

氏名(本籍)	平井久雄(滋賀県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博士(論)第303号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	平成15年3月27日
学位論文題目	Mouse Flamingo 1/Celsr 2 relates neuronal reorganization of the hypertrophic dentate granule cells after kainate injection (マウスFlamingo1/Celsr2遺伝子と、カイニン酸局所投与後の肥大化マウス海馬顆粒細胞における神経細胞の再構築の関係について)
	審査委員 主査 教授 木村 宏
	副査 教授 遠山 育夫
	副査 教授 竹内 義博

論文内容要旨

【目的】

マウスの海馬内にカイニン酸を局所投与することにより、長期にわたって、進行性に海馬顆粒細胞が肥大化し、分散する動物モデルを作成できる。このモデルの海馬における形態変化は、ヒト側頭葉てんかんにおける変化に類似しており、この形態変化のメカニズムを解明することは、ヒト側頭葉てんかんの病態の発生、進行を理解するうえで重要と考えられた。これまでの我々の研究にて、カイニン酸投与直後に、BDNFの発現増加が重要な役割を果たしていることがわかっている。しかし、その長期にわたる形態変化の維持に関係している物質は未だ不明である。そこで、無作為に、肥大化海馬に発現しているmRNAを調べることで、その維持に関与する物質を同定すべく、本実験を行った。

【方法】

成獣マウスの一側(右側)海馬にカイニン酸を局所投与し、片側の海馬肥大化モデルを作成した。投与後2週目(早期)と8週目(慢性期)にそれぞれ5匹ずつ脳を取り出し、肥大化海馬と対側海馬を摘出し、total RNAを抽出した。抽出したRNAを用いてDifferential Display PCRを行い、対側(正常側)と肥大化側とのmRNAの発現の変化を調べた。

その中で、明かに発現が増加している複数のバンドを切り出し、TAクローニングベクターを用いてサブクローニングを行った。それぞれの塩基配列を調べ、遺伝子データバンクでホモロジー検索を行った。また、クローニング産物をもとに、ジコキシゲニンおよび放射性同位元素(³²P)で標識した。cRNAプローブを作成し、カイニン酸を投与した脳と、投与しない正常の脳の凍結切片を用いてin situ hybridizationを行い、mRNAの発現分布と海馬における発現の変化を調べた。

【結果】

Differential Displayの結果、対照である対側海馬に比べ、2週目、8週目とも増加しているバンドが5種類認められた。これらの塩基配列を調べた結果、4種類はデータバンクに登録されているものと、ほとんど同一性は認められなかったが、残りの一つは、mouse Flamingo1/Celsr2と高い同一性が認められた。

In situ hybridizationの結果、mouse Flamingo1/Celsr2は、正常脳では、海馬の錐体細胞、顆粒細胞、小脳のプルキンエ細胞に比較的強い発現が見られ、脳幹等に弱い発現が認められた。カイニン酸投与群では、2週目、8週目とも、対側に比べ肥大化側で発現は増強しており、特に8週

目では、統計学的に有意な増強が認められた。

【考 察】

Flamingoはprotocadherinに属し、mouse Flamingo1/Celsr2はそのmouse homologueの一つとされる。ショウジョウバエembryoでの研究では、適切なFlamingoの発現は樹状突起の伸長に重要な役割を果たしていると考えられている。また、マウスの胎児脳を用いた研究でも、Flamingoは軸索や樹状突起の伸長を調節していると考えられており、Flamingoは神経突起の伸長に重要な役割を果たしていると考えられている。

我々が実験の対象としているモデルでは、海馬内にカイニン酸を投与することにより、海馬歯状回の長期にわたる分散が認められる。分散した歯状回では、顆粒細胞の肥大化が見られ、樹状突起も太く伸長するとともに、mossy fiberのsproutingも認められる。今回の実験の結果、mouse Flamingo1/Celsr2の発現は、対側に比べ肥大化側で増加しており、顆粒細胞の形態変化の進行と発現増加とが同期して観察された。このことより、mouse Flamingo1/Celsr2は、このモデルにおける、顆粒細胞の形態変化の進行に関係していると考えられた。

このモデルでは、形態上の類似点のみでなく、脳波上もヒト側頭葉てんかんと同様の変化が報告されている。以上より形態変化の進行と一致して発現増加のあるFlamingoは、てんかん脳における神経組織の再構築に関係していることが示唆された。

【結 論】

カイニン酸の局所投与によりもたらされる、マウス海馬歯状回の肥大化において、早期、慢性期ともmouse Flamingo1/Celsr2の発現が増加していた。肥大化した海馬では、ヒト側頭葉てんかんに相当する変化が認められており、この遺伝子は、歯状回での軸索や樹状突起の変化等のepileptogenic changeに関係している可能性が示唆された。

学位論文審査の結果の要旨

マウス海馬内にカイニン酸を投与し、海馬顆粒細胞が慢性的に肥大化・分散する動物てんかんモデルにおいて、その形態学的な変化の責任遺伝子をDifferential Display PCR法を用いて追求した。その結果5種のmRNAが浮かび上がり、そのうち1種はマウスFlamingo1/Celsr2と高い相同性を示した。そこで、in situハイブリダイゼーション法を用いてマウス脳切片を調べたところ、Flamingo1/Celsr2のmRNA発現がカイニン酸投与側の海馬顆粒細胞で著明かつ長期持続的に亢進していることを発見した。

本研究は、難治性ヒト側頭葉てんかんに生じるアンモン角硬化の分子病理を解明する基礎研究であり、その責任遺伝子としてFlamingo1/Celsr2を初めて同定したものである。従って、博士（医学）授与に値するものと判定した。

なお、最終試験は平成15年2月4日に実施し、合格と判定した。