



Title	Distribution of L1cam mRNA in the Adult Mouse Brain : In Situ Hybridization and Northern Blot Analyses
Author(s)	堀之内, 和広
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/48909">https://hdl.handle.net/11094/48909</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名	堀之内 和 広
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 21862 号
学位授与年月日	平成 20 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科未来医療開発専攻
学位論文名	Distribution of L1cam mRNA in the Adult Mouse Brain : In Situ Hybridization and Northern Blot Analyses (成熟マウス脳内における細胞接着分子 L1cam mRNA の分布解析)
論文審査委員	(主査) 教授 遠山 正彌 (副査) 教授 米田 悦啓 教授 佐藤 宏道

### 論文内容の要旨

#### [ 目 的 ]

これまでの研究では、細胞接着分子 L1cam の免疫陽性構造物が成熟マウス脳内に広く分布していることが示されており、その多くは、神経終末であると考えられる斑状免疫陽性構造物として観察されている。しかしながら、上記の免疫組織化学的研究では、細胞体における免疫反応はほとんど観察されず、従って、それら L1cam たんぱく質がどこで産生されているのかは不明であった。そこで本研究では、in situ hybridization 法を用い、成熟マウス脳内における L1cam 産生細胞の同定と分布について検討した。

#### [ 方法ならびに成績 ]

本研究は、in situ hybridization および Northern blot に用いる標識プローブ作製の鋳型プラスミドを調製することから開始した。

4 週齢オス C57BL6j マウスの小脳より RNA を抽出し、ランダムプライマーと M-MLV 逆転写酵素を用いて 1st strand DNA を合成した。さらにこれを用い、PCR 法により L1cam の 361 塩基 (2349-2709 : third fibronectin type III domain) を増幅し、pGEM-T-eazy プラスミドに挿入 (pGEM-T-L1)、in situ hybridization および Northern blot に用いる 35S または 32P 標識プローブの鋳型とした。

上記鋳型 pGEM-T-L1 から 32P 標識プローブを作製し、12 週齢オス C57BL6j マウスの脳の各部位 (嗅球、大脳皮質、線条体、海馬、間脳、中脳、小脳、橋、延髄) より調整した RNA を用いて L1cam に対する Northern blot を行った。その結果、それぞれの脳部位で L1cam 由来のバンド (~6k base) を検出し、広範囲に発現していることが判明した。また、それぞれの L1cam mRNA のバンド密度を比較すると線条体、間脳において最も高いバンド密度を示し、海馬において高いバンド密度を呈した。一方、大脳皮質、中脳においては、中等度のバンド密度を示し、嗅球、小脳、橋、延髄では、そのほかの部位に比べると比較的低いバンド密度ではあるが、L1cam mRNA の発現が認められた。

一方、35S 標識プローブを用いて 12 週齢オス C57BL6j マウスより調製した脳矢状切片に対して L1cam に対する in situ hybridization を行った。その結果、Northern blot の結果と一致して L1cam mRNA は嗅球から下位脳幹部ま

で広範囲に発現していることが観察された。また、クレシルヴァイオレットによる対比染色を行い、L1cam 発現シグナルを持つ細胞種を検討したところ、本研究では L1cam mRNA 発現シグナルは、神経細胞の細胞体のみ観察され、樹状突起や軸索、またはグリア細胞には観察されなかった。

次に、12 週齢オス C57BL6j マウスより調製した脳冠状切片を用いて、L1cam 産生細胞の分布について詳細な観察を行った。

#### 嗅球

嗅球、副嗅球における僧帽細胞において、非常に強い L1cam mRNA 発現シグナルを観察した。これに加え、房飾細胞と考えられる細胞の細胞体にも弱いながらもシグナルを観察した。

#### 大脳皮質

大脳皮質において、L1cam mRNA 発現シグナルは第 2 層で最も多く、ついで第 5 層において中等度のシグナルを観察した。

#### 大脳辺縁系

海馬においては、CA1-3 の錐体細胞に強く発現していることを観察した。また、扁桃体では、外側核、基底外側核、中心核において強い発現を示した。さらに、視床下部においては、室傍核、視索上核、乳頭体において強い発現を示し、中でも、視索上核、乳頭体はとりわけ強いシグナルが観察された。

#### 視床

視床は、L1cam mRNA 発現シグナルが最も豊富に観察された領域である。中でも背側前核は、ひととき高い発現シグナルを呈し、また、室傍核、結合核、束傍核、背外側核において強い発現シグナルを観察した。

#### 中脳

中脳においては、エディンゲル-ウェスティファル核、黒質緻密部、腹側被蓋野、三叉神経中脳路核において強いシグナルを観察した。また、赤核、中脳中心灰白質、背側縫線核において中等度のシグナルを観察した。

#### 下位脳幹部

下位脳幹部においては、強い L1cam 発現シグナルを示す神経核が多数観察された。青斑核、被蓋網様核、三叉神経運動核、顔面神経核、疑核、下オリーブ、外側網様核、迷走神経背側核、舌下神経核において非常に強い発現シグナルが観察された。

[ 総 括 ]

本研究により、成熟マウスの脳内において L1cam 産生細胞が多種存在し、脳内の広い領域に分布していることが明らかとなった。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は、細胞接着分子 L1cam の機能発現可能領域を明示することを目的に、当該分子の分布について解析・検討を行ったものである。従来、L1cam が脳組織形成に重要であることが知られていたが、一方で著者は L1cam が神経伝達調節機能を示す成熟脳に着目し、その機能発現部位を特定するに当たって極めて重要な知見となる L1cam 産生細胞の分布について検討を行った。

その結果、成熟脳において L1cam は神経細胞により産生され、その L1cam 産生神経細胞が脳の広範にわたって分布していることが明らかになった。さらに、これまで知られていた海馬などのグルタミン酸作動性神経細胞のみならず、黒質、腹側被蓋野、青斑核といったカテコールアミン神経細胞にも強く発現していることが示された。

本研究は、L1cam の機能研究に対して新たな視野をもたらすものであり、神経科学研究の今後の発展に対して大きく寄与するものであると考えられる。以上の理由から、本論文は、博士（医学）の学位を授与するに値するものと判断される。