

審査の結果の要旨

氏名 加藤 永子

本研究は、構造と機能が完成した大人の小脳において、主要なニューロンである顆粒細胞とプルキンエ細胞を選択的に欠損させると運動制御及び小脳神経回路網にどのような影響を及ぼすかを検討するため、分子遺伝学的手法を用いることにより、小脳のプルキンエ細胞あるいは顆粒細胞を選択的にかつ時期特異的に誘導欠損することが出来るマウスを作成し、運動機能と神経回路網の解析を行ったものであり、下記の結果を得ている。

- 1、小脳顆粒細胞選択的誘導除去マウスを得るために、小脳顆粒細胞特異的に CrePR を発現する ECP25 トランスジェニックマウス (+/*GluRε3-CrePR*)と、Eno2-STOP-DTA マウス(*Eno2^{DTA/DTA}*)を交配した。これらの交配により得られた両組換え遺伝子を有するマウスに RU-486 を経口投与して細胞除去を誘導し、小脳顆粒細胞選択的マーカーである neuronal nuclei (NeuN)と小脳プルキンエ細胞選択的マーカーであるカルビンジンの二重免疫染色を行った。NeuN 陽性顆粒細胞数の定量的結果、0.3 mg/g 体重の RU-486 経口投与によって、投与 5 日後に顆粒細胞をコントロールの約 10%にまで減少できることが示された。
- 2、小脳プルキンエ細胞選択的誘導除去マウスを得るために、小脳プルキンエ細胞特異的に CrePR を発現する D2CPR マウス(*GluRδ2^{+CrePR}*)と、Eno2-STOP-DTA ノックインマウスを交配した。これらの交配により得られた両組換え遺伝子を有するマウスに RU-486 を経口投与して細胞除去を誘導し、NeuN とカルビンジンの二重免疫染色を行って、細胞数を経時的に定量解析した。カルビンジン陽性プルキンエ細胞数の定量的結果、0.3 mg/g 体重の RU-486 経口投与によって、投与 5 日後にプルキンエ細胞をコントロールの約 5%にまで減少できることが示された。なお、RU-486 非投与の状態では小脳正中切片中のカルビンジン陽性プルキンエ細胞数がコントロールマウスの約半分に減少していることが示された。
- 3、0.3 mg/g 体重の RU-486 を投与することにより大部分の顆粒細胞あるいはプ

ルキンエ細胞を欠損させたマウスについて、1-40rpm の間で回転速度を段階的に変化させ、各回転数での滞在時間を測定する rotarod を実施した。その結果、顆粒細胞欠損マウスもプルキンエ細胞欠損マウスも、投与 7 日後においてコントロールマウスと比べて rotarod から落下するまでの滞在時間が有意に減少していることが示された。顆粒細胞欠損マウスとプルキンエ細胞欠損マウスでは有意な差はないことが示された。

- 4、投与 14 日後及び 21 日後に同様の rotarod テストを再実施した結果、コントロールマウスでは、再試行時には rotarod 上の滞在時間が 1 回目の試行より有意に増加するが、顆粒細胞欠損マウスおよびプルキンエ細胞欠損マウスでは、どちらも再試行により滞在時間を有意に増加させないことが示された。この結果、どちらのミュータントマウスも運動協調が重篤に障害されていることが示された。Rotarod の滞在時間に統計的に有意な差はなかったが、低速度の回転数における滞在時間に注目すると、顆粒細胞欠損マウスは非常に遅い速度にも関わらず、rod 上の滞在時間が短い傾向が観察され、顆粒細胞を欠損させた方がプルキンエ細胞を欠損するより運動協調への影響が大きいことが示唆された。
- 5、RU-486 の投与量を減少させ、NeuN とカルビンジンの二重免疫染色を行い、顆粒細胞あるいはプルキンエ細胞を用量依存的に除去できることが示された。また、0.06mg/g 体重の RU-486 経口投与で NeuN 陽性顆粒細胞数をコントロールの約 30%に、0.01mg/g 体重の RU-486 経口投与でカルビンジン陽性プルキンエ細胞数をコントロールの約 20%に減少できることが示され、顆粒細胞あるいはプルキンエ細胞を部分的に欠損させたマウスが作成できることが示された。
- 6、小脳顆粒細胞を約 30%に減少させた顆粒細胞部分欠損マウス、及びプルキンエ細胞をコントロールの約 20%にまで減少させたプルキンエ細胞部分欠損マウスの小脳矢状切片について、登上線維終末マーカーVGLuT2 の免疫染色を行い、登上線維のプルキンエ細胞支配領域の変化を検討したところ、登上線維の支配領域は有意な変化がないことが示された。また、平行線維終末マーカーVGLuT1 の免疫染色を行ったところ、顆粒細胞部分欠損マウス

ではわずかに VGlut1 のシグナルが減少していたが、プルキンエ細胞部分欠損マウスでは顕著な変化がないことが示された。

- 7、顆粒細胞部分欠損マウス、プルキンエ細胞部分欠損マウスに対して、thin rod テストを行ったところ、顆粒細胞部分欠損マウスおよびプルキンエ細胞部分欠損マウスのどちらも、コントロールと比べて、thin rod に滞在する時間が有意に短いことが示された。さらに顆粒細胞部分欠損マウスのほうがプルキンエ細胞部分欠損マウスより thin rod 滞在時間がより減少していることが示された。
- 8、顆粒細胞部分欠損マウス、プルキンエ細胞部分欠損マウスに対して、15 rpm の定速 rotarod テストを行ったところ、顆粒細胞部分欠損マウスおよびプルキンエ細胞部分欠損マウスは、どちらも試行を重ねることによって滞在時間を向上させたが、コントロールに比べて有意に滞在時間が短くなっていることが示された。また、顆粒細胞部分欠損マウスとプルキンエ細胞部分欠損マウスでは滞在時間に有意な差がないことが示された。
- 9、顆粒細胞部分欠損マウス、プルキンエ細胞部分欠損マウスに対して、1~40rpm の間で回転速度を段階的に変化させ、各回転数での滞在時間を測定する rotarod を行った。その結果、顆粒細胞部分欠損マウスもプルキンエ細胞部分欠損マウスも、投与 7 日後のテストでは、コントロールマウスと比較して滞在時間に有意な差がないことが示された。
- 10、顆粒細胞部分欠損マウス、プルキンエ細胞部分欠損マウスに対して、投与 14 日、21 日後に 1~40rpm の rotarod の再試行を行った結果、コントロールマウスと同様にプルキンエ細胞部分欠損マウスは滞在時間を有意に増加させることが示された。それに対して、顆粒細胞部分欠損マウスは、滞在時間を増加させないことが示された。

以上、本研究は、誘導的かつ選択的に顆粒細胞およびプルキンエ細胞を欠損させることで、発達時期における小脳の神経回路網形成の異常の影響を除外し、小脳の顆粒細胞を除去した場合と、プルキンエ細胞を除去した場合では運

動機能に異なった影響を及ぼすことを行動学的に明らかにすることができた。また、小脳皮質唯一の出力細胞であるプルキンエ細胞と、プルキンエ細胞にシナプスを形成している顆粒細胞との間の神経回路網のバランスが運動制御に重要であることを示唆した。開発した小脳プルキンエ細胞あるいは顆粒細胞を誘導除去できるマウス系統は、構造と機能が完成した大人の小脳において神経回路網のバランスを変化させ、小脳の機能と神経回路網がどのように変化するかを探求する上で有用なツールを提供することになると考えられる。以上より、本研究の成果は小脳の機能の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。