

Title	神経活動が制御する視床皮質軸索の枝分かれ形成におけるNetrin-4の関与
Author(s)	早野, 泰史
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/60300
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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論 文 内 容 の 要 旨

発生期において、神経細胞は出力線維である軸索を伸長させ、標的領域の周辺で枝分かれを形成し、標的細胞の樹状突起とシナプスを介して結合する。軸索枝分かれ形成の投射領域、複雑さは神経結合のパターン、強さを決定する重要な過程であると考えられている。哺乳類の視床皮質投射系はその結合様式や発生過程の知見が豊富で、軸索枝分かれ形成などの神経回路形成メカニズムを解明する上で有用な系である。これまでの研究から、視床から伸長してくる軸索は標的層である大脳皮質4層で主に枝分かれを形成することが知られているが、この層特異性は皮質4層に発現する細胞外因子が視床軸索の伸長や枝分かれ形成を制御することで獲得されていることが分かっている。一方で視床・大脳皮質細胞の神経活動が視床皮質投射を修飾していることがよく知られているが、神経活動が軸索枝分かれの層特異性の獲得にも重要な役割を担っていることが最近の研究結果から示唆されている。このことから、標的層に発現する軸索枝分かれ促進因子もしくは視床軸索側に発現する受容体分子の中に、その発現が神経活動によって調節されるものがある可能性が示唆された。本研究は神経活動によってその発現、特に遺伝子発現量が変化する分子の存在を調べ、その回路形成における役割を解析することにより、層特異的かつ神経活動依存的な神経回路形成の原理を明らかにすることを目指した。

まず、皮質4層特異的に発現する分子群について、神経活動に依存して発現を変化させる分子を調べるために、視床と皮質の共培養切片を通常の培養液と神経活動を阻害するTTX、APVを含む培養液中で2週間培養し、大脳皮質切片からRNAを抽出し、候補分子の遺伝子発現量を定量PCR法を用いて比較した。その結果、Netrin-4の発現量がTTX、APVを添加したサンプルで減少していることが分かった。Netrin-4の遺伝子発現パターンを*in situ* hybridization法を用いて調べたところ、生後4日目から大脳皮質4層を含む視床軸索の標的層特異的に発現し、神経活動が活発になる生後2週目からその発現量が増加していることが分かった。次に、Netrin-4の視床皮質投射における役割を明らかにするために、視床・大脳皮質共培養切片内の軸索枝分かれ形成を調べた。その結果Netrin-4を添加した培養切片では視床軸索の枝分かれ数が増加したことから、Netrin-4タンパク質に軸索枝分かれ形成の促進作用があることが分かった。視床軸索側にNetrin-4の受容体分子が発現しているかどうか*in situ* hybridization法を用いて調べたところ、Netrin-4と結合しうるDCC, Unc5h2, neogeninが視床核に発現していることが分かった。さらに内在性のNetrin-4が視床軸索の枝分かれ形成にどの程度関与しているのか明らかにするために、Netrin-4ノックアウト動物の視床軸索の投射を*in vivo*で解析した。生後10日目のNetrin-4ノックアウトラットの脳を視床軸索末端に特異的に集積することが知られている5HTTの抗体を用いて免疫染色をおこなったところ、野生型と比べて5HTTの蛍光強度が減弱していることが分かった。さらにノックアウトラットの大脳皮質を用いて視床皮質共培養を作製して個々の視床軸索の形態を詳細に解析したところ、野生型と比べて大脳皮質切片内での軸索枝分かれ形成が顕著に減少していることが分かった。

以上の結果から、Netrin-4は発生・発達期の大脳皮質において視床皮質投射の標的層特異的に発現し、その遺伝子発現量は神経活動によって制御されており、視床軸索の枝分かれを促進させる働きがあることが*in vivo*、*in vitro*の実験から明らかになった。このことから神経活動がNetrin-4の遺伝子発現を介して視床皮質投射の標的層特異的な枝分かれ形成を制御していることが示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

発生期に神経細胞は軸索末端で枝分かれを形成し、標的細胞との結合パターンや強度を変化させる。これには、遺伝的、後天的メカニズムが必要と考えられているが、その分子機構についてはほとんど明らかになっていなかった。申請者は、本論文で視床から大脳への投射に着目して、分子生物学的、生理学的、細胞工学的手法を用いて、この問題に取組んだ。そのためにまず、大脳皮質において

【16】

氏 名	はやの やす ふみ 史
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 2 4 2 2 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 22 年 9 月 22 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 生命機能研究科生命機能専攻
学 位 論 文 名	神経活動が制御する視床皮質軸索の枝分かれ形成におけるNetrin-4の関与
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 山本 亘彦 (副査) 教 授 村上富士夫 教 授 小倉 明彦 准教授 田辺 康人

視床軸索の標的層に特異的かつ神経活動依存的に応じてその発現量を変化させる分子を探索し、Netrin-4を同定した。次に、スライス培養下の視床軸索動態から、Netrin-4に軸索枝分かれ形成を促進させる働きがあることを示した。さらにNetrin-4ノックアウト動物を用いて、内在的なnetrin-4が視床軸索の枝分かれ形成に必要なことも明らかにした。以上の結果から、Netrin-4は、その部位特異的かつ神経活動依存的な遺伝子発現を介して、視床軸索の枝分かれ形成を制御することが示唆された。

本論文から得られた結果は、神経回路形成における遺伝的、後天的な要因の役割を知る上で非常に有用な知見であり、本論文は博士（理学）の学位に十分に値する。