Osaka University Knowledge Archive

Title	Development of Cerebellar Neurons and Glias Revealed by in Utero Electroporation : Golgi-Like Labeling of Cerebellar Neurons and Glias
Author(s)	Kita, Yoshiaki
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/26147
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

〔　題　　名　〕Development of Cerebellar Neurons and Glias Revealed by in Utero Electroporation: Golgi-Like Labeling of Cerebellar Neurons and Glias（小脳のニューロンとグリアの発生様式 ―子宮内エレクトロポレーション法を用いた標識による解析―）

学位申請者　喜　多　善　亮

Cerebellar cortical functions rely on precisely arranged cytoarchitectures composed of several distinct types of neurons and glias.　Studies have indicated that cerebellar excitatory and inhibitory neurons have distinct spatial origins, the upper rhombic lip (uRL) and ventricular zone (VZ), respectively, and that different types of neurons have different birthdates.　However, the spatiotemporal relationship between uRL/VZ progenitors and their final phenotype remains poorly understood due to technical limitations. To address this issue, we performed in utero electroporation (IUE) of fluorescent protein plasmids using mouse embryos to label uRL/VZ progenitors at specific developmental stages, and observed labeled cells at maturity.　To overcome any potential dilution of the plasmids caused by progenitor division, we also utilized constructs that enable permanent labeling of cells.　Cerebellar neurons and glias were labeled in a Golgi-like manner enabling ready identification of labeled cells.　Five types of cerebellar neurons, namely Purkinje, Golgi, Lugaro and unipolar brush cells, large-diameter deep nuclei (DN) neurons, and DN astrocytes were labeled by conventional plasmids, whereas plasmids that enable permanent labeling additionally labeled stellate, basket, and granule cells as well as three types of glias.　IUE allows us to label uRL/VZ progenitors at different developmental stages.　We found that the five types of neurons and DN astrocytes were labeled in an IUE stage-dependent manner, while stellate, basket, granule cells and three types of glias were labeled regardless of the IUE stage.　Thus, the results indicate the IUE is an efficient method to track the development of cerebellar cells from uRL/VZ progenitors facing the ventricular lumen.　They also indicate that while the generation of the five types of neurons by uRL/VZ progenitors is regulated in a time-dependent manner, the progenitor pool retains multipotency throughout embryonic development.

様式７

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　　名　（喜多善亮）			
論文審査担当者		（職）	氏　　名
	主 査	特任教授	村上富士夫
	副 査	教授	山本　亘彦
	副 査	教授	八木　健
	副 査	教授	北澤　茂

論文審査の結果の要旨

本論文は子宮内電気穿孔法を用いて全ての小脳の神経細胞とグリア細胞が小脳に由来することを示すと共に、これらの細胞を産み出す元となる脳室層のprogenitorの発達に伴う変化を明らかにしたものである。小脳皮質にはプルキンエ細胞、星状細胞、籠細胞、ゴルジ細胞、ルガロ細胞の５種類の抑制性神経細胞、顆粒細胞とunipolar brush cellの２種類の興奮性細胞、そして深部核には興奮性の投射ニューロンと抑制性の局所回路ニューロンが存在する。またアストロサイト、オリゴデンドロサイト、バーグマングリア細胞、ミクログリアの４種類のグリア細胞がある。本研究ではこれらの細胞が小脳原基の脳室層のprogenitorに由来するか否かを確認するために、まず脳室層のprogenitorに電気穿孔法を用いて赤色蛍光蛋白mCherryの遺伝子を導入した。その結果、プルキンエ細胞、ゴルジ細胞と深部核の大型細胞（興奮性投射ニューロン）が標識されてきたものの、それ以外の細胞は標識されなかった。その理由としてプラスミドを導入されたprogenitorが分裂を繰り返したために導入したプラスミドが希釈されて可視化が出来なかった可能性が考えられたため、トランスポゾンを用いて電気穿孔法で導入されたコンストラクトがprogenitorのゲノムに組み込まれるような工夫をほどこした(Kawakami et al., Dev Cell 7: 133–144.)。その結果、ミクログリアを除く全ての細胞が標識されてきた。このことはミクログリア以外の全ての細胞は小脳原基にその起源を有することを示すとともに、一部の細胞は脳室層のprogenitorが分裂を繰り返した後に、最終分化を終えた細胞が産み出されることを意味している。本論文では次に電気穿孔により遺伝子導入を行う時期を系統的に変えることで、脳室層のprogenitorの性質が発達とともにどのように変化するかを調べた。その結果、胎生10.5日目という極めて発生の早い時期から脳室層のprogenitorは小脳の全細胞を産み出す能力をもっているものの、その能力は一部の細胞に関しては発生進むとともに変化することが明らかになった。しかし、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、バーグマングリア細胞そして顆粒細胞を産み出すprogenitorは、胎生15.5日目という脳室層における細胞分裂がほぼ終了する時期になっても、脳室層に存在している事が示唆された。以上の結果は、これまでの方法では明らかにすることが出来なかった小脳の発生と小脳の細胞の起源に関する新たな知見をもたらしたものであり、その学術的な価値は高い。以上のことより、本論文は学位に値するものと認める。