

氏名(本籍地)	土屋 貴 大 (栃木県)			
学位の種類	博士 (生命科学)			
報告・学位記番号	甲第397号 (甲生第36号)			
学位記授与の日付	平成28年3月25日			
学位記授与の要件	本学学位規則第3条第1項該当			
学位論文題目	Functional analysis of CRMP4 in brain development — mainly focusing on the olfactory bulb development — 脳の発達における CRMP4の機能解明 —嗅球の発達を中心として—			
論文審査委員	主査	教授	医学博士	金子 律子
	副査	教授	医学博士	児島 伸彦
	副査	教授	博士 (農学)	根建 拓
	副査	日本獣医生命科学大学教授 博士 (獣医学)		横須賀 誠

### 【論文審査】

土屋貴大君の研究は、collapsin response mediator protein 4 (CRMP4) が脳の発達過程で果たす機能について、CRMP4遺伝子欠損マウスを用いて生理学的、形態学的、行動学的に多角的に調べ、明らかにしたものである。

脳が正常に機能する為には、脳を構成する神経細胞 (ニューロン) による神経回路形成が正確に行なわなければならない。そのためにニューロンは決められた時期に誕生し、決められた場所へ移動するとともに、正しく軸索を伸長させ、標的ニューロンとネットワークを形成する。ニューロンが軸索を伸ばす際、その進行方向を制御する因子の1つにセマフォリン3A (Sema3A) がある。Sema3A は軸索先端の成長円錐を崩壊させ伸長を抑制する反発性軸索ガイダンス分子のうちの1つである。Sema3A の細胞内シグナル伝達を媒介する因子の1つとして、1995年に五嶋らによって collapsin response mediator protein 2 (CRMP2) が発見された。これまでに CRMP1～5まで5種類のホモログが同定されており、これらの機能を明らかにしようと数多くの研究がなされてきた。しかし、CRMPファミリーの1つである CRMP4に関しては研究があまり進んでおらず、解決すべき問題点が数多く残されていた。CRMP4の脳での発現部位や発現時期などの基本的な情報さえ不十分であった。また CRMP4がニューロンの生理的機能や発達にどのように機能するか不明な点が多かった。さらに脳の高次機能における CRMP4の役割は全く不明であった。土屋君の学位論文の研究目的は、これまで研究が進んでいなかった CRMP4に関するこれらの

問題点を解決し、脳の発達における CRMP4 の機能を明らかにすることである。この研究を推進することにより、脳の発達に関する重要な知見が与えられるだけでなく、神経変性疾患や神経発達異常の原因解明、治療などへの貢献も期待される。

#### 【Chapter 1】 CRMP4 mRNA のマウス脳内での発現部位や発現時期の解析

脳発達の経過と CRMP4 発現の関連についての基本的情報を得るため、マウス脳内各部位での CRMP4 mRNA の発現局在および発現時期を詳細に調べた。市販抗体では CRMP4 の特異的発現を検出できなかったため、*in situ* ハイブリダイゼーション法により CRMP4 mRNA を検出した。実験には生後 0 日 (postnatal day 0, PD0)、PD7、PD14、8 週 (Adult) のマウス脳を用い、嗅球から延髄まで詳細に CRMP4 mRNA の発現を切片上で調べた。

その結果、CRMP4 mRNA は、多くの脳部位では生後 0 日と生後 7 日で強く発現しており、生後 14 日以降は発現が殆ど見られないことが分かった。しかし成体で神経新生が起こる少数の脳部位 (海馬歯状回および脳室下帯) では、生後 7~14 日以降から発現が見られるようになった。更に極めて少数であるが、成体神経新生部位ではないにも関わらず、成体でも CRMP4 mRNA の発現がみられる部位もあった。この研究により、CRMP4 mRNA の脳内発現部位や発現時期の詳細が初めて明らかになった。

#### 【Chapter 2】 *Crmp4* ノックアウト仔マウス嗅球の機能的特徴に関する研究

Chapter 1 で明らかにした CRMP4 mRNA 発現情報を基に、CRMP4 mRNA の発現が強い部位の 1 つであり、且つ発現の経時的変化が明瞭であった生後初期の嗅球に着目し、*Crmp4*-KO 仔マウスの生理学的研究を行った。嗅球は匂いの情報処理を司る脳部位であるため、生後初期の *Crmp4*-KO マウスの嗅覚 (匂い識別能力) を調べた。仔マウスの匂い識別能力は、仔マウスが発声する超音波を指標に調べた。単離刺激あるいは温度変化に対する超音波発声回数を比較し、野生型仔マウスと *Crmp4*-KO 仔マウスの超音波発声能力には差が無いことを確認した上で、2 つの床敷の匂い識別を比べたところ、野生型に比べ *Crmp4*-KO 仔マウスでの匂い識別能力の低下が明らかとなった。

次に、*Crmp4*-KO 仔マウスの匂い識別能力低下の原因を明らかにするために、単一匂い刺激後の興奮ニューロンの分布を嗅球内で調べた。匂い刺激の無い状態では、野生型と *Crmp4*-KO 仔マウスとも、興奮ニューロンは極めて少数であった。しかし単一匂い刺激後には、野生型では限局した位置に興奮ニューロンが出現したのに対して、*Crmp4*-KO 仔マウスでは、嗅球の吻側から尾側にかけて広範囲に亘り興奮ニューロンが広く出現した。これらの結果から *Crmp4*-KO 仔マウスでは、単一匂い刺激により正常な匂い地図に則った興奮ニューロンの局在が起きず、広範囲に亘る興奮過多状態が起こることが示された。

更に、神経の興奮・抑制に関わる様々な神経伝達物質の受容体や合成酵素の発現レベルを野生型および *Crmp4*-KO 仔マウス嗅球で比較した。その結果、*Crmp4*-KO では、神経の興奮に重要であるグルタミン酸受容体 1 (GluR1) および GluR2 の mRNA 発現および

タンパク質発現のレベルが野生型より有意に高かった。一方、興奮の抑制に重要である GABA 受容体や GABA トランスポーター等の発現レベルには、両マウス嗅球間で有意な差は認められなかった。

以上の結果から、*Crmp4*-KO 仔マウスでは、グルタミン酸受容体の発現レベルが亢進することにより、匂い刺激により興奮するニューロンが広範囲に出現し、匂い地図が嗅球内に正確に形成できず、匂い識別の低下が引き起こされた可能性が提起された。

### 【Chapter 3】*Crmp4*-KO 仔マウス嗅球の形態学的研究

生後各齢の嗅球の凍結切片を作製し、ニッスル染色、免疫組織化学、アポトーシス細胞の検出を行った。また生後 0 日の脳を用いて、DiI 蛍光色素による僧帽細胞の標識を行った。これらにより、*Crmp4*-KO マウス嗅球では、WT マウスと比較して、生後初期に幾つかの形態変化が生じていることが明らかとなった。特に、僧帽細胞の先端樹状突起で主に構成される外叢状層は、WT よりも *Crmp4*-KO 仔マウスの方が有意に厚いことが明らかになった。さらに、DiI 蛍光色素による標識から、僧帽細胞の先端樹状突起が *Crmp4*-KO 仔マウスでは WT マウスより伸長していることが確かめられた。

更に、嗅球細胞の初代培養細胞実験およびマウス海馬由来の HT22 株化培養細胞を用いた実験から、CRMP4 の欠損により樹状突起が長くなること、および CRMP4 の強制発現により樹状突起が短くなることが実験的に再現された。これらから、本研究は、CRMP4 が樹上突起伸長を抑制的に制御することを初めて明らかにした。

### 【Chapter 4】*Crmp4*-KO マウスの行動学的研究

Chapter 4 では *Crmp4*-KO マウスと野生型マウスの行動学的解析を包括的に行い、*Crmp4* 欠損が高次脳機能の発達に影響を及ぼすかについて調べた。Chapter 1～3 までは、オスの仔マウスについて研究を行ってきたが、Chapter 4 ではオスだけでなくメスマウスも使用することにより、*Crmp4* 欠損による性特異的な影響も調べた。本実験では生後 4、5、6、7、8 週齢の WT および *Crmp4*-KO マウスの雌雄（それぞれ 6～26 匹）を用い、Open-field test、Novel object recognition test、Social interaction test または Tube test、Food exploring test、Hot plate test を各週齢で行った。

Social interaction test 以外の行動実験では、*Crmp4* 欠損による有意な変化はオス・メスともに見られなかった。しかし Social interaction test では、オスの *Crmp4*-KO マウスでは active interaction の時間が野生型に比べて有意に少なく、その差は時間が経つにつれ大きくなることが分かった（3 分、5 分、10 分で、 $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ 、 $p < 0.001$  でそれぞれ有意差、two-tailed *t*-test）。一方、メスの *Crmp4*-KO マウスでは実験開始初期（3 分と 5 分）には野生型に比べ social interaction の時間が有意に少なかったが（3 分、5 分ともに  $p < 0.05$  で有意差、two-tailed *t*-test）、その後（実験開始 10 分後）その差は消失することが分かった。この結果から、*Crmp4* 欠損が social interaction の低下を引き起こすこ

と、且つその影響には性差があり、オスの方が持続的に強く現れることがわかった。

本学位請求論文は、基本的知見が殆どなかった CRMP4 について色々な角度から研究することにより、*Crmp4* mRNA の脳内での発現に関する基礎的情報を与えただけでなく、CRMP4 がニューロンの樹状突起伸長に抑制的に機能していることや、神経の興奮・抑制バランス形成のための神経回路の発達に参与し、嗅覚識別能力の発達などの脳の正常な機能発現に重要な働きをしていることを明らかにした。さらに *Crmp4* 欠損により social interaction の低下が引き起こされたことから、CRMP4 が脳の高次機能にも影響していることも示した。この研究で得られた結果は、脳の発達における CRMP4 の機能に関する有用な情報を多く与えるものであり、今後の脳研究に大きく貢献するものと言える。

#### 【審査結果】

学位請求論文に記載されている研究は、綿密に計画され、分子レベルから行動レベルまで、さらに個体レベルから培養細胞レベルまで、極めて多彩な手法を用いて遂行されており、研究成果は学術的に見ても非常に高いレベルのものである。本研究で実施された多様な実験は、CRMP4 が神経回路の興奮・抑制のバランス形成や匂い識別能力の獲得に関係し、さらに高次脳機能の発達にも参与することを初めて示した。さらに、そのメカニズムとして、興奮性受容体の発現や樹状突起の伸長に対する CRMP4 の調節機能を初めて示した。これらの一連の研究は、脳の発達および発達障害のメカニズムの解明に大きく貢献するものである。学位請求論文に掲載されている内容は、既に査読付き国際英文誌 3 報に掲載されていることから、研究成果は十分と認められる。従って、所定の試験結果と論文評価に基づき、本審査委員会は全員一致を持って土屋貴大氏の博士学位請求論文は、本学博士学位を授与するに相応しいものと判断する。