末を形成し、一つのプルキンエ細胞に対し単支配をしていた。一方、神経/グリア特異的 FAK 欠損マウスでは、プルキンエ細胞体で終末が確認され、最も遠位の終末は有棘小枝の境界まで到達せず、近位樹状突起の途中に留まっていた。また一つのプルキンエ細胞に対しトレーサー標識登上線維と非トレーサー標識登上線維の同時支配しているものが観察された。

CF 支配の近位退縮により、PC の近位樹状突起に異所的な棘突起が形成され、しばしば平行線維の近位拡大がみられることが知られている。そこでプルキンエ細胞樹状突起染色、および電子顕微鏡解析により、プルキンエ細胞近位樹状突起での棘突起を観察、定量化を試みた。その結果、神経/グリア特異的 FAK 欠損マウスでは、プルキンエ細胞近位樹状突起での棘突起の密度が有意に増加していた。以上の所見から、FAK は主要な一本の登上線維支配の強化、余剰な登上線維の排除、及び平行線維支配領域の遠位樹状突起への駆逐に参与すると考えられる。

これまでテトロドトキシン処理による神経活動の阻害やプルキンエ細胞に豊富に発現する P/Q 型カルシウムチャネル $\alpha 1$ サブユニットの欠損により、登上線維支配の近位退縮が起こることが報告されている。これらの観察は、プルキンエ細胞の神経活動が登上線維の支配を強化していることを示唆する。FAK はプルキンエ細胞に豊富に発現しており、その FAK が登上線維の支配を強化している可能性が想定された。そこでプルキンエ細胞特異的 FAK 欠損マウスを作製し、登上線維の支配の強化にプルキンエ細胞の FAK が関与するか否かを検証した。プルキンエ細胞に特異的に発現するグルタミン酸受容体 GluR $\delta 2$ のプロモーター制御下で Cre 組換え酵素を発現するマウス (D2creN) と *Fak*^{flox/flox} マウスとを交配し、プルキンエ細胞特異的

FAK 欠損マウスを作成した。このマウスでは、小葉構造、及びバグマングリアの細胞体の配置に顕著な異常は認められなかった。VGluT2 の免疫染色により登上線維の発達過程を検討したところ、プルキンエ細胞特異的 FAK 欠損マウスにおいて登上線維の支配の近位退縮を示した。さらに登上線維のトレーサー標識解析では、プルキンエ細胞体での登上線維の終末形成が確認されたが、多重支配は観察されなかった。以上の結果から、プルキンエ細胞の FAK が登上線維の支配領域の形成の一部に関与することが明らかとなった。プルキンエ細胞特異的 FAK 欠損の影響は、小脳全体での欠損に対し小さいことから、登上線維の FAK も関与していることが示唆される。

本研究により、小脳の発達において、FAK は小葉の構築、及びバグマングリアの細胞体の配置に関与することが明らかとなった。また FAK は登上線維の支配領域の形成にも影響を与え、その過程にはプルキンエ細胞の FAK が一部関与していることが明らかとなった。