

Title	GFR $\alpha 3$ , Component of the Artemin Receptor, Is Required for Migration and Survival of the Superior Cervical Ganglion
Author(s)	西野, 仁輔
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/42564">http://hdl.handle.net/11094/42564</a>
DOI	
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名	西野仁輔
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 16039 号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科病理系専攻
学位論文名	GFR $\alpha$ 3, Component of the Artemin Receptor, Is Required for Migration and Survival of the Superior Cervical Ganglion (神経栄養因子 Artemin の受容体、GFR $\alpha$ 3 は上頸神経節の遊走、生存に必要なである)
論文審査委員	(主査) 教授 濱田 博司  (副査) 教授 岡野 栄之 教授 三木 直正

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

GDNF (glial cell line derived neurotrophic factor) ファミリー (GDNF, neurturin, artemin, persephin) は TGF $\beta$  スーパーファミリーに属する神経栄養因子で、中脳ドーパミン作動性細胞、神経堤由来の末梢神経等、様々な神経細胞に対する栄養効果を持つ。

GDNF ファミリーの受容体は、リガンド特異性を決定する GPI 結合型膜タンパク ( $\alpha$  ユニット) と受容体型チロシンキナーゼである Ret ( $\beta$  ユニット) の複合体から構成される。 $\alpha$  ユニットとして GFR  $\alpha$  1、GFR  $\alpha$  2、GFR  $\alpha$  3 が哺乳類で同定されている。GFR  $\alpha$  1 は GDNF、GFR  $\alpha$  2 は neurturin および GDNF からのシグナルを伝える。GFR  $\alpha$  3 は artemin とのみ結合する。GDNF-GFR  $\alpha$  1、neurturin-GFR  $\alpha$  2 シグナル伝達系は、標的組換えマウスの解析によりその生理的重要性が示されている。しかし artemin-GFR  $\alpha$  3 については、生体での機能はほとんどわかっていない。GFR  $\alpha$  3 は主に神経堤由来の末梢神経系 (交感神経節、後根神経節、三叉神経知覚節) で発現する。本研究では、GFR  $\alpha$  3 標的組換えマウスの解析を通じ、これら神経組織における artemin-GFR  $\alpha$  3 シグナルの生理的役割を検討した。

#### 【方法ならびに成績】

- 1) GFR  $\alpha$  3 エクソン 4-8 を薬剤耐性遺伝子に置換したベクターを作製、エレクトロポレーションにて胚性幹細胞へ導入した。相同性組換えを起こした細胞を選別後、胚盤胞へ導入、得られたキメラマウスより交配をすすめ、GFR  $\alpha$  3 を欠く標的組換えマウスを作製した。
- 2) 成体における外表観察にて、標的組換え個体は重度の眼瞼下垂を示し、自律神経系の異常が示唆された。これら組織について神経細胞数の計測、免疫染色による神経投射の確認を行った。交感神経系では、上頸神経節が完全に消失あるいは非常に縮小していた。また標的器官 (上瞼板筋、顎下腺) では、上頸神経節からの神経投射が消失していた。一方、副交感神経節では細胞数、神経投射とも正常であった。
- 3) 上記、上頸神経節消失の原因時期を知るため、発生各時期における上頸神経節細胞数を標的組換え個体/正常個体間で比較した。結果、標的組換え個体では、出生直後まで細胞数は保たれていた。そして出生後から急激な細胞数減少を示した。TUNEL アッセイで陽性像を示すことから細胞死はアポトーシスが原因であることがわかった。

更に出生直後、上頸神経節および標的器官で各種マーカーの in situ hybridization、免疫染色を行った。その結果、細胞数が保たれている出生直後、標的組換え個体では細胞の成熟化、神経投射等、質的な異常が既に生じていることがわかった。

- 4) 正常個体にて、上頸神経節におけるGFR $\alpha$  3の発現を in situ hybridization により調べた。結果、胎生期（胎生12.5日）で特に強い発現を認めた。標的組換えマウスで細胞数の減少を認める出生後では、発現は逆に弱くなり一部の細胞に限局していた。
- 5) 次にGFR $\alpha$  3の発現が強い、胎生期における上頸神経節前駆細胞の発生を調べるため連続切片を作製後、細胞数の計測を行った。標的組換えマウスでは胎生11.5日まで正常な発生が起こるが、それ以降、前駆細胞の頭側への遊走が起こらないことがわかった。異常は上頸神経節に特異的であり、より尾側の交感神経節（星状神経節）は正常な発生を示した。
- 6) 更に、遊走の異常が生じる胎生11.5–14.5日において、GFR $\alpha$  3、artemin、Retの発現を調べるため、正常個体を用いた in situ hybridization を行った。結果、胎生12.5日、上頸神経節の周囲で一過性に3者の発現が一致することがわかった。
- 7) 最後に、本来GFR $\alpha$  3が発現する他の組織（後根神経節、三叉神経知覚節）について細胞数の計測、各種マーカーの免疫染色を行った。これらの組織では細胞数、質共に正常個体と変わらなかった。

#### 【総括】

以上の結果より、artemin-GFR $\alpha$  3/Retによるシグナル伝達経路は、上頸神経節の発生、特に胎生期における前駆細胞の遊走に重要であることがわかった。

正常個体では胎生12.5日、上頸神経節前駆細胞周囲においてartemin、GFR $\alpha$  3、Ret 3者の発現が一致する。この時期伝達されるシグナルは前駆細胞の遊走に必須であり、GFR $\alpha$  3を欠く標的組換えマウスでは、胎生11.5日以降、上頸神経節前駆細胞の頭側への遊走が起こらない。遊走の異常でもたらされた位置の異常により、前駆細胞は周囲からの適切なシグナルを受け取ることが出来ない。結果、出生前後における前駆細胞の成熟化、および標的器官への神経投射が妨げられる。神経投射の異常により、標的器官で提示される生存シグナルを受け取ることができず、生後の神経細胞死が起こる。

GDNF-GFR $\alpha$  1、neurturin-GFR $\alpha$  2、Retを欠く標的組換えマウスでは腎臓、腸管神経節、副交感神経節等の異常が生じる。GFR $\alpha$  3を欠く標的組換えマウスにおける表現型は、これらの異常と異なる全く新しいものであり、artemin-GFR $\alpha$  3/Retによるシグナル伝達系の生理的重要性が示された。

### 論文審査の結果の要旨

GDNFファミリー（GDNF, neurturin, artemin, persephin）は近年同定された神経栄養因子であり、その広範囲な神経細胞に対する作用から、各種神経疾患の新たな治療法の確立に大きく貢献することが期待されている因子である。治療法の確立のためには、GDNFファミリーから生じるシグナルの伝達機構、細胞レベル/個体レベルでの役割を解析、理解する必要がある。

本研究ではGFR $\alpha$  3標的組換えマウスの解析を通じ、これまで全く機能のわかっていなかった、artemin-GFR $\alpha$  3/Retシグナル伝達系の生体中における機能を初めて明らかにした。このシグナル伝達系は、交感神経系の一神経節である上頸神経節の遊走に必須であり、後の成熟化、生存に影響を与えていることが示された。

本研究は、GDNFファミリーの持つ全く未知の役割を明らかにしており、神経疾患に対する新しい治療法の確立につながるものと期待できる。よって、本研究は学位に値するものと認める。