

学位論文題名

正常マウス視神経強膜篩状板部における
星状膠細胞構築の形成過程、
特に髄鞘不形成の要因の解析を中心に

学位論文内容の要旨

目的と方法

マウス視神経において神経節細胞からでた軸索は網膜の視神経線維層・視神経乳頭部など眼球内では髄鞘を持たず、眼球と視神経の境界部となる強膜篩状板部を過ぎると髄鞘が形成される。このような特徴は、細胞体から出て間もない軸索起始部の直後から髄鞘形成が始まる一般的な中枢神経系ニューロンとは大きな差異を示す。本研究では、マウス視神経の強膜篩状板部を中心としたグリア細胞構築の形成過程を、髄鞘形成の過程を踏まえて、生後0、3、5、7、14、21、28日齢及び3ヶ月齢（本文ではP0、P3、P5、P7、P14、P21、P28、M3と各々表す）及び胎生14、15、17、19日齢（本文ではE14、E15、E17、E19と各々表す）のマウス（C57BL/6 J strain）を用いて、以下の方法で検討した。エボン包埋した資料の光学顕微鏡及び電子顕微鏡による形態学的な検索、星状膠細胞のマーカー分子であるglial fibril acidic protein (GFAP)、グルタミン酸トランスポータGLAST、brain lipid binding protein (BLBP) の免疫組織化学的な検索、稀突起膠細胞のマーカー分子であるproteolipid protein (PLP) のin situ ハイブリダイゼーション法による解析、5-bromodeoxyuridine (BrdU) 標識法による細胞増殖の解析、ゴルジ鍍銀法によるグリア細胞の全体像の解析、を行った。これにより強膜篩状板部及び眼球内部で髄鞘が形成されない要因を解析した。

結果

本研究では、視神経を、①視神経線維層（以後ONLとする）：網膜の最内層で、硝子体に接する網膜神経節細胞由来の軸索からなる層、②視神経乳頭部（以後OpPとする）：眼球内にあり、視神経線維が集合して、眼球外へ出る視神経の出口の部分、③強膜篩状板部（以後LCSとする）：神経線維が眼球からでた部分で、眼球の脈絡膜、強膜及びその外部の結合組織の位置にほぼ一致する部位、④視神経眼窩部（以後OrPとする）：強膜篩状板部より脳側の眼窩を走行している部位、の4部に区分した。BrdU標識法によると、E15、E17、E19、P0では視神経全域に多数の細胞分裂像が見られるが、P3以降加齢とともに少なくなり、特に、LCSにおける分裂像は少なくなる。幼弱型星状膠細胞のマーカーとなるGLAST及びBLBPの免疫染色によると、GLASTはE14でLCS、OrPですでに陽性であるが、BLBPはLCSでのみ陽性となり、E14ですでに星状膠細胞に分化した細胞が存在するが、LCSにおける分化が早い。また、GFAPはE19で弱い発現が視神経全域に観察されることから、E19にはすでに星状膠細胞が全域で分化を始めていると考えられる。GFAPは加齢とともにLCSで強い発現を示すようになり、P14でほぼ成熟型の分布様式をとる。

視神経をエボン切片の光顕、電顕で観察した。縦断像を見ると、P0のLCSでは、小型の細胞体を持つ星状膠細胞が神経線維に沿って、視神経線維間に散在性に並んで配列している。これはGFAPの発現しているE19の所見に類似している。しかし、P3、P5、P7になると星状膠細胞の細胞体はより大きくなり、神経線維に対して直角に扁平状になり、さらに視神経線維に沿って積み重なって配列する。P14からP21ではこの傾向は強くなり、P28で成熟マウスの配列に類似するようになる。OrPにおいては、星状膠細胞の細胞体は篩状板部のものに比べて小型であり、LCSの星状膠細胞とは異なった形態をとる。

横断像を見ると、P0のLCSでは、細胞質の少ない、小型の星状膠細胞の細胞体とそこから出る細い細胞突起によって無髄神経線維が束ねられている。電子顕微鏡像では、これらの無髄線維を束ねている隔壁は星状膠細胞の細胞体と他の細胞に由来して接着する突起から構成されており、隔壁の層の数は少ない。また、無髄線維の間に侵入する星状膠細胞の二次突起はみられない。P3、P5、P7になると、核周囲部が大きい細胞体同志が接着し、又、他の細胞に由来する細胞突起が互いに入り組んで接着しあい、隔壁を形成して、無髄神経線維をコンパクトな束に包んでいる。隔壁の層の数は加齢とともに増大する。P14になってはじめて星状膠細胞の2次突起が無髄神経線維間に侵入し、個々の無髄線維を取り囲む様に伸展するのが見られるようになる。ゴルジ鍍銀像を見ても、成熟マウスLCSの星状膠細胞は他の部位とは異なり、突起は一般に太く、細胞体と他の細胞の突起が接触して複雑な編み目を形成している。縦断像を見ると、突起は神経線維と直角に交わるように伸びており、突起の主幹から短い二次突起が線維の方向に伸びる。以上、マウスLCSの星状膠細胞の構築は視神経の他の部位とは異なる緻密な篩を形成する。一方、PLP mRNAを発現する稀突起膠細胞は、まず、P5に視神経の視(神経)交叉側に出現し、加齢とともに網膜側に向かって出現するようになり、P14でLCSの脳側端に達する。しかし、以後、成熟してもLCSを超えてOpPに入ることはない。

考察

LCSの組織構築は動物の種類によって色々な型があるが、眼球内の髄鞘形成と関連させて、以下のように整理できる。①眼球強膜と連続する強靭な結合組織が篩構造を作っているが、星状膠細胞はOrPと同じ形態の線維性星状膠細胞である。LCS及びOpPにおける太い神経線維は稀突起膠細胞によって有髄化される。②眼球強膜と連続する強靭な結合組織が作る篩構造の中で星状膠細胞はOrPにあるものとは異なる特殊な形態をとる。この例ではLCS及び眼球内は全て無髄神経線維である。星状膠細胞は神経線維を横切る方向に平面的に太い突起を伸ばして、密な細胞質性の隔壁を作り、無髄神経線維をさらに分けている。③結合組織は血管周囲にあるのみで篩状構造は作らず、星状膠細胞の形態はOrPのものとは変わらない線維性星状膠細胞である。眼球内は有髄神経線維である。④結合組織の篩構造はなく星状膠細胞の細胞体と細胞突起で篩状構造を作るもので、LCSよりONLに至るまで無髄神経線維である。本研究で検索したマウスLCSはこの型に一致した。すなわち、LCSや眼球内に髄鞘形成が無い例では、LCSの星状膠細胞はOrPのものとは比べよく発達した太い突起を持ち、これらが密に集合して神経線維を束に分ける隔壁構築を作っている。

マウス視神経のOrP中央部における髄鞘形成はほぼ生後6-7日齢頃に始まる。視神経における稀突起膠細胞の発生過程は、第三脳室底部の神経上衣細胞に由来する稀突起膠細胞前駆細胞が網膜に向かって移動し、髄鞘形成を行う。稀突起膠細胞が成熟して髄鞘を形成始めることで産生が始まるPLP mRNAは、P5で視(神経)交叉側に発現を始め、以後、網膜側に進展し、P14頃にLCSの近位部の稀突起膠細胞に発現が見られる。しかし、稀突起膠細胞はLCSを超えることはなかった。LCSにおける星状膠細胞の細胞質性の隔壁はP3ころに形成が始まり、P7にはほぼ完成しており、P14以降にはさらに星状膠細胞の2次突起が個々の無髄神経線維の間に侵入してそれを密に取り囲む。このように、稀突起膠細胞がLCSに達する時期より早

く星状膠細胞からなる特別の構築を持つLCSが形成完了することで、稀突起膠細胞の侵入を妨げ、その結果として髄鞘が形成されないことが示唆された。今後、LCSにおける星状膠細胞の性格を決定する分子や稀突起膠細胞の移動を妨げる可能性がある接着分子の解明が必要となる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 井 上 芳 郎

副 査 教 授 渡 辺 雅 彦

副 査 教 授 長 嶋 和 郎

学 位 論 文 題 名

正常マウス視神経強膜篩状板部における 星状膠細胞構築の形成過程、 特に髄鞘不形成の要因の解析を中心に

マウス視神経において神経節細胞からでた軸索は網膜の視神経線維層 (ONL)、視神経乳頭部 (OpP) など眼球内では髄鞘を持たず、眼球と視神経の境界部となる強膜篩状板部 (LCS) を過ぎて視神経眼窩部 (OrP) に至って髄鞘が形成される。このような特徴は、細胞体から出て間もない軸索起始部の直後から髄鞘形成が始まる一般的な中枢神経系ニューロンとは大きな差異を示す。本研究では、マウス視神経の強膜篩状板部を中心としたグリア細胞構築の形成過程を、髄鞘形成の過程を踏まえて、生後0、3、5、7、14、21、28日齢及び3ヶ月齢 (本文ではP0、P3、P5、P7、P14、P21、P28、M3と各々表す) 及び胎生14、15、17、19日齢 (本文ではE14、E15、E17、E19と各々表す) のマウス (C57BL/6J strain) を用いて、以下の方法で検討した。エボン包埋した資料の光学顕微鏡及び電子顕微鏡による形態学的な検索、星状膠細胞のマーカー分子であるglial fibril acidic protein (GFAP)、グルタミン酸トランスポーターGLAST、brain lipid binding protein (BLBP) の免疫組織化学的な検索、稀突起膠細胞のマーカー分子であるproteolipid protein (PLP) のin situ ハイブリダイゼーション法による解析、5-bromodeoxyuridine (BrdU) 標識法による細胞増殖の解析、ゴルジ鍍銀法によるグリア細胞の全体像の解析、を行った。これによりLCS及び眼球内部で髄鞘が形成されない要因を解析した。

BrdU標識法によると、E15、E17、E19、P0では視神経全域に多数の細胞分裂像が見られるが、P3以降加齢とともに少なくなり、特に、LCSにおける分裂像は少なくなる。幼弱型

星状膠細胞のマーカーとなるGLAST及びBLBPの免疫染色によると、E14ですでに星状膠細胞に分化した細胞が存在するが、LCSにおける分化が早い。また、GFAPはE19で弱い発現が視神経全域に観察され、GFAPは加齢とともにLCSで強い発現を示すようになり、P14でほぼ成熟型の分布様式をとる。

視神経をエポソ切片の光顕、電顕で観察した。縦断像を見ると、P3、P5、P7で星状膠細胞の細胞体はより大きくなり、神経線維に対して直角に扁平状になり、さらに視神経線維に沿って積み重なって配列する。P14からP21ではこの傾向は強くなり、P28で成熟マウスの配列に類似するようになる。OpPの星状膠細胞とは異なった形態と構築をとる。横断像を見ると、P0のLCSでは、細胞質の少ない、小型の星状膠細胞の細胞体とそこから出る細い細胞突起によって無髄神経線維が束ねられている。P3、P5、P7になると、核周囲部が大きい細胞体同志が接着し、又、他の細胞に由来する細胞突起が互いに入り組んで接着しあい、隔壁を形成して、無髄神経線維をコンパクトな束に包んでいる。隔壁の層の数は加齢とともに増大する。P14になってはじめて星状膠細胞の2次突起が無髄神経線維間に侵入し、個々の無髄線維を取り囲む様に伸展するのが見られるようになる。以上、マウスLCSの星状膠細胞の構築は視神経の他の部位とは異なる緻密な篩を形成する。一方、PLP mRNAを発現する稀突起膠細胞は、まず、P5に視神経の視(神経)交叉側に出現し、加齢とともに網膜側に向かって出現するようになり、P14でLCSの脳側端に達する。しかし、以後、成熟してもLCSを超えてOpPに入ることはない。以上から、稀突起膠細胞がLCSに達する時期より早く星状膠細胞からなる特別の構築を持つLCSが形成完了することで、稀突起膠細胞の侵入を妨げ、その結果として髄鞘が形成されないことが示唆された。

この論文は、マウス視神経のLCSおよび眼球内の髄鞘形成を阻害する構造的な要因を明らかにしたことで高く評価された。比較解剖学的に見て、網膜内に髄鞘が形成される動物が存在すること、また、ヒト網膜内に髄鞘が形成される破格が時に見られることなどから、今後、稀突起膠細胞の移動を制御する因子を解明する上で貴重な資料となることが期待された。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。